



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

TÍTULO DEL PROYECTO

**Caracterización de la señalización de
LKB1/AMPK/Akt/mTOR asociado a líneas
celulares de cáncer de mama como biosensores
en respuesta al uso de metformina en pacientes
obesas**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LAURA CECILIA FLORES GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Dr. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

TÍTULO DEL PROYECTO

**Caracterización de la señalización de
LKB1/AMPK/Akt/mTOR asociado a líneas
celulares de cáncer de mama como biosensores
en respuesta al uso de metformina en pacientes
obesas**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LAURA CECILIA FLORES GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Dr. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/964/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 01 de agosto de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **FLORES GARCÍA LAURA CECILIA** con número de cuenta **304053746** con la tesis titulada **“Caracterización de la señalización de LKB1/AMPK/Akt/mTOR asociado a líneas celulares de cáncer de mama como biosensores en respuesta al uso de metformina en pacientes obesas”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: M. EN C. JUAN PABLO MÉNDEZ BLANCO
Vocal: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de octubre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar, me gustaría agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto de doctorado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Esta tesis deriva del proyecto científico financiado por el CONACyT:

“Fronteras de la Ciencia 733 (2015)”

Por último, me gustaría agradecer a mi Comité Tutor, integrado por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera y el Dr. Oscar Armando Pérez Méndez. Quienes contribuyeron con sus conocimientos y opiniones en el enriquecimiento de mi proyecto y en mi formación como Doctora en Ciencias.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de todos estos años desde que emprendí el camino para ser Doctora en Ciencias. A mis hermanas que han tratado de entender mis miedos profesionales y darme sus palabras de aliento. Porque gracias a mi familia soy la persona que soy y a la cual aman con sus muchos defectos y sus virtudes.

Agradezco al Dr. Alejandro Zentella por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto que me dejó tantas enseñanzas y por integrarme a su laboratorio, permitiéndome un crecimiento tanto profesional como personal. Le agradezco por todos sus consejos, tiempo y todo el apoyo que me ha brindado todos estos años. Por fomentar mi capacidad de análisis y autocrítica, compartir sus conocimientos para llevar a cabo mi desarrollo profesional y apoyar cada una de mis ideas “locas” para probar en este proyecto.

Al maestro José Luis Ventura por enseñarme tantas técnicas del laboratorio, brindándome su tiempo y paciencia, pero sobre todo por darme su amistad y esos consejos que a veces tanto necesitaba.

A la maestra Catalina Machuca por haber creído en mí hace tantos años y poner en mí esa semilla para llegar a este punto. Gracias al profesor Ernesto Mendoza por sus palabras de aliento.

A Doña Manuela Gallaga por brindarme su cariño y atenciones haciendo más ameno el tiempo que pasaba en el laboratorio.

A compañeros del laboratorio con quienes pasé buenos momentos y de quienes obtuve enseñanzas a través de las cosas buenas y malas.

Dedicatoria

Esta tesis la dedico a mi familia y a cada una de las personas que han contribuido en mi vida.

En especial a mi mamá, por ser la madre que siempre he necesitado y estar a mi lado siempre. Simplemente por ser mi mamá y darme tu apoyo incondicional a pesar de todo.

A mi papá por su apoyo y darme las herramientas para ser una persona independiente y aunque antes no lograba entender tu afán de exigir lo mejor de mí, hoy entiendo que gracias a eso he logrado alcanzar mis metas.

A mis hermanas, que pese a los desacuerdos siempre nos hemos apoyado.

A mi sobrina, quien me ha enseñado a ser fuerte ante cualquier circunstancia, pues a pesar de su corta edad es una guerrera.

“Hay cosas que no queremos que sucedan pero que hay que aceptar, cosas que no queremos saber, pero hay que aprender y personas sin las que no podemos vivir, pero es mejor dejarlas ir”

ÍNDICE

Página

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Cáncer de Mama.....	3
1.1.1. Definición de Cáncer de Mama.....	3
1.1.2. Estadísticas.....	4
1.1.3. Clasificación.....	5
1.1.4. Tratamiento.....	12
1.1.5. Factores de Riesgo.....	14
1.2. Relación Obesidad-Cáncer de mama.....	16
1.2.1. Obesidad.....	16
1.2.2. Obesidad y Cáncer de Mama.....	18
1.2.2.1. Mecanismos de Asociación entre Obesidad y Cáncer de mama.....	22
1.3. Vía de Señalización PI3K/Akt.....	26
1.4. Metformina.....	29
1.4.1. Metformina y Cáncer de Mama.....	30
1.4.2. Mecanismo de acción antitumoral de metformina.....	31
2. Justificación.....	34
3. Hipótesis.....	34
4. Objetivos.....	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Particulares.....	35
5. Sueros, Materiales y Métodos.....	36
5.1. Muestras de Sueros Humanos.....	36
5.2. Procedimientos para SFB y SNP.....	36
5.3. Ultracentrifugación de Sueros Humanos.....	36
5.4. Líneas Celulares.....	37
5.5. Reactivos y Anticuerpos.....	37
5.6. Protocolos de Reducción de Suero Fetal Bovino.....	38
5.7. Ensayos de Proliferación.....	38
5.8. Electroforesis SDS de Sueros ultracentrifugados.....	39
5.9. Western Blot.....	39
5.10. RT-PCR.....	40
5.11. Formación de Esferoides.....	41
5.12. Ensayo de Migración.....	42
5.13. Captación de Glucosa.....	42
5.14. Análisis Estadístico.....	42
6. Resultados.....	43
6.1. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo celular en presencia de sueros humanos.....	43
6.1.1. Evaluación de la viabilidad de células MCF-7 en presencia de suero con y sin activación por calor.....	43

6.1.2. Efecto de la presencia de rojo fenol sobre la viabilidad bajo la suplementación de suero humano.....	44
6.1.3. Evaluación de protocolos de reducción de suero fetal bovino sobre la viabilidad de células MCF-7.....	45
6.1.4. Evaluación de protocolos de reducción de suero fetal bovino sobre la fosforilación de Akt en células MCF-7.....	47
6.1.5. Efecto de la concentración de glucosa sobre la viabilidad de células MCF-7 en respuesta a diferentes tipos de suplementación.....	48
6.2. Determinación de los Biosensores Celulares de Cáncer de Mama para la evaluación de sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad (Selección del Biosensor).....	49
6.2.1. Determinación de la tolerancia a suero humano sin inactivar en un panel de líneas celulares de cáncer de mama.....	49
6.2.2. Determinación de la IC50 de metformina en un panel de líneas celulares de cáncer de mama.....	51
6.2.3. Evaluación de los niveles de fosforilación de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K por estimulación con suero humano y metformina.....	52
6.2.4. Comparación de la viabilidad por sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad en líneas celulares de cancer de mama.....	61
6.3 Comparación de sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad (Validación del Modelo).....	64
6.3.1. Curso temporal de activación de la vía IR/Akt/p70S6K por exposición a sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad.....	64
6.3.2. Evaluación de los niveles de mRNA de isoformas de Akt por estimulación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad.....	67
6.3.3. Evaluación de la migración celular bajo suplementación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad.....	70
6.3.4. Comparación del efecto citotoxico de metformina bajo la suplementación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad.....	71
6.3.5. Efecto de la presencia de metformina sobre la captación de glucosa bajo suplementación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad.....	72
6.4. Selección de la población para la intervención farmacológica con metformina.....	72
6.4.1. Comparación de la viabilidad por sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad con diferente estatus hormonal.....	73
6.4.2. Comparación de la actividad de la vía IR/Akt/p70S6K por sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad con diferente estatus hormonal.....	74

6.4.3. Evaluación de los niveles de expresión de mRNA de isoformas de Akt por estimulación con sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad con diferente estatus hormonal.....	78
6.5. Evaluación del efecto del suero de mujeres con obesidad posmenopáusicas tratadas con metformina.....	79
6.5.1. Evaluación de la proliferación de células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina.....	80
6.5.2. Evaluación de la vía IR/Akt/p70S6K y Erk 1/2 en células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina.....	81
6.5.3. Evaluación de isoformas de mRNA de Akt en células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina.....	85
6.5.4. Evaluación de la vía NF- κ B y p38 en células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina.....	86
7. Discusión.....	89
8. Conclusión.....	102
9. Perspectivas.....	103
10. Referencias Bibliográficas.....	104
11. Anexo 1.....	115
11.1. Caracterización de banda de 48 kDa generada por la estimulación con sueros humanos.....	104
11.1.1. Evaluación de sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad por la presencia de una banda de 48 kDa en células MCF-7.....	104
11.1.2. Evaluación de sueros de mujeres eutróficas con inactivación por calor o dislipidación por la presencia de una banda de 48 kDa en células MCF-7.....	104
11.1.3. Determinación de banda e 48 kDa por el uso de anticuerpos específicos para cada isoforma de Akt.....	105
11.1.4. Determinación de la aparición de banda de 48 kDa en otros tejidos por estimulación con sueros de mujeres eutróficas.....	106
11.1.5. Evaluación de la aparición de banda de 48 kDa por estimulación con suero de mujer premenopáusica eutrófica en presencia de inhibidores de fosforilación y del proteosoma.....	107
11.1.6. Determinación de la fracción de suero ultracentrifugado a la cual se asocia la aparición de banda de 48 kDa.....	107
12. Anexo 2.....	108
12.1. Determinación de la fracción de suero humano que presenta actividad tumorigénica en células MCF-7 de cáncer de mama.....	108

12.1.1. Determinación de patrones proteicos de fracciones de sueros ultracentrifugados.....	108
12.1.2. Evaluación de la viabilidad inducida por fracciones de sueros humanos ultracentrifugados.....	109
12.1.3. Evaluación de Akt en células MCF-7 estimuladas con fracciones de sueros ultracentrifugados.....	110
12.1.4. Evaluación de la formación de esferoides de células MCF-7 expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados.....	111
12.1.5. Evaluación de la migración de células MCF-7 transfectadas con GFP expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados.....	113
12.1.6. Determinación de la captación de glucosa en células MCF-7 expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados.....	114
13. Artículo Publicado.....	126

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Desarrollo de Cáncer de Mama.....	3
Figura 2. Número estimado de casos de incidentes y muertes por cáncer en mujeres en todo el mundo.....	4
Figura 3. Número estimado de casos de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas.....	5
Figura 4. Clasificación de cáncer de mama por forma celular al microscopio.....	6
Figura 5. Clasificación de cáncer de mama por localización.....	7
Figura 6. Clasificación de cáncer de mama por inmunohistoquímica.....	9
Figura 7. Clasificación de cáncer de mama por etapa de desarrollo.....	11
Figura 8. Clasificación de obesidad por índice de masa corporal.....	17
Figura 9. Incidencia de Cáncer de mama ajustado por IMC en mujeres Premenopáusicas y Posmenopáusicas.....	19
Figura 10. Tasa de Supervivencia global y supervivencia libre de progresión ajustado por IMC.....	20
Figura 11. Mecanismos de asociación entre obesidad y el desarrollo de cáncer de mama.....	25
Figura 12. Señalización de la vía IR/PI3K/Akt.....	28
Figura 13. Mecanismos de acción antitumoral de metformina en cáncer de mama.....	33
Figura 14.- Western Blot de Akt en células MCF-7 sometidas a diferentes protocolos de reducción de SFB.....	47
Figura 15. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células MCF-10A.	53
Figura 16. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1Akt/p70S6K en células MCF-7.....	54
Figura 17. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células DSG-BC1.....	55
Figura 18. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células ZR-75-30.....	56
Figura 19. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células BT-474.....	57
Figura 20. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células BT-474R.....	58
Figura 21. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células SKBR-3R.....	59
Figura 22. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células MDA-MB-231.....	60
Figura 23. Western Blot de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en células ECL-1.....	61
Figura 24. Western Blot de curso temporal de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en células MCF-7 por estimulación con sueros humanos.....	64

Figura 25. Gel de agarosa de productos de RT-PCR de Akt-1, Akt-2, Akt-3 y PPIA de células MCF-7 estimuladas en un curso temporal con sueros SNP y SOP.....	67
Figura 26. Micrografía de las células MCF-7 que atravesaron la membrana de “transwell” en respuesta a la estimulación con sueros humanos.....	70
Figura 27. Western Blot de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en células MCF-7 estimuladas con sueros de mujeres con diferente IMC y estatus hormonal.....	75
Figura 28. Western Blot de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K y Erk 1/2 en células MCF-7 estimuladas con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina.....	82
Figura 29. Western Blot de moléculas de la vía NF-κB y p38 en células MCF-7 estimuladas con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina.....	87
Figura 30. Esquema de los componentes que conforman un biosensor.	90
Figura 31. Representación esquemática de la activación de la vía IR-β/Akt/p70S6K en células MCF-7 expuestas a sueros humanos con diferentes características metabólicas y efecto del tratamiento con metformina en pacientes con obesidad.....	102
Figura 32. Western Blot de Akt-1 en células MCF-7 estimuladas con sueros humanos con diferente IMC.....	115
Figura 33. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con suero SNP inactivado o dislipidado.....	116
Figura 34. Western Blot de isoformas de Akt en células MCF-7 estimuladas con suero SNP.....	116
Figura 35. Western Blot de Akt-1 en células tumorales de diferentes tejidos estimuladas con suero SNP.....	117
Figura 36. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con suero SNP con inhibidores de fosforilación y proteosoma.....	118
Figura 37. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con fracciones de suero SNP ultracentrifugados.....	119
Figura 38. Electroforesis de fracciones de sueros humanos ultracentrifugados.....	120
Figura 39. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con fracciones de sueros SNP o SOP ultracentrifugados.....	121
Figura 40. Agregados de células MCF-7 en presencia de fracciones de sueros humanos ultracentrifugados.....	122
Figura 41. Células MCF-7 migradas por estimulación con fracciones de sueros humanos ultracentrifugados.....	124

Índice de Gráficas

	Página
Gráfica 1. Evaluación de la viabilidad de células MCF-7 en presencia de sueros con y sin inactivación por calor.....	44
Gráfica 2. Efecto en la viabilidad en presencia o ausencia de rojo fenol en el medio de cultivo.....	45
Gráfica 3. Efecto en la viabilidad de la línea MCF-7 por diferentes protocolos de reducción de SFB.....	46
Gráfica 4. Comparación de la viabilidad de la línea MCF-7 con diferentes protocolos de reducción de SFB y diferente tipo de suplementación.....	46
Gráfica 5.- Niveles de fosforilación de Akt en células MCF-7 sometidas a diferentes protocolos de ayuno.....	47
Gráfica 6. Efecto en la viabilidad de la línea MCF-7 por diferentes concentraciones de glucosa en el medio de cultivo.....	48
Gráfica 7. Tolerancia a suero humano en un panel de líneas celulares de cáncer de mama.....	50
Gráfica 8. IC50 de Metformina en un panel de líneas celulares de cáncer de mama.....	52
Gráfica 9. Niveles de Fosforilación de MCF-10A.....	53
Gráfica 10. Niveles de Fosforilación de MCF-7.....	54
Gráfica 11. Niveles de Fosforilación DSG-BC1.....	55
Gráfica 12. Niveles de Fosforilación ZR-75-30.....	56
Gráfica 13. Niveles de Fosforilación BT-474.....	57
Gráfica 14. Niveles de Fosforilación BT-474R.....	58
Gráfica 15. Niveles de Fosforilación SKBR3R.....	59
Gráfica 16. Niveles de Fosforilación MDA-MB-231.....	60
Gráfica 17. Niveles de Fosforilación ECL-1.....	61
Gráfica 18. Comparación de la viabilidad en líneas de cáncer de mama por exposición a sueros eutróficos vs obesos.....	63
Gráfica 19. Comparación del curso temporal de activación de la vía IR/Akt/p70S6K por estimulación con SNP vs SOP.....	66
Gráfica 20. Niveles de expresión de mRNA de isoformas de Akt bajo estimulación con sueros humanos.....	69
Gráfica 21. Migración de células MCF-7 bajo suplementación con sueros de mujeres premenopáusicas con diferente IMC.....	70
Gráfica 22. Efecto de metformina sobre la viabilidad en células MCF-7 en presencia de sueros humanos.....	71
Gráfica 23. Captación de glucosa en presencia de metformina bajo la suplementación con sueros humanos.....	72
Gráfica 24. Comparación de la viabilidad de la línea MCF-7 en respuesta a sueros humanos con diferente IMC y estado hormonal.....	74
Gráfica 25. Comparación de pIR por estimulación con diferentes tipos de sueros humanos.....	75
Gráfica 26. Comparación de pAkt-1/2/3 por estimulación con diferentes tipos de sueros humanos.....	76

Gráfica 27. Comparación de pAkt-1 por estimulación con diferentes tipos de sueros humanos.....	77
Gráfica 28. Comparación de pp70S6K por estimulación con diferentes tipos de sueros humanos.....	78
Gráfica 29. Comparación de los niveles de expresión de mRNA de isoformas de Akt por estimulación con diferentes tipos de sueros humanos.....	79
Gráfica 30. Proliferación de células MCF-7 expuestas al suero de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina.....	80
Gráfica 31. Comparación de la viabilidad de células MCF-7 expuestas a sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina y clasificadas por alteraciones metabólicas.....	81
Gráfica 32. Comparación del efecto de sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad a diferentes tiempos de tratamiento con metformina en la fosforilación de IR.....	82
Gráfica 33. Comparación del efecto de sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad a diferentes tiempos de tratamiento con metformina en la fosforilación de Akt.....	83
Gráfica 34. Comparación de la fosforilación de Akt en células MCF-7 expuestas a sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina y clasificadas por alteraciones metabólicas....	83
Gráfica 35. Comparación del efecto de sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad a diferentes tiempos de tratamiento con metformina en la fosforilación de Erk 1/2.....	84
Gráfica 36. Comparación del efecto de sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad a diferentes tiempos de tratamiento con metformina en la fosforilación de p70S6K.....	85
Gráfica 37. Comparación de los niveles de expresión de mRNA de isoformas de Akt por estimulación con sueros de mujeres tratadas con metformina.....	86
Gráfica 38. Comparación de Niveles de fosforilación de moléculas de la vía NF-κB en células MCF-7 por estimulación con sueros de mujeres tratadas con metformina.....	87
Gráfica 39. Comparación de Niveles de fosforilación de p38 en células MCF-7 por estimulación con sueros de mujeres tratadas con metformina	88
Gráfica 40. Viabilidad de células MCF-7 inducida por fracciones de sueros ultracentrifugados.....	110
Gráfica 41. Niveles de pAkt por estimulación con fracciones de sueros humanos ultracentrifugados.....	111
Gráfica 42. Viabilidad de esferoides de células MCF-7 expuestas a fracciones de sueros humanos ultracentrifugados.....	112
Gráfica 43. Migración de células MCF-7 expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados.....	113
Gráfica 44. Determinación de la captación de glucosa en células MCF-7 expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados.....	114

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Riesgo Absoluto de Cáncer de mama por edad.....	4
Tabla 2. Parámetros utilizados para la determinación de obesidad.....	17
Tabla 3. Mecanismos de asociación entre obesidad y cáncer de mama...	22
Tabla 4. Moléculas en pacientes con obesidad alteradas por el tratamiento con metformina.....	30
Tabla 5. Mecanismos de acción antitumoral de metformina en cáncer de mama.....	31
Tabla 6. Lista de anticuerpos para Western Blot.....	40
Tabla 7. Oligos de isoformas de Akt y PPIA para RT-PCR.....	41
Tabla 8. IC50 de Metformina en un panel de líneas celulares de Cáncer de mama.....	51
Tabla 9. Características de sueros premenopáusicos eutróficos y obesos.....	62
Tabla 10. Características metabólicas de sueros de mujeres pre y posmenopáusicas con diferentes IMC.....	73
Tabla 11. Características de Mujeres Posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina.....	80

ABREVIATURAS

0ST	0 semanas de tratamiento
4E-BPs	proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E
10ST	10 semanas de tratamiento
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALCAM	Molécula de adhesión de células leucocitarias activadas
AMP	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Cinasa Activada por AMP
ApoA1	apolipoproteína A1
ApoB	apolipoproteína B
APOD	apolipoproteína D
ARNm	Mensajero de ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BRCA1	cáncer de mama 1
CCL2	ligando 2 de quimiocina
CCL5	ligando 5 de quimiocina
CDK2	cinasa dependiente de ciclina 2
Chk1	Cinasa de Punto de control 1
CK5	Citoqueratina 5
CK17	Citoqueratina 17
CLDN8	Gen de Claudina 8
COX-2	prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
Ctr	Control
Cys	Cisteína
DEPTOR	proteína de interacción mTOR que contiene el dominio DEP
DHCR24	24-deshidrocolesterol reductasa
Dislp	Dislipidado
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGFR-2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
eIF4B	factor de iniciación de la traducción eucariota 4B
eIF4F	factor de iniciación eucariota 4F
ERG-1	proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
FASN	Gen de ácido graso sintasa
FDA	Food and Drug Administration
FKBP5	proteína de unión a FK506 5
FOXO3	Caja de horquilla O3
GFP	proteína verde fluorescente
GLUT-1	Transportador de Glucosa 1
GLUT4	Transportador de Glucosa 4
GPCR	receptores acoplados a proteínas G
GRB7	Proteína 7 unida al factor de crecimiento
GRP30	receptor acoplado a proteína G para estrógeno
GSHS	glutación sintetasa
HA	Hipertensión Arterial
HDAC-1	HDAC-1
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HIF-1α	factor 1-alfa inducible por hipoxia
His	Histidina
HOMA-IR	modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
IC50	concentración inhibidora 50
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGF-R	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina
IKB-α	Proteína inhibidora α de NF- κ B
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de masa corporal
Ins	Insulina
IR	Receptor de Insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina

ITGA5	Gen de integrina alfa-5
JAK2	cinasa Jano 2
kDa	Kilodaltons
LDL-C	lipoproteínas de baja densidad
Lys	Lisina
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
MCP-1	proteína 1 quimioatrayente de monocitos
Metf	Metformina
miRNA	RNA pequeños no codificantes
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MUL1	proteína ligasa 1 de ubiquitina mitocondrial E3
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OCT4	factor de transcripción 4 de unión a octámero
OCT 1/2	Transportador de cationes orgánicos 1/2
PAI-1	Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 1
PBS	buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PKD1	proteína 3-fosfoinositida dependiente de la proteína quinasa-1
PKD2	proteína 3-fosfoinositida dependiente de la proteína quinasa-2
PKC	proteína cinasa C
PI3K	Fosfoinositol 3- cinasa
PIP	fosfatidilinositol
PPIA	peptidilprolil isomerasa A
PR	Receptor Progesterona
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTP1B	tirosina-proteína fosfatasa no receptora tipo 1
RAG	genes activadores de recombinación
RE	Receptor de estrógenos
RF	Rojo Fenol
RI	Resistencia a la insulina
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SHBG	globulina fijadora de hormonas sexuales
SNP	Suero de mujer premenopáusica normopeso
SNPost	Suero de mujer posmenopáusica normopeso
SOCS3	supresor de la señalización de citocinas 3
SOP	Suero de mujer con obesidad premenopáusica
SOPost	Suero de mujer con obesidad posmenopáusica
SPDEF	Gen del factor de transcripción Ets de dominio puntiagudo SAM
SR	Sin reducción de SFB
SREBP-1	factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides
STAT3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
TGF-β	factor de crecimiento transformador-beta
Thr	Treonina
TKI	inhibidores de la tirosina cinasa
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TSC2	Complejo de esclerosis tuberosa 2
TTC3	Gen de proteína 3 repetida de tetrapéptido
Tyr	Tirosina
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial, de acuerdo con cifras de GLOBOCAN (2020) se reportaron 2 261 419 casos nuevos que representan el 47.8% del total de neoplasias en la población femenina y 684 996 defunciones que representan el 13.6% de muertes por enfermedad neoplásica. Aunque es una enfermedad multifactorial, la obesidad es un factor de riesgo que incrementa 26% la probabilidad de desarrollar cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. Por otra parte, uno de los medicamentos utilizados para el control glucémico de pacientes con obesidad es la metformina, donde estudios retrospectivos han asociado un efecto protector contra el desarrollo de cáncer de mama que se presenta en el 30% de las usuarias. Aunque los estudios *in vitro* han demostrado un efecto antitumoral del fármaco, sobrepasan la concentración biodisponible en sangre, por lo que es poco probable que en el organismo el fármaco pueda presentar el mecanismo antitumoral descrito. Así el uso de la célula tumoral como biosensor de cambios sirvió como herramienta para la comparación de sueros humanos con diferentes características metabólicas y hormonales, afectando la vía IR/Akt/p70S6K por exposición al suero de mujeres con obesidad en comparación con mujeres eutróficas. Nuestros resultados mostraron que las células MCF-7 pueden ser consideradas como un biosensor robusto para la identificación de diferencias en moléculas séricas, por medio de la modulación de los niveles de fosforilación de Akt repercutiendo directamente en el incremento de la viabilidad y la migración celular bajo la estimulación con sueros de mujeres con obesidad. En particular, los sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad indujeron mayores tasas de proliferación asociadas al aumento en la fosforilación de Akt, efecto que fue revertido después del tratamiento con metformina en mujeres que presentaron resistencia a la insulina. Mientras en mujeres sin resistencia a la insulina el tratamiento con metformina resultó en la regulación negativa de la vía de NF- κ B.

ABSTRACT

Breast cancer is a public health problem worldwide, according to data from GLOBOCAN (2020), 2 261 419 new cases were reported representing 47.8% of all neoplasms in the female population, and 684 996 deaths, representing the 13.6% of deaths from the neoplastic disease. Although it is a multifactorial disease, obesity is a risk factor that increases the probability of developing breast cancer by 26% in postmenopausal women. On the other hand, one of the drugs used for glycemic control in obese patients is metformin, which retrospective studies have associated with a protective effect against the development of breast cancer, but that occurs in 30% of users. Although in vitro studies have shown an antitumor effect of the drug, they exceed the bioavailable concentration in blood, so it is unlikely that the drug can present the described antitumor mechanism. Thus, the use of the tumor cell as a biosensor of changes as a tool for the comparison of human sera with different metabolic and hormonal characteristics, the IR/Akt/p70S6K pathway will appear due to exposure to the serum of obese women compared to eutrophic women. Our results showed that MCF-7 cells can be considered a robust biosensor for the identification of differences in serum molecules, through the modulation of Akt phosphorylation levels, directly affecting the increase in viability and cell migration under stimulation with sera from obese women. In particular, sera from obese postmenopausal women induced higher proliferation rates associated with increased Akt phosphorylation, an effect that was reversed after metformin treatment in women with insulin resistance. While in women without insulin resistance, metformin treatment resulted in downregulation of the NF- κ B pathway.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER DE MAMA

1.1.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se define como un conjunto de enfermedades que se asocia principalmente a la sobreexpresión de estrógenos y a la capacidad de respuesta del tejido de la mama, que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células malignas en el epitelio de los lobulillos o conductos de la mama. Al progresar la enfermedad presenta la formación de un tumor que pasa por extensión local, dispersión nodal o diseminación a órganos distantes como pulmón, riñón, aparato digestivo, hueso o cerebro (American Cancer Society (2021)) (Figura 1).

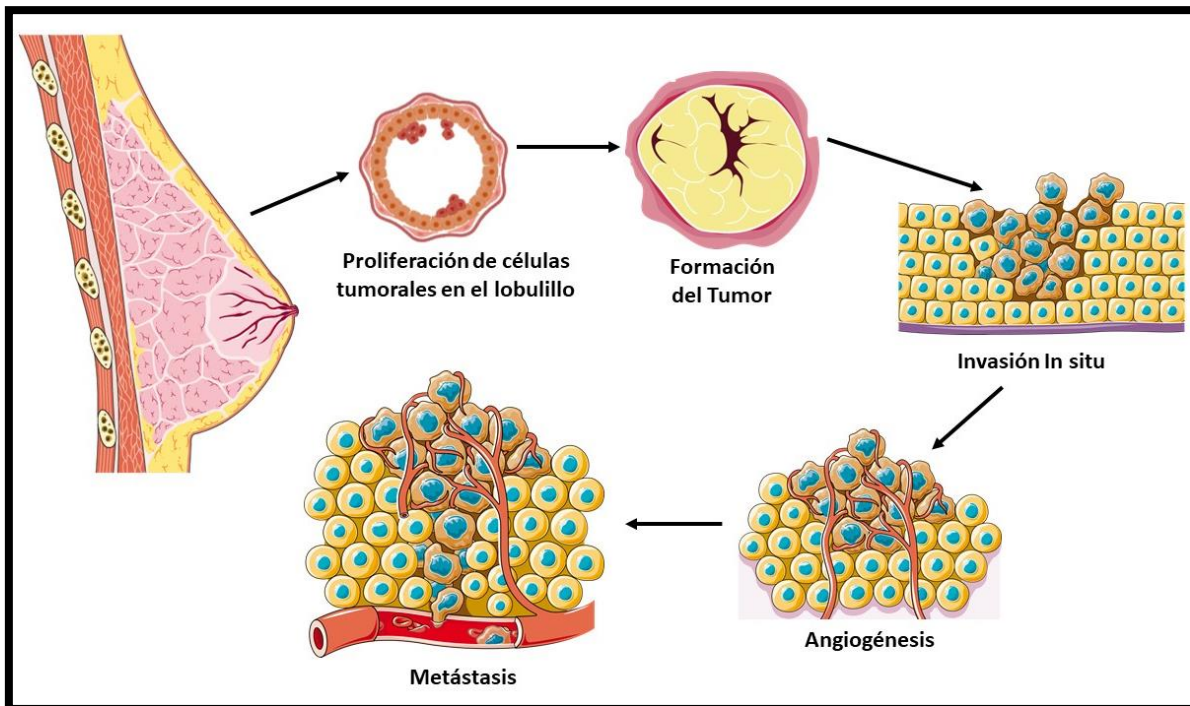


Figura 1. Desarrollo de Cáncer de Mama

1.1.2 ESTADÍSTICAS

A nivel mundial el cáncer de mama es considerado como un problema de salud pública al representar el 47.8% del total de las neoplasias en la población femenina y ser la principal causa de mortalidad en mujeres por enfermedad neoplásica representando el 13.6% (GLOBOCAN, 2020). En 2020 en el mundo se reportaron 2 261 419 casos nuevos de cáncer de mama y 684 996 defunciones por la misma enfermedad (GLOBOCAN, 2020) (Figura 2).

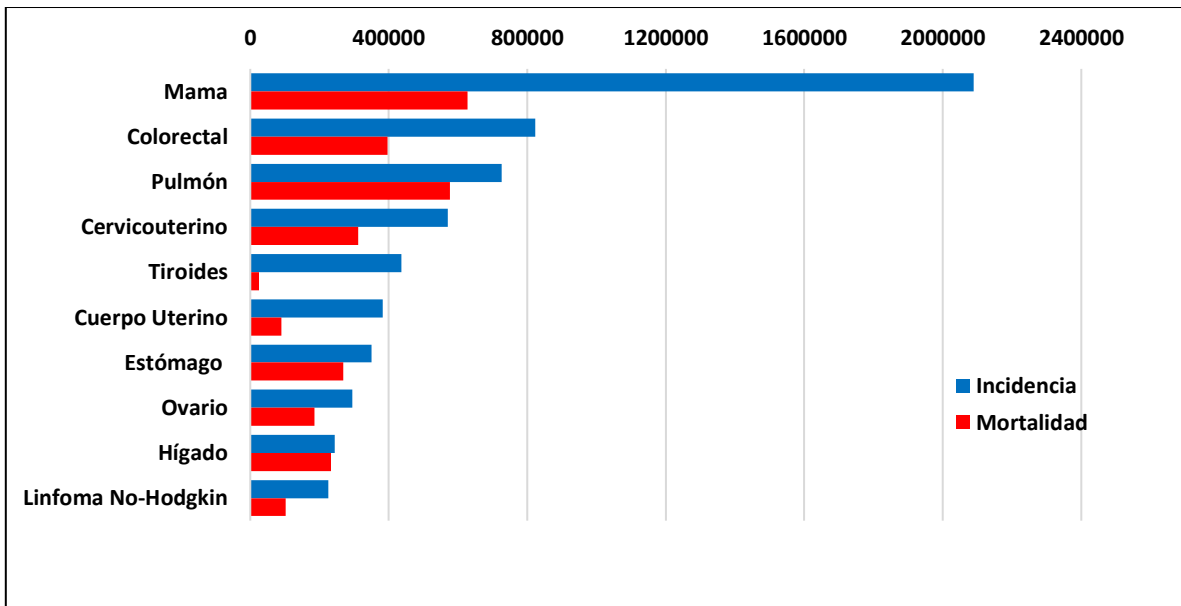


Figura 2. Número estimado de casos de incidentes y muertes por cáncer en mujeres en todo el mundo. Modificado de GLOBOCAN (2020)

Se estima que 1 de cada 8 mujeres desarrollara cáncer de mama, mientras que la probabilidad de morir por la misma enfermedad es 1 de cada 36 mujeres (American Cancer Society, 2021). Esta enfermedad presenta un riesgo absoluto que varía de acuerdo al grupo etario (Tabla 1) (BREASTCANCER.ORG, 2020):

Tabla 1. Riesgo Absoluto de Cáncer de Mama por edad	
Grupo Etario	Riesgo Absoluto
30-39 años	0.44%
40-49 años	1.47%
50-59 años	2.38%
60-69 años	3.56%

Además de presentar diferencias por etnia, donde las mujeres caucásicas presentan una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad, mientras las mujeres con ascendencia africana son más propensas a morir por cáncer de mama (American Cancer Society, 2021).

Para 2020, en México el cáncer de mama representó el 28.2% del total de neoplasias en mujeres y el 17.2% de muertes por la misma enfermedad, con 29 929 casos nuevos y 59 442 muertes por la misma. Esto lo posiciona en el octavo lugar en incidencia y el noveno en mortalidad entre 24 países latinoamericanos (GLOBOCAN, 2020) (Figura 3).

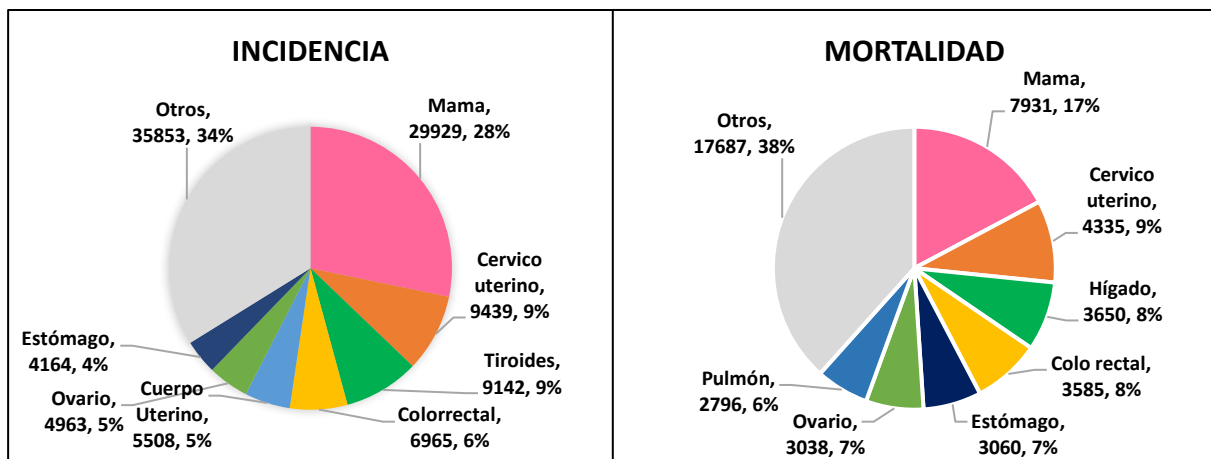


Figura 3. Número estimado de casos de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas. Modificado de GLOBOCAN (2020)

En los últimos años se ha modificado la distribución de casos por grupos etarios, por lo que la edad de aparición es más temprana al presentar un aumento del 45.5% del total de casos nuevos a la edad de 35 años (CNEGSR, 2017).

1.1.3 CLASIFICACIÓN

Al ser una enfermedad heterogénea, el cáncer de mama presenta características variables, permitiendo su clasificación de diferentes formas.

- **Forma Celular al microscopio** (American Cancer Society, 2021) (Figura 4):
 - o **Carcinoma:** son tumoraciones originadas por las células del epitelio mamario.

- **Sarcomas:** tumoraciones que se originan de las células del músculo, grasa o tejido conectivo del seno.
- **Cáncer Inflamatorio:** en este tipo de cáncer no se presenta una sola protuberancia o tumor, debido a que es producto del bloqueo que producen las células cancerosas en los vasos linfáticos de la piel del seno, generando rubor, calor y dolor en la piel de la mama.

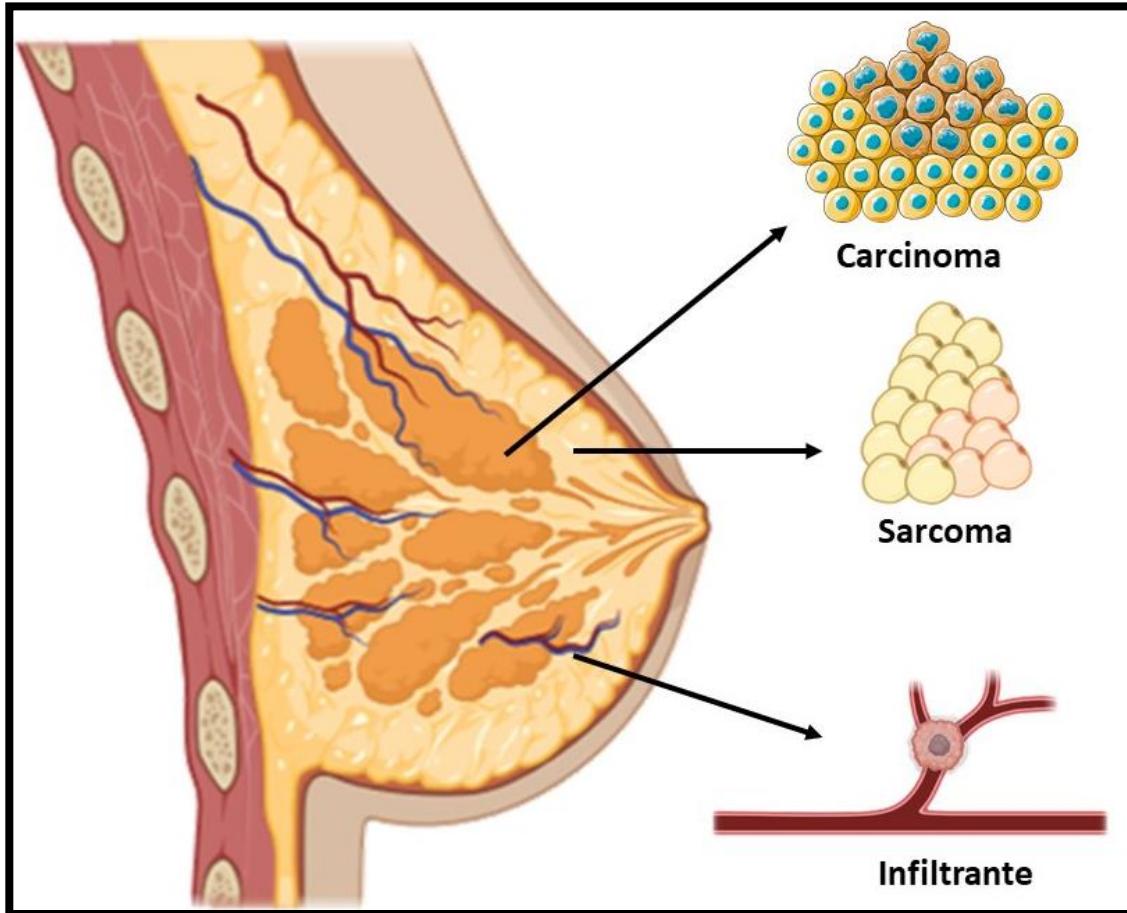


Figura 4. Clasificación de cáncer de mama por forma celular al microscopio

- **Localización** (American Cancer Society, 2021) (Figura 5):
 - **In situ:** las células no han invadido los tejidos adyacentes a los conductos o lobulillos de la glándula mamaria.
 - Ductal: el crecimiento tumoral se presenta dentro de los conductos de la mama, sin atravesar la pared del conducto.
 - Lobulillar: el crecimiento de las células tumorales se da dentro de los lobulillos de la mama, sin atravesar la pared del lobulillo.

- **Infiltrante:** las células cancerosas se han propagado a tejidos circundantes a través de los conductos de la mama, las cuales pueden presentar la capacidad de generar metástasis hacia otros órganos a través del sistema linfático y torrente sanguíneo.

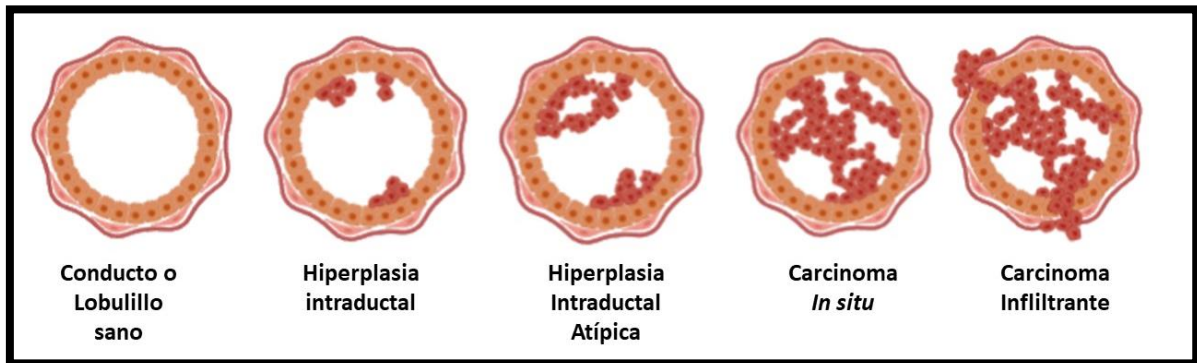


Figura 5. Clasificación de cáncer de mama por localización.

- **Expresión Inmunoquímica:** basada en la reacción antígeno-anticuerpo y permite la identificación de marcadores presentes en las células tumorales (American Cancer Society, 2021) (Figura 6):
 - **Luminal A:** su patrón inmunofenotípico es similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria, al expresar citoqueratinas, receptores hormonales como estrógenos y progesterona, y genes asociados a su activación como LIV1 y CCND1. No expresan el receptor Her-2 y presentan baja expresión de genes relacionadas con la proliferación (Fragomeni *et al*, 2018). Corresponde al 67% de los tumores mamarios (Selitrennik & Lev, 2015).
 - **Luminal B:** presenta niveles más bajos del receptor de estrógenos y mayor nivel del receptor de progesterona, expresa niveles más altos de genes de proliferación. Son negativos a la expresión del receptor Her-2 (Fragomeni *et al*, 2018).
 - **Luminal Her-2:** además de expresar bajos niveles del receptor de estrógenos y altos niveles del receptor de progesterona, presenta expresión del receptor Her-2 y expresa citoqueratinas CK9 y CK10 (Fragomeni *et al*, 2018).

- **Her-2+:** sobreexpresa genes ubicados en el cromosoma 17q como: EGFR-2 y GRB7, además de sobreexpresar genes de proliferación. Se asocia a tumores altamente agresivos y de mal pronóstico (Fragomeni *et al*, 2018). Representan entre el 10 al 15% del total de los tumores mamarios (Selitrennik & Lev, 2015).
- **Triple Negativo:** no presenta expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y Her-2. Expresa citoqueratinas de alto peso molecular como CK5 y CK17, expresa genes asociados a células mioepiteliales cuyo inmunofenotipo corresponde a c-kit, factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina 1, caveolina, integrina- β 4 y laminina. Suelen presentar alteraciones en genes como *BRCA1* y *P53* (Fragomeni *et al*, 2018). Representa entre el 2 al 18% del total de los tumores mamarios (Costa *et al*, 2018). Presenta alta heterogeneidad por lo que se agrupa en:
 - **Basaloide 1 (Basal-like 1):** presenta alta expresión de genes del ciclo celular por lo que incrementa las tasas de proliferación y tiene alteraciones en genes de reparación de ADN.
 - **Basaloide 2 (Basal-like 2):** presentan un incremento en la señalización de factores de crecimiento como: EGFR, MET, WNT e IGF.
 - **Inmunomodulador:** presenta alteraciones en genes involucrados en procesos de inmunidad celular.
 - **Mesenquimatoso:** tienen alteraciones en genes relacionados con la movilidad celular, diferenciación y activación de vías de receptores que interactúan con la matriz extracelular.
 - **Mesenquimatoso tipo “MLS”:** presentan procesos biológicos similares a los tumores mesenquimatosos, pero con la señalización de factores de crecimiento y enriquecimiento de genes asociados a la transición epitelio-mesénquima.
 - **Receptor de Andrógenos Positivo:** tiene alta expresión de genes relacionados con la señalización del receptor de

andrógenos como: DHCR24, ALCAM, FASN, FKBP5, APOD, PIP, SPDEF y CLDN8 (Zaharia & Gómez, 2013).

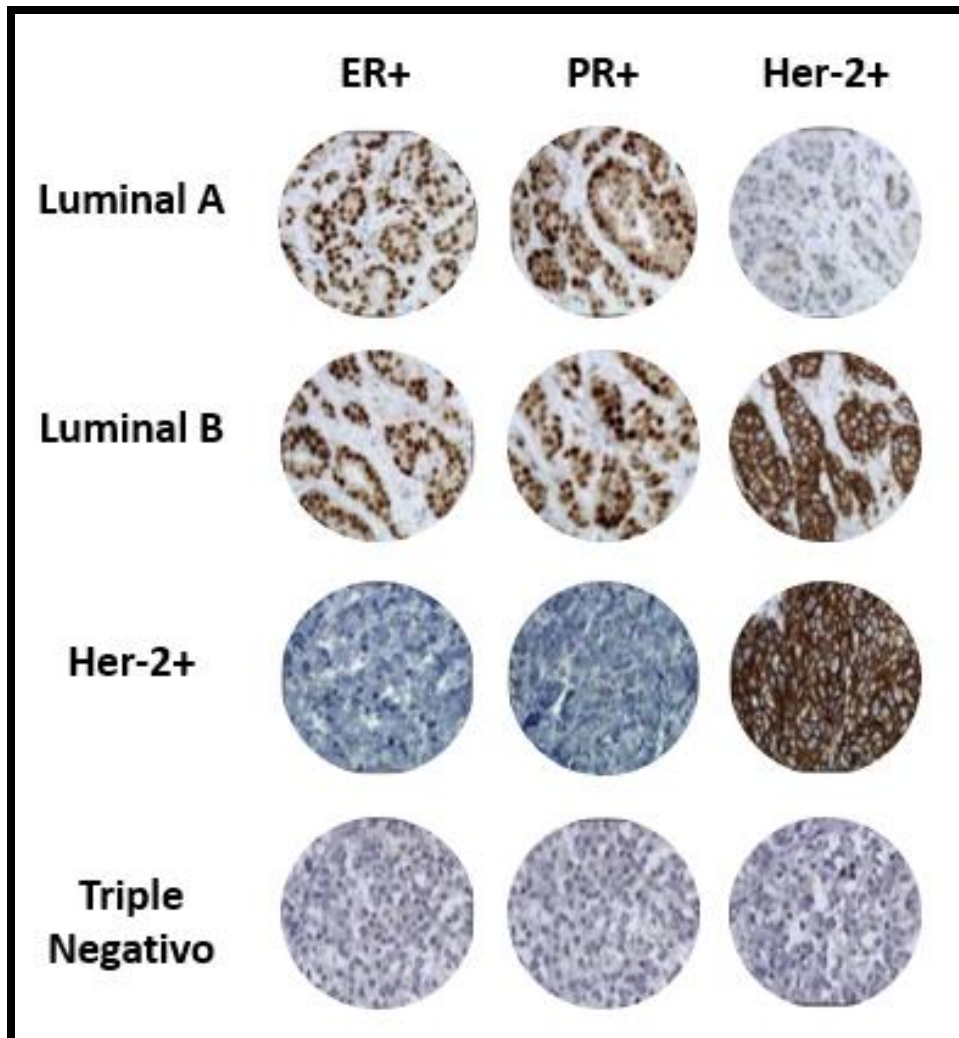


Figura 6. Clasificación de cáncer de mama por inmunohistoquímica. Modificado de Rivenbark *et al* (2013).

- **Microarreglos** (García *et al*, 2015):
 - **Luminal**: representa del 60-80%
 - Luminal A
 - Luminal B
 - **Similar a basal**: representa del 10-20%
 - **Similar a normal**
 - **Her-2+**: representa del 15-20%

- **Bajo en Claudina**
- **Pronostico por expresión Génica** (Fragomeni *et al*, 2018):
 - **Neoplasias de bajo grado:** expresan receptor de estrógeno y receptor de progesterona e incluye a:
 - Luminal A
 - Luminal B
 - Luminal Her-2
 - **Neoplasias de alto grado:** no presentan expresión de los receptores de estrógenos y progesterona, pero si sobreexpresan Her-2. Incluye:
 - Basal
 - Her-2+
 - Tipo Normal
- **Etapa de Desarrollo (TNM):** toma en consideración el tamaño del tumor y el grado de diseminación a ganglios linfáticos y diseminación metastásica a otras partes del cuerpo (American Cancer Society, 2021) (Figura 7):
 - **Etapa 0:** las células cancerosas se encuentran localizadas únicamente en el interior de los conductos mamarios y no presentan carácter invasivo, denominado carcinoma *in situ*.
 - **Etapa 1:** se presenta una tumoración inferior a los 2 cm de diámetro.
 - IA: tumor menor a 2 cm de ancho y sin diseminación a ganglios linfáticos.
 - IB: tumor de menos de 2 cm de diámetro y presenta diseminación de células cancerosas en ganglios linfáticos.
 - **Etapa 2:** tumor con un tamaño menor a 2 cm con diseminación axilar.
 - IIA: tumoración menor a 2 cm con diseminación a ganglios linfáticos de la axila.
 - IIB: tumoración mayor a 2 cm y menor a 5 cm, que presenta 50% de probabilidad de diseminación a ganglios linfáticos axilares.
 - **Etapa 3:** el tumor presenta un tamaño menor a 5 cm, con extensión a las axilas.
 - IIIA: tumor menor a 5 cm de diámetro con diseminación a ganglios linfáticos del esternón, sin diseminación a ganglios linfáticos axilares.

- IIIB: la tumoración puede presentar cualquier tamaño y presenta diseminación a la pared torácica, el pecho puede presentar inflamación, con o sin diseminación a ganglios linfáticos de la axila o detrás del esternón.
- IIIC: tumoración de cualquier tamaño con diseminación a ganglios linfáticos detrás del esternón y axila, o encima y debajo de la clavícula.
- **Etapa 4:** el tumor puede presentar cualquier tamaño y presenta diseminación a otros tejidos y órganos del cuerpo (metástasis).

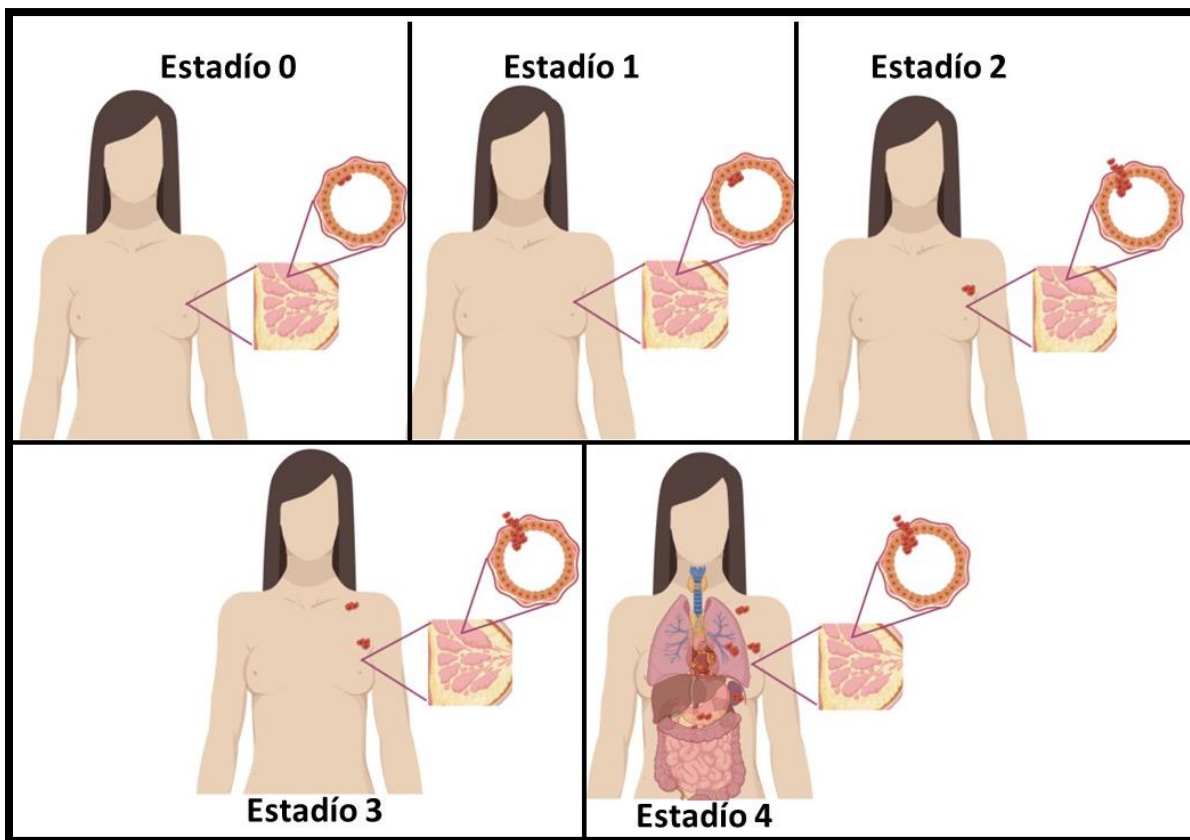


Figura 7. Clasificación de cáncer de mama por etapa de desarrollo.

1.1.4 TRATAMIENTO

El tratamiento multidisciplinario del cáncer de mama depende del tamaño, ubicación del tumor y la diseminación. El tratamiento se encuentra dividido en (American Cancer Society, 2021):

- **Terapia Locorregional:** eliminación de cualquier tumoración visible por medio de:
 - o Cirugía Conservadora
 - o Cirugía No Conservadora
- **Terapia Sistémica:** tiene como objetivo el control y tratamiento de la enfermedad, reduciendo el riesgo de recaída y la eliminación de células cancerosas que pudieran persistir después de la remoción del tumor. Está dividida en:
 - o **Neoadyuvante:** la administración de la terapia sistémica se genera previo a la resección tumoral, principalmente utilizada para mujeres en etapas IIA y IIB que reúnen criterios para cirugía conservadora.
 - o **Adyuvante:** la terapia sistémica es administrada después de la cirugía de resección, con el objetivo de eliminar la posible existencia de enfermedad residual y de esta forma reducir el riesgo de recaída local o metástasis.
- **Radioterapia:** elimina las células tumorales por medio de la utilización de radiación ionizante, disminuyendo el tamaño tumoral y facilitando la cirugía conservadora en tumores operables. Además, es utilizada cuando los ganglios axilares están comprometidos reduciendo el riesgo de recurrencia (American Cancer Society, 2021).
- **Quimioterapia:** utiliza fármacos basados en la capacidad de interferir con la rápida tasa de proliferación de las células tumorales, promoviendo la citoreducción. Se utiliza para el tratamiento de tumores menores a 2 cm, con ganglios axilares comprometidos y se utiliza principalmente como terapia preoperatoria en mujeres con cáncer de mama triple negativo que pueden ser candidatas a cirugía conservadora o pacientes que presentan metástasis (American Cancer Society, 2021). Dentro de este grupo se encuentran:

- **Agentes Alquilantes:** inducen daño al ADN al incorporar grupos alquilo, disminuyendo la proliferación, en este grupo se encuentran: Clorambucil y Melfalan.
- **Antimetabolitos:** son sustancias análogas a compuestos celulares naturales: Metotrexato, 6-Mercaptopurina y 5-Fluorouracilo.
- **Alcaloides de la vinca inhibidores de microtúbulos:** Etopósido, Tenipósido, Vincristina y Vinblastina.
- **Entrecruzadores e inductores de radicales libres derivados de Platino:** Carboplatino y Cisplatino.
- **Antraciclinas alquilantes:** generan daño en el ADN disminuyendo la proliferación de células tumorales. Incluyen: Doxorubicina y Epirubicina.
- **Alcaloides activadores de microtúbulos:** estimulan el ensamblaje de tubulina en microtúbulos estables inhibiendo su polimerización, disminuyendo la mitosis. Incluye a Docetaxel.
- **Hormonoterapia:** debido a la alta dependencia hormonal que presentan la mayoría de los tumores mamarios, este tipo de tratamiento disminuye la acción generada por las hormonas en las células tumorales y se utiliza para el tratamiento de tumores del subtipo luminal. Se divide en (American Cancer Society, 2021):
 - **Tratamientos Competitivos:**
 - **Antiestrógenos:** actúan como agonistas del receptor de estrógenos, disminuyendo la proliferación de las células tumorales. Entre los que se encuentran: Tamoxifeno, Toremifeno y Fulvestrant.
 - **Progestágenos:** presentan un efecto antiproliferativo en tumores positivos al receptor de progesterona, al regular de forma indirecta la activación del receptor de estrógenos como Medroxiprogesterona y Megestrol.
 - **Inhibidores de aromatasa:** bloquean la actividad de la enzima aromatasa del tejido adiposo en mujeres posmenopáusicas, disminuyendo la conversión de andrógenos en estrógenos. Sin embargo, no pueden bloquear la producción de estrógenos por parte de los ovarios, razón por la que no son efectivos en mujeres premenopáusicas. Dentro

de este grupo se encuentra: Letrozol, Anastrozol y Exemestano (American Cancer Society, 2021). Divididos en:

- Tipo I: derivados de la androstendiona.
 - Tipo II: inhibidores no esteroideos.
- **Terapia Biológica:** generación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína Her-2 (American Cancer Society, 2021), en este grupo se encuentra:
- **Trastuzumab:** es un anticuerpo monoclonal que inhibe la activación de Her-2, acelerando su internalización y degradación, además recluta a células inmunes que eliminan a la célula tumoral y regula a la baja el factor de crecimiento endotelial y otros factores angiogénicos (Carreto, 2002).
 - **Pertuzumab:** inhibe la señalización intracelular de Her-2 a través de las vías PI3K y MAPK (Vademecum, 2020).
- **Terapia con moléculas pequeñas TKI:**
- **Lapatinhib:** inhibe el sitio de unión de ATP del dominio cinasa de Her-2, por lo que disminuye su señalización (American Cancer Society, 2021).

1.1.5 FACTORES DE RIESGO

Un factor de riesgo se define como cualquier elemento que incrementa la probabilidad de contraer una enfermedad. Para el cáncer de mama no se ha identificado una causa directa por la cual se desarrolla la enfermedad, pero han sido identificados factores de riesgo que en combinación con variables ambientales y genéticas contribuyen a su aparición, tales como (American Cancer Society, 2021):

- **Hormonales:** como el cáncer de mama es un tumor hormono-dependiente, cualquier factor que incremente la exposición a estrógenos representa un factor de riesgo.
 - **Menarquía Temprana:** en mujeres que presentaron su primera menstruación antes de los 12 años se incrementa ligeramente el riesgo de desarrollar cáncer de mama.
 - **Menopausia tardía:** mujeres que presentan la menopausia después de los 52 años tienen un riesgo doble de padecer cáncer mamario, como consecuencia del tiempo de exposición a estrógenos y progestágenos.

- **Uso de anticonceptivos orales:** se ha reportado un ligero incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres que emplean anticonceptivos orales.
- **Terapia Hormonal:** el uso prolongado de estrógenos y/o progesterona aumenta ligeramente el riesgo de presentar cáncer de mama.
- **Edad:** la probabilidad de desarrollar cáncer de mama incrementa a medida que la mujer envejece, con una edad promedio de aparición de 54 años (American Cancer Society, 2021).
- **Primera gestación tardía:** mujeres que presentaron su primer embarazo entre los 30-35 años presentan un riesgo 5 veces mayor de desarrollar una tumoración mamaria (American Cancer Society, 2021).
- **Reproductivos:** se presenta una disminución del 7% en el riesgo de desarrollar cáncer de mama por cada embarazo, al que se añade una reducción del 4.3% por cada 12 meses de lactancia (Aguilar *et al* , 2012).
- **Tejido mamario denso:** el exceso de tejido glandular y menor cantidad de tejido graso en la mama, genera un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (American Cancer Society, 2021).
- **Enfermedad mamaria previa:** la presencia de cambios fibroquísticos y lesiones benignas como: fibroadenoma complejo, hiperplasia moderada florida, hiperplasia ductal o lobulillar atípica; aumenta 4 a 5 veces el riesgo de cáncer de mama (American Cancer Society, 2021).
- **Antecedentes de carcinoma de endometrio.**
- **Genéticos:** antecedentes familiares de cáncer de mama incrementan de 2-4 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Además, se tiene un 60% de probabilidad de presentar la enfermedad antes de la menopausia (American Cancer Society, 2021).
 - **Mutación en el gen BRCA1:** la presencia de mutaciones en el gen BRCA1 aumentan 60% el desarrollo de cáncer de mama heredable.
 - **Mutación en el gen BRCA2:** la mutación en el gen BRCA2 se asocia con un incremento del 60-85% el riesgo de desarrollar cáncer de mama.
- **Estilo de vida:** factores de estilo de vida pueden contribuir al desarrollo de cáncer de mama (American Cancer Society, 2021):

- **Actividad Física:** el ejercicio moderado protege contra la aparición de cáncer de mama.
- **Alcohol:** la ingesta de alcohol incrementa 7 al 10% el riesgo de desarrollar cáncer de mama.
- **Tabaquismo:** las mujeres fumadoras presentan un incremento en la probabilidad de desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, en mujeres posmenopáusicas se ha reportado una disminución asociada al efecto antiestrogénico del tabaco.
- **Síndrome Metabólico:** incrementa 1.6 veces el riesgo de presentar una tumoración en la mama (Agnoli *et al*, 2015)
- **Obesidad:** después de la menopausia, la presencia de obesidad aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Kosalka *et al*, 2019).

En los últimos años estos dos últimos factores de riesgo han tomado gran interés en la investigación, pues en estudios prospectivos se ha demostrado que confieren una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de mama en un 30 a 50%. Mientras la mortalidad en mujeres con obesidad (IMC>40 kg/m²) es tres veces mayor en comparación con mujeres delgadas (Barone *et al*, 2020).

1.2 RELACIÓN OBESIDAD-CÁNCER DE MAMA

1.2.1 OBESIDAD

La obesidad es definida como un estado de desequilibrio energético consecuencia del exceso en la ingesta de energía y el poco gasto energético, que conduce a un aumento en la masa del tejido adiposo, tanto por el número como por el tamaño de los adipocitos. Finalmente, este tejido adiposo presenta disfunción adipocitaria favoreciendo una mayor acumulación de triglicéridos y alteración de su función endócrina (Goossens, 2017). Todo esto es promovido por una dieta poco saludable, sedentarismo, factores genéticos, endocrinos, neurales y microbiota (Amin *et al* (2019), Blüher (2019), Izquierdo & Crujeiras (2019), Caslin & Hasty (2019)). En la obesidad se ha documentado la presencia de cambios funcionales dentro del tejido adiposo, cerebro, hígado, páncreas, músculo esquelético e intestino, por lo que se considera una enfermedad crónica progresiva (Blüher (2019), Caslin & Hasty (2019)).

Existen múltiples parámetros para diagnosticar la obesidad entre los que se encuentran (Tabla 2) (National Institutes of Health, 2014) :

Tabla 2. Parámetros utilizados para la determinación de obesidad	
Parámetro	Descripción
Índice de Masa Corporal (IMC)	Se calcula con base en el peso y estatura del individuo (Peso/talla ²). Clasificado en: - Obesidad Grado I o moderada de 30-34.9 kg/m ² . - Obesidad Grado II o severa de 35 a 39.9 kg/m ² . - Obesidad Grado III o mórbida ≥ 40 kg/m ²
Índice cintura/cadera (ICC)	Mide la relación existente entre el perímetro de la cintura y el perímetro de la cadera. Mide la grasa abdominal (cintura/cadera). Un valor superior a 0.8 en mujeres se considera obesidad
Índice cintura/talla (ICA)	Relaciona el perímetro de la cintura con la talla. Un valor superior a 0.5 se considera obesidad (cintura/talla).
Índice de grasa corporal	Cantidad de grasa respecto al peso total del cuerpo. Mayor a 32% es considerado obesidad (IMC+edad+sexo-5.4)
Índice de grasa visceral	Distingue entre la cantidad de grasa periférica y la cantidad de grasa visceral evaluada por medio de la bioimpedancia.
Índice de volumen corporal (IVB)	Relaciona el volumen corporal total con el volumen del abdomen.

Pese a la existencia de múltiples parámetros que diagnostican la obesidad, el índice de masa corporal (IMC) siguen siendo el más utilizado (Figura 8).

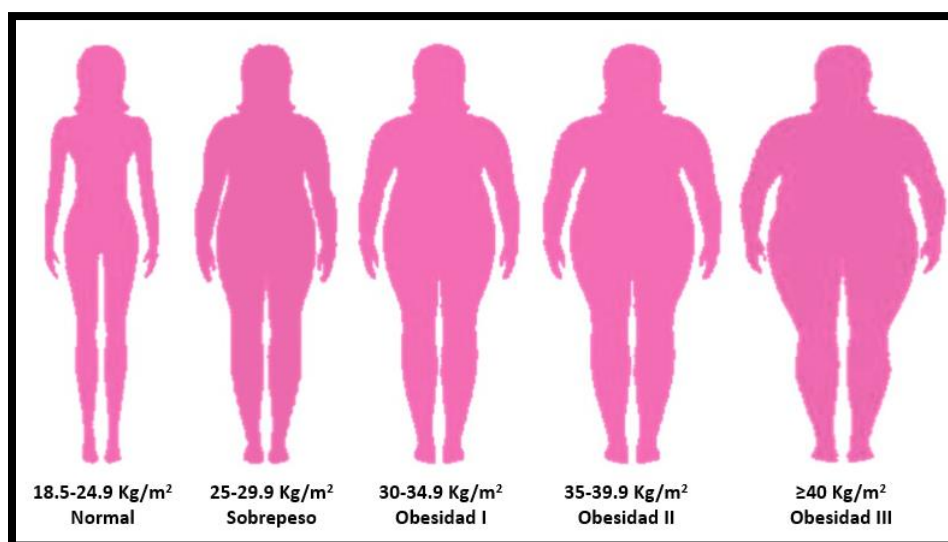


Figura 8. Clasificación de obesidad por índice de Masa Corporal (IMC).

Para 2016, la Organización Mundial de la Salud reportó que aproximadamente el 13% de la población mundial adulta era obesa, por lo que más de 1900 millones de adultos mayores a 18 años tenían sobrepeso. De los cuales 650 millones presentaban algún grado de obesidad, en donde el 39% de los hombres y el 40% de las mujeres tenían sobrepeso (Biganzoli *et al*, 2017).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 2018, en México se presenta una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en adultos del 75%, donde las mujeres tuvieron una prevalencia de 76.8% y los hombres de 73%.

Específicamente la obesidad central se asocia con un mayor riesgo de mortalidad de forma independiente al IMC, presenta una mayor asociación con la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia e inflamación (Sun *et al*, 2019).

Además, la presencia de obesidad en un individuo se considera un factor de riesgo para enfermedades como: enfermedades cardiovasculares, diabetes, trastornos del aparato locomotor y algunos cánceres que incluyen cáncer de endometrio, colón y mama (Moreno, 2012).

1.2.2 OBESIDAD Y CÁNCER DE MAMA

Existe evidencia en metaanálisis sobre un aumento del 12% en el riesgo absoluto de desarrollar cáncer de mama por cada 5 kg/m² de aumento en el IMC, mientras en mujeres posmenopáusicas el riesgo aumenta un 46% (Barone *et al*, 2020).

La asociación entre obesidad y el riesgo de desarrollar cáncer de mama depende del estado menopáusico y el subtipo de cáncer mamario (Allott & Hursting, 2015). Se ha observado un aumento de 1.82 veces en la probabilidad de desarrollar cáncer de mama del subtipo luminal A en mujeres posmenopáusicas que presentan obesidad. Mientras en mujeres premenopáusicas la presencia de obesidad se asoció con un efecto inverso de 0.86% en la incidencia de cáncer, por lo que se asocia como un factor “protector” pese a que en algunos reportes se ha demostrado que esta población presenta mayor probabilidad de presentar tumores mamarios del subtipo triple negativo (Amadou *et al* (2013), Allott & Hursting (2015), Trestini *et*

al (2018), Mutschler *et al* (2018)) (Figura 9). En tanto para tumores de los subtipos luminal B y Her-2+, existe poca evidencia que vincule la presencia de obesidad con un incremento en el riesgo de desarrollar este tipo de tumores (Allott & Hursting (2015), Arnold *et al* (2016)).

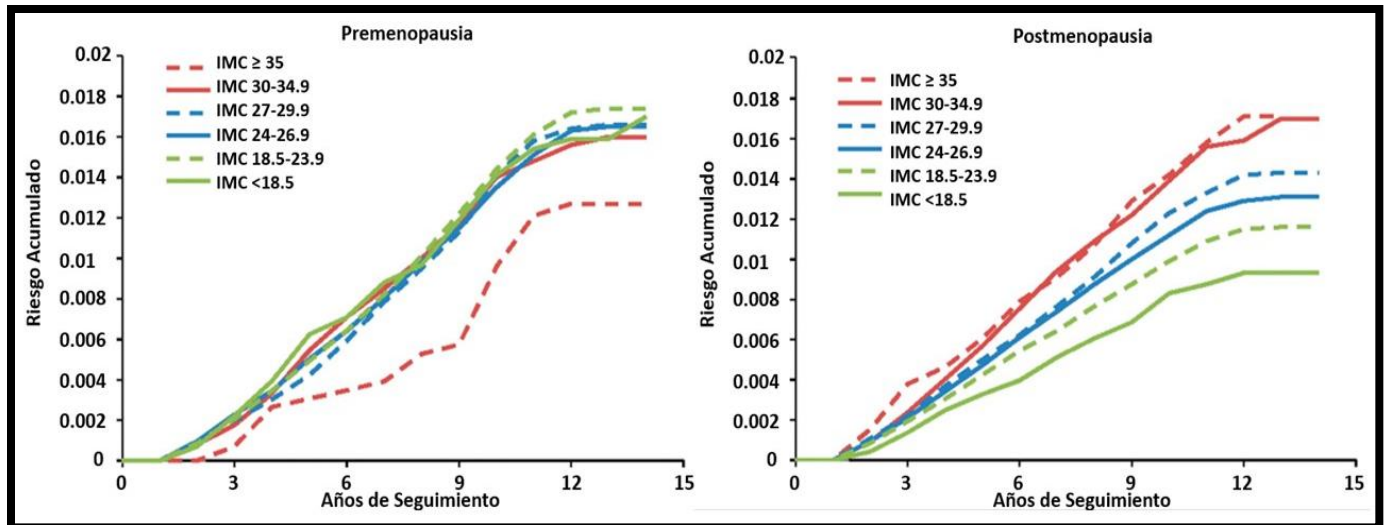


Figura 9. Incidencia de Cáncer de mama ajustado por IMC en mujeres Premenopáusicas y Posmenopáusicas. Modificado de Chen *et al* (2016)

Aunque el IMC es el principal criterio para determinar la presencia de obesidad y el criterio en el cual se fundamentan las tasas de asociación con el cáncer de mama, actualmente se ha descrito que la relación cintura-cadera incrementa 1.5 veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas, mientras en mujeres premenopáusicas se presenta un riesgo de 0.92 veces (Amadou *et al*, 2013). En ambos grupos se observa una mayor probabilidad de presentar tumores del subtipo triple negativo, con tumoraciones más grandes y detección en etapas III y IV (Sun *et al*, 2015). Si bien sigue habiendo discusión sobre cuál es la mejor medida para describir la obesidad, todas las que se han empleado a la fecha han mostrado una clara asociación entre obesidad y cáncer de mama.

Pese al efecto protector asociado a la obesidad en mujeres premenopáusicas, se han reportado edades de aparición de cáncer de mama más tempranas en mujeres con obesidad, aproximadamente de 31 vs 55 años en comparación a mujeres eutróficas (normopeso) (Aguilar *et al*, 2011). Lo anterior a su vez se asocia con una relación de cáncer de mama hereditario, ya que el 50% de mujeres con sobrepeso

y el 33% de mujeres con obesidad presentan antecedentes de cáncer de mama, respecto al 16.7% de las mujeres eutróficas (Aguilar *et al*, 2012).

Por otra parte, la presencia de obesidad se ha asociado con un mayor riesgo de mortalidad por cáncer de mama, con la reducción del 11% de la supervivencia, tanto en mujeres pre y posmenopáusicas. Con un riesgo de 1.18 veces en menor supervivencia libre de progresión y un riesgo de 1.13 veces en supervivencia global en comparación con mujeres normopeso, pero se ha observado que las mujeres premenopáusicas presentan peor supervivencia libre de progresión y supervivencia global en comparación con mujeres con posmenopáusicas (Azrad & Demark-Wahnefried (2014), Arce *et al* (2014), Arnold *et al* (2016), Allott & Hursting (2015), Bergom *et al* (2016), Sánchez *et al* (2019), Lee *et al* (2019), Modzelewska *et al* (2019)) (Figura 10).

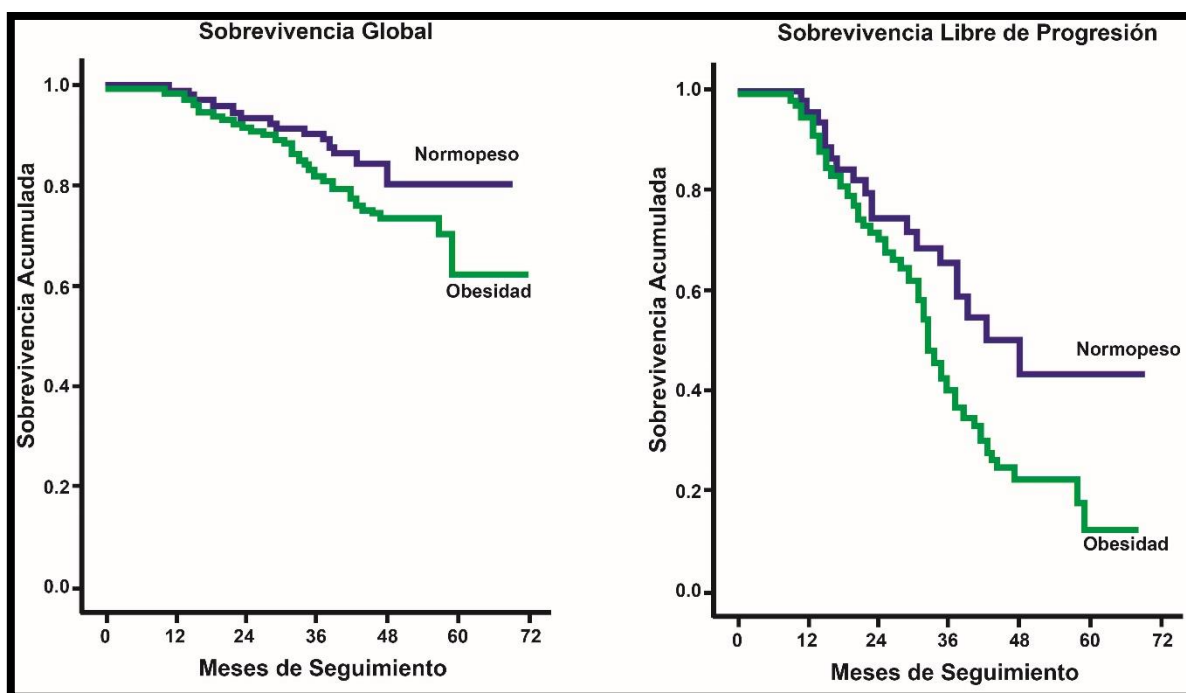


Figura 10. Tasa de supervivencia global y supervivencia libre de progresión ajustado por IMC. Modificado de Arce *et al* (2014)

Lo anterior se debe a múltiples factores como: disminución de un 10-20% en las tasas de detección temprana, detección de tumores de mayor tamaño, positividad de ganglios linfáticos, aumento de 1.4% en el riesgo de recidiva, tasas de recurrencia más tempranas, menores dosis de tratamiento de quimioterapia que

limitan su efectividad, mayor riesgo de efectos adversos de la quimioterapia, reducción en la eficacia de la terapia endocrina, inducción de radio-resistencia por activación de Chk1 y un aumento del 46% de desarrollar metástasis (Azrad & Demark-Wahnefried (2014), Allott & Hursting (2015), Widschwendter *et al* (2015), Raman *et al* (2016), Biganzoli *et al* (2017), Björner *et al* (2017), Lee *et al* (2019), Trestini *et al* (2018), Lehuédé *et al* (2019), Sánchez *et al* (2019), Amin *et al* (2019), Chen & Du (2019)). En los tumores triple negativo el incremento en la mortalidad se asocia a una respuesta patológica completa disminuida a la quimioterapia, mientras para tumores Her-2+ un IMC más alto promueve un pronóstico desfavorable cuando las pacientes son tratadas con trastuzumab por la secreción de factores solubles (Trestini *et al* (2018), Lehuédé *et al* (2019)).

Existen diferencias en la supervivencia global utilizando ambos índices de obesidad, mientras el IMC se asocia a peores resultados en mujeres con cáncer triple negativo, la relación cintura-cadera presenta mayor influencia en la mortalidad de mujeres con cáncer de mama luminal (Sun *et al*, 2015).

Sumado a la presencia de obesidad se debe considerar que en su mayoría estas pacientes también presentan síndrome metabólico que es definido como una agrupación de problemas de salud que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial, que incluye alteraciones metabólicas como: resistencia a la insulina, obesidad abdominal, cambios proinflamatorios, dislipidemias, predisposición a diabetes tipo 2, aterosclerosis e hipertensión (Stern *et al*, 2004). Para determinar que un individuo presenta síndrome metabólico debe presentar 3 o más de las alteraciones previamente descritas. La presencia de síndrome metabólico se asocia con un riesgo absoluto de desarrollar cáncer de mama de 1.67 veces, en donde las mujeres posmenopáusicas presentan un riesgo de 3.12 en comparación con mujeres premenopáusicas que presenta mayor asociación con la alteración de glucosa en ayuno (Agnoli *et al* (2015), Bitzur *et al* (2016)).

1.2.2.1 MECANISMOS DE ASOCIACIÓN ENTRE OBESIDAD Y CÁNCER DE MAMA

Aunque la asociación entre obesidad y cáncer de mama se ha descrito desde hace más de 20 años, el mecanismo por el que la obesidad promueve el desarrollo de cáncer de mama sigue sin ser comprendido del todo debido al gran número de moléculas que se alteran en forma directa o indirecta por el tejido adiposo disfuncional y la complejidad de sus interacciones que pueden aumentar la carga tumoral, proliferación y metástasis a través de la regulación de sellos distintivos del cáncer como: inestabilidad genómica, cambios metabólicos en el tejido, alteración de la matriz extracelular, inhibición de la apoptosis, aumento de la angiogénesis, alteración del sistema inmune y diseminación metastásica (Chen & Du (2019), Sánchez *et al* (2019)). A pesar de esto se han propuesto algunos mecanismos que se describen a continuación y se resumen en la Tabla 3 y Figura 11.

Tabla 3. Mecanismos de asociación entre obesidad y cáncer de mama			
Molécula	Mecanismo	Efecto Biológico	Referencia
Insulina/IGF-1	↑ Glucosa ↑ Insulina o IGF-1 Activación de MAPK, HIF-1α Amplificación de Her-2 ↑ Bcl-1, Bcl-XL ↓ Bax	Proliferación Inhibición de Apoptosis Activación RE Angiogénesis	Sun <i>et al</i> (2016) Caslin & Hasty (2019)) Amin <i>et al</i> (2019) Choucair <i>et al</i> (2019) Björner <i>et al</i> (2017) Sánchez <i>et al</i> (2019)
Hormonas Sexuales	↑ Estrógenos ↓ SHBG Activación de GRP30 Activación de Scr, PI3K y MAPK	Proliferación Viabilidad Inhibición de Apoptosis ROS Ca ²⁺ Daño al ADN	Amin <i>et al</i> (2019). Choucair <i>et al</i> (2019) Lei <i>et al</i> (2018) Wei <i>et al</i> (2014)
Adipocinas	↓ Adiponectina Activación de PTP1B y AMPK ↑ Leptina Activación de PI3K/Akt MAPK, JAK2/STAT3, RE ↑ Ciclina D, p53, survivina, c-myc, p21, c-jun, ERG-1, SOCS3, IL-1, E-caderina, VEGF, Nanog, SOX2 y OCT4 ↑ CCL2 y CCL5	Proliferación Insensibilidad a Trastuzumab Células madre del cáncer Transición epitelio-mesénquima Migración celular	Sánchez <i>et al</i> , (2019) Amin <i>et al</i> (2019) Chen & Du (2019) Modzelewska <i>et al</i> (2019)

Lípidos	↑ HDL, LDL-C, ApoA1 y ApoB ↑ mediadores inflamatorios ↑ Proteína C-Reactiva, amiloide-A, haptoglobina y PAI-1 ↑ Aldehídos Lipídicos	Resistencia a la insulina Ataque nucleofílico de cadenas laterales en residuos de Lys, His y Cys Estrés en retículo endoplásmico ROS Ca ²⁺	Amin <i>et al</i> (2019) Borguist <i>et al</i> (2016) Allott & Hursting (2015) Hauck <i>et al</i> (2019) Salvestrini <i>et al</i> (2019)
Citocinas Proinflamatorias	↑ COX-2, TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-1 β y prostaglandinas ↓ GSXS-transferasa A4, peroxiredoxina 3 y GHS peroxidasa 4 ↑ TNF- α Inhibición de lipoproteína lipasa ↑ estrógenos ↑ IL-6 ↑ IL-8 Activación de RE y EGF, HIF-1 α y HDAC-1 ↑ IL-1 β ↑ VEGF ↑ TGF- β	Resistencia a la insulina ROS Disfunción mitocondrial Proliferación Migración celular Quimioresistencia Angiogénesis Transición epitelio-mesénquima Metástasis	(Caslin & Hasty, 2019) Allott & Hurting (2015) Sánchez <i>et al</i> (2019) Trestini <i>et al</i> (2018) Hauck <i>et al</i> (2019) Amin <i>et al</i> (2019) Tangvarasittichai <i>et al</i> (2016) King <i>et al</i> (2017) Tang <i>et al</i> (2017) Luey & May (2016)
ROS y RNS	↑ ROS y RNS	Acortamiento de telómeros Peroxidación lipídica Daño al ADN	Salvestrini <i>et al</i> (2019)

Además, la presencia de obesidad incrementa el desarrollo de microbiota intestinal del tipo sacarolítico, lo que aumenta la digestión e incrementa el consumo de energía y el mayor depósito de grasa, lo que contribuye al aumento de peso (Baiden & Tuyvaerts, 2019).

Sumado a los mecanismos antes descritos, la obesidad interfiere en mecanismos de reparación de ADN, consecuencia de la alteración de patrones de metilación de genes involucrados en la reparación (Salvestrini *et al*, 2019). Se ha demostrado en tumores de pacientes con obesidad, el incremento en la expresión de 62 genes y un decremento en 50 genes, que regulan 59 procesos biológicos como: la

señalización de insulina, la inflamación, metabolismo de glucosa, vías biosintéticas, transición epitelio-mesénquima y metástasis (Fuentes-Mattei *et al*, 2014).

Por otra parte, se ha identificado la generación de exosomas derivados de adipocitos, los cuales contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina mediante la activación de macrófagos y la posterior producción de citocinas proinflamatorias (Khalyfa *et al*, 2018).

Como se describió previamente, varias de las moléculas desreguladas en la obesidad convergen en la regulación positiva de la vía PI3K/Akt.

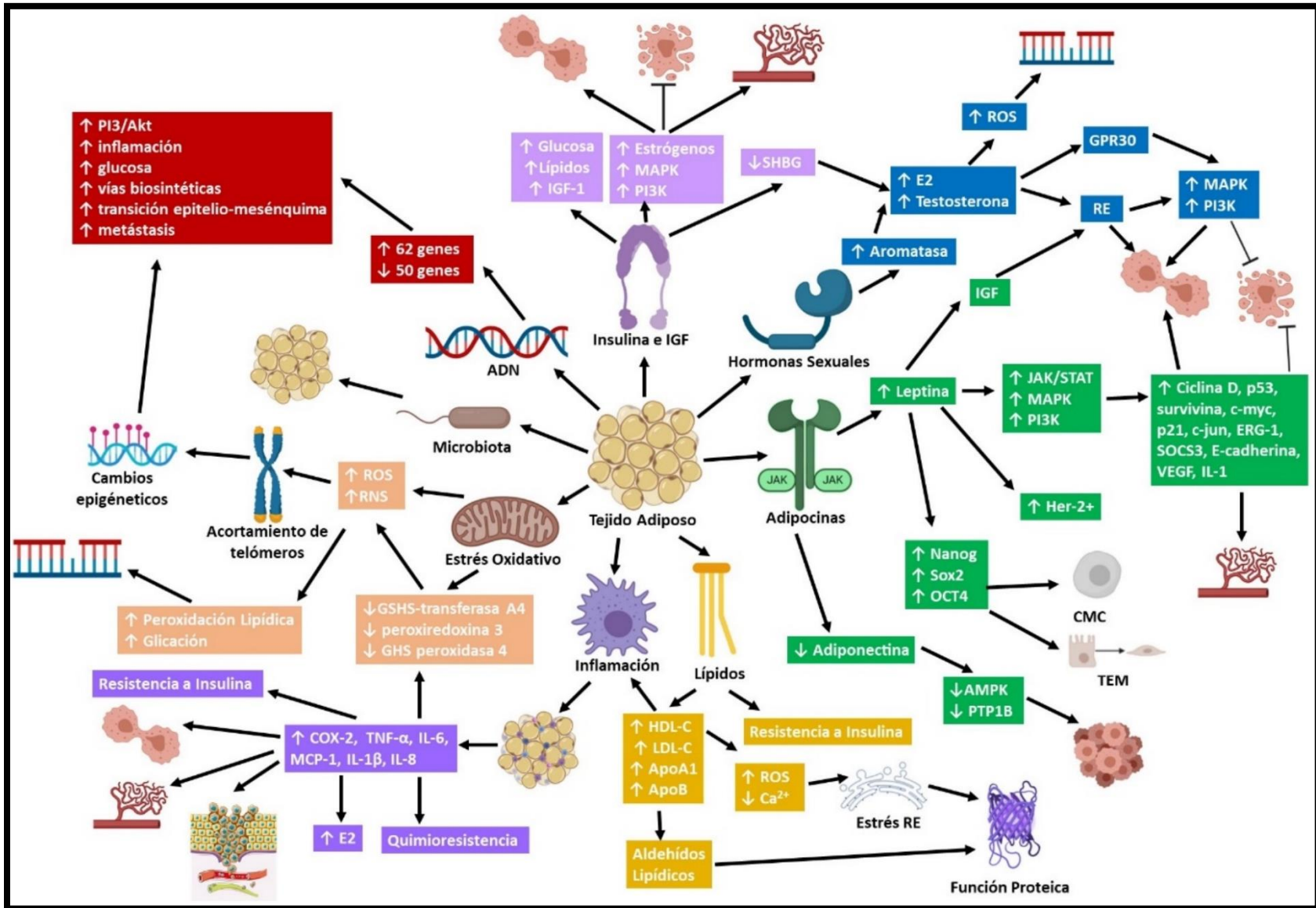


Figura 11. Mecanismos de asociación entre obesidad y el desarrollo de cáncer de mama (Cada color representa un mecanismo).

1.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt

Además de representar un papel importante en la relación entre obesidad y cáncer de mama, la vía de señalización PI3K/Akt tiene un papel preponderante en la carcinogénesis a través de su función anabólica dependiente de la activación del ribosoma. A esto se suma una desregulación en más del 70% de los tumores mamarios por lo que incrementa la proliferación, metabolismo y metástasis (Ye *et al* (2016), Costa *et al* (2018)).

La activación anómala de la vía PI3K/Akt ocurre por la mutación o amplificación de los genes que codifican PI3K o Akt y por la pérdida, inactivación o mutación de PTEN, mutación o sobreexpresión de Her-2 o GPCR (Ye *et al*, 2016).

Son muchos los factores implicados en la activación la vía PI3K/Akt, dentro de los cuales el eje IR/IGF-1 presenta un papel importante en la proliferación y diferenciación celular (Belfiore *et al* (2018), García *et al* (2015)). Sumado a su papel como uno de los principales mediadores en la asociación entre obesidad y cáncer de mama debido a la sobreproducción de insulina e IGF-1.

La presencia de insulina, IGF-1 e IGF-2 promueven la activación de los receptores IR e IGF-R en las células tumorales de cáncer de mama, que presentan sobreexpresión de estos receptores, que a su vez se encuentran activos de forma constitutiva por la producción autocrina de IGF-2 por parte de la célula tumoral (Belfiore *et al* (2018), García *et al* (2015)).

Una vez que los ligandos de los receptores IR o IGF-R se une, estos sufren un cambio conformacional que permite que su dominio cinasa pueda producir una autofosforilación. En este estado activado el dominio cinasa cataliza la fosforilación de residuos de tirosina en la región C-terminal y yuxtamembrana del propio receptor. Posteriormente proteínas como IRS que carecen de actividad cinasa intrínseca se unen a algunas de estas fosfotirosinas. Una vez unidas el dominio cinasa fosforila al IRS, que sirve como proteína acopladora para moléculas de señalización intracitosólicas como PI3K (Bastarrachea *et al* (2008), Ikin & Hilken (2017)) (Figura 12).

PI3K es un heterodímero compuesto por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110), las cuales presentan una regulación transcripcional por

STAT3 (Rädler *et al* (2017), Costa *et al* (2018)). Una vez que PI3K se une a IRS fosforila fosfoinositidos de membrana, lo que lleva al reclutamiento y activación de PDK1, PDK2 y Akt (Dey *et al*, 2015) (Figura 12).

La traslocación a la membrana de PDK1, PDK2 y Akt permite la fosforilación y activación de esta última, la cual es una molécula que sirve como centro de integración de una gran cantidad de vías que regulan la tumorigénesis por inducción de la traducción, supervivencia, apoptosis, regulación metabólica y ciclo celular, particularmente por la subsecuente activación de mTOR (Dey *et al*, 2015) (Figura 12). La proteína Akt presenta tres isoformas que tienen un papel en la carcinogénesis, Akt-1 induce la proliferación y un efecto inverso en la metástasis, mientras Akt-2 incrementa la migración celular (Ye *et al* (2016), Rädler *et al* (2017)).

Akt activa fosforila a TSC2 inhibiendo su función, lo que permite la liberación de la GTPasa Rheb que fosforila a mTOR (Sonnenblick *et al*, 2019). mTOR es un importante regulador anabólico que controla procesos biosintéticos de macromoléculas como la traducción de proteínas, transcripción de ARNm, biosíntesis ribosomal, biogénesis de lípidos, autofagia, función mitocondrial, respuesta inmune y metabolismo de glucosa (He *et al*, 2016). Entre las moléculas blanco de mTOR se encuentran p70S6K, HIF1- α , c-Myc y SREBP-1 (Cantor & Sabatini, 2012). Por otra parte, existe una regulación cruzada entre la señalización de mTOR y RE, en donde mTOR activa transcripcionalmente a RE y este activa a mTOR, lo que contribuye a la resistencia endocrina (Bostner *et al*, 2018) (Figura 12).

El complejo mTOR activo fosforila a p70S6K, aumentando su actividad cinasa para fosforilar a 40SrpS6 y eIF4B que junto a la fosforilación de 4E-BPs por mTOR, permiten la formación del complejo eIF4F que interactúa con la tapa 7-metilguanosina presente en el extremo 5' de todos los ARNm y media el reclutamiento de la subunidad 40S ribosomal al ARNm, promoviendo la traducción de proteínas que incluyen factores de crecimiento, activadores del ciclo celular, factores angiogénicos e inhibidores de la apoptosis (Dowling *et al*, 2007) (Figura 12). Como bucle de retroalimentación positiva, mTOR y p70S6K pueden fosforilar a IRS, lo que resulta en la activación de Akt y el mantenimiento de la señalización (Zakikhani *et al*, 2010).

Mientras la fosforilación de c-Myc por medio de mTOR, estimula la expresión de genes implicados en la captación de glucosa, glucólisis, transporte del piruvato glucolítico, transportadores de glutamina, biogénesis mitocondrial, glutaminólisis, metabolismo de serina/glicina y la ácido graso-sintasa (Cantor & Sabatini, 2012) (Figura 12).

Por otra parte, la activación de SREBP por acción de mTOR, induce la desregulación en la síntesis de lípidos de *ново*, que son necesarios para la producción de membrana para la proliferación celular sostenida (Cantor & Sabatini, 2012) (Figura 12).

Además, la activación de la PI3K/Akt/mTOR estabiliza y preserva la reparación de rotura de la doble cadena de ADN, al interactuar con el complejo de recombinación homóloga, genera resistencia a la terapia endocrina por activación del RE en tumores luminales, promueve la resistencia a trastuzumab en tumores Her-2+ y en tumores triple negativo induce quimioresistencia (Ye *et al* (2016), Belfiore *et al* (2018), Costa *et al* (2018), Yamamoto *et al* (2019), Lei *et al* (2018)).

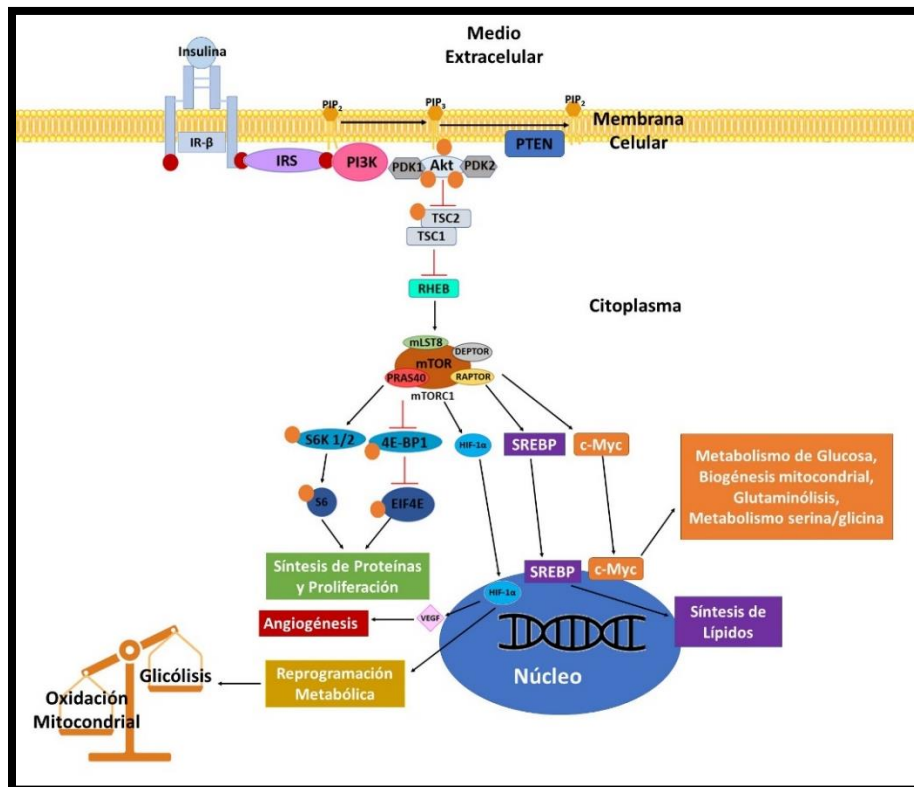


Figura 12. Señalización de la vía IR/PI3K/Akt. Puntos rojos representan fosforilaciones activadoras en residuos de Tyr. Puntos anaranjados representan fosforilaciones activadoras en residuos Ser-Thr.

Para el tratamiento de cáncer de mama se han desarrollado varios inhibidores para diferentes puntos de la vía de señalización como son: SAR245408, Taselisib, PX-866 y BKM120 para PI3K, Ipatasertib para Akt y Everolimus para mTOR (Yamamoto *et al* (2019), Bostner *et al* (2018), Costa *et al* (2018)). A partir del año 2019 la FDA aprobó Alpelisib como tratamiento contra PI3K en pacientes con cáncer de mama avanzado hormono dependiente (ER+, PR+ y Her-2-) (amp.cancer.org). Todas son terapias que no han tenido éxito debido a la falta de especificidad lo que genera altos perfiles de toxicidad, por lo que se han buscado nuevas alternativas de tratamiento como es el fármaco metformina.

1.4 METFORMINA

La N-N-dimetilbiguanida o mejor conocida como metformina está compuesta por dos moléculas de guanidina unidas por la eliminación de un radical amino formando un catión protonado (Foretz *et al* (2014), An & He (2016)). Es un fármaco empleado para el tratamiento de la diabetes y en algunos casos para el control metabólico en pacientes con obesidad (Rena *et al*, 2013). Debido a su acción antihiper glucemiante genera la reducción en la producción de glucosa hepática y el aumento de la utilización de glucosa, además no actúa como hipoglucemiante (An & He, 2016).

Para su función antihiper glucemiante su principal mecanismo de acción es la inhibición en la producción hepática de la glucosa por medio de la activación de AMPK que inhibe la expresión de genes gluconeogénicos y lipogénicos, disminuye la lipotoxicidad e incrementa la sensibilidad a la insulina en el hepatocito lo que reduce la gluconeogénesis (Bastarrachea *et al*, 2008). Además, la metformina activa AMPK en el músculo esquelético estimulando la captación de glucosa (Bastarrachea *et al*, 2008).

Por mecanismos que se desconocen, la metformina no estimula la secreción de insulina, disminuye la absorción de glucosa a nivel intestinal, aumenta la captación y utilización de glucosa por músculo esquelético y tejido adiposo, potencializa la acción de insulina endógena aumentando la síntesis de glucógeno en músculo esquelético, disminuye la oxidación de ácidos grasos, mejora la función endotelial y disminuye los niveles de ROS (Foretz *et al* (2014), An & Le (2016), Rena *et al* (2013)).

La metformina se administra por vía oral y se absorbe en el intestino delgado de forma incompleta y lenta, no se une a proteínas plasmáticas por lo que su distribución a tejidos periféricos es rápida, (Bastarrachea *et al*, 2008). Su vida media plasmática oscila entre 1.5 a 5 hrs, no se metaboliza en el hígado y se elimina inalterada por el riñón en un 90% en un plazo de 12 hrs (Bastarrachea *et al* (2008), Graham *et al* (2011)).

Por otra parte, el uso de metformina en pacientes con obesidad con o sin síndrome metabólico ha mostrado cambios en moléculas séricas como (Tabla 4):

Tabla 4. Moléculas en pacientes con obesidad alteradas por el tratamiento con metformina	
Molécula	Referencia
↓ Insulina y Acetato	Mueller <i>et al</i> (2021)
↓ Fractalquina y E-selectina	Schinzari <i>et al</i> (2020)
↓ factor diferenciador del crecimiento 15	Day <i>et al</i> (2019)
↓ Ácidos Grasos Libres	Li <i>et al</i> (2012)
↓ Proteína C-Reactiva	He <i>et al</i> (2012)
↓ Colesterol total, Colesterol HDL, colesterol LDL, Triglicéridos ↑ Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales	Worsley <i>et al</i> (2015)

1.4.1 METFORMINA Y CÁNCER DE MAMA

Evans *et al* (2005) fueron los primeros en encontrar una posible asociación entre el uso de metformina y la reducción en la incidencia de cáncer, desde entonces al menos 17 estudios epidemiológicos han examinado esta asociación. En donde se ha reportado que, en usuarios de metformina en comparación con otras terapias para el control de la diabetes, se presenta una disminución del 30% en la incidencia de todos los cánceres y en específico las mujeres presentaron una incidencia más baja de cáncer de mama invasivo, razón por la que se ha sugerido que la metformina presenta un potencial papel como agente anticancerígeno (An & He, 2016). Estos efectos se han limitado a pacientes con cáncer de mama que presentan resistencia a la insulina, un IMC mayor a 30 kg/m² y/o diabetes, por lo que es probable que su efecto sea por un mecanismo indirecto (Col *et al* (2012), Allott & Hursting (2015), Bao *et al* (2014), Giles *et al* (2018)).

Particularmente, algunos estudios reportan diferencias en la asociación entre el uso de metformina y el subtipo de cáncer de mama. Uno de ellos informó la disminución

en la incidencia de tumores luminales A, luminales B y Her2+, otro reporta una disminución en tumores Her-2+ y otro reporta la reducción en la incidencia de tumores luminales A y B (Allot & Hursting (2015), Berstein *et al* (2011), DeCensi *et al* (2014), Fuentes *et al* (2014), DeCensi *et al* (2015)). A pesar de estas discrepancias, en todos los casos resulta consistente que la metformina presenta una mejor respuesta antineoplásica en pacientes con niveles elevados de triglicéridos y estrógenos.

1.4.2 MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DE METFORMINA

El papel antitumoral de la metformina en el cáncer de mama se ha descrito por dos mecanismos principales, así como mecanismos no canónicos, los cuales se describe a continuación y se encuentran resumidos en la Tabla 5 y Figura 13:

Tabla 5. Mecanismos de acción antitumoral de metformina en cáncer de mama			
Mecanismo	Moléculas	Efecto Biológico	Referencias
Efecto Indirecto	↓ Activación de IR ↓ PI3K, Akt, MEK, ERK1, Scr ↓ TNF- α , IL-6 y VEGF	↓ Proliferación ↓ Angiogenesis	Bao <i>et al</i> (2014) An & He (2016) Menéndez <i>et al</i> (2016) Dowling <i>et al</i> (2012) Brown <i>et al</i> (2010) Green <i>et al</i> (2011) Ma <i>et al</i> (2013) Caslin & Hasty (2019)
Efecto Directo	Internalización del fármaco por OCT 1/2 Unión al complejo I de Cadena respiratoria ↓ ATP ↑ ROS y RNS Activación de PKC, LKB1 y AMPK, p53 Alteración de AMP:ATP Inhibición de TSC2 ↓ Ki67, Akt, c-Myc, ciclina D, VEGF Inhibición de HIF-1 α	Inhibición de la cadena respiratoria por: 1- Acumulación 2- Alteración de Ca ²⁺ ↓ Lipogénesis y Gluconeogénesis Detención del ciclo celular en G1	Zakikhani M <i>et al</i> (2010) Foretz <i>et al</i> (2014) Rena <i>et al</i> (2013) El-Mir <i>et al</i> (2000) Schäfer G (1976) Green <i>et al</i> (2011) Miller & Birnbaum (2010) Piwkowska <i>et al</i> (2010) Kane <i>et al</i> (2010) Logie <i>et al</i> (2012) Bost <i>et al</i> (2012) Andrzejewski <i>et al</i> (2014) Bao <i>et al</i> (2014) An & He (2016) Dowling <i>et al</i> (2007) Viollet <i>et al</i> (2012) Obara <i>et al</i> (2015) Hatoum & McGowan (2015) Dowling <i>et al</i> (2012) Zhang <i>et al</i> (2017) Li <i>et al</i> (2017) Brown <i>et al</i> (2010)

			Zhuang & Miskimins (2008) Kalender <i>et al</i> (2010) Hadad <i>et al</i> (2015) Queiroz <i>et al</i> (2014) Marinello <i>et al</i> (2016) Gollavilli <i>et al</i> (2015) Al-Zaidan <i>et al</i> (2017) Liu <i>et al</i> (2012) Syed <i>et al</i> (2019)
No Canónico	<p>↑ miR-200c ↓ Akt-2 y Bcl-2</p> <p>↑ p21cip y p27Kip e inhibición de CDK2/Ciclina E</p> <p>↑ Bax</p> <p>Traslocación p53 a núcleo por AMPK</p> <p>↓ Akt-FOXO3 por AMPK</p> <p>↓ Antioxidantes ↑ p53 y TGF-β</p> <p>↓ potencial de membrana mitocondrial</p> <p>↓ RE</p> <p>Inactivación de IRS-1</p> <p>Activación de AMPK por ATM</p> <p>Inhibición de mTOR por fosforilación de RAG</p> <p>Inhibición de la degradación de DEPTOR</p> <p>Inhibición de MPAK por desplazamiento de RAS mediado por PCK</p> <p>↓ c-Myc por ↑ miR-33^a</p> <p>Unión de Metf ADN ↓ miRNAs</p>	<p>Apoptosis</p> <p>↓ Transición Epitelio-Mesénquima</p>	<p>Zhang <i>et al</i> (2017)</p> <p>Zhuang <i>et al</i> (2008)</p> <p>Hadad <i>et al</i> (2015)</p> <p>Green <i>et al</i> (2011)</p> <p>Queiroz <i>et al</i> (2014)</p> <p>Marinello <i>et al</i> (2015)</p> <p>Li <i>et al</i> (2017)</p> <p>Giles <i>et al</i> (2018)</p> <p>Zakikhani M <i>et al</i> (2010)</p> <p>Grossmann <i>et al</i> (2015)</p> <p>Dowling <i>et al</i> (2012)</p> <p>Obara <i>et al</i> (2015)</p> <p>Iglesias <i>et al</i> (2013)</p> <p>Pulito <i>et al</i> (2017)</p> <p>Mondal <i>et al</i> (2018)</p>

Los mecanismos canónicos (Directo e indirecto) antes descritos son los más aceptados y habían demostrado que el efecto antitumoral de la metformina requería la presencia de LKB1 o TSC2 (Dowling *et al*, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

Varios estudios *in vitro* ponen de manifiesto el efecto anticancerígeno de la metformina, pero las concentraciones utilizadas son mayores en comparación a la concentración biodisponible en sangre. Por otra parte, el efecto “protector” contra el desarrollo de cáncer se reporta en el 30% de los usuarios de metformina. Nosotros proponemos que el efecto antitumoral de la metformina en este 30% de las pacientes puede asociarse a la regulación de componentes séricos (adipocitocinas y metabolitos) relacionados al uso continuo de fármaco por más de 2 meses (10 semanas), los cuales afectan la vía de señalización de IR/Akt/p70S6K. Así, el uso de células tumorales como biosensores de estos cambios en la composición sérica ofrece una herramienta para identificar cambios en la fosforilación de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K. La utilización de este ensayo *in vitro* permitiría identificar al subgrupo de mujeres que se beneficiarían por el tratamiento con metformina.

3. HIPÓTESIS

En un subgrupo de pacientes con un IMC mayor a 30 kg/m² que responden diferencialmente al tratamiento con metformina habrá cambios en la composición sérica de adipocitocinas (adipocinas, citocinas proinflamatorias y hormonas, entre otras). En conjunto estos componentes séricos serán reconocidos por las células de cáncer de mama, generando patrones de fosforilación específicos de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K relacionados con una posible disminución del metabolismo anabólico. Estos resultados *in vitro* podrían explicar el efecto citostático y citotóxico asociado a la disminución en el desarrollo de cáncer de mama en usuarias de metformina.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el perfil de fosforilación de cinasas de la vía de señalización de IR/Akt/p70S6K producido por la exposición a sueros de pacientes con IMC mayor a 30 kg/m² a 0 y 10 semanas de tratamiento con metformina en células MCF-7.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones óptimas de cultivo para la evaluación de sueros humanos.
- Determinar las líneas de cáncer de mama que pueden ser utilizadas como biosensores para evaluar diferencias en la concentración de moléculas séricas (Selección del Biosensor).
- Caracterización de los perfiles de fosforilación de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K producido por el suero de mujeres con diferentes características metabólicas y hormonales (Validación de Modelo).
- Evaluar la viabilidad de las células MCF-7 en presencia del suero de pacientes con IMC mayor a 30 kg/m² tratadas con metformina.
- Evaluar si el suero de pacientes con IMC mayor a 30 kg/m² tratadas con metformina presentan un efecto diferencial sobre las fosforilaciones de los sistemas IR/Akt/p70S6K, NF-κB y ERK en células MCF-7.

5. SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestras de Sueros Humanos

Fue un estudio prospectivo controlado, no aleatorizado con cegamiento simple. Se recolectó la sangre de mujeres eutróficas o con obesidad sanas bajo el protocolo BQO-2044-16/20-1 aprobado por los Comités de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y buenas prácticas clínicas. Se obtuvo el consentimiento informado antes de la participación, todas las muestras y los datos de los donantes se codificaron para mantener la confidencialidad. Las mujeres con obesidad posmenopáusicas fueron tratadas con 2550 mg/día de metformina durante 10 semanas. El IMC se calculó y las donantes se agruparon según la categoría de IMC (eutrófico 20-24.9 kg/m² u obesidad ≥ 30 kg/m²). Se obtuvieron 30 ml de sangre de cada donante y las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 30 min a 4 °C. Del centrifugado se colectó el suero, el cual fue etiquetado y preservado a -70 °C hasta su utilización.

5.2 Procedimientos para SFB y SNP

Para algunas pruebas fueron utilizados sueros con o sin inactivación por calor, por lo que el SFB y el suero SNP fueron puestos a baño maría a 56 °C durante 30 min, con agitación cada 10 min.

La dislipidación de los sueros SFB y SNP se realizó por la adición de carbón activado en agitación constante “over night”. Posteriormente, se eliminó el carbón activado y el suero fue centrifugado a 3000 rpm a 4 °C durante 30 min y se decantó en un tubo nuevo, repitiendo esta acción hasta la eliminación completa de carbón activado. Posteriormente el suero fue filtrado por una membrana de 0.20 μ m para su esterilización.

5.3 Ultracentrifugación de sueros humanos

Los sueros humanos fueron sometidos a ultracentrifugación durante 16 hrs a 110 000 g a 8 °C, posteriormente se obtuvieron tres fracciones, la fracción superior e intermedia fueron unidas como una sola fracción a la que se denominó “sobrenadante”, mientras el pellet fue resuspendido en 200 μ l de PBS estéril. Las fracciones fueron mantenidas a 4 °C hasta su utilización.

5.4 Líneas Celulares

Se utilizaron las líneas celulares MCF-7, MCF-7-GFP, T47-D, ZR-75-30, BT-474, SKBR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468, PC3, HCT15, A549, HEK-293 y HeLa del ATCC. Las líneas BT-474R y SKBR-3R se generaron para la resistencia a trastuzumab y las líneas DSG-BC1, DSG-BC2, ECL-1 fueron obtenidas de cultivos primarios de mujeres mexicanas con cáncer de mama y diferentes IMC. Cada una de las líneas se mantuvo en medio de cultivo RPMI-1640, excepto las líneas BT-474 y BT-474R que se mantuvieron en medio de cultivo Hybri-Care y las células SKBR-3 y SKBR-3R en medio de cultivo McCoy 5A. En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 10% de SFB y las células fueron mantenidas a 36 °C al 5% de CO₂.

5.5 Reactivos y Anticuerpos

El medio de cultivo RPMI-1640, el medio de cultivo DMEM bajo en glucosa y el suero fetal bovino fueron de Gibco-Thermo Fisher Scientific. El medio de cultivo McCoy 5A fue de Caisson Labs. El medio de cultivo Hybri-Care fue de ATCC. Medio de cultivo RPMI sin glucosa y sin rojo fenol, medio RPMI-1640 sin rojo fenol y 200 mM de glucosa fueron de Invitro S.A. Medio RPMI-1640 sin rojo fenol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato disódico, fosfato monopotásico, Nonidet 40, SDS, Na₃VO₄, PMSF, NaF, cóctel cOmplete 25x, wortmanina, genistéina, cristal violeta, azul de coomasie, EDTA, metanol, glicina, Tris- Base, NaOH, glutaraldehído, ácido acético, beta-mercaptoetanol, azul de bromofenol, glicerol, MTT, persulfato de amonio, TEMED, Tween-20, Clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida (metformina) fueron de Sigma Aldrich. Bortezomib fue de Sandoz. TNF- α humano recombinante de R&D Systems. Solución de acrilamida/bisacrilamida al 30% y Quick Start Bradford Protein Assay Dye Reagent de Biorad. Insulina humana recombinante de acción rápida de PiSA (100 IU/ml). 2-desoxi-D-glucosa tritiada (5-10 Ci/mmol) de Perkin Elmer Inc. Anticuerpos contra IR- β (sc-81465), pIR- β (Tyr 1162-1163) (sc-25103-3), LKB1 (sc-8185), LKB1 Ser 428 (sc-32245), Akt-1 (sc-1618-R), pAkt Ser 473 (sc-81433), pAkt Ser 473 (sc-514032), p70S6K (sc-8418), pp70S6K (Thr 389) (sc-8416), Akt-2 (sc-81148), Erk (sc-271269), pp38 (Tyr 182) (sc-166182), p38 (sc-7972), p65 (sc-372) y β - actina (sc-47778) eran de Santa Cruz Biotechnology. Anticuerpo contra pAkt-1 Ser 473 (#9018), pAkt-2 Ser 474 (#8599) y Akt-3 (#14982),

pp65 (Ser 536) (#93H1) y pErk (Thr 202-Tyr 204) (#4370) de Cell Signaling Technology. Anticuerpo IKB- α (610690) de BD Transduction Laboratory. Anticuerpos secundarios contra ratón y conejo de Invitrogen-Thermo Fisher Scientific. Oligos para RT-PCR fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT).

5.6 Protocolos de Reducción de Suero Fetal Bovino

Fueron probados un protocolo sin reducción de SFB y dos con reducción de SFB. El protocolo 1 fue de acuerdo con lo informado por Arellano-Plancarte *et al* (2010), en donde las células se sembraron con medio RPMI-1640 con 10% de SFB durante 24 hrs, luego el cambio se realizó con medio RPMI-1640 con 2% de SFB durante 16 hrs, después de este tiempo el cambio se realizó con medio RPMI-1640 sin rojo fenol con 0% SFB durante 4 hrs antes de comenzar los experimentos. En el protocolo 2 las células se sembraron con medio RPMI-1640 con 10% de SFB durante 24 hrs, luego el cambio se realizó con medio RPMI-1640 con 8% de SFB durante 4 hrs, después de este tiempo el cambio se realizó con medio RPMI-1640 con 5% dejando 4 hrs, luego el cambio se realizó con medio RPMI-1640 con 2% de SFB durante 16 hrs, después de este tiempo el cambio se realizó con medio RPMI-1640 sin rojo fenol con 0% SFB durante 4 hrs antes de comenzar los experimentos.

5.7 Ensayos de Proliferación

Para las líneas MCF-7, DSG-BC1, DSG-BC2, BT-474, BT-474R, SKBR-3 y SKBR-3R, se sembraron 15 000 células/cm². Las líneas T47-D, ZR-75-30, MDA-MB -231, MDA-MB-468 y ECL-1 fueron sembradas a 10 000 células/cm². Después del proceso de reducción de SFB, el medio se reemplazó con medio RPMI-1640 sin rojo fenol suplementado con 10% SFB, 5% SFB o 5% de suero humano. Para las pruebas con las fracciones de sueros ultracentrifugados el medio fue suplementado con 5% del sobrenadante o 5% del pellet resuspendido, en ambos casos esta dilución fue equivalente a un promedio de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (± 0.5) de proteína. En la curva dosis respuesta de metformina, además de la suplementación con los diferentes tipos de suero se adicionó 5, 10, 20 o 40 mM del fármaco. Realizado el cambio con los diferentes estímulos se dejó el ensayo durante 48 hrs. Pasado este tiempo las células se fijaron con medio DMEM al 1% SFB-2% de glutaraldehído durante 15 min, luego se tiñeron con cristal violeta al 0.5% durante 15 min. El tinte absorbido

por las células fijadas se disolvió en ácido acético al 10% y su densidad óptica se determinó a 595 nm (OD595) en placas de 96 pozos en un lector Skan It RE.

5.8 Electroforesis SDS-PAGE de Sueros ultracentrifugados

Después de la ultracentrifugación se realizó una dilución seriada de las fracciones obtenidas y sus respectivos inputs iniciando con una dilución de 1:40 hasta una dilución 1:320. Posteriormente se midió la concentración proteica de las muestras por el método de Bradford (reactivo de colorante de ensayo de proteína de Biorad). Las muestras en concentración de 30 µg de proteína fueron sometidas a electroforesis en geles SDS-PAGE de acrilamida al 12%. Posteriormente, los geles fueron teñidos por el método de azul de Coomassie. Las imágenes se obtuvieron usando el fotodocumentador Fusion Fx de Vilber Lourmant.

5.9 Western Blot

Las células se sembraron en cajas de cultivo celular de 100 mm con la misma densidad celular descrita en el ensayo de proliferación y se sometieron al protocolo de reducción de SFB ya descrito. Después de la privación de suero, se añadió medio RPMI-1640 sin rojo fenol con 0.5 IU/ml de insulina durante 10 o 60 min, 5% de sueros humanos (eutróficos u obesos) durante 5, 10, 30 o 60 min (dependiendo de la prueba). En la prueba con las fracciones de sueros ultracentrifugados el medio se suplemento con 5% del sobrenadante o 5% del pellet-resuspendido, en la prueba con suero dislipidado o inactivado se empleó una dilución del 5%, respectivamente durante 10 min. Para el ensayo de inhibidores, las células se incubaron previamente durante 30 min con Genisteína 200 mM, Wortmanina 100 nM o Bortezomib 80 nM. En el ensayo con metformina se adicionó 5 mM del fármaco. Para la señalización de NF-κB se utilizaron 10 ng de TNF-α como control positivo de activación, durante 10 o 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se realizó la extracción de proteínas utilizando el tampón de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE de acrilamida al 8 o 12% y se transfirieron a membranas Immobilon-P PVDF de Merck Millipore en un sistema de transferencia húmeda. Las membranas transferidas se bloquearon durante 1 h con leche, después se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios:

Anticuerpo	Dilución	PM (kDa)
pIR ((Tyr 1162-1163)	1:500	95
IR total	1:1000	
LKB1 Ser 428	1:1000	52
LKB1 total	1:1000	
pAkt (Ser 473)	1:500	Akt-1 62 Akt-2 56 Akt-3 60
Akt total	1:10000	62
pp70S6K (Thr 389)	1:1000	70
p70S6K total	1:1000	
pAkt-1 (Ser 473)	1:1000	62
pAkt-2 (Ser 474)	1:1000	56
Akt-2 total	1:1000	
Akt-3 total	1:1000	60
pp65(Ser 536)	1:500	65
p65 total	1:2000	
IKK-α	1:2000	38
pErk 1/2 (Thr 202-Tyr 204)	1:2000	Erk-1 44 Erk-2 42
Erk total	1:1000	44
pp38 (Tyr 182)	1:500	38
pp38 total	1:500	
β-actina	1:2000	43

Posteriormente, los anticuerpos secundarios fueron incubados a temperatura ambiente durante 1 h. Las bandas fueron reveladas utilizando el kit Super Signal West Pico PLUS de Thermo Scientific. Las imágenes se obtuvieron usando el fotodocumentador Fusion Fx de Vilber Lourmant y la densitometría fue cuantificada por el programa Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EUA).

5.10 RT-PCR

Las células se sembraron como se describe en el ensayo de proliferación y se sometieron al protocolo de reducción de SFB descrito anteriormente. La estimulación con 5% de sueros humanos en RPMI-1640 sin rojo fenol se llevó a cabo durante 5, 10, 30 o 60 min. Después del tiempo de estimulación, se aisló el ARN total utilizando Tripure Isolation Reagent (Roche) y se cuantificó en el espectrofotómetro Skan It RE. La integridad del ARN se determinó mediante un gel desnaturante de formaldehído-agarosa. La transcripción inversa se realizó con el sistema de transcripción inversa M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) que duró 5 min a 70 °C y 45 min a 42 °C. La PCR se realizó utilizando el Hot Start Master Mix Kit en un termociclador Peltier Thermal Cycler-100 (MJ Research) comenzando

a 95 °C durante 15 min, seguido de 30 seg a 94 °C, 1 min a 52 °C y 1 min a 72 °C por ciclo, finalmente a 72 °C durante 10 min. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

Oligo	Secuencia	TM	# Ciclos	Amplicón
Akt-1 sentido	5'-TCAAGAATGATGGCACCTTCATTG-3'	52°	32	1008
Akt-1 antisentido	5'-CCTCCATGAGGATGAGCTCAAAA-3'			
Akt-2 sentido	5'-ATGAATGAGGTGTCTGTCATCAAAG-3'	52°	32	856
Akt-2 antisentido	5'-CTTTGTCCAGCATGAGGTTTT-3'			
Akt-3 sentido	5'-TTGTGAAAGAAGTTGGGTTTCAG-3'	52°	32	552
Akt-3 antisentido	5'-CTTCATCCTTTGCAATAATGACTTC-3'			
PPIA sentido	5'-GTTTACCCCTGATCGTGCAGCAG-3'	52°	32	475
PPIA antisentido	5'-CGAGTTGTCCACAGTCAGCAATG-3'			

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.5% en TAE, se empaparon con bromuro de etidio y se utilizó el marcador de pares de bases pUCmix. Las imágenes de los genes se obtuvieron utilizando un fotodocumentador Fusion Fx de Vilber Lourmat y las bandas se cuantificaron mediante el programa Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EE. UU.).

5.11 Formación de Esferoides

Fueron sembradas 50, 000 células en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, 5% de sueros humanos, 5% del sobrenadante de sueros humanos o 5% del pellet resuspendido de sueros humanos en microplacas Corning para esferoides ULA de 96 pozos y se dejó el cultivo durante 72 hrs. Pasado este tiempo se tomaron imágenes fotográficas. Para el ensayo de MTT, el medio fue reemplazado con medio RPMI-1640 sin rojo fenol con el reactivo de MTT como lo describe el fabricante y se incubó durante 4 hrs a 36 °C, posteriormente el medio fue eliminado y se adicionaron 100 µl de PBS y 100 µl de isopropanol. Se tomaron 100 µl de la solución anterior y su densidad óptica se determinó a 570 nm (OD570) en placas de 96 pocillos detectadas en un lector Skan It RE.

5.12 Ensayo de Migración

Las células MCF-7 transfectadas con GFP se sembraron en placas "Transwell" de 24 pozos a una densidad de 15 000 células/cm² y se sometieron al proceso de reducción de SFB descrito anteriormente. La prueba comenzó con el cambio del medio del fondo del pozo por medio RPMI-1640 sin rojo fenol suplementado con suero humano al 5% (eutrófico u obeso) o 5% del sobrenadante o pellet resuspendido de cada tipo de suero y el medio del inserto del pozo fue reemplazado por medio RPMI-1640 sin fenol rojo sin suplementación. El ensayo duró 48 hrs, después de ese tiempo, los pocillos de la placa con las células transfectadas con GFP que migraron se fotografiaron en un microscopio confocal Nikon A1R + STORM. El número de células migradas fue determinado utilizando el programa Fiji (NIH, Bethesda, Maryland, EE. UU.).

5.13 Captación de Glucosa

Las células MCF-7 se sometieron al mismo procedimiento de reducción de suero descrito anteriormente, excepto en el cambio de medio sin SFB, el medio RPMI-1640 fue sin rojo fenol y sin glucosa durante 4 hrs antes del ensayo. Posteriormente, el medio se reemplazó con medio DMEM bajo en glucosa sin rojo fenol suplementado con 6 µCi/ml de glucosa tritiada y con 1 IU/ml de insulina o 5% de sueros humanos (eutróficos u obesos) o 5% del sobrenadante o pellet resuspendido de cada suero durante 60 min. Después del tiempo de estimulación, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. El PBS se reemplazó por una solución de hidróxido de sodio 0.2 N y se incubó durante la noche a 37 °C. El lisado con marca radiactiva se disolvió en líquido de centelleo y se leyó en un contador de centelleo Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR Packard.

5.14 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una o dos vías o ANOVA de muestras repetidas con Dunnet, DMS, Games-Howell como pruebas Post-hoc utilizando SPSS, versión 25 (Armonk, NY: IBM Corp.). Considerando una p <0.05 como significativo. El cálculo de IC50 se realizó por medio del método PROBIT.

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de las condiciones óptimas de cultivo celular en presencia de sueros humanos

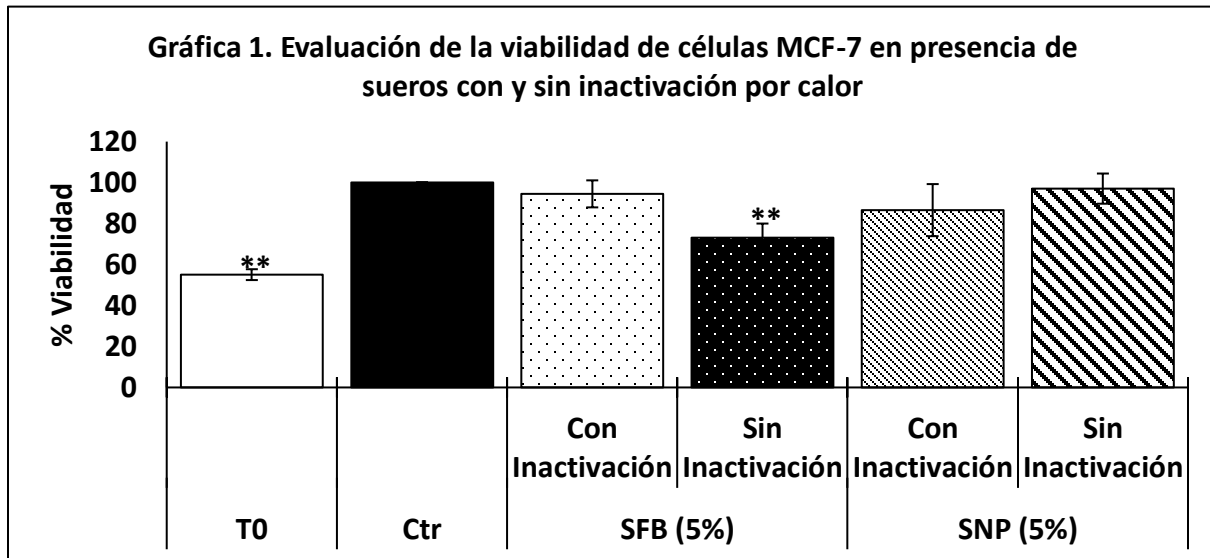
El concepto del uso de líneas de cáncer de mama humano como biosensores de cambio en los componentes séricos de mujeres normopeso ($IMC \leq 25 \text{ Kg/m}^2$) vs con obesidad ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) es novedoso. Por tal motivo no existía información sobre las condiciones adecuadas para llevar a cabo esta comparación, por lo anterior se realizó la estandarización de las condiciones óptimas de cultivo para realizar los ensayos con sueros humanos. La estandarización se realizó utilizando el suero de una mujer normopeso premenopáusica (SNP).

6.1.1. Evaluación de la viabilidad de células MCF-7 en presencia de suero con y sin inactivación por calor

Tradicionalmente el cultivo de células de mamíferos, incluyendo las células humanas emplean sueros animales “inactivados por calor”. Dado que la mayoría de los sueros empleados son heterólogos con respecto a las líneas celulares humanas que se utilizan para la investigación es necesario inactivar al sistema del complemento presente en estos sueros. El tratamiento con calor ($56 \text{ }^\circ\text{C}$) por 30 min inactiva al factor 8 del sistema del complemento presente en el suero, eliminando su potencial efecto tóxico (Anderson & Anderson, 2002). Dado que este protocolo se basa en la adición de sueros humanos al cultivo de células humanas de cáncer de mama fue necesario determinar el potencial efecto tóxico de la presencia del sistema del complemento. Al no existir información sobre el uso de suero humano en cultivo celular y considerando la presencia de moléculas termosensibles que pudieran presentar un efecto sobre la viabilidad y la señalización celular, el primer paso fue determinar el efecto del suero humano con y sin inactivación del sistema de complemento sobre la viabilidad celular.

Como muestra la Gráfica 1, la suplementación con 5% SFB sin inactivación tuvo una reducción en la viabilidad celular del 27% respecto al control (Ctr), mientras que bajo la suplementación con suero SNP no hubo cambios estadísticamente significativos respecto a Ctr. Considerando la viabilidad de Ctr como 100%, la viabilidad observada con suero SNP con inactivación fue de 86.54% y 97% con suero SNP sin inactivación. En base a los resultados anteriores, para los ensayos

posteriores se decidió utilizar 5% de SFB inactivado y 5% de suero SNP sin inactivación para conservar moléculas termosensibles.

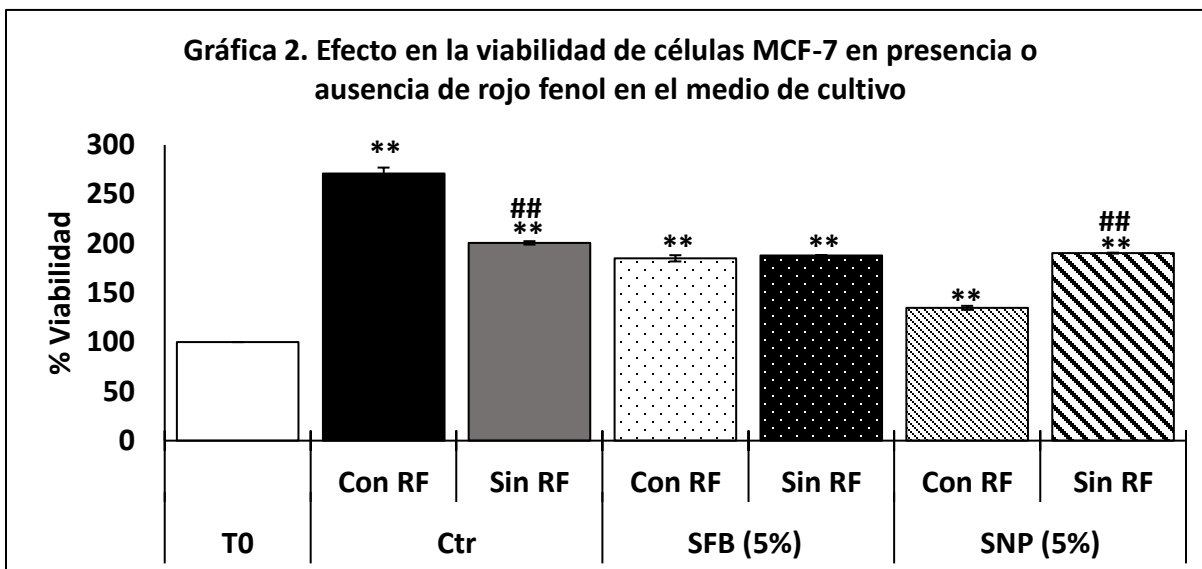


* Comparación vs Ctr. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr=control, SFB=suero fetal bovino, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

6.1.2. Efecto de la presencia de rojo de fenol sobre la viabilidad bajo la suplementación de suero humano

Considerando que el rojo de fenol presente en los medios de cultivo es utilizado como indicador de pH y mimetiza al estradiol uniéndose a su receptor, decidimos evaluar la viabilidad en presencia o ausencia de rojo de fenol en la suplementación con sueros humanos. Para este ensayo evaluamos la viabilidad de la línea MCF-7 en medio RPMI con o sin rojo de fenol (RF) bajo las diferentes suplementaciones, considerando el número de células a T0 como el 100%.

La Gráfica 2 muestra que bajo la suplementación de 10% SFB (Ctr) hubo un incremento del 70% en la viabilidad en presencia de RF respecto a la ausencia de RF. Mientras en la suplementación con 5% SFB no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las dos condiciones (184.9% con RF y 187.8% sin RF). Por otro lado, bajo la suplementación con 5% SNP en ausencia de RF hubo un aumento de 55% en la viabilidad respecto a la presencia de RF. Por otra parte, la viabilidad bajo la suplementación con suero SNP en ausencia de RF fue similar a la observada en la suplementación con 5 y 10% de SFB en ausencia de RF, en base a lo anterior se decidió utilizar medio sin RF en los ensayos posteriores.

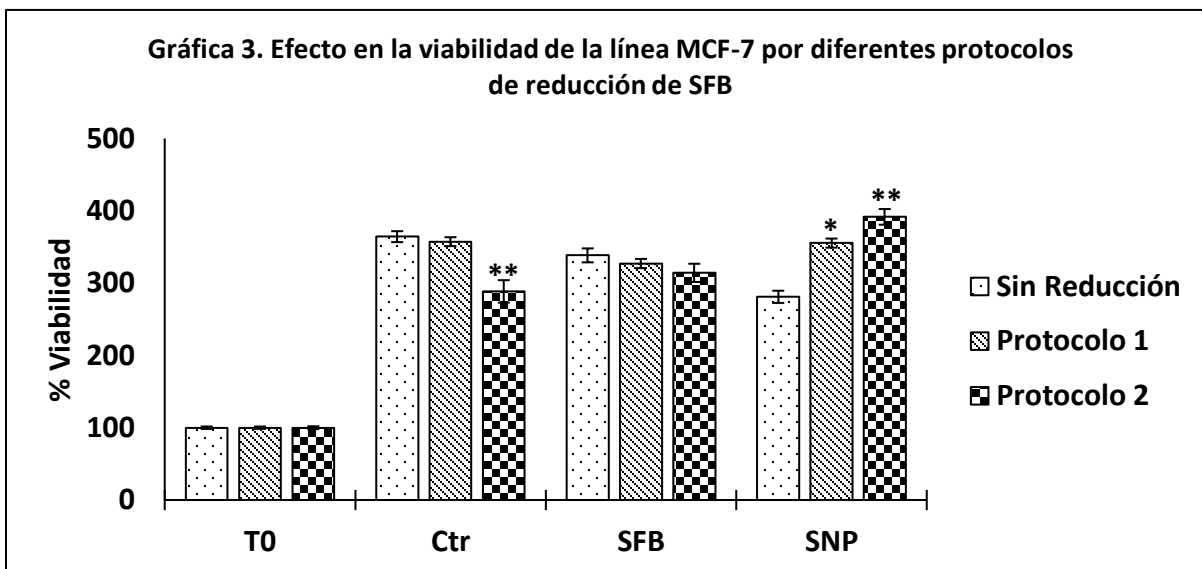


* Comparación vs T0, ## vs Con RF misma suplementación. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr=control, SFB=suero fetal bovino, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

6.1.3. Evaluación de protocolos de reducción de suero fetal bovino sobre la viabilidad de células MCF-7

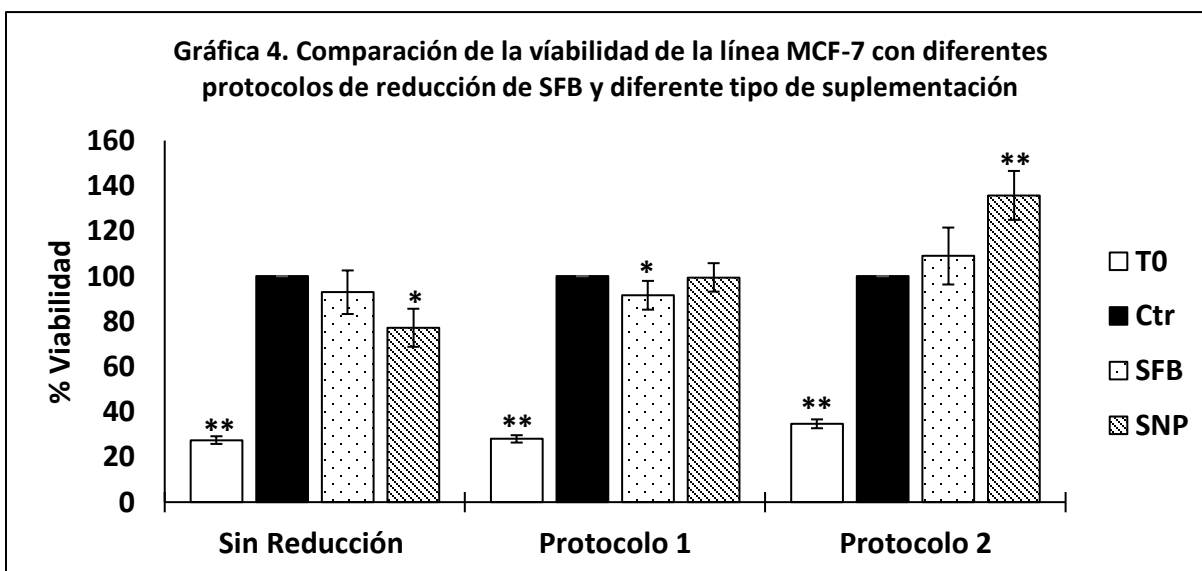
Bajo la premisa de utilizar a la célula tumoral como un biosensor de cambio en los componentes séricos, se planteó la idea de disminuir el estado de fosforilación basal de célula tumoral para así poder evaluar la respuesta a la suplementación con suero humano. Por tal motivo se evaluaron dos protocolos de reducción de SFB (descritos en materiales y métodos) en comparación a la condición estándar de cultivo sin reducción de SFB, iniciando con la evaluación de la viabilidad celular.

En la gráfica 3, utilizando el número de células a T0 como el 100%, se observa que el protocolo 2 de reducción de SFB (P2) presentó una menor tasa de viabilidad en Ctr en comparación con el protocolo sin reducción de SFB (SR) y el protocolo 1 de reducción de SFB (P1) (76 y 68%, respectivamente). En la suplementación con 5% SFB no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres protocolos (338%, 327% y 314%, respectivamente). Mientras en la suplementación con 5% SNP, el protocolo SR presentó menor tasa de viabilidad en comparación con los protocolos 1 y 2 (74 y 110%, respectivamente). Los resultados anteriores demostraron que la reducción de SFB independiente del protocolo resulta en un aumento de la viabilidad.



* Comparación vs Sin reducción. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr=control, SFB=suero fetal bovino, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

Al comparar las diferentes suplementaciones (10% de SFB, 5% SFB y 5% SNP) de un mismo procedimiento de reducción de SFB, en la Gráfica 4 se observa que en el protocolo sin reducción (SR) hubo una disminución en la viabilidad del 23% bajo la estimulación con 5% SNP respecto a Ctr. Para el protocolo 1 se observó una disminución en la viabilidad del 8% bajo la suplementación con 5% SFB respecto a Ctr. Finalmente, en el protocolo 2, la suplementación con 5% SNP indujo un aumento en la viabilidad del 35% en comparación a Ctr.



* Comparación vs Ctr mismo protocolo de reducción. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr=control, SFB=suero fetal bovino, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

6.1.4. Evaluación de protocolos de reducción de suero fetal bovino sobre la fosforilación de Akt en células MCF-7

Posteriormente evaluamos el estado de fosforilación de Akt en células sometidas a los dos protocolos de reducción de SFB considerando como punto de partida la fosforilación de Akt sin estímulo (T0, con valor de 1) de cada protocolo de ayuno.

Como se observa en la Figura 14 y la gráfica 5 el protocolo 1 presentó mayor incremento en pAkt (1 vez) en comparación al protocolo 2 cuando las células fueron estimuladas con Ins. Por otra parte, cuando las células fueron estimuladas con suero SNP, en ambos protocolos hubo una reducción en pAkt, pero fue mayor en el protocolo 2 con una reducción de 0.31 veces (SNP-Ayuno 2) en comparación con SNP-Ayuno 1.

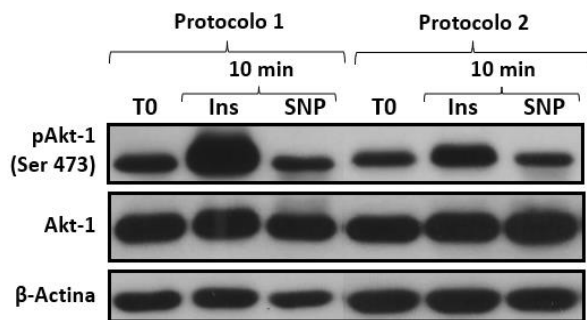
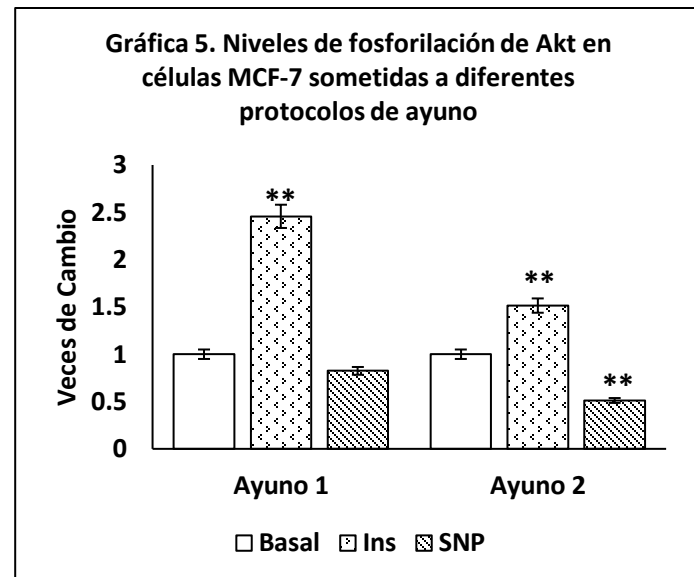


Figura 14. Western Blot de Akt en células MCF-7 sometidas a diferentes protocolos de reducción de SFB. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina y 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 mismo ayuno. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$.

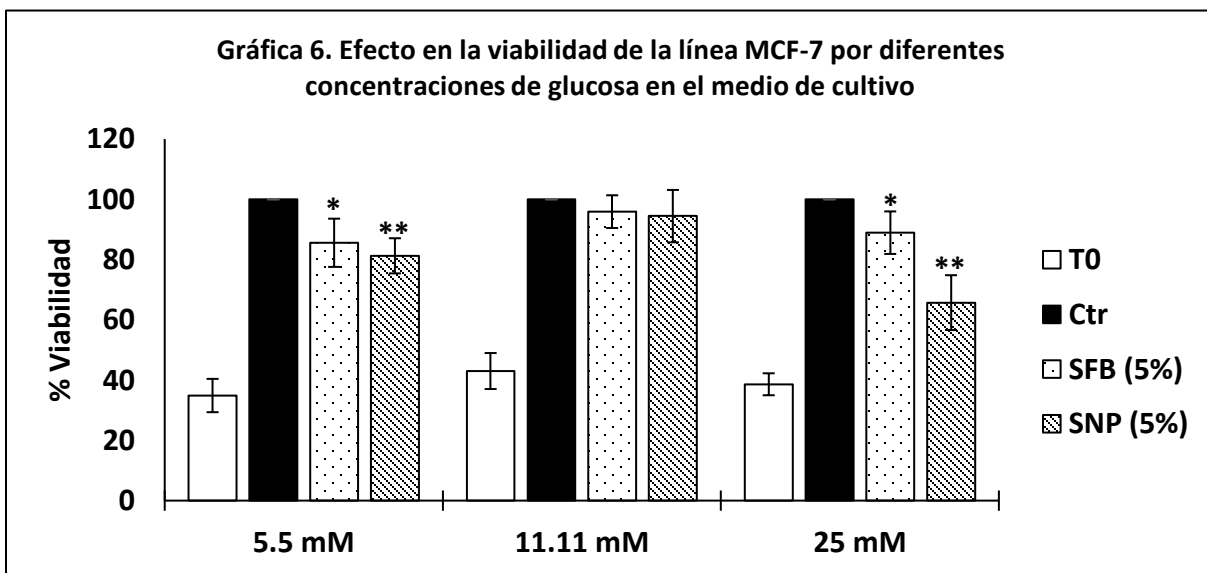
Ins=Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

Con los resultados anteriores se decidió utilizar el protocolo 1 de reducción de SFB para el resto de los experimentos, debido a que no presentó diferencias significativas en la viabilidad bajo las diferentes suplementaciones y permitió observar mayores incrementos en la fosforilación de Akt bajo los diferentes estímulos, tanto con insulina como SNP.

6.1.5. Efecto de la concentración de glucosa sobre la viabilidad de células MCF-7 en respuesta a diferentes tipos de suplementación

Se ha reportado que la presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo puede afectar la respuesta de las células tumorales a la presencia de metformina (Nasir *et al*, 2019). Además, desconocíamos el efecto de la concentración de glucosa bajo la suplementación con sueros humanos, por lo que decidimos evaluar el efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre la viabilidad celular. Considerando los medios de cultivo estándar para el cultivo de las diferentes líneas de cáncer de mama (MEM, RPMI y DMEM), utilizamos 5.5 mM, 11.11 mM y 25 mM de glucosa en el medio de cultivo.

En la Gráfica 6 se observa que bajo una concentración de glucosa de 5.5 y 25 mM, la suplementación con 5% SFB tuvo una reducción en la viabilidad de 14 y 11% en comparación a su respectivo Ctr. Mientras bajo la suplementación con 5% SNP, en concentraciones de glucosa de 5.5 y 25 mM de glucosa, hubo una reducción en la viabilidad de 18 y 34% en comparación a su respectivo Ctr. En base a los resultados anteriores, la concentración de glucosa de 11.11 mM fue la óptima para realizar los ensayos con suero humano.



* Comparación vs T0 misma concentración de glucosa. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr=control, SFB=suero fetal bovino, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

6.2. Determinación de los Biosensores Celulares de Cáncer de Mama para la evaluación de sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad (Selección del Biosensor)

Tomando en consideración que el tratamiento con metformina ha sido asociado a un efecto protector contra el desarrollo de cáncer de mama, el uso de la célula tumoral como biosensor se planteó para evaluar los cambios en la concentración de moléculas séricas que son reguladas por el tratamiento con metformina. Por lo que después del establecimiento de las condiciones óptimas para llevar a cabo los experimentos con sueros humanos, se procedió a determinar cuáles líneas celulares de los diferentes subtipos de cáncer de mama podrían ser utilizadas en cultivo con suero humano.

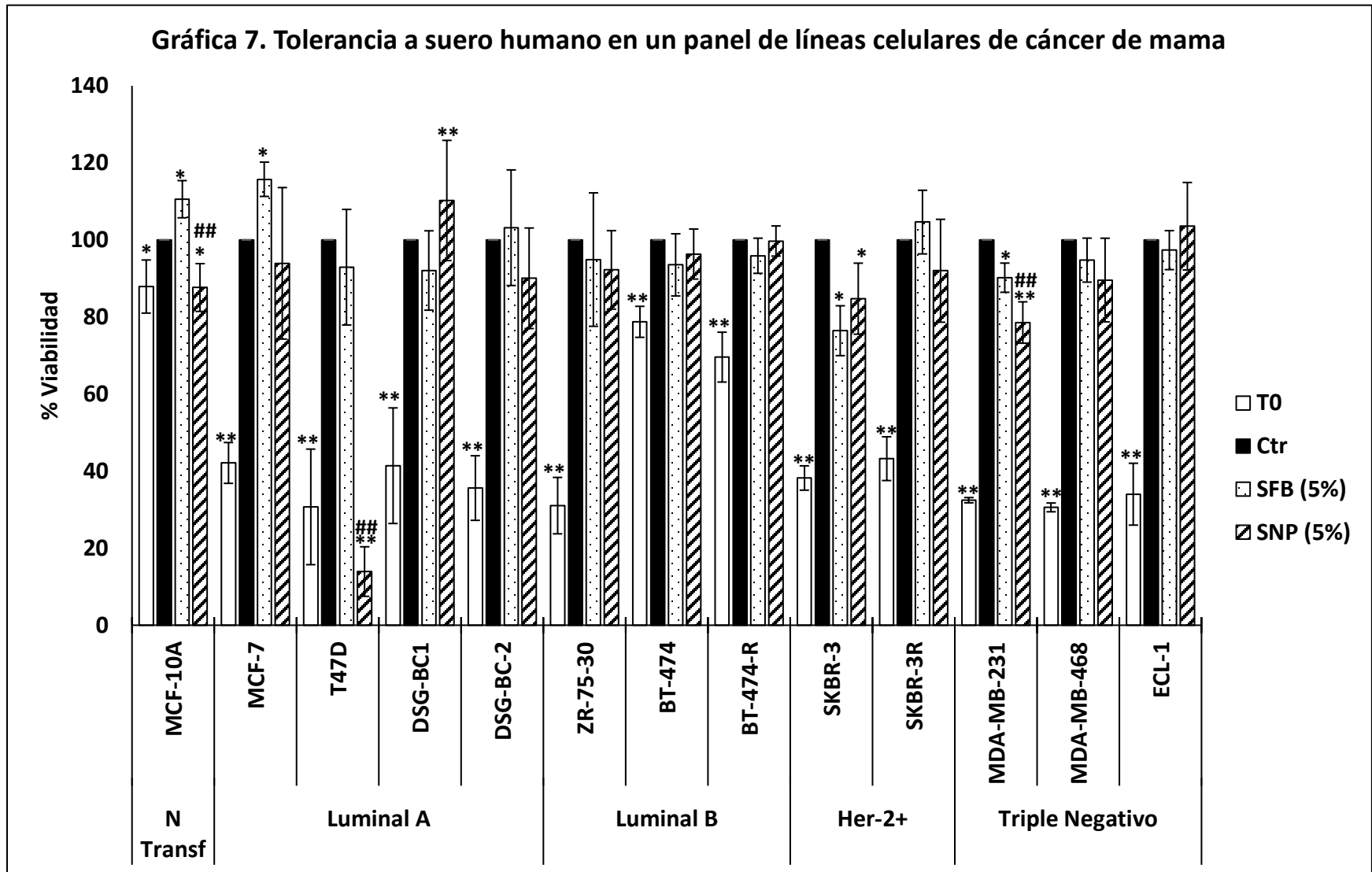
Los criterios evaluados para la elección de los biosensores celulares fueron: tolerancia al suero humano sin inactivar, IC50 de metformina bajo suplementación de suero humano, evaluación de cambios en el estado de fosforilación de la vía de la insulina e inhibición de la vía Akt/p70S6K por metformina.

6.2.1. Determinación de la tolerancia a suero humano sin inactivar en un panel de líneas celulares de cáncer de mama

Previamente habíamos determinado el uso de suero humano sin inactivación del sistema del complemento, sin embargo, desconocíamos si todas las líneas de cáncer de mama presentaban la misma respuesta, por lo que evaluamos la tolerancia a la suplementación con suero humano sin inactivación.

En la Gráfica 7 se observa que la mayoría de las líneas de cáncer de mama que conformaron nuestro panel fueron tolerantes al suero humano sin inactivación (SNP), excepto la línea T47D que tuvo una reducción en la viabilidad del 86% respecto a Ctr. Mientras las líneas MCF-10A, SKBR3 y MDA-MB-231 presentaron una reducción en la viabilidad del 12-21% respecto a Ctr. Contrario al efecto que tuvo la línea DSG-BC1 que aumento la viabilidad 10%. Con los datos anteriores la línea T47D fue descartada como posible biosensor por presentar baja viabilidad en respuesta a suero humano sin inactivación.

Gráfica 7. Tolerancia a suero humano en un panel de líneas celulares de cáncer de mama



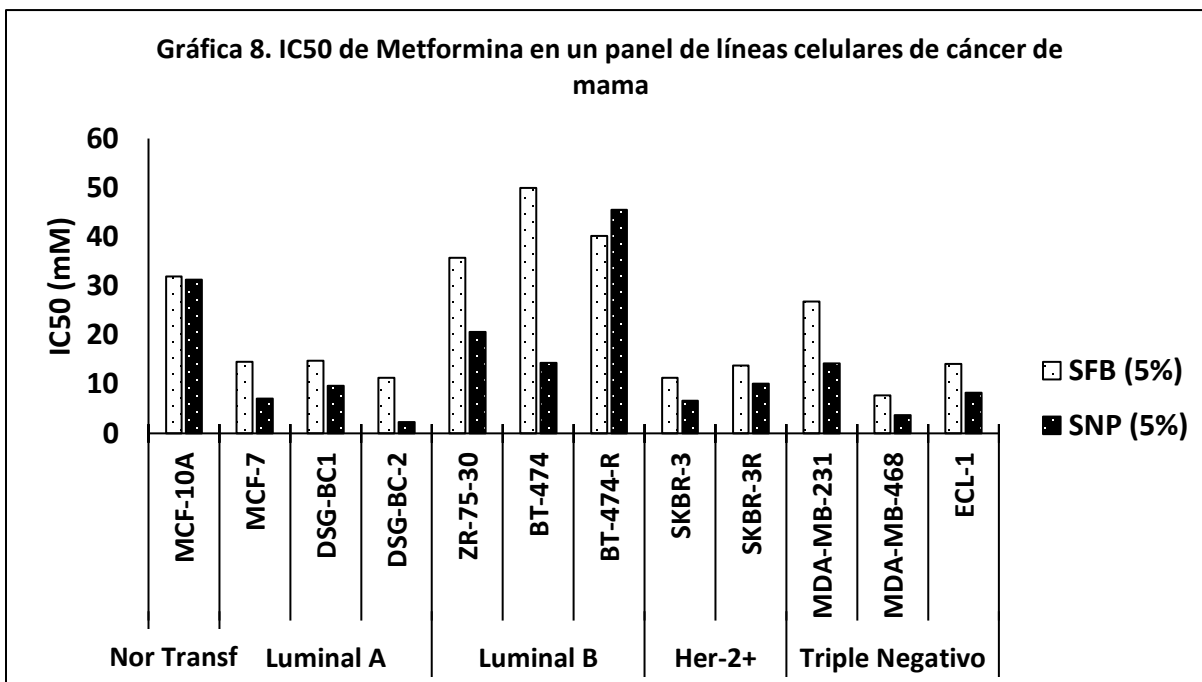
* Comparación vs Ctr de cada línea, # vs SFB. * p < 0.05, ** p < 0.005. Ctr=control, SFB=suero fetal bovino, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

6.2.2. Determinación de la IC50 de metformina en un panel de líneas celulares de cáncer de mama

En estudios donde han evaluado el efecto antitumoral de metformina reportan una concentración biodisponible del fármaco menor a 5 mM. Por lo que determinamos la IC50 del fármaco que presentan las diferentes líneas de cáncer de mama. Esto nos permitiría discriminar si el efecto observado era consecuencia de los cambios metabólicos producidos por el tratamiento con el fármaco o eran resultado de la presencia de metformina en el suero, cuando analizamos los sueros de pacientes que recibieron tratamiento con metformina por 10 semanas (Gráfica 29).

Como se observa en la Tabla 8 y Gráfica 8, la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama que conformaron nuestro panel, en presencia de 5% SNP presentaron una IC50 de metformina más baja en comparación a la suplementación con 5% SFB. Excepto en la línea MCF-10A que presentó un IC50 similar en ambas suplementaciones (31.9 mM y 31.2 mM) y en la línea BT-474R que tuvo una IC50 más alta en presencia de suero SNP (45.5 mM). Mientras las líneas DSG-BC2, SKBR3 y MDA-MB-468 fueron descartadas por presentar valores de IC50 menores o muy cercanos a 5 mM (9.6 mM, 6.6 mM y 3.6 mM, respectivamente).

Tabla 8. IC50 de Metformina en un panel de líneas celulares de Cáncer de Mama					
Subtipo Molecular	Línea Celular	IC50 SFB (mM)	IC50 SNP (mM)	IC50 Promedio SFB (mM)	IC50 Promedio SNP (mM)
Luminal A	MCF-7	14.58	7.1	13.5	6.3
	DSG-BC-1	14.75	9.64		
	DSG-BC-2	11.29	2.31		
Luminal B	ZR-75-30	35.7	20.66	41.94	26.86
	BT-474	50	14.38		
	BT-474R	40.13	45.55		
Her-2+	SKBR-3	11.27	6.64	12.52	8.36
	SKBR-3R	13.77	10.09		
Triple Negativo	MDA-MB-231	26.8	14.21	16.1	8.7
	MDA-MB-468	7.69	3.68		
	ECL-1	14.1	8.26		



Ctr=control, SFB=suero fetal bovino, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica

Además, se observa que el subtipo luminal B fue más resistente a metformina al presentar una IC50 promedio de 41.94 mM bajo suplementación con SFB y 26.86 mM en presencia de SNP. Mientras el subtipo luminal A fue más sensible a metformina, ya que presentó una IC50 promedio de 13.5 mM con SFB y 6.35 mM con SNP.

6.2.3. Evaluación de los niveles de fosforilación de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K por estimulación con suero humano y metformina

Posteriormente se evaluaron los niveles de fosforilación de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en las líneas que no habían sido descartadas como posibles biosensores. La elección se basó en la activación por estimulación con insulina (Ins) como control positivo y con suero SNP. También se consideró la activación de LKB1 e inhibición de la señalización de Akt/p70S6K por exposición a metformina en ausencia de estimulación con insulina. El estado de fosforilación de todos los elementos de la vía de señalización y el total de cada elemento se evaluó a los 10 min de estimulación comparándolos con el estado de fosforilación antes del estímulo (T0).

En la Figura 15 y Gráfica 9 se observa que en la línea MCF-10A bajo estimulación con Ins hubo un aumento de 0.7 veces en fosfo receptor de insulina (pIR) y 1.4 veces en pAkt en comparación con T0. Sin embargo, bajo la misma estimulación con insulina, pLKB1 presentó una reducción de 0.48 veces respecto a T0. En la estimulación con SNP se observa un aparente aumento en la fosforilación de pIR (Gráfica 9 y Figura 15 tercer carril; SNP) sin embargo, una vez normalizado contra IR total hubo una reducción de 0.56 veces en pIR. Contrario al aumento de 1.35 veces en pLKB1 en comparación a T0 bajo estimulación con SNP. Bajo el estímulo con metformina (Metf) hubo un incremento de 0.35 veces en pIR y 0.4 veces en pAkt, mientras pLKB1 tuvo una reducción de 0.18 veces y pp70S6K de 0.22 veces respecto a T0. Aunque la línea MCF-10A tuvo una respuesta favorable a la estimulación con Ins, fue descartada como biosensor por no presentar una activación de la vía bajo el estímulo con SNP y al presentar un aumento en la activación de la señalización por el estímulo con metformina.

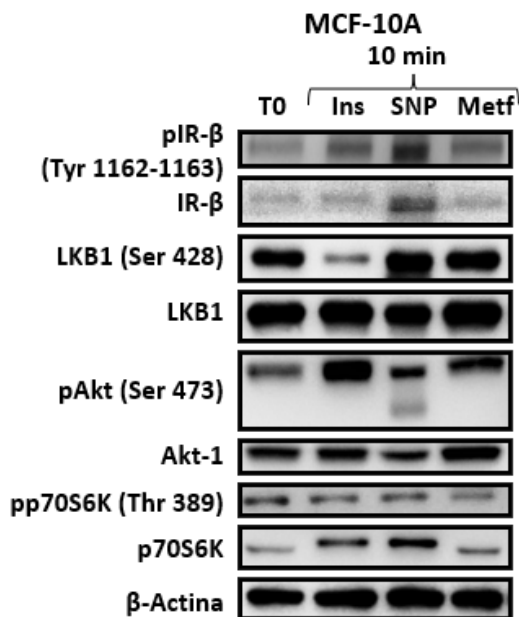
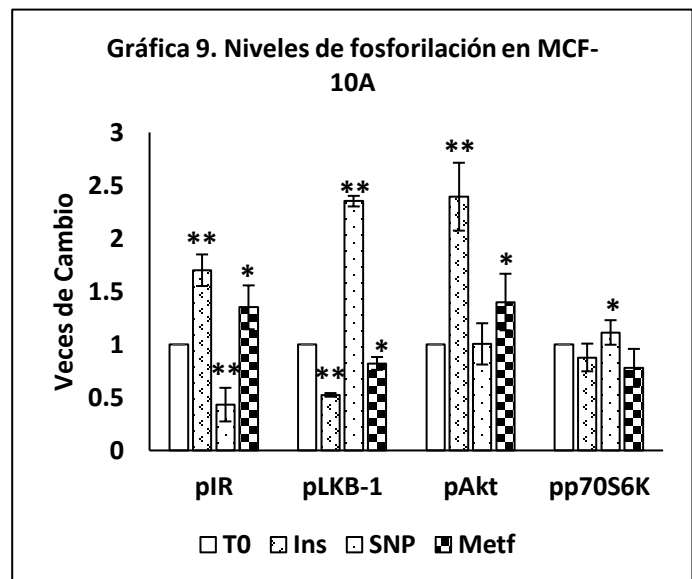


Figura 15. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células MCF-10A. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

Para la línea MCF-7 se observó un aumento en la fosforilación de todos los elementos analizados en respuesta a Ins. En donde se presentó un aumento de 1.3 veces en pIR, 0.68 veces en pLKB1, 1 vez en pAkt y 0.8 veces en pp70S6K bajo estimulación con Ins en comparación a T0. Al estimular con SNP, pIR incrementó 0.6 veces, 0.7 veces en pLKB1 y 0.2 veces en pp70S6K respecto a T0. Bajo estimulación con metformina, pIR presentó un decremento de 0.31 veces y 0.33 veces en pAkt, mientras pp70S6K tuvo un aumento de 0.36 veces respecto a T0. En base a los resultados anteriores esta línea fue elegida como posible biosensor, al presentar una activación de la vía por estimulación con Ins y SNP, y por presentar inhibición de la señalización bajo exposición a metformina (Figura 16 y Gráfica 10).

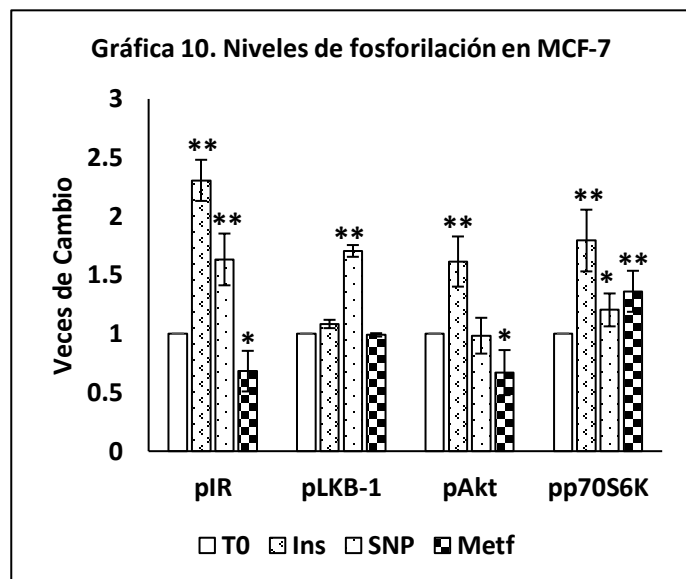
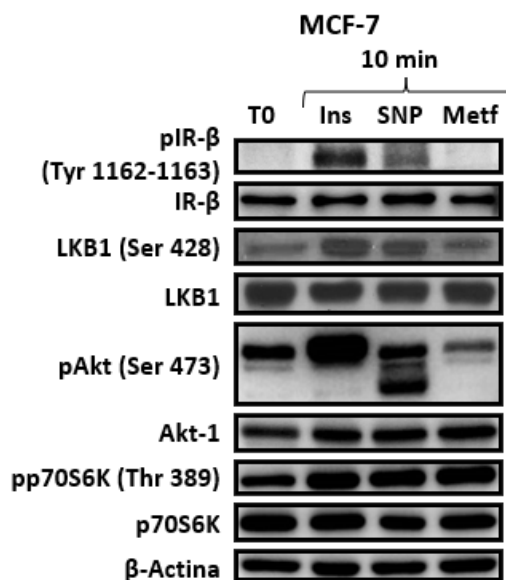


Figura 16. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células MCF-7. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.

* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

En la línea DSG-BC1 (Figura 17 y Gráfica 11) la estimulación con Ins generó un incremento de 0.5 veces en pLKB1 y 0.2 veces en pp70S6K en comparación con T0. En la estimulación con SNP hubo un incremento de 4.2 veces en pLKB1 y 0.5 veces en pp70S6K. Por otra parte, bajo estimulación con metformina hubo un aumento de 0.62 veces en pIR, 4 veces en pLKB1, además de una disminución de

0.12 veces en pAkt respecto a T0. Por lo anterior, esta línea se descartó como posible biosensor al presentar un incremento en la fosforilación de pLKB1 en todas las estimuciones pese al incremento en la señalización de la vía de estudio. Además de la falta de caracterización profunda de esta línea celular.

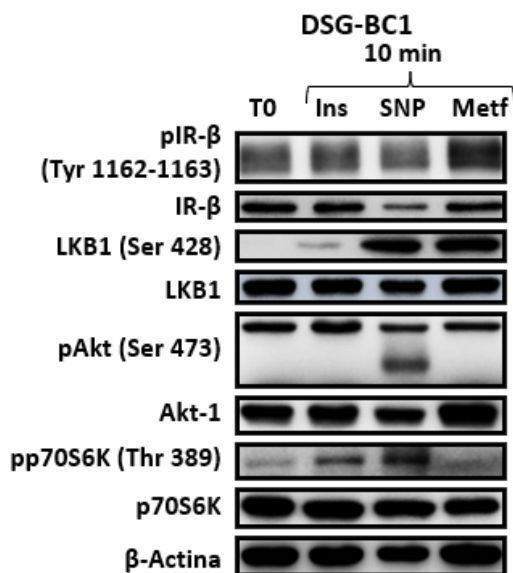
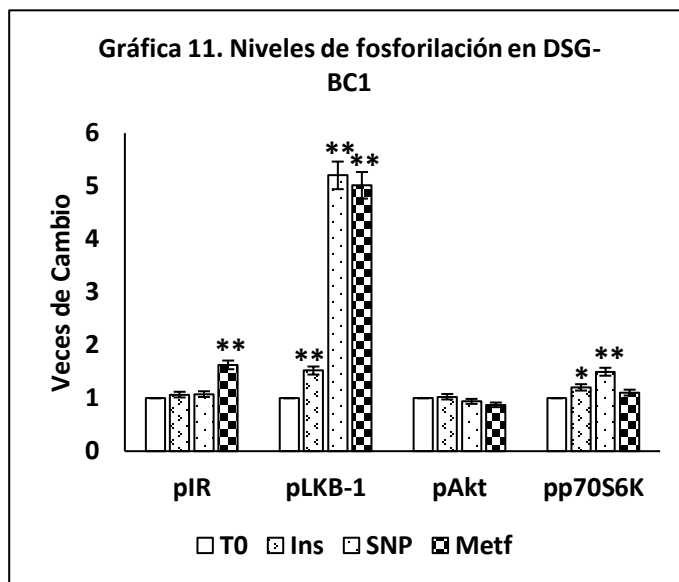


Figura 17. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células DSG-BC1. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

Para la línea ZR-75-30 (Figura 18 y Gráfica 12) se presentó un aumento de 1.14 veces en pIR, 0.2 veces en pLKB1, 0.94 veces en pAkt y 0.6 veces en pp70S6K bajo estimulación con Ins en comparación con T0. Con estimulación con SNP, hubo un incremento de 0.47 veces en pIR y 0.4 veces en pAkt, mientras pLKB1 tuvo una reducción de 0.12 veces respecto a T0. Bajo estimulación con metformina se incrementó 0.35 veces pIR y 0.22 veces pp70S6K en comparación a T0. Pese al incremento en la fosforilación de IR y p70S6K bajo estímulo con metformina, esta línea fue considerada como un posible biosensor debido a que presentó una adecuada activación de la vía bajo estimulación con Ins y SNP.

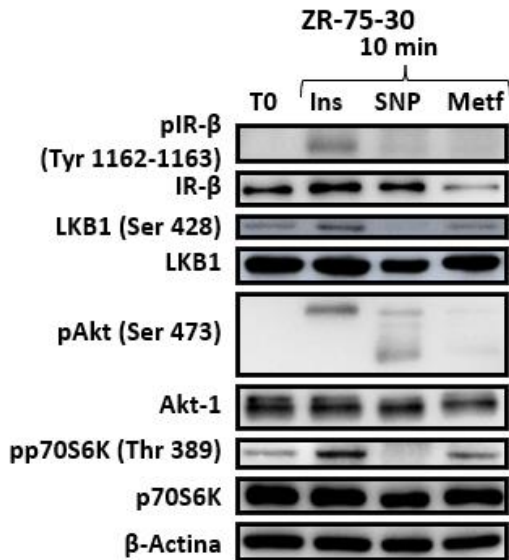
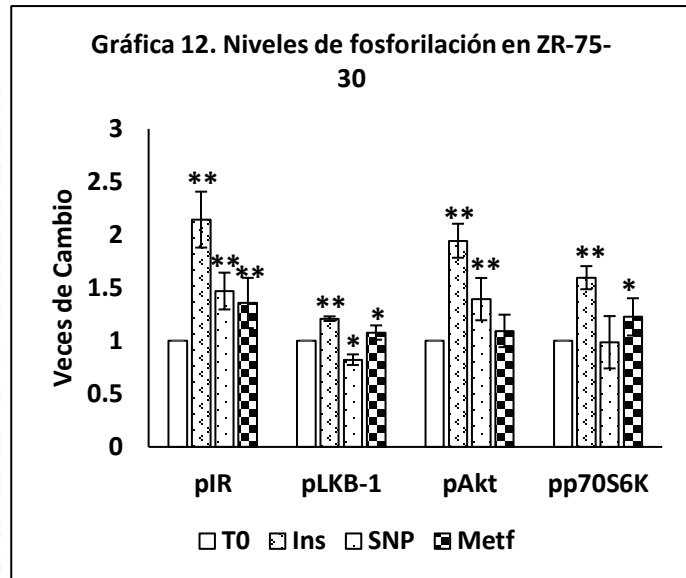


Figura 18. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células ZR-75-30. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

La Figura 19 y Gráfica 13 muestran los resultados de la línea BT-474, en donde bajo estimulación con Ins hubo un aumento de 0.77 veces en pLKB1 respecto a T0. Bajo estimulación con SNP, hubo una reducción de 0.46 veces en pIR, un aumento de 0.61 veces en pLKB1, 0.26 veces en pAkt y 1.3 veces en pp70S6k respecto a T0. Bajo estimulación con metformina hubo aumento de 0.78 veces en pLKB1, 0.91 veces en pAkt y 0.35 veces en pp70S6K en comparación a T0. En base a lo anterior, esta línea se descartó como biosensor ya que presentó un aumento en la señalización por estimulación con metformina.

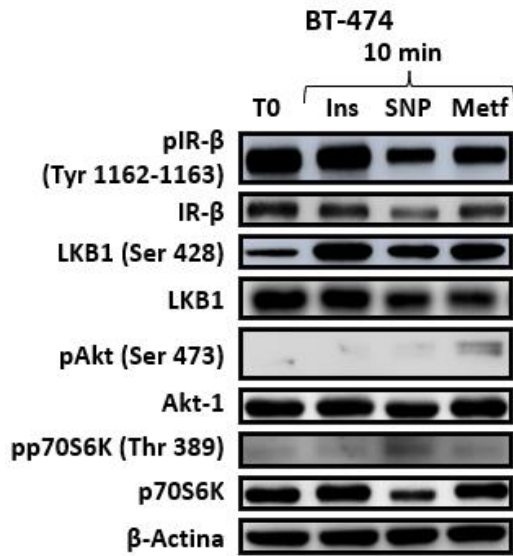
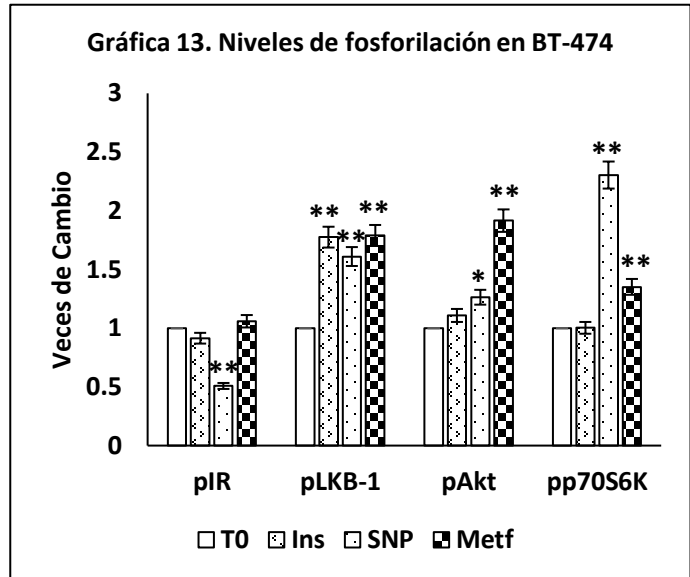


Figura 19. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células BT-474. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

En la línea BT-474R (resistente a Trastuzumab) (Figura 20 y Gráfica 14), la estimulación con Ins disminuyó 0.73 veces en pIR y 0.22 veces en pLKB1, pero aumento 0.46 veces en pp70S6k en comparación con T0. Bajo estimulación con SNP hubo una disminución de 0.74 veces en pIR, 0.29 veces en pLKB1, 0.12 veces en pAkt y 0.13 veces en pp70S6K respecto a T0. En presencia de metformina hubo un decremento de 0.5 veces en pIR, 0.33 veces en pLKB1 y 0.2 veces en pp70S6K respecto a T0. Por los resultados anteriores, la línea fue descartada como biosensor, pues no presentó activación de la vía por estimulación con Ins ni por SNP.

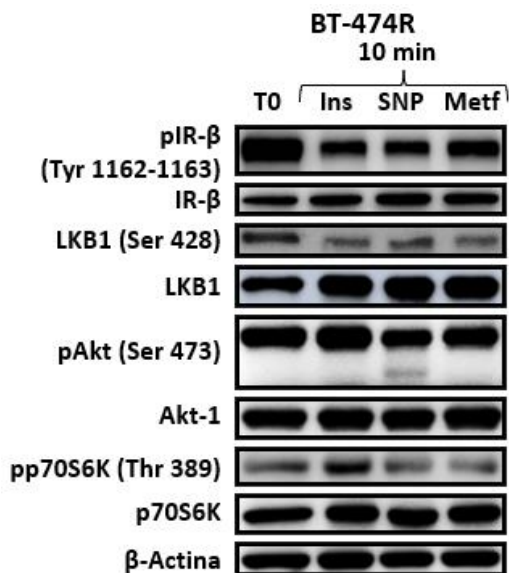
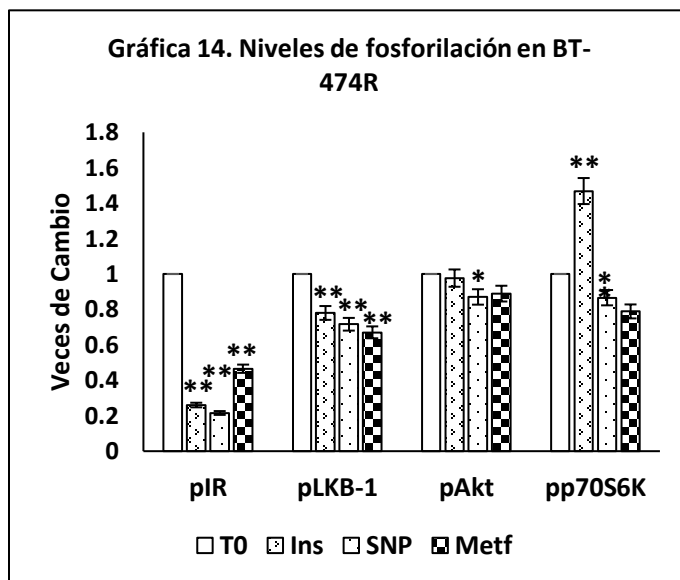


Figura 20. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células BT-474R. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

En la Figura 21 y Gráfica 15 se observa que la línea SKBR3R (resistente a Trastuzumab) tuvo un incremento en la fosforilación de 0.72 veces en pIR, 1.4 veces en pAkt y 1 vez en pp70S6K, mientras pLKB1 presentó un decremento de 0.19 veces respecto a T0. El estímulo con SNP presentó un incremento de 0.81 veces en pIR, 0.63 veces en pAkt y 0.22 veces en pp70S6K respecto a T0. Bajo el estímulo con metformina se presentó un aumento de 1.6 veces en pIR, 0.26 veces en pAkt y 0.45 veces en pp70S6K comparado con T0. Aunque esta línea presentó la activación de la vía de señalización por estímulo con Ins y SNP, fue descartada por el incremento en la señalización por estimulación con Metf y la falta de caracterización profunda.

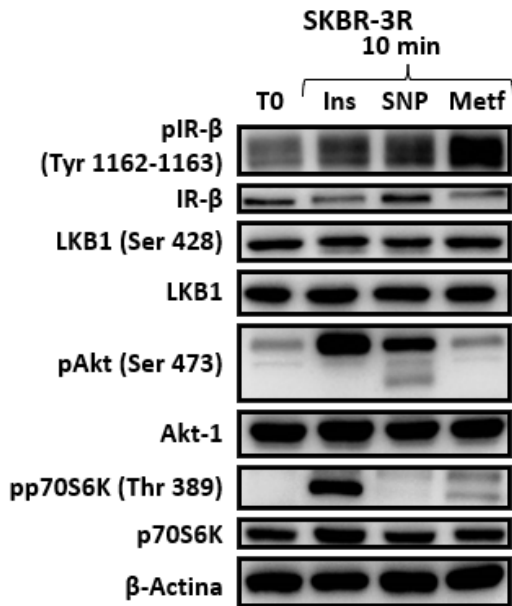
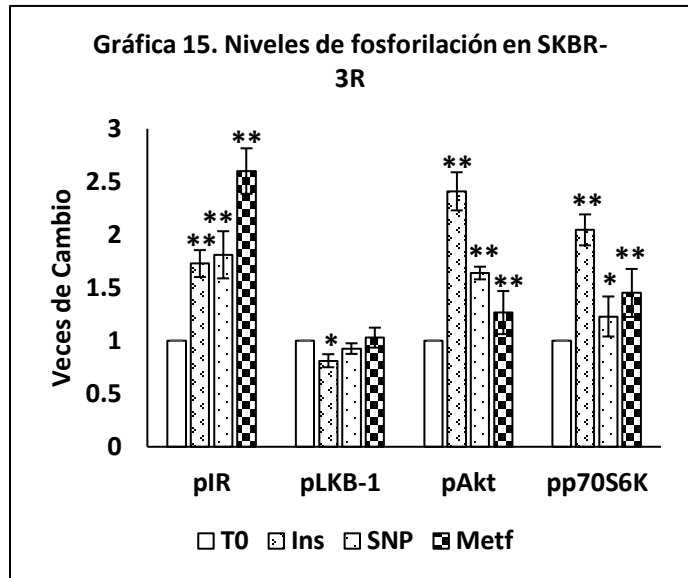


Figura 21. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células SKBR-3R. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

En la línea MDA-MB-231 (Figura 22 y Gráfica 16), la estimulación con Ins indujo un aumento de 0.44 veces en pIR, 0.24 veces en pLKB1, 0.98 en pAkt y 0.18 veces en pp70S6K en comparación a T0. Por estimulación con SNP hubo un aumento de 0.27 veces en pIR, 1 vez en pLKB1 y 0.29 veces en pAkt respecto a T0. Bajo la estimulación con metformina se presentó un incremento de 0.79 veces en pLKB1, pero hubo una reducción en pAkt de 0.12 veces. Por haber presentado una adecuada activación de la vía de señalización con estimulación con Ins y SNP, la línea MDA-MB-231 fue considerada como posible biosensor.

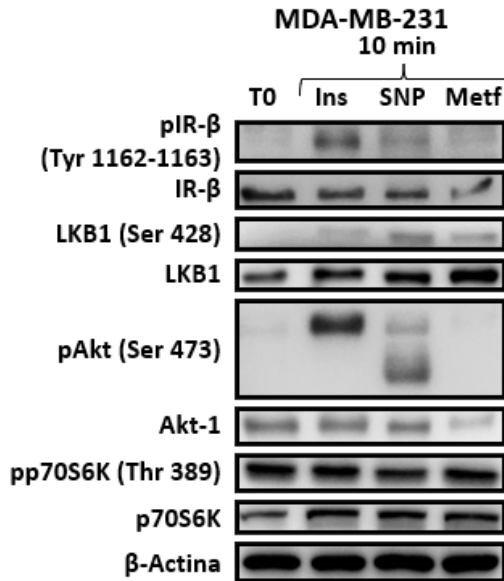
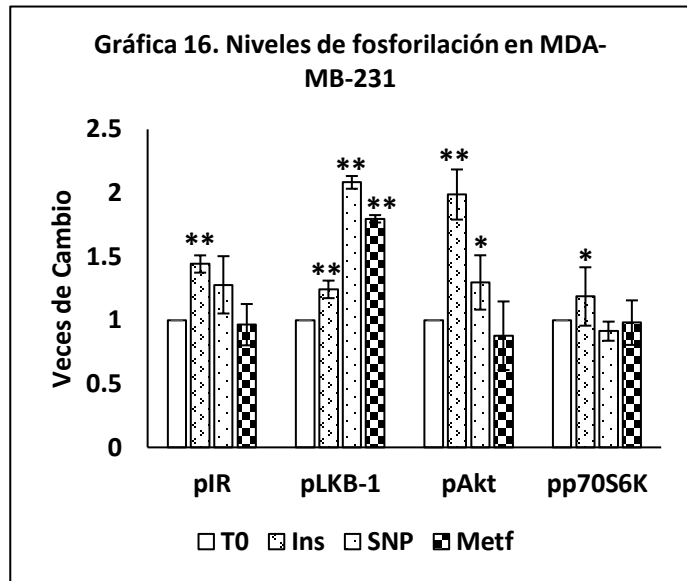


Figura 22. Western Blot de moléculas de la vía IR/LKB1/Akt/p70S6K en células MDA-MB-231. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p < 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

La Figura 23 y la Gráfica 17 muestran que en la línea ECL-1 por estimulación con Ins hubo un aumento de 1.4 veces en pIR, 0.4 veces en pLKB1, 0.58 veces en pAkt y 1.1 veces en pp70S6K respecto a T0. Bajo la estimulación con SNP hubo un incremento de 0.48 veces en pIR, 0.24 veces en pLKB1, 0.17 veces en pAkt y 0.35 veces en pp70S6K en comparación a T0. En la estimulación con metformina se presentó un aumento de 0.4 veces en pIR, 0.61 veces en pLKB1 y 0.21 veces en pp70S6K respecto a T0. Aunque la línea presentó una activación de la vía de señalización bajo el estímulo con In y SNP fue descartada como biosensor debido al aumento de la señalización por estímulo con metformina y la falta de caracterización profunda.

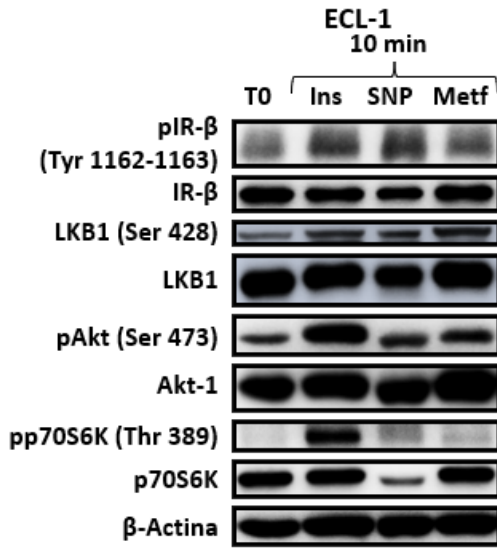
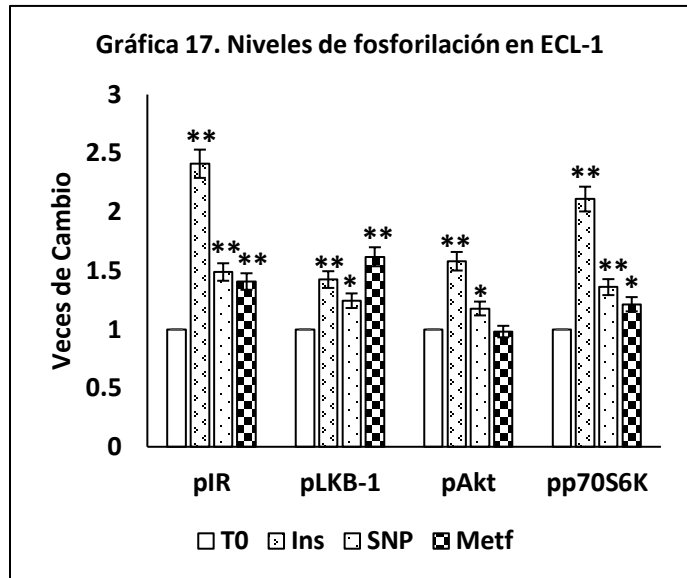


Figura 23. Western Blot de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en células ECL-1. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5 mM de metformina (Metf). T0 = antes de estimular; 10 min = 10 min estimulación.



* Comparación vs T0 de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= Insulina, SNP= suero de mujer normopeso premenopáusica, Metf=metformina

De los resultados anteriores, las líneas que fueron elegidas como posibles biosensores para evaluar las diferencias en moléculas séricas entre mujeres eutróficas y con obesidad fueron: MCF-7, ZR-75-30 y MDA-MB-231. Además, en la mayoría de las líneas se observó la presencia de una banda extra con el anticuerpo de pAkt Ser 473 que apareció únicamente bajo el estímulo con suero de mujer premenopáusica normopeso (SNP), la cual se evaluó posteriormente (Anexo 1). Por otra parte, se observó que en presencia de metformina algunas líneas presentaron una inhibición de la señalización desde los 10 min de exposición a nivel IR de manera independiente a la activación de LKB1.

6.2.4 Comparación de la viabilidad por sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad en líneas celulares de cáncer de mama

Al identificar a las líneas MCF-7, ZR-75-30 y MDA-MB-231 como las líneas de cáncer de mama que presentaron activación de la vía de PI3K/Akt por estimulación con suero humano, se procedió a evaluar cuál de estas líneas podría discernir entre sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas (SNP) en comparación con mujeres premenopáusicas con obesidad (SOP).

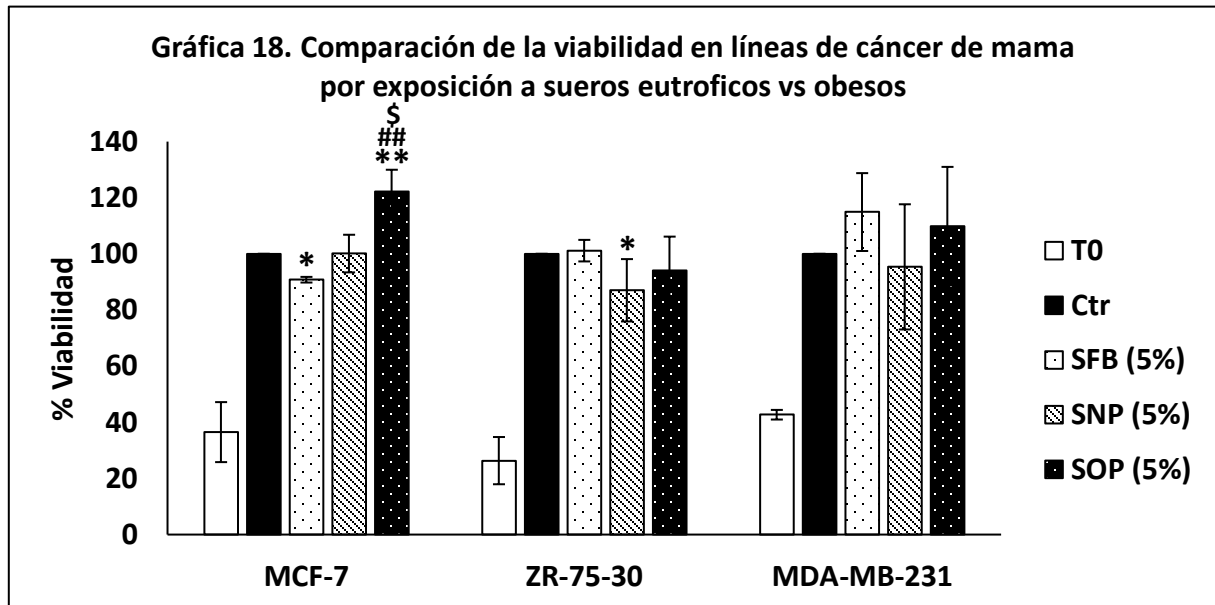
Como se mencionó anteriormente, las mujeres con obesidad presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, por lo que decidimos comparar el efecto de sueros de mujeres con obesidad vs normopeso. A través de una prueba piloto se determinó por medio del programa G Power un tamaño de muestra de 10 sueros para cada grupo (eutrófico vs obeso), con un poder estadístico del 80%, 90% de confianza y $\alpha=0.05$. Una vez colectadas las muestras se evaluaron algunas características metabólicas. En la Tabla 9 se describen las características de cada grupo, donde se observa que los triglicéridos presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre mujeres normopeso vs con obesidad.

Característica	SNP	SOP
Peso	56±4.2	84.6±13.5**
Estatura	1.61 ± 0.04	1.62 ± 0.06
IMC	21.5 ± 0.8	33.5 ± 4.2
Edad	31±6.5	31.8±4.5
Glucosa (mg/dL)	84.6±9.7	86.3±4.1
Colesterol Total (mg/dL)	167.1±11.6	173.6±39
Colesterol HDL (mg/dL)	48.6±8.1	56.6±26.7
Colesterol LDL (mg/dL)	101.6±7.5	98.8±21.7
Triglicéridos (mg/dL)	86.9±14.9	160.3±13.5**
Tipo Sanguíneo	O+ 7 A+ 2 B+ 1	O+ 7 O- 1 A+ 2

En un estudio previo de nuestro laboratorio (Hernández, 2016) se determinó que existe un efecto diferencial sobre la viabilidad de la línea MCF-7 al comparar sueros de mujeres con diferentes características metabólicas. Tomando estos datos decidimos comparar la viabilidad celular. En la Gráfica 18 se observa que en la línea MCF-7 la suplementación con 5% SFB presentó una disminución en la viabilidad del 9% respecto a Ctr, contrario al incremento del 22% bajo estimulación con 5% SOP. Mientras al comparar contra 5% SFB el aumento fue del 31% bajo estimulación con 5% SOP. Por otra parte, hubo un incremento del 20% bajo estimulación con 5% SOP respecto a SNP.

Para la línea ZR-75-30 (Gráfica 18), la suplementación con 5% SNP indujo una reducción del 13% respecto a Ctr. Por otra parte, al comparar contra 5% SFB y entre sueros humanos no hubo diferencias estadísticamente significativas.

En la línea MDA-MB-231 (Gráfica 18), no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar contra Ctr o 5% SFB, ni al comparar entre sueros humanos.



Los resultados anteriores demostraron que las líneas ZR-75-30 y MDA-MB-231 no pudieron diferenciar adecuadamente entre los dos tipos de sueros humanos. Para la línea ZR-75-30 ambos grupos presentaron una tasa de viabilidad similar, mientras la línea MDA-MB-231 presentó mayor variabilidad en la respuesta a los diferentes sueros de cada grupo, por lo que la dispersión fue mayor, razones por las que estas líneas se descartaron para ser utilizadas para comparar sueros humanos con características metabólicas diferentes. Por otra parte, la línea MCF-7 fue capaz de discernir entre ambos tipos de suero con un rango dinámico mayor, lo que permitió diferenciar cambios pequeños entre los sueros de ambos grupos de estudio.

6.3. Comparación de sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad (Validación del Modelo)

Una vez que se determinó a través de la viabilidad celular que la línea MCF-7 podía diferenciar entre sueros con diferentes características metabólicas, el siguiente paso fue validar el modelo a través de la evaluación de diferentes parámetros biológicos que a su vez serviría como una caracterización inicial del efecto de estos grupos de sueros sobre la célula tumoral, complementando la poca información que existe sobre el uso de sueros humanos en cultivo celular.

6.3.1 *Curso temporal de activación de la vía IR/Akt/p70S6K por exposición a sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad*

Si bien es conocido que en tumores de cáncer de mama de mujeres con obesidad existe un incremento en la activación de Akt, se desconoce el mecanismo por el cual se da esta activación. Por lo que decidimos realizar un curso temporal de la activación de la vía IR/Akt/p70S6K para determinar si parte de este incremento era mediado por una activación temprana por la exposición a sueros con características metabólicas diferentes. En la Figura 24 se presenta el Western Blot de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en un curso temporal después de la estimulación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad.

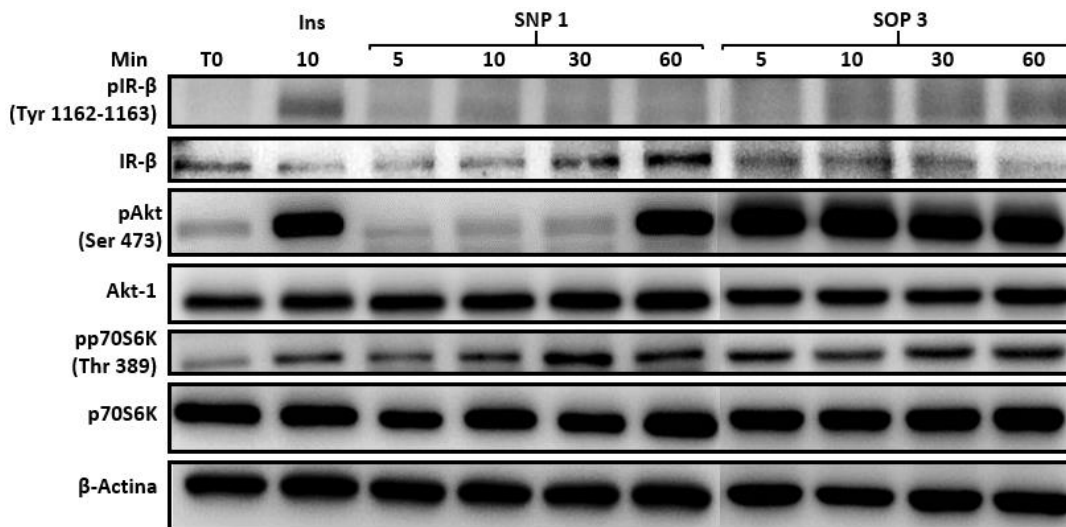


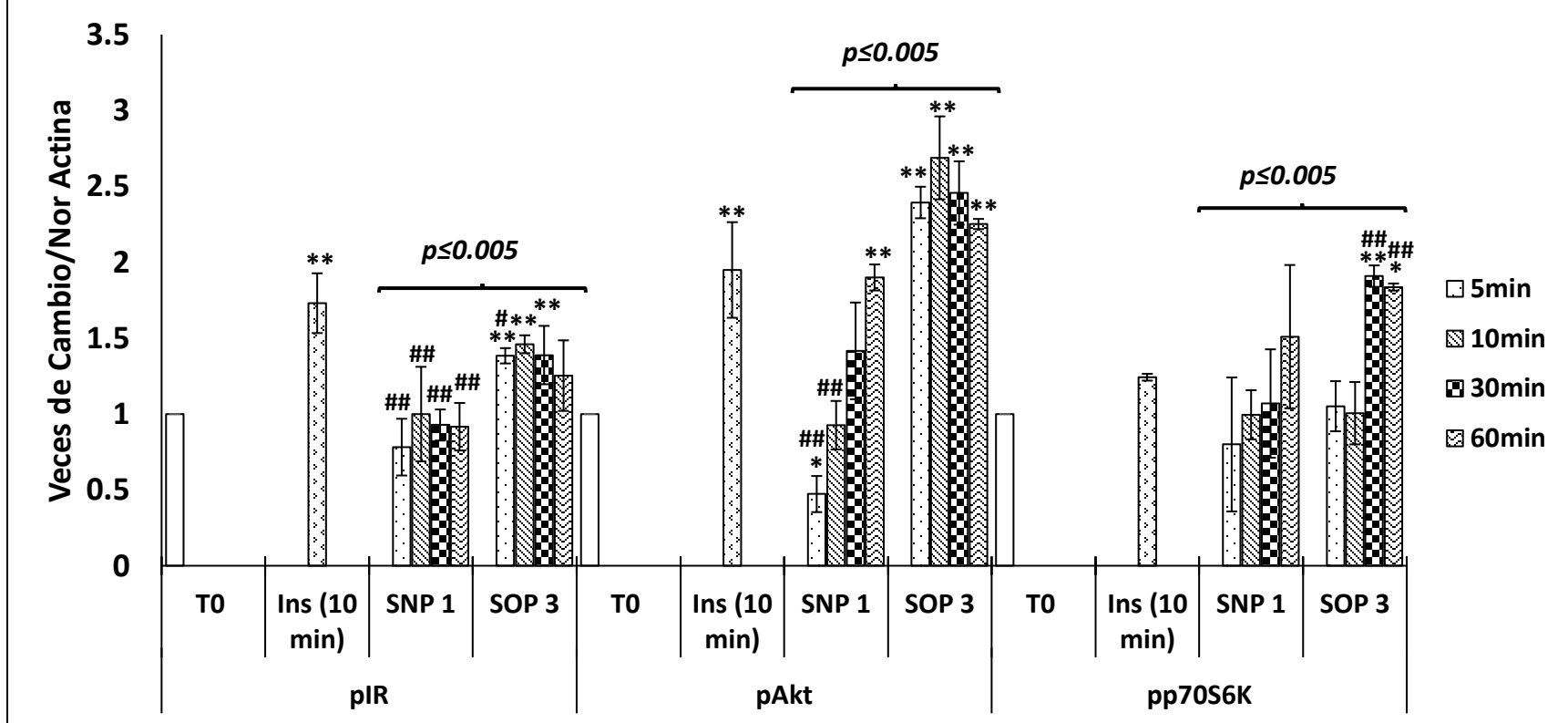
Figura 24. Western Blot de curso temporal de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en células MCF-7 por estimulación con sueros humanos. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5% suero de mujer con obesidad premenopáusica (SOP).

La estimulación con sueros SOP incremento la fosforilación del receptor de insulina (IR) desde los primeros 5 min de estimulación de manera constante hasta los 60 min, presentado el pico de activación a los 10 min con un incremento de 0.45 veces respecto a T0. Por su parte, la estimulación con sueros SNP presentó a los 10 min de estimulación el mayor nivel de fosforilación, aunque fue similar a T0. Al comparar los promedios de cada curso temporal, se observó que los sueros SOP aumentaron 0.46 veces la fosforilación de IR respecto a SNP (Gráfica 19).

A nivel de Akt (Gráfica 19), la estimulación con sueros SOP presentó un incremento en la fosforilación desde los primeros 5 min de manera constante hasta los 60 min, donde el pico máximo se observó a los 10 min con un incremento de 1.68 veces respecto a T0. Mientras la estimulación con SNP presentó un incremento gradual a partir de los 10 min de estimulación, alcanzando el pico de fosforilación a los 60 min con un aumento de 0.9 veces respecto a T0. Al comparar los promedios de cada curso temporal, se observó un aumento de 1.2 veces por estimulación con sueros SOP respecto a SNP. Por otra parte, se observó que bajo la estimulación con sueros SNP los niveles de Akt total fueron disminuyendo a lo largo del tiempo, contrario a lo observado por estimulación con sueros SOP en donde los niveles de la proteína total fueron constantes.

Para p70S6K (Gráfica 19), la estimulación con sueros SOP indujo un incremento paulatino en la fosforilación de la proteína, alcanzando un incremento máximo de 0.9 veces a los 30 min de estimulación en comparación a T0 pese a la activación temprana de Akt. Por otro lado, la estimulación con SNP incremento paulatinamente la fosforilación de p70S6K hasta alcanzar el pico a los 60 min con un incremento de 0.5 veces respecto a T0. Al comparar los promedios de cada curso temporal, se observó que los sueros SOP aumentaron 0.35 veces la fosforilación respecto a SNP.

Gráfica 19. Comparación del curso temporal de activación de la vía IR/Akt/p70S6K por estimulación con SNP vs SOP



* Comparación vs T0 de cada molécula, # vs Ins de cada molécula. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins=insulina, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

De forma general, los sueros SOP promovieron la activación temprana de las tres moléculas evaluadas en comparación a sueros SNP. Por otra parte, la molécula que presentó mayor diferencia en su fosforilación al comparar ambos tipos de suero fue Akt.

6.3.2 Evaluación de los niveles de mRNA de isoformas de Akt por estimulación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad

Con los resultados del ensayo anterior, al realizar las densitometrías de los Western Blots se determinó que la exposición a sueros SNP generó una disminución en los niveles de Akt total no así en las estimulaciones con sueros de mujeres premenopáusicas con obesidad, por lo que se decidió determinar los niveles de mRNA por estimulación de sueros SNP y SOP en un curso temporal. En la Figura 25 se observan los geles de agarosa para cada isoforma de Akt, utilizando PPIA como control constitutivo.

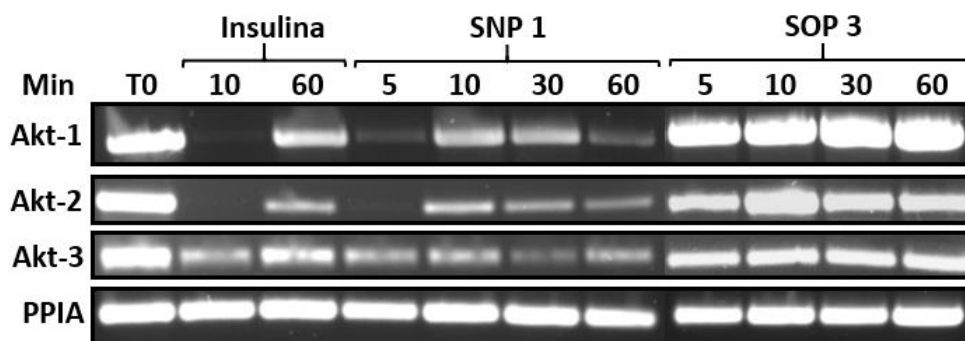


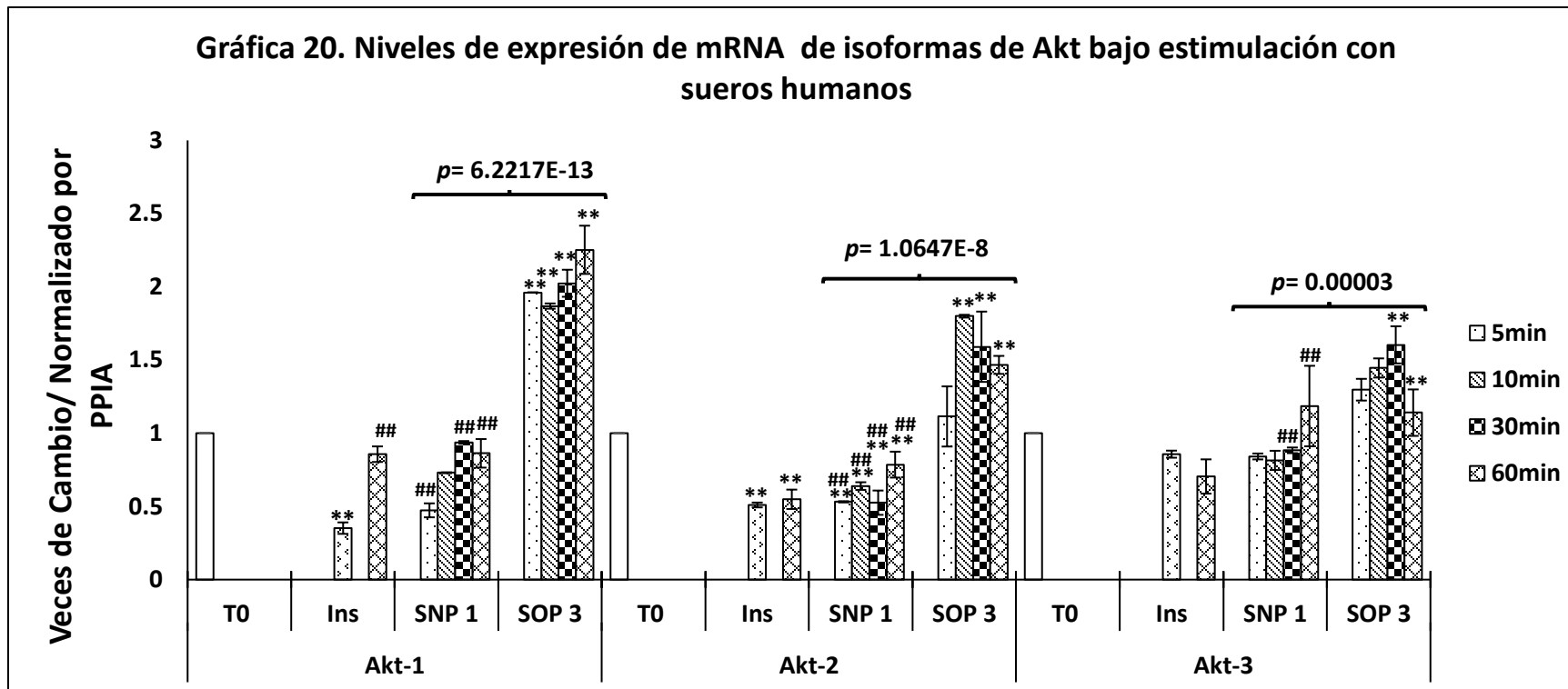
Figura 25. Gel de agarosa de productos de RT-PCR de Akt-1, Akt-2, Akt-3 y PPIA de células MCF-7 estimuladas en un curso temporal con sueros SNP y SOP. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% suero de mujer normopeso premenopáusica (SNP) y 5% suero de mujer con obesidad premenopáusica (SOP).

En la Gráfica 20 se observa que los niveles de Akt-1 mRNA bajo estimulación con sueros SNP disminuyó 0.5 veces a los 5 min respecto a T0 y presentó un aumento gradual hasta alcanzar los niveles de expresión de T0 a los 30 min de estimulación. Mientras bajo estimulación con sueros SOP se observó un aumento de 0.96 veces a los 5 min respecto a T0 y se mantuvo constante hasta los 60 min de estimulación. Al comparar los dos cursos temporales se encontró que los sueros SOP incrementaron 1.25 veces los niveles de expresión de Akt-1 mRNA en comparación a SNP.

Bajo estimulación con sueros SNP, los niveles de expresión de Akt-2 mRNA disminuyeron 0.47 veces a los 5 min de estimulación comparado a T0 hasta alcanzar un aumento de 0.72 veces a los 60 min. Por su parte, la estimulación con sueros SOP indujo un incremento de 0.11 veces a los 5 min de estimulación respecto a T0 hasta alcanzar un aumento de 0.81 veces a los 10 min. Comparando los dos cursos temporales se encontró que los sueros SOP indujeron un incremento de 0.87 veces en comparación de SNP (Gráfica 20).

La estimulación con suero SNP presentó una reducción de 0.16 veces a los 5 min de estimulación respecto a T0 en los niveles de expresión de Akt-3 mRNA, hasta presentar un incremento de 0.5 veces a los 60 min. Mientras la estimulación con sueros SOP indujo un incremento de 0.3 veces a los 5 min de estimulación respecto a T0 y alcanzó un incremento de 0.6 veces a los 30 min. Al comparar los cursos temporales, se observó que bajo estimulación con sueros SOP hubo un incremento de 0.4 veces en los niveles de expresión de Akt-3 mRNA en comparación a SNP (Gráfica 20).

Gráfica 20. Niveles de expresión de mRNA de isoformas de Akt bajo estimulación con sueros humanos



* Comparación vs T0 de cada molécula, # vs Ins de cada molécula. * p < 0.05, ** p < 0.005. Ins=insulina, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

6.3.3 Evaluación de la migración celular bajo suplementación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad

Otra de las características del cáncer que se han visto modificados por la presencia de obesidad es la metástasis, ya que la migración *in vitro* es un subrogado de esta característica evaluamos la migración celular comparando el efecto de sueros de mujeres premenopáusicas normopeso vs con obesidad.

Al evaluar la migración en la línea MCF-7, en la Figura 26 y Gráfica 21 se observa que bajo la suplementación con sueros SOP hubo un incremento en la migración celular de 102% y 29% por SNP en comparación a SFB. Mientras al comparar entre sueros humanos, los sueros SOP indujeron 74% mayor migración en comparación a sueros SNP.

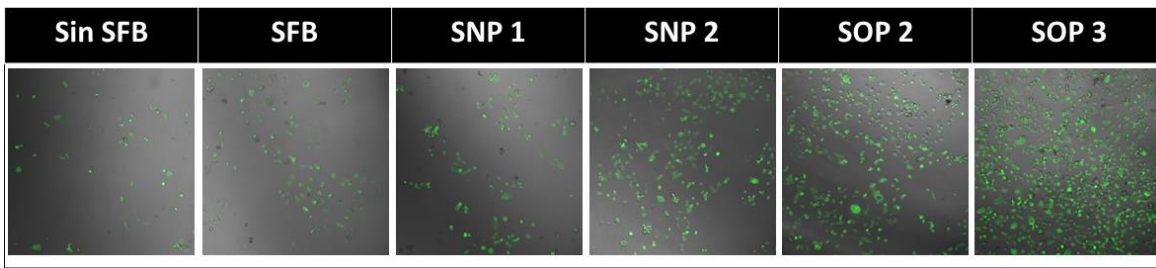
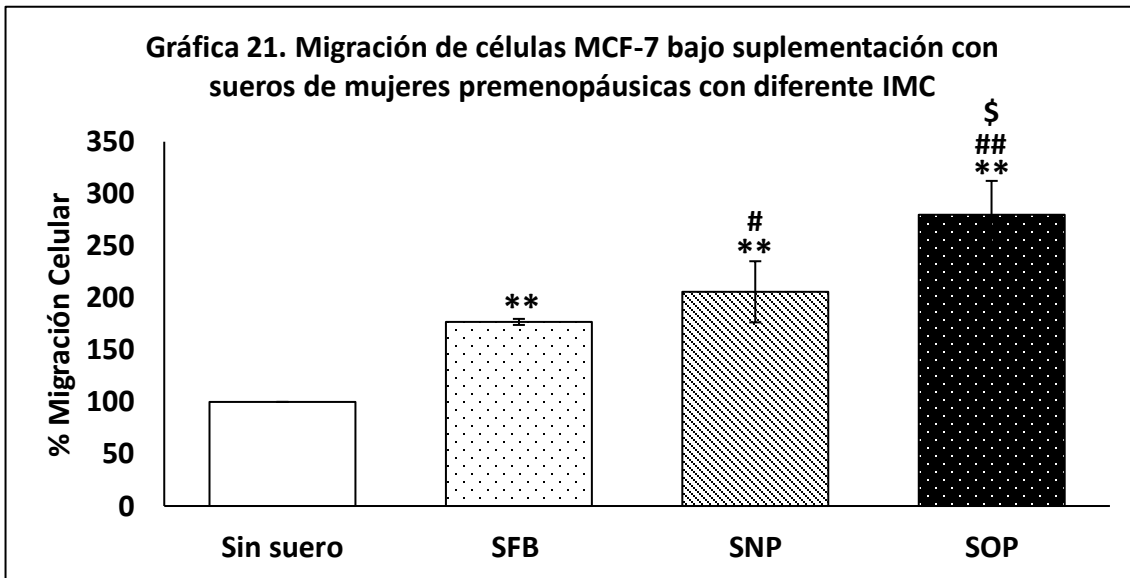


Figura 26. Micrografía de células MCF-7 que atravesaron la membrana de "transwell" en respuesta a la estimulación con sueros humanos. Células estimuladas con 5% SFB, 5% sueros de mujeres normopeso premenopáusicas (SNP) y 5% sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas (SOP).



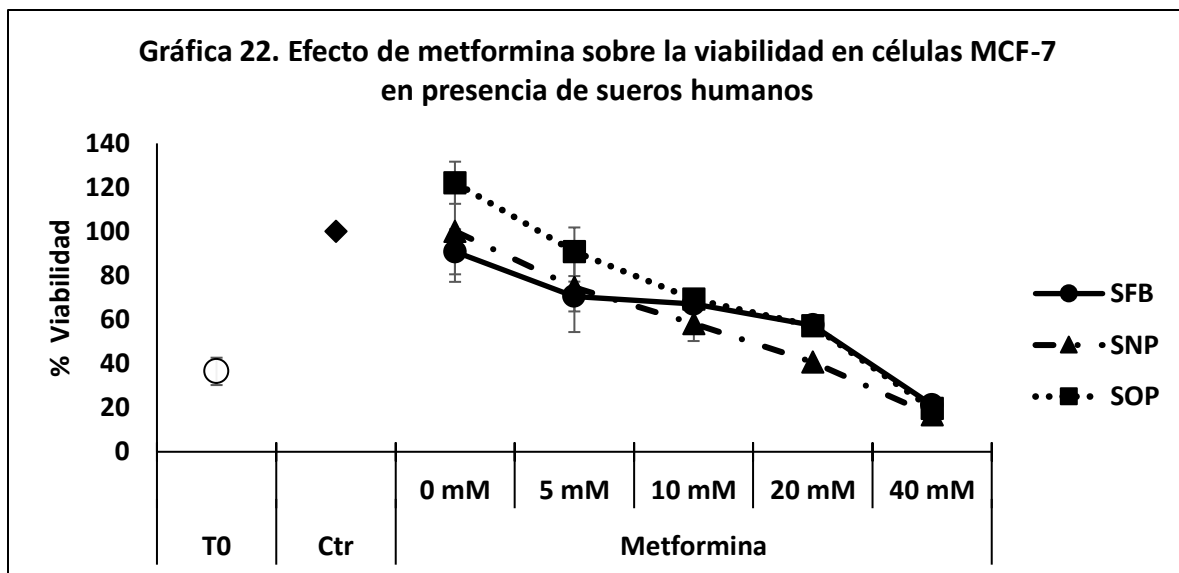
* Comparación vs sin suero, # vs SFB, \$ vs SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

Estos resultados muestran que la adición de suero, tanto bovino como humano incrementa la migración a través de la membrana del “transwell”. La mayor migración inducida por el suero SOP sugiere una diferente composición sérica enriquecida con factores que promueven la migración.

6.3.4 Comparación del efecto citotóxico de metformina bajo la suplementación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad

Aunque existe amplia evidencia del efecto citotóxico de la metformina en cultivo celular, se desconoce cuál es el efecto del fármaco en presencia de sueros humanos. Para descartar que los efectos que pudiéramos observar por los sueros de mujeres con tratamiento con metformina fuera consecuencia de la presencia del fármaco en el suero, decidimos realizar una caracterización del efecto de la concentración mínima reportada en cultivo celular del fármaco (5 mM) en presencia de sueros humanos.

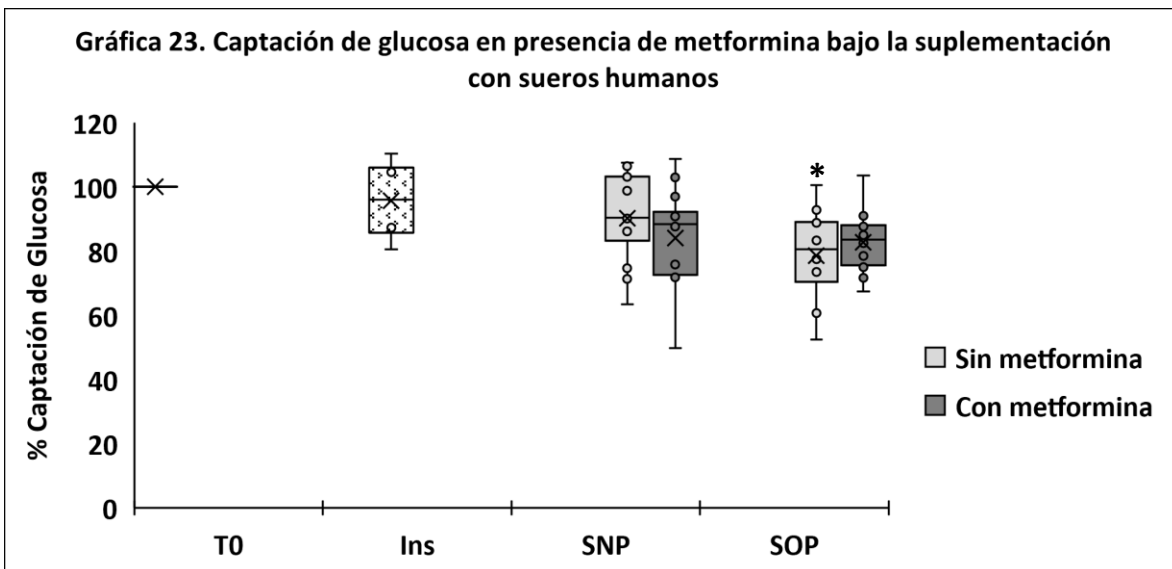
Como muestra la Gráfica 22, hubo una reducción en la viabilidad dependiente de la concentración de metformina en el medio. En el caso de la suplementación con SFB se presentó una IC50 de 16.4 mM de metformina, en la suplementación con sueros SNP la IC50 fue de 12.7 mM y en la suplementación con sueros SOP la IC50 fue de 19 mM. Los datos anteriores mostraron que las células MCF-7 presentaron mayor sensibilidad a metformina bajo la suplementación con sueros SNP, efecto contrario al observado bajo suplementación con sueros SOP.



SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

6.3.5 Efecto de la presencia de metformina sobre la captación de glucosa bajo suplementación con sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad

Al ser un regulador de la captación de glucosa, la metformina podría regular el efecto Warburg en las células tumorales, por lo que decidimos evaluar el efecto del fármaco en la captación de glucosa de las células MCF-7. En la Gráfica 23 se observa que bajo la suplementación con sueros SNP hubo un incremento en la captación de glucosa del 12% en comparación a sueros SOP. Por otra parte, en presencia de metformina no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, pero se observaron dos comportamientos: 1) bajo suplementación con sueros SNP hubo una reducción en la captación de glucosa y 2) bajo suplementación con sueros SOP hubo un incremento en la captación de glucosa.



Ins=insulina, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

6.4 Selección de la población para la intervención farmacológica con metformina

Al validar que la línea MCF-7 fue la única línea de cáncer de mama que podía ser utilizada como biosensor, se procedió a determinar la población de mujeres con obesidad en la cual se podría llevar a cabo la intervención farmacológica con metformina, ya que se desconocía si podría existir un efecto diferencial de

metformina mediado por el estado hormonal de la mujer, pues la mayor parte de los estudios retrospectivos que reportan el efecto antitumoral de metformina se han realizado en mujeres posmenopáusicas. Por lo anterior, comparamos los sueros de mujeres pre y posmenopáusicas eutróficas vs con obesidad.

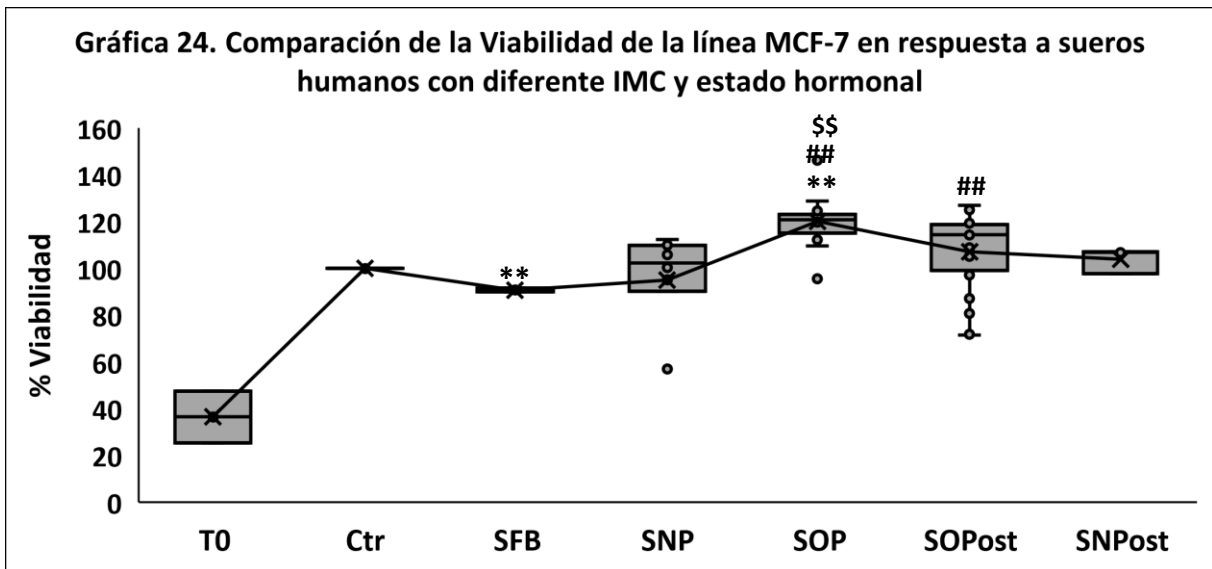
En la Tabla 10 se muestran algunos parámetros metabólicos de los grupos de estudio. Donde los triglicéridos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres normopeso y con obesidad, tanto pre como posmenopáusicas. Mientras el colesterol HDL presentó diferencias significativas entre mujeres normopeso vs con obesidad del grupo de posmenopausia.

Tabla 10. Características metabólicas de sueros de mujeres pre- y posmenopáusicas con diferentes IMC				
Característica	Premenopausia		Posmenopausia	
	SNP n= 10	SOP n= 10	SNPost n=2	SOPost n=10
Peso	56.3±4.2	84.6±13.5**	56.5±6.3	98±12.3**
Estatura	1.59 ± 0.05	1.6 ± 0.054	1.5 ± 0.03	1.6 ±0.06
IMC	20.9± 1.67	32.8 ± 4.5**	23.4 ± 0.41	40.2± 7.2**
Edad	31±6.5	31.8±4.5	52±4.2	55.6±3.8
Glucosa (mg/dL)	84.6±9.7	86.3±4.1	92.1±8.1	91.2±7.2
Colesterol Total (mg/dL)	167.1±11.6	173.6±39	154±9.15	172.1±30.9
Colesterol HDL (mg/dL)	48.6±8.1	56.6±26.7	55±3.6	43.9±8.9*
Colesterol LDL (mg/dL)	101.6±7.5	98.8±21.7	94±7.2	106.5±31.1
Triglicéridos (mg/dL)	86.9±14.9	160.3±13.5**	101±5.2	148.9±31.6*

* p≥0.05, ** p≥0.005

6.4.1. Comparación de la viabilidad por sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad con diferente estatus hormonal

Para la selección de la población en la que aplicaríamos la maniobra farmacológica, en principio evaluamos el efecto de los diferentes tipos de sueros humanos sobre la viabilidad celular. Como se muestra en la Gráfica 24, los sueros SOP presentaron un aumento del 20% en comparación con Ctr, 29% en comparación con 5% SFB y 25% en comparación con SNP. Mientras que los sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad (SOPost) mostraron un aumento del 16% en comparación con el 5% de SFB y 14% en comparación a SNP.



* Comparación vs Ctr, # vs SFB, \$ vs SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.00$. $n=10$ para cada grupo. Ctr=control, SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas, SNPost= sueros de mujeres normopeso posmenopáusicas

Los resultados anteriores demostraron que las células MCF-7 presentaron mayores tasas de viabilidad bajo estimulación con sueros de mujeres con obesidad, tanto premenopáusicas como posmenopáusicas. Sin embargo, el grupo de sueros SOP fue el que promovió mayor incremento en comparación con las mujeres pre- y posmenopáusicas de peso normal.

6.4.2. Comparación de la activación de la vía IR/Akt/p70S6K por sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad con diferente estatus hormonal

Posteriormente evaluamos los niveles de fosforilación de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K bajo estimulación con sueros de mujeres pre- y posmenopáusicas eutróficas vs con obesidad. Para este ensayo se utilizó un anticuerpo que reconoce las tres isoformas de Akt (pAkt 1/2/3 (Ser 473)) y un anticuerpo que reconoce específicamente la isoforma Akt-1 (pAkt-1 (Ser 473)), esto con la finalidad de discernir la isoforma de Akt sobre la que tienen mayor efecto los diferentes tipos de sueros humanos. En la Figura 27 se observa el Western Blot de las moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K bajo la estimulación con los diferentes sueros humanos de cada grupo de estudio.

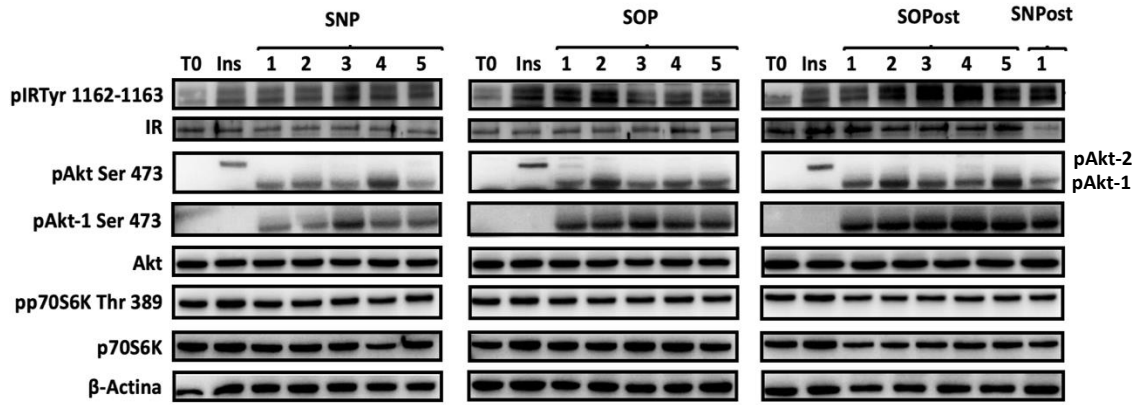
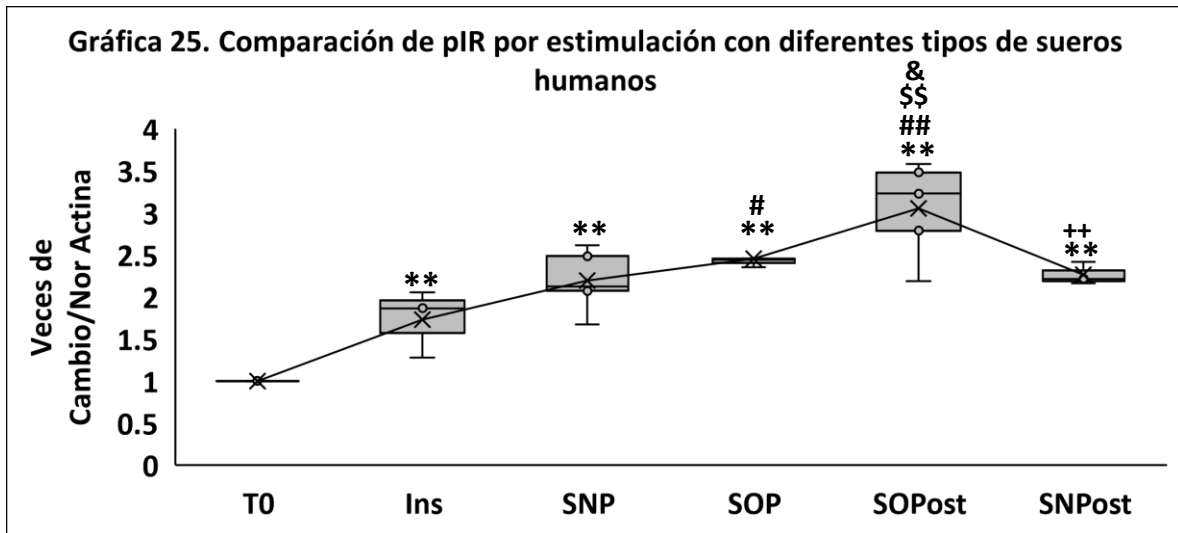


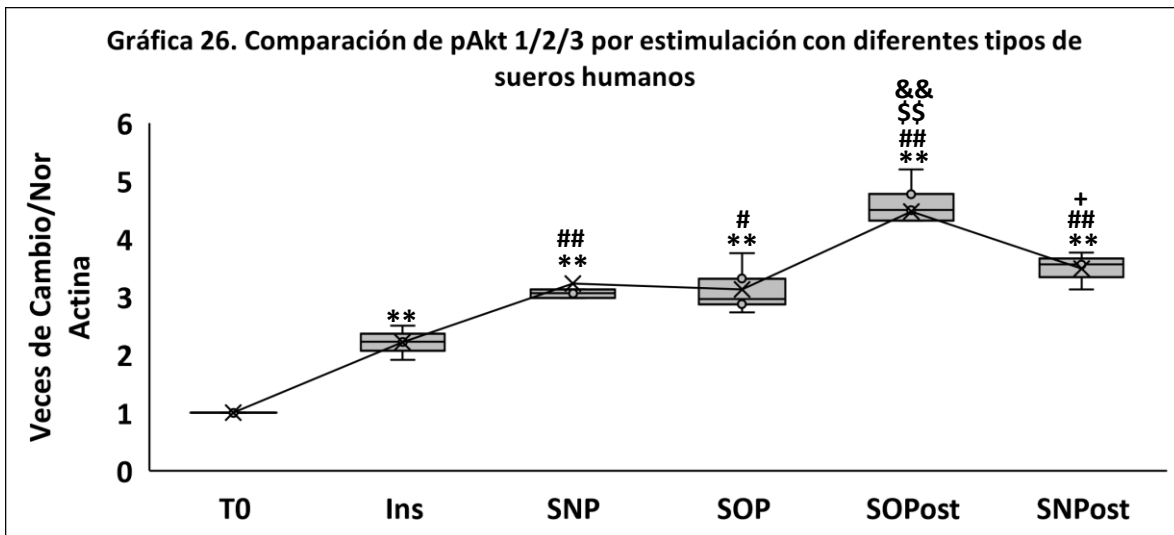
Figura 27. Western Blot de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en células MCF-7 estimuladas con sueros de mujeres con diferente IMC y estatus hormonal. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% SNP, 5% SOP, 5% sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas (SOPost) y 5% sueros de mujeres normopeso posmenopáusicas (SNPost). Imagen representativa de 5 sueros de cada grupo.

Para el análisis por grupo se evaluaron los 10 sueros descritos en la Tabla 9 con 3 repeticiones independientes. Este análisis mostró que para la fosforilación de IR (Gráfica 25) hubo un incremento de 0.8 veces bajo estimulación con Ins, 1 vez con SNP, 1.3 veces con SOP, 2 veces con SOPost y 1.1 veces con sueros de mujeres posmenopáusicas normopeso (SNPost) respecto a T0. En comparación a Ins los sueros SOP tuvieron un aumento de 0.75 veces y 1.35 veces bajo estimulación con sueros SOPost. Respecto a sueros SNP, los sueros SOPost tuvieron un incremento de 0.8 veces. Al comparar contra los sueros SOP, los sueros SOPost presentaron un incremento de 0.5 veces. En comparación a sueros SOPost hubo una disminución de 0.75 veces en la estimulación con los sueros SNPost.



* Comparación vs Ctr, # vs SFB, \$ vs SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.00$. n=10 para cada grupo. Ctr=control, SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas, SNPost= sueros de mujeres normopeso posmenopáusicas

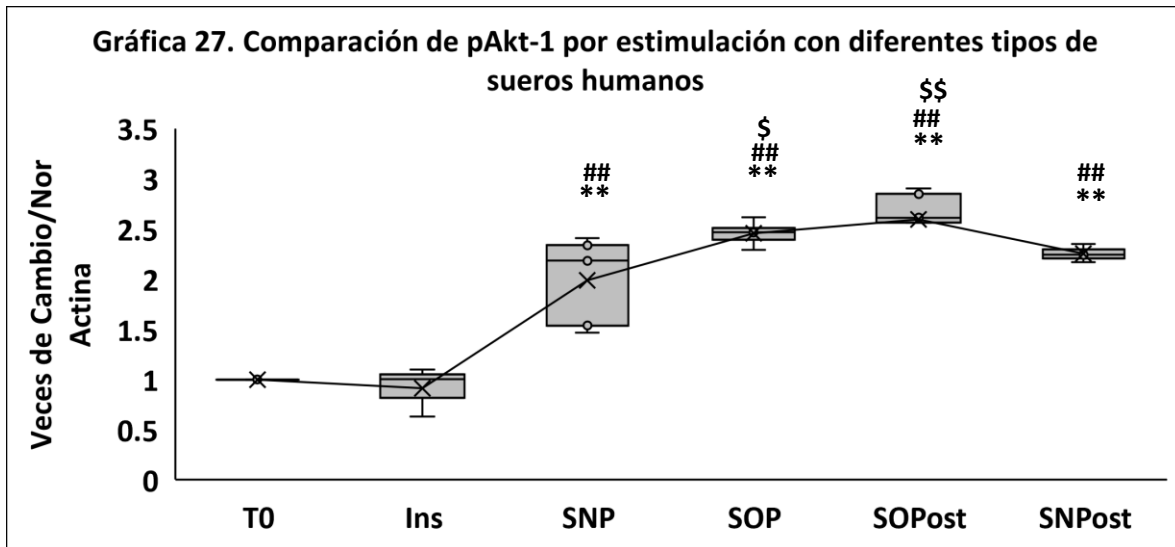
En la Gráfica 26 se observan los niveles de fosforilación de Akt 1/2/3, donde hubo un incremento de 1.1 veces por estimulación con Ins, 2 veces por SNP, 1.8 veces por SOP, 3 veces por SOPost y 2 veces por SNPPost respecto a T0. En comparación a Ins los sueros SNP tuvieron un aumento de 1 vez, los sueros SOP 0.9 veces, los sueros SOPost 2.3 veces y los sueros SNPPost 1.3 veces. Respecto a sueros SNP, los sueros SOPost tuvieron un incremento de 1.28 veces. Al comparar contra los sueros SOP, los sueros SOPost presentaron un incremento de 1.4 veces. En comparación a sueros SOPost hubo una disminución de 1 vez en la estimulación con los sueros SNPPost. Aunque el anticuerpo anti-Akt reconoce las 3 isoformas, las imágenes del Western Blot, muestran que la señal de fosforilación predominante corresponde a Akt-1, sólo la insulina promovió la fosforilación de Akt-2.



* Comparación vs Ctr, # vs SFB, \$ vs SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.00$. n=10 para cada grupo. Ctr=control, SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas, SNPPost= sueros de mujeres normopeso posmenopáusicas

Con los datos anteriores observamos que la señalización es mediada principalmente por Akt-1, por lo que decidimos corroborar esta información utilizando un anticuerpo específico contra Akt-1. En la Gráfica 27 se observan los niveles de fosforilación de Akt-1, en donde hubo un incremento de 1 vez por estimulación con SNP, 1.3 veces por SOP, 1.5 veces por SOPost y 1.2 veces por SNPPost en comparación con T0. En comparación a Ins los sueros SNP tuvieron un aumento de 1 vez, SOP 1.55 veces, SOPost 1.7 veces y SNPPost 1.1 veces. Respecto a sueros SNP, los sueros SOP presentaron un aumento de 0.5 veces y

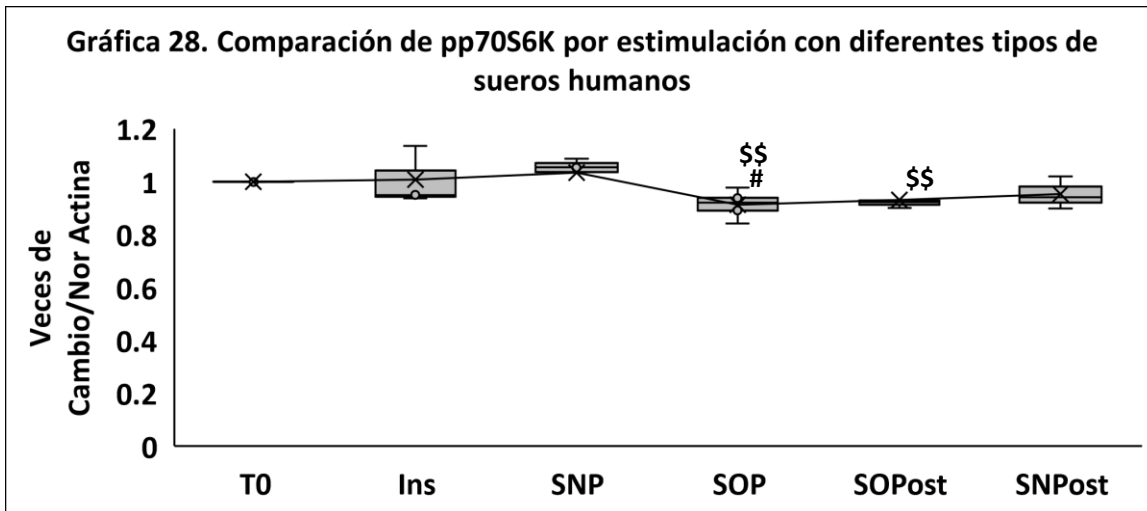
SOPost 0.6 veces. Al comparar contra los sueros SOP no hubo diferencias estadísticamente significativas. En comparación a sueros SOPost tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas.



* Comparación vs Ctr, # vs SFB, \$ vs SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.00$. $n=10$ para cada grupo. Ctr=control, SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas, SNPPost= sueros de mujeres normopeso posmenopáusicas

Al comparar los resultados de las gráficas 26 y 27 observamos un patrón semejante en la fosforilación de Akt. Se observó un aumento secuencial conforme incrementa el IMC que a su vez también es influenciado por el estado hormonal. Se corroboró que las mujeres con obesidad posmenopáusicas presentaron los mayores niveles de fosforilación de Akt. La única discordancia se presentó con la insulina que promueve la fosforilación de Akt-2.

En la Gráfica 28 se observan los niveles de fosforilación de p70S6K, donde ninguna de las estimulaciones evaluadas presentó diferencias significativas respecto a T0. En comparación a Ins solo la estimulación con sueros SOP presentó una disminución de 0.09 veces. Respecto a sueros SNP, los sueros SOP presentaron una disminución de 0.09 veces y SOPost 0.07 veces. Al comparar contra los sueros SOP no hubo diferencias estadísticamente significativas. En comparación a sueros SOPost tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas. Esta falta de activación en la proteína podría estar relacionada a lo observado en la gráfica 19, en donde el tiempo de activación de p70S6K se observó a los 30 min de estimulación.



* Comparación vs Ctr, # vs SFB, \$ vs SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.00$. n=10 para cada grupo. Ctr=control, SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas, SNPost= sueros de mujeres normopeso posmenopáusicas

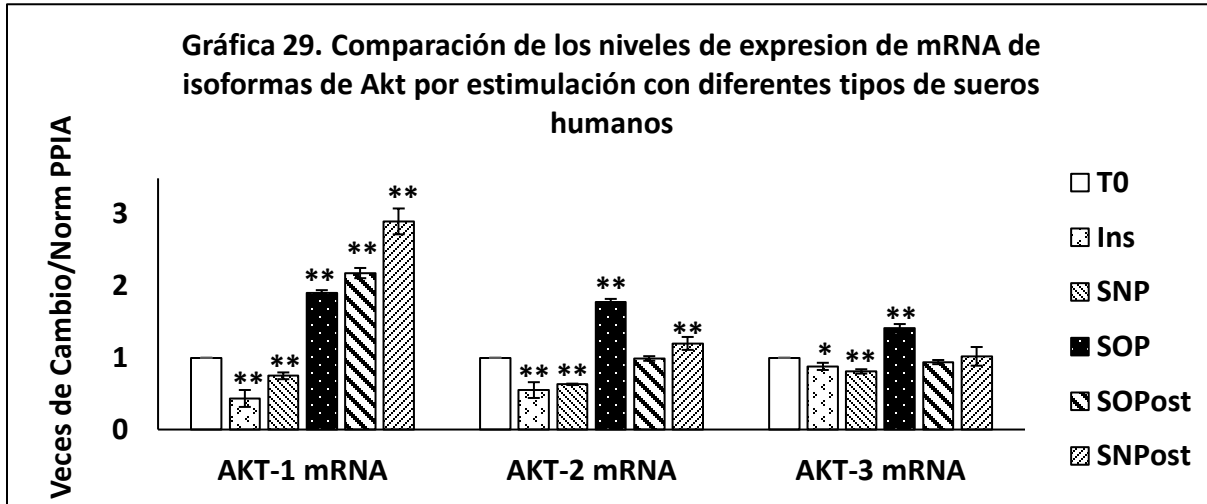
Los resultados anteriores mostraron un incremento secuencial en la fosforilación de IR, Akt 1/2/3 y Akt 1 bajo la estimulación con los diferentes grupos de sueros humanos, excepto con los sueros SNPost que fue muy similar a SNP. Además, los sueros SOPost presentaron los mayores incrementos en la fosforilación de las moléculas evaluadas, exceptuando a p70S6K que presentó una reducción en la fosforilación respecto a T0. También, la fosforilación de Akt-1 fue la que identifico con mayor diferencia entre sueros humanos.

6.4.3. Evaluación de los niveles de expresión de mRNA de isoformas de Akt por estimulación con sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad con diferente estatus hormonal

Como se demostró en la Gráfica 20, existe una regulación en la expresión de las isoformas de Akt mediado por la exposición a sueros humanos con diferentes características metabólicas, pero se desconocía sí de igual forma podría existir una regulación por sueros con características hormonales diferentes. Por lo que evaluamos la expresión de las isoformas de Akt a 10 min de exposición con sueros humanos con diferentes IMC y estatus hormonal.

En la Gráfica 29 se observa que la estimulación con sueros SNP disminuyeron 0.25 veces el mRNA Akt-1, contrario al aumento de 0.9 veces con SOP, 1.2 veces con SOPost y 1.9 veces con SNPost en comparación a T0. Mientras la expresión de

mRNA Akt-2 disminuyó 0.36 veces por SNP, en contraste al aumento de 0.78 veces con SOP y 0.24 veces con SNPPost respecto a T0. Por otra parte, la expresión de mRNA Akt-3 disminuyó 0.18 veces por SNP y aumento 0.41 veces por SOP respecto a T0.



* Comparación vs T0. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. n=10 para cada grupo. Ins= insulina, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas, SNPPost= sueros de mujeres normopeso posmenopáusicas

En conjunto, los datos anteriores sugirieron que el suero de mujeres obesas posmenopausicas, podría contribuir a un aumento en los niveles de viabilidad de las células tumorales, asociado al aumento en la fosforilación de Akt y la expresión de mRNA Akt-1. Estos resultados y la mayor incidencia de cáncer de mama en mujeres posmenopausicas, nos llevó a centrarnos en esta población para realizar la intervención farmacologica con metformina.

6.5. Evaluación del efecto del suero de mujeres con obesidad posmenopáusicas tratadas con metformina

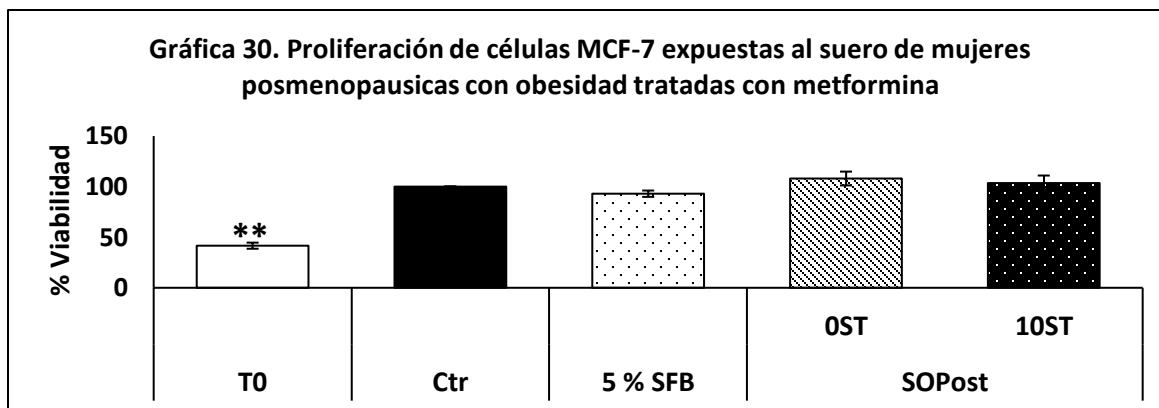
Para determinar si el tratamiento con metformina podía inducir cambios en moléculas séricas de mujeres posmenopáusicas con obesidad que pudieran tener un impacto en la célula tumoral. Inicialmente habíamos calculado una muestra de 48 pacientes, pero solo colectamos 30 pacientes, de las cuales únicamente 12 mujeres completaron el tratamiento con metformina. De estas 12 mujeres se evaluó el efecto de sus sueros a 0 semanas de tratamiento (0ST) y 10 semanas de tratamiento (10ST) con metformina sobre la proliferación celular, niveles de fosforilación de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K, expresión de mRNA de

isoformas de Akt y señalización de NF- κ B, ERK y p38 en células MCF-7. Las características del grupo de estudio de mujeres posmenopáusicas con obesidad que recibieron tratamiento con metformina se describen en la Tabla 11.

Tabla 11. Características de Mujeres Posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina								
	Población Total		Obesidad I		Obesidad II		Obesidad III	
	N= 12		N=6		N=3		N=3	
Edad	55.6 \pm 3.8		55.6 \pm 3.7		54 \pm 2.6		57.3 \pm 5.5	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
IMC (kg/m ²)	36.4 \pm 6.6	35.6 \pm 6.6	31.5 \pm 1.2	31.2 \pm 0.8	36 \pm 1.1	35.7 \pm 1.3	46.3 \pm 4.2	44.2 \pm 4.9
Glucosa (mg/dL)	91.2 \pm 7.5	90.7 \pm 10.4	89.5 \pm 3.3	91.2 \pm 10.2	88.3 \pm 8.9	83.3 \pm 3.7	97.6 \pm 9.8	95 \pm 9.7
Triglicéridos (mg/dL)	148.9 \pm 61.6	159.6 \pm 61.7	157.8 \pm 76.2	157.4 \pm 52.2	118.3 \pm 25.9	112.3 \pm 30.5	161.6 \pm 61.7	194.3 \pm 80.1
Colesterol HDL (mg/dL)	43.9 \pm 8.9	46.6 \pm 7.6	38.4 \pm 15.3	46.8 \pm 6	53 \pm 9.5	61 \pm 12	42.6 \pm 5	41.6 \pm 4.5
Colesterol LDL (mg/dL)	106.5 \pm 31.1	116 \pm 31.5	107.5 \pm 35.2	119 \pm 38.7	82.3 \pm 22.6	92.3 \pm 20.6	129 \pm 9	123.3 \pm 13.8
HOMA-IR	1.9 \pm 1.1	2.1 \pm 1	2 \pm 1.1	2.4 \pm 0.8	1.2 \pm 0.16	1.24 \pm 0.43	2.4 \pm 1.6	1.5 \pm 0.8

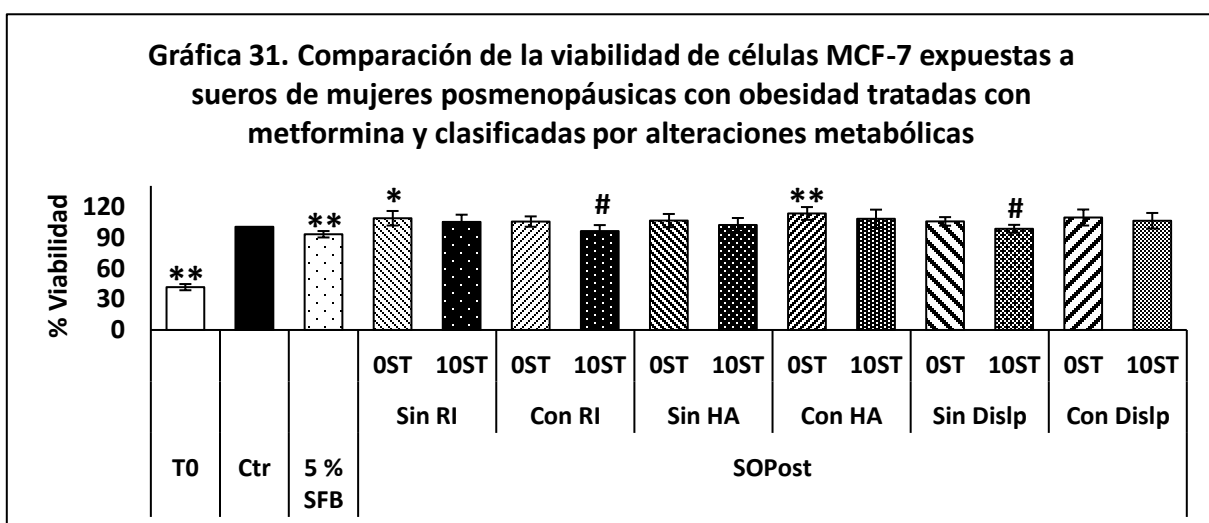
6.5.1. Evaluación de la proliferación de células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina

Lo primero que evaluamos fue la viabilidad de las células MCF-7 bajo exposición a sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes (0ST) y después del tratamiento con metformina (10 semanas-10ST). Como se observa en la Gráfica 30 no se observaron cambios significativos en la viabilidad de las células MCF-7 expuestas a sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina durante 10 semanas.



* Comparación vs Ctr. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr= control, SFB= Suero fetal bovino, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas

Posteriormente la población fue subdividida por la presencia de alteraciones metabólicas, encontrando dos pacientes con resistencia a la insulina (RI), tres con hipertensión arterial (HA), ocho con dislipidemia (Dislp); de las cuales una paciente presentó resistencia a la insulina y dislipidemia, dos hipertensión arterial y dislipidemia y una presentó las tres alteraciones metabólicas. En la Gráfica 31 se observa que las pacientes sin resistencia a la insulina y las pacientes con hipertensión arterial, en ausencia del tratamiento con metformina (0ST) presentaron un incremento en la viabilidad celular de 9% y 13% respecto a Ctr. Mientras al comparar 0ST vs 10ST se observó que las pacientes con resistencia a la insulina presentaron una reducción en la viabilidad del 11% y 7% en pacientes sin dislipidemia. De manera individual la paciente que presentó las tres alteraciones metabólicas fue quien tuvo la mayor reducción en la viabilidad con el 10% a las 10 semanas de tratamiento con metformina respecto a 0ST.



* Comparación vs Ctr, # vs 0ST. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr= control, SFB= Suero fetal bovino, SPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas

6.5.2. Evaluación de la vía IR/Akt/p70S6K y Erk 1/2 en células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina

Posteriormente para determinar si la disminución observada en la viabilidad celular estaba asociada a la reducción en la activación de la vía IR/Akt/p70S6K, evaluamos los niveles de fosforilación de moléculas de esta vía de señalización. Además considerando el efecto diferencial sobre la viabilidad dependiente de las

características metabólicas, también evaluamos a la proteína ERK como representante de la vía MAPK, la cual tiene un papel sobre la viabilidad celular. Para esto estimulamos células MCF-7 con sueros de mujeres posmenopausicas con obesidad tratadas con metformina durante 0 y 10 semanas (Figura 28).

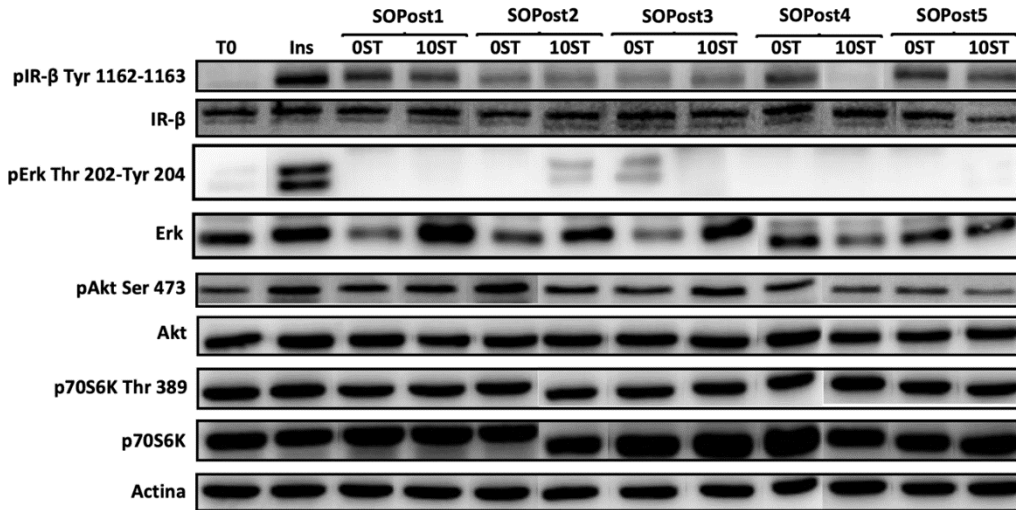
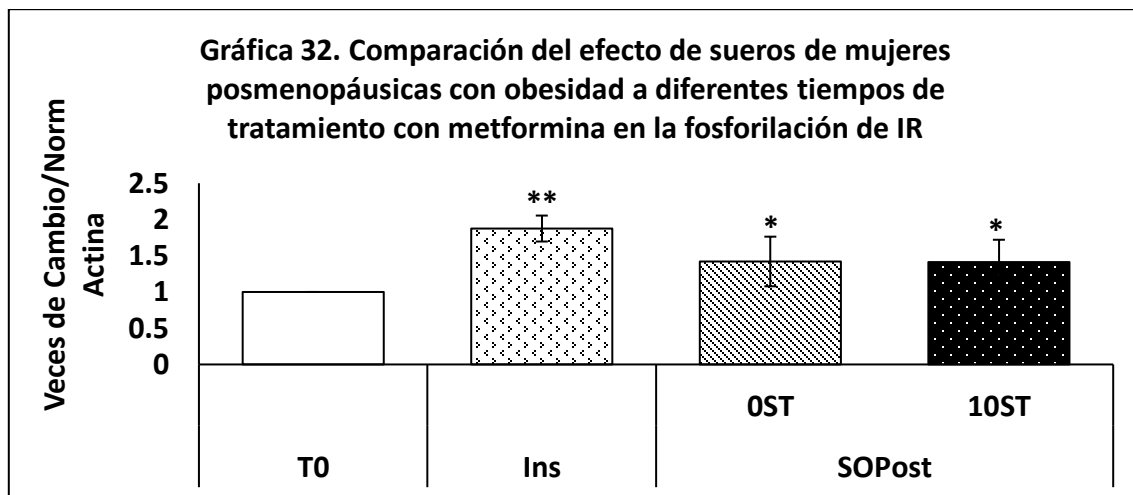


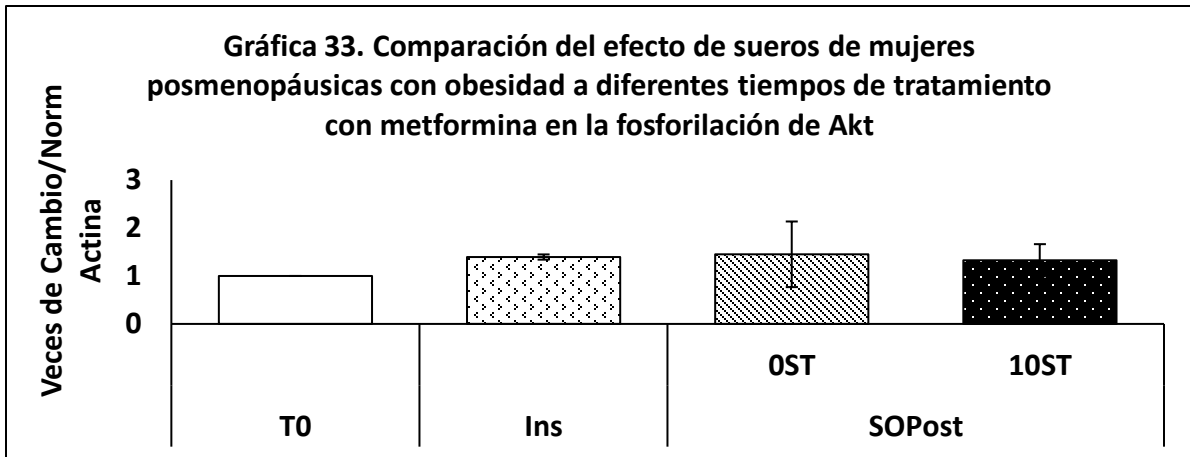
Figura 28. Western Blot de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K y Erk 1/2 en células MCF-7 estimuladas con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina. Células estimuladas por 10 min con 0.5 IU/ml insulina, 5% sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas (SOPost) a 0 (0ST) y 10 (10ST) semanas de tratamiento con metformina.

Al evaluar la fosforilación de IR se observó un aumento de 0.4 veces en la estimulación a 0ST y 10ST semanas de tratamiento con metformina en comparación al T0, pero no se observaron cambios estadísticamente significativos entre 0ST y 10ST. Es importante mencionar que al subdividir la población en base a las alteraciones metabólicas tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 32).



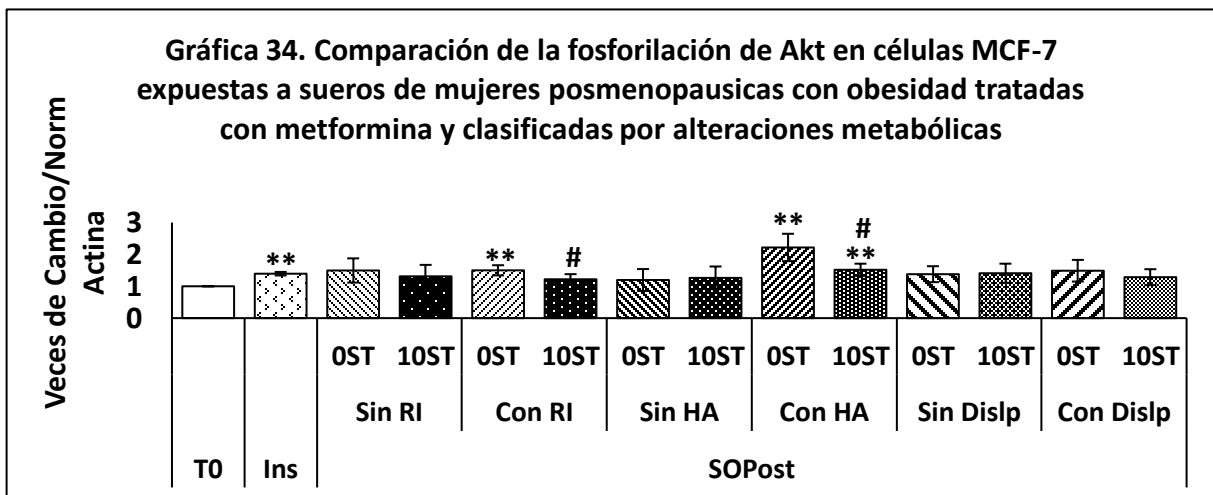
* Comparación vs T0. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins=insulina, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas

Al evaluar la fosforilación de Akt, no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando las células fueron estimuladas con los sueros de las pacientes con obesidad tratadas con metformina (0ST y 10ST) (Gráfica 33).



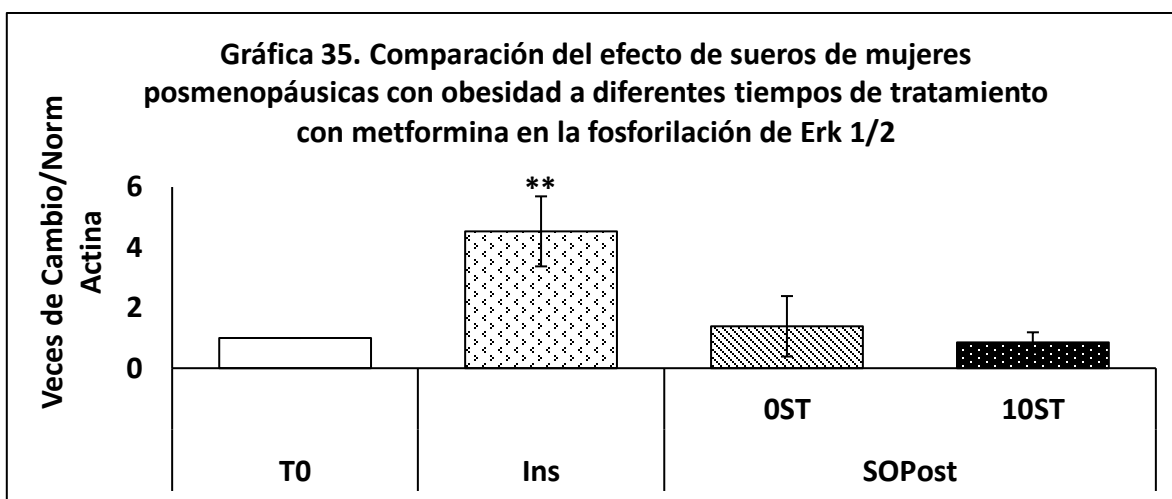
* Comparación vs T0. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins=insulina, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas

Pero al dividir a la población por la presencia de alteraciones metabólicas se observó que después del tratamiento con metformina (10ST), los sueros de pacientes con resistencia a la insulina (RI) indujeron una reducción de 0.3 veces y los sueros de pacientes con hipertensión arterial (HA) 0.6 veces en comparación a sus respectivos 0ST (Gráfica 34). Lo cual se correlaciono con la disminución de la viabilidad en las pacientes con resistencia a la insulina, no así en las pacientes con hipertensión arterial.



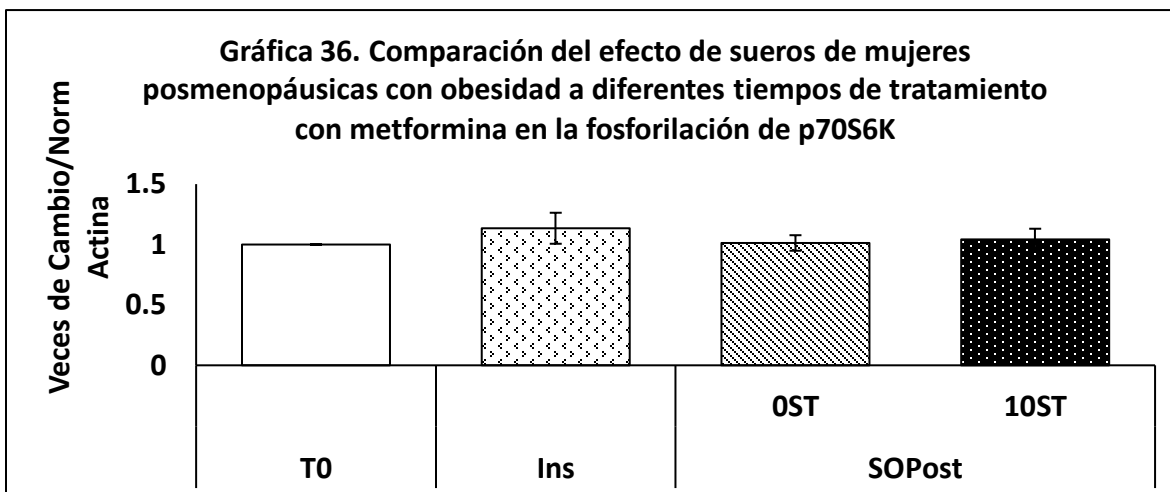
* Comparación vs T0, # vs 0ST. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins=insulina, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas

Por otra parte, como en el ensayo de proliferación se observó una diferencia en el efecto inducido por los sueros de mujeres posmenopausicas con obesidad mediado por la presencia de resistencia a la insulina, se evaluó la fosforilación de Erk 1/2 (Thr 202-Tyr 204) para determinar si la viabilidad inducida por los sueros con HOMA <3 era producido por la activación de la vía MAPK cinasa. Aunque se observó una disminución de 0.67 veces a 10ST en comparación con 0ST, no fue estadísticamente significativo, ni tampoco al subdividir a la población en base a las alteraciones metabólicas (Gráfica 35).



* Comparación vs T0. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins=insulina, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas

En el caso de p70S6K no se observaron cambios estadísticamente significativos en sus niveles de fosforilación cuando las células fueron estimuladas con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas durante 10 semanas con metformina en comparación a 0 semanas (0ST) (Gráfica 36). Por otra parte, aunque en algunas pacientes se observó una reducción en los niveles de fosforilación de p70S6K, no se pudo asociar a uno de los grupos generados por la presencia de alteraciones metabólicas.

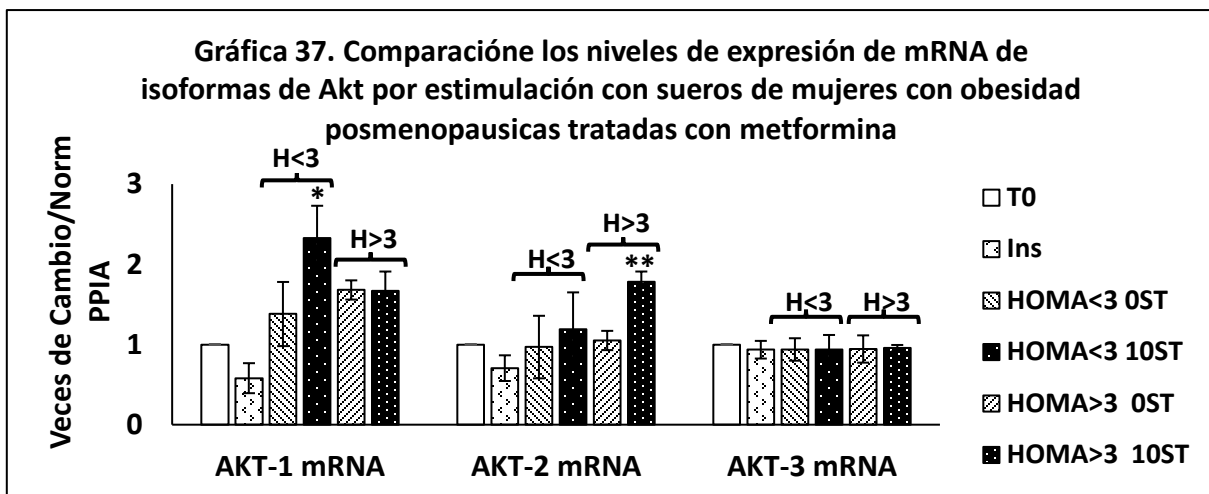


* Comparación vs T0. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins=insulina, SOPost= sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas

En conjunto, los resultados anteriores mostraron que las mujeres posmenopáusicas con obesidad que tuvieron una respuesta al tratamiento con metformina disminuyendo la viabilidad y la fosforilación de Akt fueron aquellas con resistencia a la insulina ($HOMA > 3$). Por lo anterior se decidió únicamente subdividir a la población por la presencia de resistencia a la insulina, en donde los grupos quedaron conformados por 3 pacientes en el grupo con resistencia a la insulina y 9 en el grupo sin resistencia a la insulina.

6.5.3. Evaluación de isoformas de mRNA de Akt en células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina

Como se observó en la Gráfica 29, la estimulación de las células MCF-7 con sueros de mujeres con obesidad indujo un aumento en la expresión del mRNA de las isoformas de Akt, por lo que decidimos evaluar si después del tratamiento con metformina se podría revertir dicho efecto. La Gráfica 37 muestra un aumento de 1 vez en la expresión de mRNA Akt-1 cuando las células fueron estimuladas con los sueros de mujeres con $HOMA < 3$ después de 10 semanas de tratamiento con metformina (10ST) en comparación con su respectivo OST. Para el mRNA Akt-2 hubo un aumento 0.75 veces por la suplementación con sueros de mujeres con $HOMA > 3$ después de 10 semanas de tratamiento con el fármaco. En el caso de mRNA Akt-3 no se observaron cambios estadísticamente significativos.



* Comparación vs OST. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= insulina, H<3 = HOMA<3, H>3 = HOMA>3.

Los resultados anteriores mostraron que la disminución en la fosforilación de Akt-1 en mujeres con HOMA>3 no está relacionada con la disminución en la expresión del mRNA. Curiosamente, aunque no se observaron cambios significativos en la fosforilación de Akt en pacientes sin resistencia a la insulina (HOMA<3), sí hubo cambios en la expresión del mRNA Akt-1 a las 10 semanas de tratamiento con metformina.

6.5.4. Evaluación de la vía NF- κ B y p38 en células MCF-7 bajo la suplementación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad antes y después del tratamiento con metformina

Se ha descrito que la presencia de obesidad induce un estado inflamatorio de bajo grado, por lo que no se descarta que la metformina también pudiera influir sobre las vías de señalización asociadas a la inflamación. Por otra parte, se sabe que la metformina regula negativamente la expresión de algunas citocinas proinflamatorias, por lo que decidimos evaluar la señalización de NF- κ B y p38 en células MCF-7 expuestas a los sueros de mujeres con obesidad después de 10 semanas de tratamiento con metformina. En la Figura 29 se muestra el western blot de I κ B- α y p65 a 10 y 30 min de estimulación con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas durante 10 semanas con metformina.

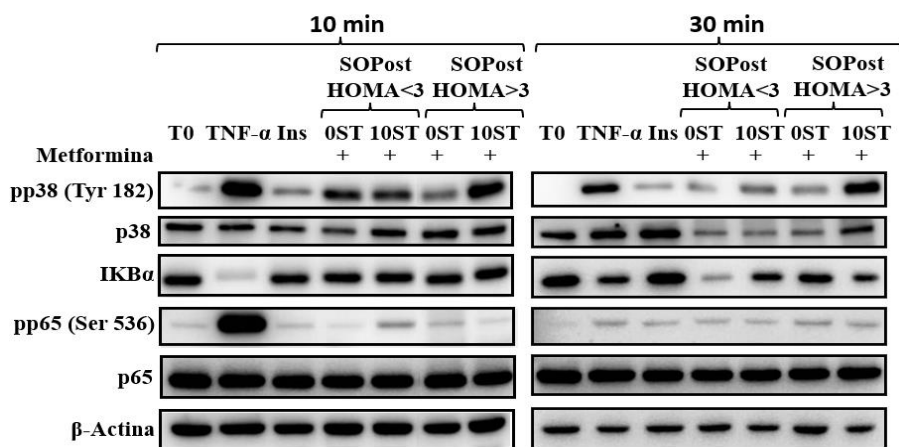
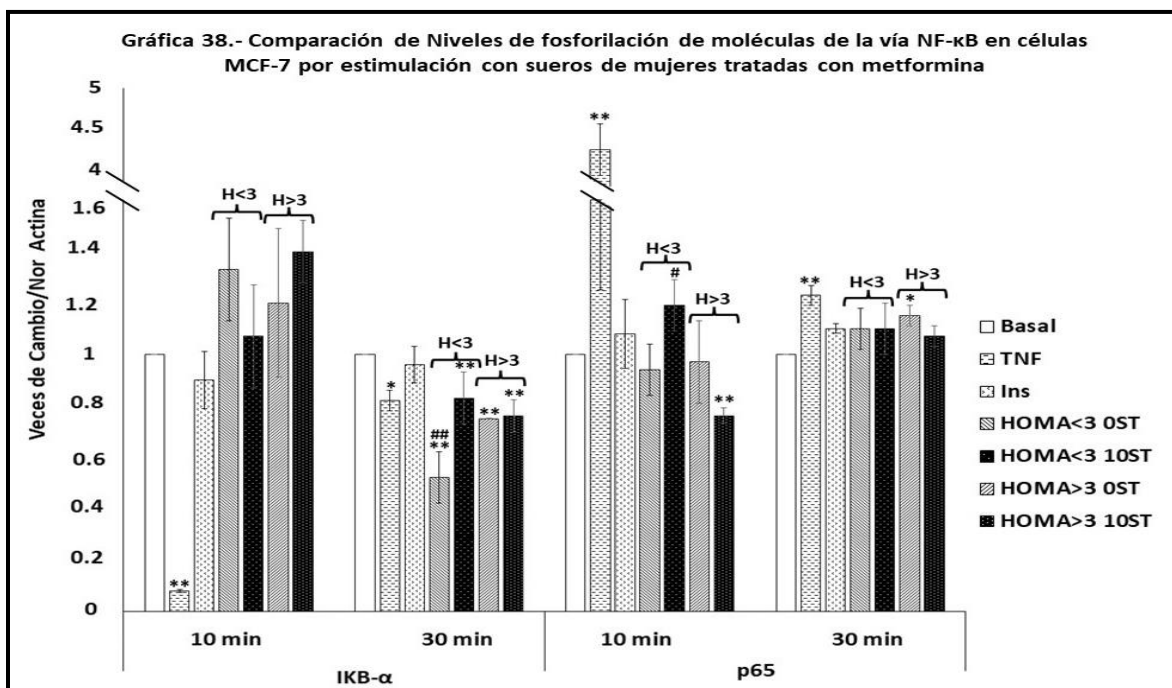


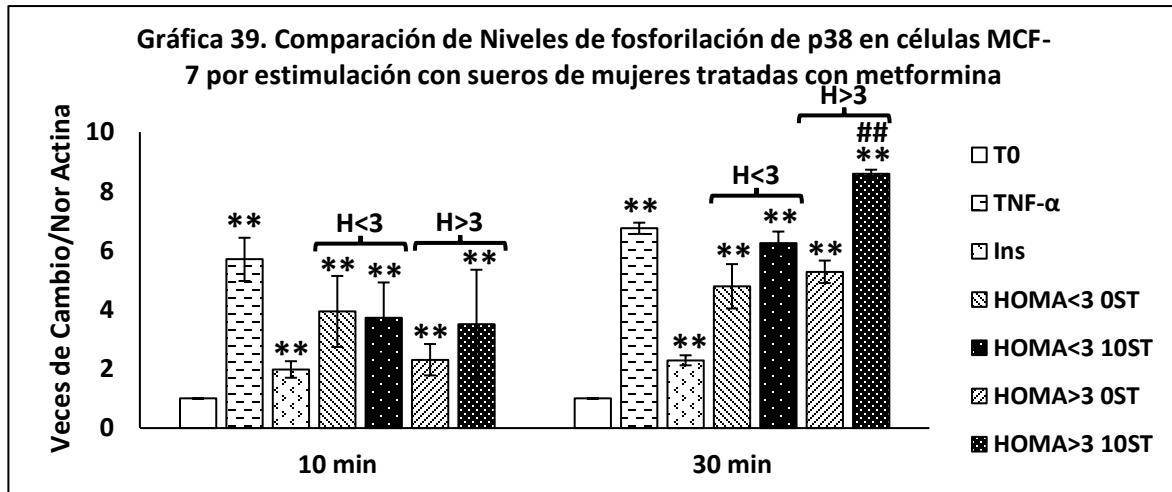
Figura 29. Western Blot de moléculas de la vía NF-κB y p38 en células MCF-7 estimuladas con sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad tratadas con metformina. Células estimuladas con 0.5 IU/ml insulina, 5% sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas (SOPost) a 0 y 10 semanas de tratamiento con metformina divididos por la presencia de resistencia a la insulina.

Al evaluar los niveles de fosforilación de moléculas de la vía NF-κB, observamos que la estimulación con sueros de mujeres con HOMA<3 antes del tratamiento con metformina (0ST) indujeron una degradación de IκBα de 0.3 veces a los 30 min de estimulación en comparación a 10ST (Gráfica 38). Mientras que a los 10 min de estimulación hubo un aumento de 0.45 veces en la fosforilación de p65 con sueros de pacientes con HOMA<3 con 10 semanas de tratamiento (10ST) en comparación a 0ST.



* Comparación vs T0, # vs OST. * p≥0.05, ** p≥0.005. Ins= insulina, H<3 = HOMA<3, H>3 = HOMA>3.

Por otra parte, se ha reportado que la activación de NF- κ B requiere la activación de p38 como cofactor, que a su vez es regulado por metformina. Al evaluar la fosforilación de p38 (Tyr 182) a los 10 min de estimulación no se observaron cambios estadísticamente significativos a 10ST respecto a 0ST en ninguno de los grupos de estudio. Sin embargo, a 30 min de estimulación hubo un incremento de 3.3 veces en pp38 (Tyr 182) por exposición a sueros de mujeres con HOMA>3 a las 10ST respecto a su 0ST (Gráfica 39).



* Comparación vs T0, # vs 0ST. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= insulina, H<3 = HOMA<3, H>3 = HOMA>3.

En conjunto los resultados anteriores mostraron que el tratamiento corto con metformina tiene un efecto positivo en mujeres con obesidad con resistencia a la insulina, al revertir el incremento en la fosforilación de Akt y la viabilidad de células MCF-7 expuestas a los sueros de estas mujeres. Por otra parte, aunque nuestros resultados mostraron que en mujeres con obesidad sin resistencia a la insulina existe un aumento de la fosforilación de p65, la reducción en la degradación de I κ B α impediría la traslocación a núcleo de NF- κ B, interrumpiendo su señalización.

7. DISCUSIÓN

Las oscilaciones entre normopeso, sobrepeso y obesidad se presentan en las poblaciones animales y en el humano como resultado de periodos de abundancia (épocas de cosechas) y de escasez (sequía o invierno). Si bien a lo largo de la historia estas fluctuaciones permitieron la existencia de alelos con mayor eficiencia para el almacenamiento de lípidos (denominados genes “ahorradores de energía”, propuesto por Neel en 1962), no explica del todo la epidemia actual de obesidad (Ruíz *et al*, 2019). Por lo cual es necesario considerar hipótesis complementarias como la del “epigenoma económico” de Stöger, en donde todos los humanos presentan los genes “ahorradores”, los cuales sufren la alteración en la expresión fenotípica producido por las variaciones ambientales, generando modificaciones epigenéticas que pueden transmitirse a través de la línea germinal (Genné, 2014).

A lo anterior se suma la literatura científica documentada desde el siglo XVI cuando se comienza a utilizar el término “obesidad” y su posterior conceptualización como una enfermedad en el siglo XIX. Sin embargo, es en el siglo XX cuando la obesidad presenta un cambio epidemiológico a consecuencia de la mejora en la calidad de vida. Dentro de las modificaciones asociadas a este cambio se incluyen: la movilidad social, el aumento en la esperanza de vida y la urbanización, que en conjunto promovieron un cambio en el estilo de vida incrementando el consumo calórico y disminuyendo la actividad física, afectando la expresión del “epigenoma ahorrador”. Es así, que a partir de 1975 a 2014 a nivel mundial el aumento de peso fue de 1.5 Kg por década, razón por la que la investigación en la obesidad, en el siglo XXI presentó un aumento de 424% en comparación al siglo XX (Ruíz *et al*, 2019).

El sobrepeso y la obesidad han mostrado ser elementos de riesgo para el desarrollo no solo de enfermedades metabólicas sino también de otras condiciones patológicas como las neoplasias de esófago, colo-rectal, páncreas, próstata, endometrio y mama (Sánchez *et al*, 2014). En particular en el cáncer de mama el sobrepeso y la obesidad incrementan de 2-3 veces el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Amadou *et al*, 2013). Por lo que, la relación entre obesidad y cáncer de mama se reconoce como un problema de salud pública, lo que ha motivado la investigación sobre los mecanismos que conllevan a esta asociación. Razón por la

cual el desarrollo de nuevas herramientas para su investigación es un área que se encuentra en plena expansión.

En este trabajo consideramos el uso de células de cáncer de mama como un biosensor. Un biosensor es aquel que permite detectar e interpretar parámetros biológicos o químicos por medio de tres componentes: el sensor biológico, el transductor y el detector (Jiménez & León (2008), Castro *et al* (2007)). En nuestro estudio propusimos el uso de la célula tumoral como el sensor biológico, el transductor analizando los cambios en los patrones de fosforilación y el detector asociado a la proliferación y migración (Figura 30). Estas variables presentaron patrones diferenciales al exponer a las células tumorales a componentes séricos de mujeres con características metabólicas y hormonales diferentes.

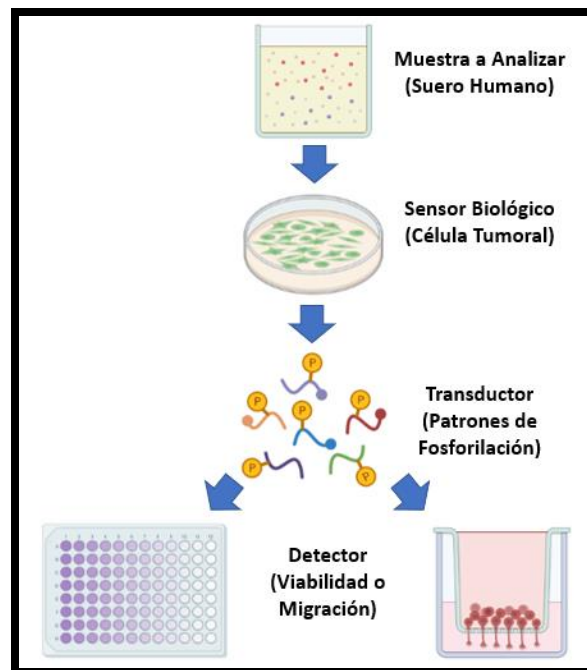


Figura 30. Esquema de los componentes que conforman un biosensor.

El proponer a la célula tumoral como un biosensor para detectar diferencias en moléculas séricas fue un concepto nuevo, por lo cual nos encontramos con la falta de información que estableciera las condiciones adecuadas para el uso de sueros humanos. Aunque sabemos que en este momento no es posible replicar el “microambiente tumoral”, una aproximación directa es emplear un componente sistémico, como es el suero humano.

La primera limitante con el uso de sueros humanos fue la preservación de moléculas termosensibles que están presentes en el suero en forma nativa y funcional, las cuales repercuten en la promoción y progresión de la carcinogénesis. Además, tuvimos que considerar la presencia de moléculas que inducen la eliminación de células tumorales, como son los componentes C1, C2 y C8 del sistema del complemento que inician el proceso de opsonización en unión a C6 y que normalmente son inactivados a 56 °C (Linscott y Triglia, 1981).

Para el cultivo con SFB, la falta de inactivación por calor tuvo una reducción importante sobre la viabilidad de las células tumorales que fue más significativo en comparación al efecto que presentó el suero humano, probablemente como consecuencia del rechazo inmunológico mediado por anticuerpos anti-Gal α 1-3 presentes en el SFB (Bazán *et al*, 2004). Por otro lado, aunque la disminución que se observó por estimulación con suero eutrófico sin inactivación del sistema de complemento no fue estadísticamente significativa, la inactivación térmica mostró la inhibición de proteínas termosensibles que tienen efecto en la inducción de la proliferación como podrían ser insulina e IGF, entre otras.

Por otra parte, tuvimos que tomar en consideración la presencia de rojo fenol en el medio de cultivo debido a reportes como el de Berthois *et al* (1986). En este trabajo se describió que esta molécula presenta cierta semejanza estructural con estrógenos no esteroideos. Más aún, la concentración de rojo de fenol presente en el medio de cultivo incrementa significativamente la proliferación y la síntesis de proteínas en células sensibles a estrógeno, como es el caso de células de cáncer de mama. Por todo lo anterior, desconocíamos si esto podía interferir en la suplementación con sueros humanos. Nuestros resultados mostraron que la ausencia de rojo fenol en la suplementación con suero de mujer normopeso favoreció la proliferación celular posiblemente por la unión del rojo fenol a proteínas séricas que inhiben su unión a receptores estrogénicos reduciendo la proliferación inducida por esta molécula y permitiendo la acción de inhibidores de la proliferación presentes en el suero (Berthois *et al*, 1986).

En otro orden de ideas, una de las metodologías ampliamente utilizadas en la investigación *in vitro* es la reducción de SFB para la evaluación de procesos celulares como: ciclo celular, diferenciación, bioestimulación, niveles de

fosforilación, entre otros (Rosebrock (2017), Langan & Chou (2011)). Pese a que la reducción “semigradual” de SFB (10%-2%-0%) genera una reducción en el tamaño y mayor desprendimiento de la placa de cultivo, fue la que presentó una respuesta similar a su control bajo la suplementación con suero de mujer normopeso. Lo que nos permitió generar un mayor rango dinámico en la respuesta entre sueros eutróficos vs con obesidad, favoreciendo la capacidad de diferenciar entre ambos tipos de suero humano.

Otro de los puntos a evaluar fue la concentración de glucosa en el medio de cultivo, ya que desconocíamos si la concentración de glucosa podría influir en la suplementación con sueros humanos. Se sabe que la concentración de glucosa en sangre es de 5 mM en condiciones normoglucémicas, mientras en individuos con obesidad que no presentan un adecuado control glucémico en promedio pueden alcanzar una concentración de 11.11 mM de glucosa (Pajuelo *et al*, 2018). Por otra parte, se reconoce que la hiperglucemia puede inducir la proliferación y disminuir la apoptosis por aumento en la producción de lactato, promoviendo el efecto Warburg que a su vez incrementa la producción de ROS (Nasir Kansestani *et al*, 2019). Este efecto fue comprobado en la concentración de 25 mM de glucosa en el medio de cultivo bajo la suplementación con SFB, pero en la suplementación con suero humano hubo una reducción significativa en la viabilidad que fue mayor a la reducción observada en una concentración de 5 mM. Lo anterior podría explicarse por lo reportado por Zhang *et al* (2019) en donde mostraron que en altas concentraciones de glucosa se incrementa la producción de ROS induciendo la liberación de citocromo C y la posterior activación de las caspasas 3 y 9 promoviendo la apoptosis, contrario a lo que podría suceder a bajas concentraciones en donde se presenta inducción de la autofagia por activación de LC3B explicando la reducción en la viabilidad.

Por otro lado, el suero humano está compuesto por 22 proteínas principales entre las que destacan: albumina, IgG total, transferrina, fibrinógeno, IgA total, Alfa 2-macroglobulina, IGG total, alfa-antitripsina, complemento C3, haptoglobulina, glicoproteína alfa 1 ácida, apolipoproteína A1, lipoproteína, factor H, ceruloplasmina, complemento C4, factor B del complemento, prealbúmina, complemento C9, complemento C1q y complemento C8, las cuales son moléculas que pueden generar la destrucción de la célula tumoral (Anderson & Anderson,

2002). Pese a la presencia de proteínas que pueden promover la eliminación de células tumorales, la mayoría de las líneas de cáncer de mama que formaron nuestro panel celular mantuvieron su viabilidad en la suplementación con suero humano. Lo anterior podría deberse al uso de suero normopeso perteneciente a una mujer con tipo sanguíneo O+, explicando el mantenimiento de la viabilidad para la línea MCF-7 que expresa antígeno O+ en su superficie celular (ATCC). Para el resto de las líneas celulares no existe una descripción tan detallada pero la probabilidad de expresión de antígeno O+ es elevada considerando que es el tipo sanguíneo con mayor abundancia (Mengoli *et al*, 2015).

Por otra parte, una de las vías de señalización más importantes en el desarrollo de cáncer es la vía de PI3K/Akt, la cual se encuentra desregulada aproximadamente en el 70% de los tumores mamarios (Tokunaga *et al* (2014), Wu *et al* (2018), Hinz & Jücker (2019)). Además, esta vía de señalización es una de las más importantes en la asociación entre obesidad y cáncer de mama al ser activada por moléculas que se encuentran en exceso en la obesidad como insulina e IGF (Bowers *et al* (2013), Sánchez *et al* (2014), Allot & Hursting (2015), Dietze *et al* (2017), Chen *et al* (2016), Argol *et al* (2015), Gérard & Brown (2017), Amadou *et al* (2013), Agnoli *et al* (2015), Borengasser *et al* (2015), Antonia *et al* (2016)). A pesar del reconocimiento de esta asociación, el uso de sueros humanos solo se ha reportado en los estudios de Bowers *et al* (2013 y 2015), por lo que no contábamos con información de la respuesta de las células de nuestro panel a la estimulación con sueros humanos. Nuestros resultados mostraron respuestas variables de forma independiente al subtipo de cáncer de mama, pese a la importancia de la vía PI3K/Akt asociada a los subtipos luminal y triple negativo (Hinz & Jücker (2019), Clark & Toker (2014), Schettini *et al* (2017), Shao *et al* (2017)).

Esta variación en la respuesta de líneas que pertenecen a un mismo subtipo molecular de la enfermedad puede ser consecuencia de la expresión de otros receptores. Por ejemplo, en el subtipo luminal A la presencia de receptores como el de andrógenos, progesterona, glucocorticoides, prolactina, entre otros, que podrían expresarse en mayor abundancia por lo que se contraponen a la importancia de la vía PI3K/Akt. Mientras en el subtipo triple negativo, las diferencias en la activación de la vía de estudio pueden ser consecuencia de la alta variabilidad que presenta cada uno de los subtipos de cáncer de mama triple negativo (Shao *et al*, 2017).

Como se mencionó anteriormente Bowers *et al* (2013 y 2015) son los únicos que han comparado el efecto de sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad, mostrando para la línea MCF-7 un incremento en la viabilidad por exposición al suero de mujeres con obesidad asociado a un incremento en la fosforilación de Akt. Nuestros resultados corroboran este efecto en el que se presentó un incremento en la viabilidad bajo exposición a sueros de mujeres con obesidad en comparación con el suero de mujeres eutróficas. Este resultado refuerza la asociación entre obesidad y el desarrollo de cáncer de mama del subtipo luminal A. No así en las líneas ZR-75-30 y MDA-MB-231 que previamente habían sido seleccionadas como posibles biosensores.

Lo observado en la línea MDA-MB-231 mostró que los sueros de mujeres con obesidad presentaron una tendencia a inducir mayor proliferación. Sin embargo, la dispersión que presentaron los sueros del mismo grupo de IMC redujo la significancia estadística y demostró que existe variabilidad biológica que podría estar relacionada con las concentraciones séricas de factores de crecimiento y hormonas presentes en cada uno de los sueros analizados o por el tipo sanguíneo.

En el caso de la línea MCF-7, no hubo diferencias significativas al comparar sueros del mismo IMC, pero diferente estado hormonal, ya que los sueros de mujeres con obesidad posmenopáusicas, aunque presentaron un ligero incremento en la proliferación respecto a su control no fue diferente a lo observado con el suero de las mujeres premenopáusicas con obesidad.

Así mismo, aunque la activación de la vía IR/Akt/p70S6K por insulina se presenta en un tiempo de estimulación de 10 min, este efecto es observado en una concentración mayor en comparación a la que se encuentra en sangre, razón por la que a nivel del receptor de insulina (IR) la fosforilación no incremento a los mismos niveles cuando fueron evaluados los sueros de mujeres normopeso vs con obesidad. Sin embargo, pese a que ambos tipos de suero presentaron su mayor nivel de fosforilación a 10 min de estimulación, los sueros de mujeres con obesidad promovieron niveles más elevados de pIR posiblemente asociado a la mayor concentración de insulina e IGF (Bowers *et al*, 2013), y en especial los sueros de mujeres posmenopáusicas con obesidad generaron un mayor incremento de la fosforilación.

Pese a que en ambos tipos de suero la activación de IR ocurrió al mismo tiempo, en Akt la activación inducida por los sueros con obesidad se presentó desde los 5 min de estimulación. Este efecto puede ser resultado de la presencia de mayores concentraciones en los sueros de mujeres con obesidad de otras moléculas como leptina, EGF y estrógenos, entre otras (Bowers *et al*, 2013). Estas hormonas convergen en Akt o pueden inhibir la degradación de la proteína al promover su unión con Hsp90 que inhibe la desfosforilación de Thr 308 mediado por la fosforilación de Ser 129 por CK2 o por la fosforilación directa por Scr, explicando la activación sostenida de Akt (Risso *et al*, 2015). A lo que se suma la disposición continua de Akt que observamos a lo largo del curso temporal y que fue resultado de la síntesis constante de mRNA producto de la estimulación con estos sueros. Lo anterior podría ser resultado de la activación de STAT3 por la activación del receptor de leptina, donde la isoforma Akt-1 presentó mayor sobreexpresión asociando el efecto de estos sueros a mayor proliferación (Zhang *et al* (2013), Bowers *et al* (2013), Barone *et al* (2019)).

Cabe mencionar que el efecto sobre la fosforilación de Akt fue mayor por estimulación con el suero de mujeres posmenopáusicas con obesidad, lo cual puede ser resultado del incremento de la fosforilación de IR. A esto podría sumarse el efecto del exceso de estrógenos presente en esta población, generando la activación del receptor de estrógenos (RE) que a su vez presenta un bucle de retroalimentación positiva con Akt (Wei *et al*, 2014).

Contrario al efecto que tuvieron los sueros de mujeres normopeso que presentaron una menor fosforilación de Akt y un retraso en la señalización, que podría ser resultado de la degradación vía proteosomal al generar una banda de 48 kDa de Akt-1 (Anexo 1) y por la reducción de la expresión de las isoformas de Akt. En el caso de la degradación de Akt-1, este proceso podría estar mediado por la ubiquitinación de la lisina 48 de Akt por medio de ubiquitin ligasas como: CHIP, BRCA1, TTC3 y MUL1 (Chan *et al*, 2014). Este efecto se asoció específicamente a un componente del sobrenadante (Anexo 2) como la adiponectina o citocinas antiinflamatorias como IL-10 que promueven la fosforilación y activación de AMPK lo que conduce a la activación de FOXO1 o FOXO3 que aumenta la expresión de MUL1 promoviendo la ubiquitinación y la subsecuente degradación de Akt. Pero no se descarta la participación de las otras ubiquitin ligasas que promueven la

ubiquitinación de la lisina 48 de Akt (Antonia *et al* (2016), Mauro *et al* (2017), Guan *et al* (2016), Kim *et al* (2017)).

Mientras la reducción en la expresión de las isoformas de Akt se podría explicar por la presencia de miRNAs reguladores negativos de la expresión de Akt tales como: MIR-409-3p que suprime la cantidad total de Akt-1, miR-200c que disminuye la cantidad de Akt-2, miR-433 y miR-29b que regulan a la baja a Akt-3 (Hinz & Jücker, 2019).

Aunque se reconoce que Akt tiene un papel importante en la carcinogénesis, la mayoría de los estudios la describen como una molécula única sin tomar en consideración la presencia de tres isoformas con funciones no redundantes y blancos específicos. Akt-1 inhibe a TSC para la posterior activación de los complejos mTOR1 (síntesis de proteínas y el crecimiento celular) que activa a p70S6K y mTOR2 (proliferación y supervivencia). Mientras Akt-2 tiene como sustratos AS160, HDM2, miosina, entre otros, para regular el transporte de los Gluts y el metabolismo, inhibir a p53 y modificar el citoesqueleto (Clark & Toker (2014), Hinz & Jücker (2019)).

Por lo que, el uso de un anticuerpo panAkt permitió identificar una activación temprana y sostenida en presencia de sueros de mujeres con obesidad, efecto que no tuvo una repercusión directa sobre la activación de p70S6K que ocurrió a los 30 min de estimulación. Posteriormente se identificó que esta activación fue mediada por la activación de la isoforma Akt-1, por lo que la fosforilación de pan-Akt presenta una divergencia en la señalización para modular procesos independientes, a pesar de su activación temprana.

En cuanto al uso de metformina como un fármaco antitumoral, la mayoría de los estudios *in vitro* utilizan medios de cultivo con una concentración alta de glucosa, concentraciones suprafarmacológicas y tiempos largos de exposición (48 y 72 hrs), en los que se ha descrito que el efecto directo de metformina se genera a través de la activación de AMPK y la fosforilación de TCS2 que inhibe la señalización de mTOR/p70S6K (Al-Zaidan *et al* (2017), Queiroz *et al* (2014), Dowling *et al* (2007)).

En nuestro ensayo obtuvimos IC50s similares a las reportadas para las líneas MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y BT-474 bajo la suplementación con SFB (Ben

Sahra *et al* (2008), Liu *et al* (2009), Zhuang & Miskimins (2011)). Sin embargo, nuestro ensayo reveló que la suplementación con sueros de mujeres normopeso sensibilizo a las células tumorales presentando IC50s más bajas, probablemente debido a la presencia de inhibidores de la proliferación presentes en estos sueros tales como la adiponectina (Anderson & Anderson, 2002). Efecto contrario al observado bajo la suplementación con sueros de mujeres con obesidad que presentaron una IC50 mayor a la del SFB, posiblemente como consecuencia de la presencia de altas concentraciones de moléculas inductoras de la proliferación como insulina, IGF y leptina, entre otras (Sun *et al* (2016), Caslin & Hasty (2019)).

Además, nuestros resultados mostraron que líneas como MCF-7, BT-474 resistente a trastuzumab y MDA-MB-231 presentaron una disminución en la activación de moléculas de la vía IR/Akt/p70S6K en concentraciones medias de glucosa (11.11 mM), 5 mM de metformina y 10 min de exposición al fármaco. Estos resultados fueron semejantes a lo reportado por Wahdab-Alaswad *et al* (2013) a nivel de Akt y p70S6K y lo reportado por Dowling *et al* (2015) a nivel de Akt en tumores de pacientes con cáncer de mama tratadas con metformina. Por lo anterior, proponemos el siguiente mecanismo: a 10 min de exposición y 5 mM de metformina se presenta la disminución en los niveles de fosforilación de IR o IRS que promueven una reducción en la activación de Akt repercutiendo en la activación de mTOR y posteriormente de p70S6K de forma independiente a la activación de LKB1.

Por otra parte, se ha descrito que las células tumorales presentan un incremento de la captación de glucosa de 20 a 30 veces más en comparación con células normales al presentar una mayor tasa de glucólisis aeróbica debido al efecto Warburg, efecto que en las células MCF-7 es mediado por GLUT-1 (Demmel *et al* (2015), Nasir Kansestani *et al* (2019)). Debido a la información sobre las concentraciones elevadas de insulina e IGF presentes en el suero de mujeres con obesidad y la activación de Akt (que habíamos observado previamente) que interviene en el transporte de GLUT1 y GLUT4 (Clark & Toker (2014), Hinz & Jücker (2019), Santos & Hussain (2019)), se esperaba que las células suplementadas con el suero de mujeres con obesidad presentaran una mayor captación de glucosa. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que los sueros de mujeres eutróficas promovieron una mayor captación de glucosa. Este efecto puede ser explicado por la presencia

de mayores niveles de adiponectina que aumenta la activación de AMPK promoviendo la biogénesis mitocondrial aumentando la demanda de glucosa para la producción de ATP, manteniendo el efecto Warburg (Rinaldi *et al*, 2018). Mientras bajo la suplementación con sueros de mujeres con obesidad, se ha demostrado que la célula tumoral en un entorno de adiposidad sufre una reprogramación catabólica de lípidos y aminoácidos, lo que incrementa la beta-oxidación, la desaminación oxidativa y la transaminación, aumentando los niveles de acetato y piruvato para la síntesis de novo de glucosa y otros metabolitos como ribosa-fosfato y NADPH (Luis *et al*, 2019). Lo anterior aumenta la producción de energía a través de la respiración aeróbica, efecto que se denomina “Inversión del Efecto Warburg” (Luis *et al* (2019), Blanquer *et al* (2016), Balaban *et al* (2018)).

Dicha actividad se perdió al fraccionar los sueros (Anexo 2), efecto que podría explicarse por el probable enriquecimiento de leptina promoviendo mayor síntesis de genes gluconeogénicos o por el enriquecimiento de lípidos saturados que inhiben a IRS presentes en el sobrenadante de los sueros (Petersen & Shulman, 2017). Mientras en la fracción del pellet el efecto observado podría ser explicado por la presencia de ceramidas y miR-192 y miR-122 en exosomas de adipocitos, inhibiendo a IRS (Castaño *et al*, 2018).

En tanto, en presencia de metformina se observaron dos efectos contrarios, bajo la suplementación con sueros de mujeres normopeso se presentó una disminución en la captación de glucosa. Efecto contrario al observado bajo la suplementación con sueros de mujeres con obesidad, que en presencia de metformina tuvieron una tendencia a incrementar la captación de glucosa, revirtiendo la inversión del efecto Warburg que habíamos observado en ausencia del fármaco y que es resultado de la activación de AMPK y la activación de genes gluconeogénicos (Brown *et al* (2010), Chatterjee *et al* (2015)).

Como se mencionó previamente, al fraccionar los sueros humanos (Anexo 2) observamos que la fracción del pellet de sueros de mujeres con obesidad produjeron mayores niveles de viabilidad y fosforilación. Especulamos que estos sueros podrían contener exosomas, los cuales pueden contener proteínas citosólicas como Wnt y Hedgehog que regulan la proliferación de diversos tejidos humanos y por la presencia de miRNAs que participan en la progresión tumoral, la

angiogénesis y metástasis (Chen *et al* (2019), Lee *et al* (2019)). En específico, los exosomas encontrados en sangre de personas con obesidad presentan menor concentración de supresores tumorales como miR-148b y miR-4269, y un aumento de oncomiR miR-23b (Zimta *et al*, 2019). Además de la presencia de miR-148b que antagoniza con oncomiR-214 en la promoción de la migración al modular la expresión de ITGA5 y ALCAM (Zimta *et al*, 2019).

Para el caso de los sueros de mujeres normopeso se observó que el sobrenadante fue la fracción que presentó un efecto inductor de viabilidad relacionado al incremento en la fosforilación de Akt (Anexo 2). Este cambio en el estado de fosforilación podría asociarse a un enriquecimiento de factores de crecimiento, contrario a la disminución observada en el pellet posiblemente por la presencia de miRNAs supresores de tumores como miR-148b que se encuentra incrementado en las personas eutróficas (Zimta *et al*, 2019).

En otro orden de ideas, los esferoides representan un modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia de agregación de muchos tipos celulares, mostrando uniformidad en el tamaño y morfología. Además, están formados por una capa externa de células proliferantes, una capa intermedia de células quiescentes y una zona interna de necrosis (Meseguer *et al*, 2015). En nuestro sistema de cultivo de esferoides (Anexo 2), las células MCF-7 que fueron expuestas al sobrenadante de los dos tipos de suero promovieron la formación de un agregado compacto probablemente consecuencia del poco tiempo que mantuvimos el cultivo, ya que se ha reportado que la línea forma inicialmente agregados compactos que tiene la capacidad de evolucionar a esferoides. Dicha capacidad se encuentra mediada principalmente por la expresión de E-cadherina que puede incrementar su expresión por la activación de HIF-1 α por activación de Akt/mTOR (Comşa *et al* (2015), Jahani *et al* (2020)).

Por otro lado, se ha descrito que la obesidad regula el aumento en la migración de células tumorales incrementando la metástasis en las mujeres con obesidad, por aumento en la concentración sérica de leptina, insulina e IGF-1. (Amadou *et al* (2013), Andò *et al* (2016), Antonia *et al* (2016), Babaei *et al* (2015)). Lo reportado para las células MCF-7 indica que generalmente no presentan migración, pero incrementan este proceso por expresión autocrina de VEGF por estimulación con

estrógenos (Comşa *et al*, 2015). Nuestros resultados mostraron que el suero de mujeres con obesidad indujo un aumento en la capacidad de migración de las células MCF-7 probablemente por la activación de la vía Akt/mTOR que activa a HIF-1 α promoviendo la expresión de VEGF (Hinz & Jücker, 2019). Sin embargo, el fraccionamiento de los dos tipos de suero (Anexo 2) mostró para sueros de mujeres normopeso que ambas fracciones tienen la misma capacidad para inducir migración en comparación con su input. En contra posición, las fracciones de sueros de mujeres con obesidad redujeron su capacidad de migración en comparación a su input. Por lo que ambas fracciones presentan moléculas que en conjunto regulan la migración inducida por el suero de estas mujeres.

Por su parte, cuando las mujeres fueron tratadas con metformina y sus sueros fueron evaluados en la célula tumoral, el análisis por grupo no mostró diferencias estadísticamente significativas en la reducción de la proliferación y los niveles de fosforilación de Akt a lo largo del tiempo de tratamiento con el fármaco, pero se pudo identificar a mujeres con resistencia a la insulina e hipertensión que sí mostraron dicha reducción. En el caso de las mujeres con resistencia a la insulina, se relaciona con lo reportado en múltiples metaanálisis que sugieren que existe una reducción en la incidencia y mortalidad por cáncer de mama en usuarias de metformina (Allot & Hursting (2015), Col *et al* (2012), Viollet *et al* (2012)). Sin embargo, se debe tomar en consideración que el uso del fármaco se da en pacientes diabéticas que por ende presentan resistencia a la insulina, pero el efecto antitumoral solo se reporta en el 30% de los usuarios. Además de los resultados anteriores, se observó un aumento en la fosforilación de p38 en esta población después del tratamiento con metformina, lo que corrobora lo informado previamente sobre un efecto antitumoral de la metformina a través de la activación de p38 (Xie *et al* (2014), Batlle *et al* (2019), Ryu *et al* (2020)).

Por otra parte, aunque nosotros esperábamos observar cambios en la fosforilación de Erk después del tratamiento con metformina en pacientes sin resistencia a la insulina para explicar la viabilidad observada, la reducción en la fosforilación de esta molécula no fue significativa después del tratamiento con metformina. Pero sí observamos la reducción de la degradación de IKB α y un aumento de la fosforilación de p65, independientemente de la fosforilación de p38. Lo anterior indicaría que pese a la fosforilación p65, la reducción en la degradación de IKB α impediría la

traslocación de NF- κ B al núcleo. Además de la regulación negativa que presenta la fosforilación de p65 en la serina 536, lo que resultaría en un efecto antitumoral como se ha reportado en múltiples estudios (Pradère *et al* (2016), Kim *et al* (2011), Moiseeva *et al* (2013)).

De tal manera, interpretamos que el conjunto de estos resultados implica que la metformina tiene dos efectos independientes: i) El primero mediante la regulación de Akt en mujeres con resistencia a la insulina y ii) El segundo mediante la regulación de NF- κ B en mujeres sin resistencia a la insulina.

Este es uno de los primeros estudios que utiliza a la célula tumoral para comparar el suero de mujeres eutróficas vs mujeres con obesidad, en el cual se evaluaron varios procesos que establecen la relación entre obesidad y cáncer como son proliferación, migración y captación de glucosa por medio de la evaluación de la modulación de la vía IR/Akt/p70S6K, que es un efecto mediado tanto por componentes proteicos y lipídicos presentes en el suero de las mujeres con obesidad, así como por mecanismos poco estudiados como son los exosomas.

Pese a la información que aquí se presentó, este es un estudio piloto por lo que una de nuestras limitaciones es el número de sueros evaluados, lo que tuvo un efecto en varios de nuestros análisis que presentaron valores de p cercanos a 0.05 debido a la variabilidad de los individuos evaluados pero que no alcanzaron significancia estadística, por lo que al incrementar el número de muestras será posible obtener efectos más robustos. Otra de las limitaciones que tuvo este estudio fue el uso de una sola línea de cáncer de mama, pese a que inicialmente evaluamos un panel de 13 líneas, sin embargo, como consecuencia de la n tan pequeña desechamos a dos líneas representantes de dos subtipos de cáncer de mama, por lo cual no podemos descartar que los efectos que observamos en la línea MCF-7 puedan ser replicados en otros modelos de la enfermedad.

Aunque la investigación sobre la relación obesidad-cáncer de mama utiliza múltiples herramientas, la mayoría de los enfoques utilizados consideran a las mujeres con obesidad como una población única sin considerar características intrínsecas a cada mujer. Es por ello que la utilización de la célula tumoral como biosensor de moléculas séricas es una herramienta útil para la subclasificación de la población de mujeres con obesidad. Sin dejar de considerar que esta es una etapa inicial que

requiere estudios complementarios de proteómica y metabolómica para finalmente correlacionar los mecanismos moleculares y criterios clínicos para disminuir las variables a evaluar y en un futuro encontrar marcadores séricos asociados a la protección contra el desarrollo de cáncer de mama en usuarias de metformina.

8. CONCLUSIÓN

Nuestro estudio demuestra que la célula tumoral MCF-7 puede ser empleada como biosensor para la comparación de sueros de mujeres eutróficas vs con obesidad. Identificando un incremento significativo en los niveles de expresión y fosforilación de Akt en forma temprana y sostenida que repercute en el incremento de la proliferación y migración de la célula tumoral, mediado por la presencia de obesidad y que se asocia principalmente a la isoforma Akt-1, particularmente en mujeres posmenopáusicas con obesidad. Este efecto fue revertido en mujeres posmenopáusicas con obesidad que recibieron tratamiento con metformina y que fue independiente a la activación de IR, aunque se requiere un estudio a profundidad. Mientras en mujeres sin resistencia a la insulina se observó la regulación de la señalización de NF- κ B. Por su parte, el suero de las mujeres eutróficas indujo un retraso en la activación de Akt-1 asociado a la degradación vía proteosomal que resulta en la disminución de procesos tumorigénicos (Figura 31).

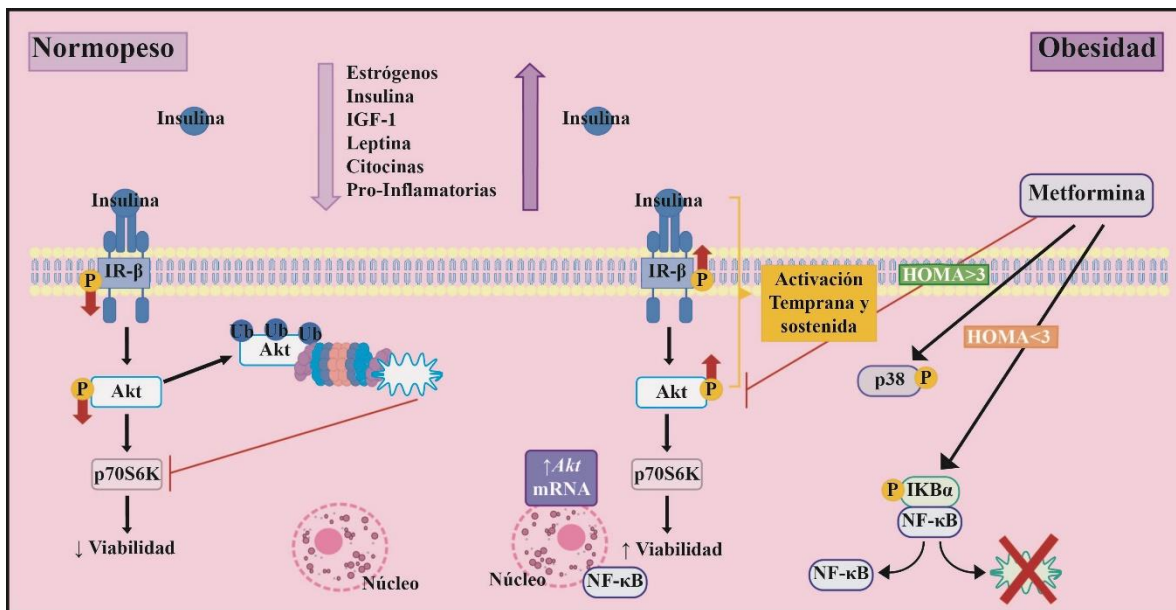


Figura 31. Representación esquemática de la activación de la vía IR- β /Akt/p70S6K en células MCF-7 expuestas a sueros humanos con diferentes características metabólicas y efecto del tratamiento con Metformina en pacientes con obesidad

9. PERSPECTIVAS

- Incremento del número de sueros evaluados para cada grupo y determinar si el fenómeno observado en la línea MCF-7 puede ser replicado en otros modelos celulares.
- Caracterización profunda de los componentes del suero.
- Mayor caracterización de las pacientes que presentan respuesta antitumoral al tratamiento a metformina.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agnoli C, Grioni S, Sieri S, Sacerdote C, Ricceri F, Tumino R, Frasca G, Pala V, Mattiello A, Chiodini P, Iacoviello L, De Curtis A, Panico S, Krogh V (2015) **“Metabolic syndrome and breast cancer risk: a case-cohort study nested in a multicenter Italian cohort”** PLoS One 10(6):e0128891
2. Aguilar MJ, González E, García AP, Álvarez J, Padilla CA, Guisado R, Rizo M (2011) **“Obesidad y su implicación en el cáncer de mama”** Nutr Hosp 26(4):899-903
3. Aguilar MJ, Neri M, Padilla CA, Pimentel ML, García A, Muy N (2012) **“Sobrepeso/obesidad en mujeres y su implicación en el cáncer de mama; edad de diagnóstico”** Nutr Hosp 27(5):1643-1647
4. Al-Zaidan L, El Ruz RA, Malki AM (2017) **“Screening Novel Molecular Targets of metformin in breast cancer by proteomic approach”** Front Public Health 5:227
5. Allott EH, Hursting SD (2015) **“Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies”** Endocr Relat Cancer 22(6): R365-86
6. Amadou A, Hainaut P, Romieu I (2013) **“Role of obesity in the risk of breast cancer: lessons from anthropometry”** J Oncol 2013:906495
7. American Cancer Society (2021), [cancer.org](https://www.cancer.org) | 1.800.227.2345
8. Amin MN, Hussain MS, Sarwar MS, Rahman Moghal MM, Das A, Hossain MZ, Chowdhury JA, Millat MS, Islam MS (2019) **“How the association between obesity and inflammation may lead to insulin resistance and cancer”** Diabetes Metab Syndr 13(2):1213-1224
9. An H, He L (2016) **“Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes”** J Endocrinol 228(3): R97-106
10. Anderson NL, Anderson NG (2002) **“The human plasma proteome: hystoru, character, and diagnostic prospects”** Mol Cell Proteomics 1(11):845-67
11. Andò S, Barone I, Giordano C, Bonofiglio D, Catalano S (2016) **“The multifaceted mechanism of Leptin signaling within tumor microenvironment in driving breast cancer growth and progression”** Frontiers in oncology 26 vol. 4
12. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, St-Pierre J (2014) **“Metformin Directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics”** Cancer Metab 28;2-12 doi:10.1186/2049-3002-2-12
13. Antonia F, Ricci S, Kouidhi S, Rizzo A, Penon A, Formisano P, Giordano A, Di Carlo A, Di Domenico M (2016) **“Multifaceted breast cancer: the molecular connection with obesity”** Journal of Cellular Physiology DOI 10.1002/jcp.25475
14. Arce C, Aguilar JL, Villareal C, Lara FU, Olvera D, Alvarado A, Flores D, Mohar A (2014) **“Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients”** Breast Cancer Res Treat 146(1):183-8
15. Argol DF, Iyengar NM, Hudis CA. Obesity and Cancer: Concepts and Challenges. Indian J Surg Oncol (2015) 6(4):390-398. doi: 10.1007/s13193-015-0483-z.
16. Arnold KM, Flynn NJ, Sims-Mourtada J (2016) **“Obesity and Breast Cancer: DO Age, Race and Subty Matter?”** BAOJ Cancer Res Ther 2(5). Pii 021
17. Azrad M, Demark-Wahnefried W (2014) **“The association between adiposity and breast cancer recurrence and survival: A review of the recent literature”** Curr Nutr Rep 3(1):9-15
18. Babaei Z, Moslemi D, Parsian H, Khafid S, Pouramirc M, Mosapour A (2015) **“Relationship of obesity with serum concentrations of leptin, CRP and IL-6 in breast cancer survivors”** Journal of the Egyptian National Cancer Institute 27, 223-229
19. Baiden-Amisshah REM, Tuyaeerts S (2019) **“Contribution of Aging, Obesity, and Microbiota on Tumor Immunotherapy Efficacy and Toxicity”** Int J Mol Sci 20(14)
20. Balaban S, Lee LS, Varney B, Aishah A, Gao Q, Shearer RF, Saunders DN, Grewal T, Hoy AJ (2018) **“Heterogeneity of fatty acid metabolism I breast cancer cells underlies differential sensitivity to palmitate-induced apoptosis”** Mol Oncol 12(9):1623-1638
21. Bao B, Azmi AS, Ali S, Zaiem F, Sarkar FH (2014) **“Metformin may function as anti-cancer agent via targeting cancer stem cells: the potential biological significance of tumor-associated miRNAs in breast and pancreatic cancers”** Ann Transl Med 2(6):59

22. Barone I, Giordano C, Bonofiglio D, And'ò S, Catalano S (2019) **“The weight of obesity n breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives”** *Semin Cancer Biol* pii: S1044-579X (19)30194-4.
23. Barone I, Giordano C, Bonofiglio D, Andò S, Catalano S (2020) **“The weight of obesity in breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives”**. *Semin Cancer Biol*; 60:274–284. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.001> PMID: 31491560
24. Bastarrachea RA, Montero JC, Saavedra-Gajardo V, Cerda-Flores R, Machado-Domínguez A, Comussie AG (2008) **“Objetivos moleculares para diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la obesidad”** *Rev méd. Chile* 136(1): 107-117
25. Batlle R, Andrés E, Gonzalez L, Llonch E, Igea A, Gutierrez-Prat N, et al. “Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal-endothelial transition by p38 α through TGF- β and JNK signaling”. *Nat Commun*. 2019 Jul 11;10(1):3071. doi: 10.1038/s41467-019-10946-y. PMID: 31296856; PMCID: PMC6624205.
26. Bazán M, Gonzalez N, Delgado L **“Xenotransplante: Estado actual, limitantes y expectativas”**. *Rev Cubana Cir* (2004), vol. 43, n.2.
27. Belfiore A, Malaguarnera R, Nicolosi ML, Lappano R, Ragusa M, Morrione A, Vella V (2018) **“A novel functional crosstalk between DDR1 and the IGF axis and its relevance for breast cancer”** *Cell Adh Migr* 12(4):305-314
28. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberge P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F (2008) **“The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level”** *Oncogene* 27(25):3576-86
29. Bergom C, Kelly T, Bedi M, Saeed H, Prior P, Rein LE, Szabo A, Wilson JF, Currey AD, White J (2016) **“Association of Locoregional Control With High Body Mass Index in Women Undergoing Breast Conservation Therapy for Early-Stage Breast Cancer”** *Int J Radiat Oncol Biolo Phys* 96(1):65-71
30. Berstein LM, Boyarkina MP, Tsyrlina EV, Turkevich EA, Semiglazov VF (2011) **“More favorable progesterone receptor phenotype of breast cancer in diabetics treated with metformin”** *Med Oncol* 28(4):1260-3
31. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (1986) **“Phenol red tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(8):2496-500
32. Biganzoli E, Desmedt C, Fornili M, de Azambuja E, Cornez N, Ries F, Closon-Dejardin MT, Kerger J, Focan C, Di Leo A, Nogaret JM, Sotiriou C, Piccart M, Demicheli R (2017) **“Recurrence dynamics of breast cancer according to baseline body mass index”** *Eur J Cancer* 87:10-20
33. Bitzur R, Brenner R, Maor E, Antebi M, Ziv-Baran T, Segev S, Sidi Y, Kivity S (2016) **“Metabolic syndrome, obesity, and the risk of cancer development”** *Eur J Intern Med* 34:89-93
34. Björner S, Rosendahl AH, Simonsson M, Markkula A, Jirström K, Borgquist S, Rose C, Ingvar C, Jernström H (2017) **“Body Mass Index Influences the Prognostic Impact of Combined Nuclear Insulin Receptor and Estrogen Receptor Expression in Primary Breast Cancer”** *Front Endocrinol (Lausanne)*.28;8:332
35. Blanquer-Rosselló MDM, Oliver J, Sastre-Serra J, Valler A, Roca P (2016) **“Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells”** *Int J Biochem Cell Biol* 72:18-26
36. Blüher M (2019) **“Obesity: global epidemiology and pathogenesis”** *Nat Rev Endocrinol* 15(5):288-298
37. Borengasser A, Karbassi B, Hedges R, Rogers L, Kadlubar S, Emmons T **“Adipocyte hypoxia promotes epithelial-mesenchymal transition-related gene expression and estrogen receptor negative phenotype in breast cancer cells”** *Oncology Reports* (2015) 33: 2689-2694
38. Borguist S, Butt T, Almgren P, Shiffman D, Stocks T, Orho-melander M, Manjer J, Melander O (2016) **“Apolipoproteins, lipids and risk of cancer”** *Int J Cancer* 138(11):2648-56

39. Bost F, Ben-Sahra I, Tanti JF (2012) **“Prevention of Mutagenesis: New Potential Mechanisms of Metformin Action in Neoplastic Cells”** *Cancer Prev Res (Phila)* 5(4):503-6
40. Bostner J, Alayev A, Berman AY, Formander T, Nordenskjöld B, Holz MK, Stål O (2018) **“Raptor localization predicts prognosis and tamoxifen response in estrogen receptor-positive breast cancer”** *Breast Cancer Res Treat* 168(1):17-27
41. Bowers L, Cavazos D, Maximo I, Brenner A, Hursting S, deGraffenried L **“Obesity enhances nongenomic estrogen receptor crosstalk with the PI3K/Akt and MAPK pathways to promote in vitro measures of breast cancer progression”**. *Breast Cancer Research* (2013) 15:R59
42. Bowers LW, Wiese M, Brenner AJ, Rossi EL, Tekmal RR, Hursting SD, et al. **“Obesity Suppresses Estrogen Receptor Beta Expression in Breast Cancer Cells via a Her2-Mediated Pathway”**. *PLoS One* (2015) 10(12):e0145452. doi: 10.1371/journal.pone.0145452.
43. Brown KA, Hunger NI, Docanto M, Simpson ER (2010) **“Metformin inhibits aromatase expression in human breast adipose stromal cells via stimulation of AMP-activated protein kinase”** *Breast Cancer Res Treat* 123(2):591-6
44. Cantor JR, Sabatini DM (2012) **“Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces”** *Cancer Discov* 2(10):881-98
45. Caslin HL, Hasty AH (2019) **“Extrinsic and Intrinsic Immunometabolism Converge: Perspectives on Future Research and Therapeutic Development for Obesity”** *Curr Obes Rep* 8(3):210-219
46. Castaño C, Kalko S, Novials A, Párrizas M (2018) **“Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice”** *Proc Natl Acad Sci USA* 115(48):12158-12163
47. Castro LP, Luna VM, Villalobos R **“Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México”**. *Rev Int. Contam. Ambient.* (2007) 23 (1) 35-45
48. Carreto M (2002) **“Trastuzumab”** *OFFARM* Vol. 21 Núm. 7, pp-124-126
49. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (2017) **“Cáncer de Mama, Información Estadística”** Secretaría de Salud http://cnegrs.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/CancerdeLaMujer/InfEstad.htm
50. Chan CH, Jo U, Kohrman A, Rezaeian AH, Chou PC, Logothetis C, Lin HK. **“Posttranslational regulation of Akt in human cancer”** *Cell Biosci.* 2014 Oct 1;4(1):59. doi: 10.1186/2045-3701-4-59. PMID: 25309720; PMCID: PMC4192732.
51. Chatterjee S, Thaker N, De A (2015) **“Combined 2-deoxy glucose and metformin improves therapeutic efficacy of sodium-iodide symporter-mediated targeted radioiodine therapy in breast cancer cells”** *Breast Cancer (Dove Med Press)* 7:251-65
52. Chen S, Datta-Chaudhuri A, Deme P, Dickens A, Dastgheyb R, Bhargava P, Bi H, Haughey NJ (2019) **“Lipidomic characterization of extracellular vesicles in human serum”** *J Circ Biomark* 8:1849454419879848
53. Chen MJ, Wu WY, Yen AM, Fann JC, Chen SL, Chiu SY, Chen HH, Chiou ST (2016) **“Body mass index and breast cancer: analysis of nation-wide population-based prospective cohort study on 1 393 985 Taiwanese women”** *Int J Obes (Lond)* 40(3):524-30
54. Chen Y, Wen Y, Li Z, Luo D, Zhang X. **“The molecular mechanisms between metabolic syndrome and breast cancer”** *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016) 471 391-395. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.034.
55. Chen J and Du B (2019) **“Novel positioning from obesity to cancer: FTO, an m⁶A RNA demethylase, regulates tumor progression”** *J Cancer Res Clin Oncol* 145(1):19-29
56. Choucair A, Pham TH, Omarjee S, Jacquemetton J, Kassen L, Trédan O, Rambaud J, Marangoni E, Corbo L, Treilleux I, Le Romancer M (2019) **“The arginine methyltransferase PRMT1 regulates IGF-1 signaling in breast cancer”** *Oncogene* 38(21):4015-4027
57. Clark AR and Toker A (2015) **“Signaling specificity in the Akt pathway in breast cancer”** *Biochem Soc Trans* 42(5):1349-55

58. Col NF, Ochs L, Springmann V, Aragaki A, Chlebowski R (2012) **“Metformin and breast cancer risk: a meta-analysis and critical literature review”** *Breast Cancer Res Treat* 135(3):639-46
59. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M (2015) **“The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research”** *Anticancer Res* 35(6):3147-54
60. Costa RLB, Han HS, Gradishar WJ (2018) **“Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review”** *Breast Cancer Res Treat* 169(3):397-406
61. Day EA, Ford RJ, Smith BK, Mohammadi-Shemirani P, Morrow MR, Gutgesell RM, Lu R, Raphenya AR, Kabiri M, McArthur AG, McInnes N, Hess S, Paré G, Gerstein HC, Steinberg GR. **Metformin-induced increases in GDF15 are important for suppressing appetite and promoting weight loss.** *Nat Metab.* 2019 Dec;1(12):1202-1208. doi: 10.1038/s42255-019-0146-4. Epub 2019 Dec 9. PMID: 32694673.
62. DeCensi A, Puntoni M, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Johansson HA, Cazzaniga M, Pruberi G, Serrano D, Schwab M, Hofmann U, Mora S, Aristarco V, Macis D, Bassi F, Luini A, Lazzeroni M, Bonanni B, Pollak MN (2014) **“Differential effects of metformin on breast cancer proliferation according to markers of insulin resistance and tumor subtype in a randomized presurgical trial”** *Breast Cancer Res Treat* 148(1):81-90
63. DeCensi A, Puntoni M, Guerrieri-Gonzaga A, Cazzaniga M, Serrano D, Lazzeroni M, Virigiani A, Gentilini O, Petrera M, Viale G, Cuzick J, Bonanni B, Pruneri G (2015) **“Effect of Metformin on Breast Ductal Carcinoma In Situ Proliferation in a Randomized Presurgical Trial”** *Cancer Prev Res (Phila)* 8(10):888-94
64. Demmel F, Brischewein M, Wolf P, Huber F, Pfister C, Wolf B (2015) **“Nutrient depletion and metabolic profiles in breast carcinoma cell lines measured with a label-free platform”** *Physiol Meas* 36(7):1367-81
65. Dey N, Williams C, Leyland-Jones B, De P (2015) **“A critical role for HER3 in Her2-amplified and non-amplified breast cancer: function of a kinase-dead RTK”** *Am J Transl Res* 7(4):733-50
66. Dietze E, Chavez T, Seewaldt V. **“Obesity and Triple-Negative Breast Cancer: Disparities, Controversies, and Biology”** *The American Journal of Pathology* (2017) 9.pii:S0002-9440(17)30396-6b. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.09.018.
67. Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N (2007) **“Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells”** *Cancer Res* 67(22):10804-12
68. Dowling RJ, Niraula S, Stambolic V, Goodwin PJ (2012) **“Metformin in cancer: translational challenges”** *J Mol Endocrinol* 48(3): R31-43
69. Dowling RJ, Niraula S, Chang MC, Done SJ, Ennis M, McCreedy DR, Leong WL, Escallon JM, Reedijk M, Goodwin PJ, Stambolic V (2015) **“Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study”** *Breast Cancer Res* 17:32
70. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X (2000) **“Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I”** 275(1):223-8
71. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD (2005) **“Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients”** *BMJ* 330(7503):1304-5
72. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS (2018) **“Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer”**. *Surg Oncol Clin N Am.* 27(1):95-120. doi: 10.1016/j.soc.2017.08.005. PMID: 29132568; PMCID: PMC5715810.
73. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B (2014) **“Metformin: from mechanisms of action to therapies”** *Cell Metab* 20(6):953-66
74. Fuentes-Mattei E, Velazquez-Torres G, Phan L, Zhang F, Chou PC, Shin JH, Choi HH, Chen JS, Zhao R, Chen J, Gully C, Carlock C, Qi Y, Zhang Y, Wu Y, Esteva FJ, Luo Y, McKeehan WL, Ensor J, Hortobagyi GN, Pusztai L, Fraser Symmans W, Lee MH, Yeung SC (2014) **“Effects of obesity on transcriptomic changes and cancer hallmarks in estrogen receptor-positive breast cancer”** *J Natl Cancer Inst* 106(7). Pii: dju158
75. García-Castro A, Zonca M, Florindo-Pinheiro D, Carvalho-Pinto CE, Cordero A, Gutiérrez del Fernando B, García-Grande A, Mañes S, Hahne M, González-Suárez E, Planelles L (2015)

- “APRIL promotes breast tumor growth and metastasis and is associated with aggressive basal breast cancer”** Carcinogenesis 36(5):574-84
76. Genné-Bacon EA. **“Thinking evolutionarily about obesity.”** Yale J Biol Med. 2014 Jun 6;87(2):99-112. PMID: 24910556; PMCID: PMC4031802.
 77. Gérard C & Brown K. **“Obesity and breast cancer-role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue”** Molecular and Cellular Endocrinology (2017) DOI 10.1016/j.mce.2017.09.014.
 78. Giles ED, Jindal S, Wellberg EA, Schedin T, Anderson SM, Thor AD, Edwards DP, MacLean PS, Schedin P (2018) **“Metformin inhibits stromal aromatase expression and tumor progression in a rodent model of postmenopausal breast cancer”** Breast Cancer Res 20(1):50
 79. Gollavilli PN, Kanugula AK, Koyyada R, Karnewar S, Neeli PK, Kotamraju S (2015) **“AMPK inhibits MTDH expression via GSK3b and SIRT1 activation: potential role in triple negative breast cancer cell proliferation”** FEBS J 282(20):3971-85
 80. Goossens GH (2017). **“The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function.”** Obes Facts;10(3):207-215. doi: 10.1159/000471488. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28564650; PMCID: PMC5644968.
 81. Graham G, Punt J, Arora M, Day R, Doogue M, Duong J, Furlong T, Greenfield J, Greenup L, Kirkpatrick C, Ray J, Timmins P, Williams K (2011) **“Clinical pharmacokinetics of metformin”** Clin Pharmacokinet 50(2):81-98
 82. Green AS, Chaouis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D, Tamburini J (2011) **“LKB1/AMPK/mTOR signaling pathway in hematological malignancies: from metabolism to cancer cell biology”** Cell Cycle 10(13):2115-20
 83. Green AR, Powe DG, Rakha EA, Soria D, Lemetre C, Nolan CC, Barros FFT, Macmillan RD, Garibaldi JM, Ball GR, Ellis O (2013) **“Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers”** Br J Cancer 109(7):1886-1894
 84. Grossmann ME, Yang DQ, Guo Z, Potter DA, Cleary MP (2015) **“Metformin Treatment for the Prevention and/or Treatment of Breast/Mammary Tumorigenesis”** Curr Pharmacol Rep 1(5):312-323
 85. Guan F, Ding Y, Zhang Y, Zhou Y, Li M, Wang C. **“Curcumin Suppresses Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Autophagy-Dependent Akt Degradation”.** PLoS One. 2016 Jan 11;11(1):e0146553. doi: 10.1371/journal.pone.0146553. PMID: 26752181; PMCID: PMC4708990.
 86. Hadad SM, Coates P, Jordan LB, Dowling RJ, Chang MC, Done SJ, Purdie CA, Goodwin PJ, Stambolic V, Moulder-Thompson S, Thompson AM (2015) **“Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial”** Breast Cancer Res Treat 150(1):149-55
 87. Hatoum D, McGowan EM (2015) **“Recent Advances in the Use of Metformin: Can Treating Diabetes Prevent Breast Cancer?”** Biomed Res Int 2015:548436
 88. Hauck AK, Huang Y, Hetzel AV, Bernlohr DA (2019) **“Adipose oxidative stress and protein carbonylation”** J Biol Chem 294(4): 1083-1088
 89. He H, Zhao Z, Chen J, Ni Y, Zhong J, Yan Z, Li Y, Liu D, Pletcher MJ, Zhu Z. **Metformin-based treatment for obesity-related hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** J Hypertens. 2012 Jul;30(7):1430-9. doi: 10.1097/HJH.0b013e328353e249. PMID: 22525206.
 90. He CI, Bian YY, Xue Y, Liu ZX, Zhou KQ, Yao CF, Lin Y, Zou HF, Luo FX, Qu YY, Zhao JY, Ye ML, Zhao SM, Xu W (2016) **“Pyruvate Kinase M2 Activates mTORC1 by Phosphorylating AKTS1”** Sci Rep 6:21524
 91. Hernández AJ (2016) **“Efecto del suero de mujeres con diferentes grados de obesidad tratadas con metformina sobre la proliferación y muerte en la línea celular MCF-7”** UNAM
 92. Hinz N and Jücker M (2019) **“Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review”** Cell Commun Signal 17(1):154
 93. Iglesias DA, Yates MS, van der Hoeven D, Rodkey TL, Zhang Q, Co NN, Burzawa J, Chigurupati S, Celestino J, Bowser J, Broaddus R, Hancock JF, Schmandt R, Lu KH (2013)

- “Another surprise from Metformin: novel mechanism of action via K-Ras influences endometrial cancer response to therapy”** Mol Cancer Ther 12(2):2847-56
94. Ikink GJ, Hilkens J (2017) **“Insulin receptor substrate 4 (IRS4) is a constitutive active oncogenic driver collaborating with HER2 and causing therapeutic resistance”** Mol Cell Oncolo 4(2): e1279722
 95. Izquierdo AG, Crujeiras AB (2019) **“Obesity-Related Epigenetic Changes After Bariatric Surgery”** Front Endocrinol (Lausanne) 10:232
 96. Jahani M, Shahalaei M, Norooznezhad F, Miraghaee SS, Hosseinzadeh L, Moasefi N, Khodarahmi R, Farokhi, Mahnam A, Mansouri K (2020) **“TSGA10 over expression decreases metastatic and metabolic activity by inhibiting HIF-1 in breast cancer cells”** Arch Med Res 51(1):41-53
 97. Jiménez C and León DE **“Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios”**. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica (2008) ISSN 0121-4004 Volumen 16 número 1
 98. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G (2010) **“Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 in a Rag GTPase-Dependent Manner”** Cell Metab 11(5):390-401
 99. Kane Da, Anderson EJ, Prince JW 3rd, Woodlief TL, Lin CT, Bikman BT, Cortright RN, Neuffer PD (2010) **“Metformin selectively attenuates mitochondrial H2O2 emission without affecting respiratory capacity in skeletal muscle of obese rats”** Free Radic Biol Med 49(6):1082-7
 100. Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Gozal D (2018) **“Exosome and Macrophage Crosstalk in Sleep-Disordered Breathing-Induced Metabolic Dysfunction”** Int J Mol Sci 19(11)
 101. Kim HG, Hien TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, Kwon KI, Kim BH, Kim SK, Song GY, Jeong TC, Jeong HG. **Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation.** Br J Pharmacol. 2011 Mar;162(5):1096-108. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01101.x.
 102. King J, Mir H, Singh S (2017) **“Association of Cytokines and Chemokines in Pathogenesis of Breast Cancer”** Prog Mol Biol Transl Sci 151:113.136
 103. Kosalka P., Johnson C, Turek M, Sulpher J, Law A, Botros J, Dent S, Aseyev O (2019) **“Effect of obesity, dyslipidemia, and diabetes on trastuzumab-related cardiotoxicity in breast cancer”** Curr Oncolo 26(3): e314-e321
 104. Langan TJ, Chou RC (2011) **“Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation”** Methods Mol Biol 761:75-83
 105. Lee K, Kruper L, Dieli-Conwright CM, Mortimer JE (2019) **“The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment”** Curr Oncol Rep 21(5):41
 106. Lei B, Huang Y, Liu Y, Xu J, Sun S, Zhang X, Xu G, Wu M, Yu Y, Feng C (2018) **“Low-concentration BPF induced cell biological responses by the ER α and GPER1-mediated signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells”** Ecotoxicol Environ Saf 15; 165:144-152
 107. Lehuédé C, Li X, Dauvillier S, Vaysse C, Franchet C, Clement E, Esteve D, Longué M, Chaltiel L, Le Gonidec S, Lazar I, Geneste A, Dumontet C, Valet P, Nieto L, Fallone F, Muller C (2019) **“Adipocytes promote breast cancer resistance to chemotherapy, a process amplified by obesity: role of the major vault protein (MVP)”** Breast Cancer Res 21(1):7
 108. Li XM, Li Y, Zhang NN, Xie YH, Shi YQ. **Combination therapy with metformin and fenofibrate for insulin resistance in obesity.** J Int Med Res. 2012;39(5):1876-82. doi: 10.1177/147323001103900531. Erratum in: J Int Med Res. 2012;40(3):1216. PMID: 22117989.
 109. Li Y, Wang M, Zhi P, You J, Gao JQ (2017) **“Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-Glycoprotein in MCF/ADR cells and xenograft models”** Oncotarget 9(2):2158-2174

110. Linscott WD, Triglia RP (1981) **"The bovine complement system"** *Adv Exp Med Biol* 137:413-30
111. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE, Thor AD (2009) **"Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells"** *Cell Cycle* 8(13):2031-40
112. Liu L, Siu FM, Che CM, Xu A, Wang Y (2012) **"Akt blocks the tumor suppressor activity of LKB1 by promoting phosphorylation-dependent nuclear retention through 14-3-3 proteins"** *Am J Transl Res* 4(2):175-86
113. Logie L, Harthill J, Patel K, Bacan S, Hamilton DL, Macrae K, McDougall G, Wang HH, Xue L, Jiang H, Sakamoto K, Prescott AR, Rena G (2012) **"Cellular Responses to the Metal-Binding Properties of Metformin"** *Diabetes* 61(6):1423-33
114. Luey BC, May FE (2016) **"Insulin-like growth factors are essential to prevent anoikis in oestrogen-responsive breast cancer cells: importance of the type I IGF receptor and PI3-kinase/Akt pathway"** *Mol Cancer* 15:8
115. Luis C, Duarte F, Faria I, Jarak I, Oliveira PF, Alves MG, Soares R, Fernandes R (2019) **"Warburg effect Inversion: Adiposity shifts central primary metabolism in MCF-7 breast cancer cells"** *Life Sci* 223:38-46
116. Ma Y, Guo FC, Wang W, Shi HS, Li D, Wang YS (2013) **"K-ras gene mutation as a predictor of cancer cell responsiveness to metformin"** 8(3):763-8
117. Marinello PC, DaSilva TN, Panis C, Neves AF, Machado KL, Borges FH, Guarnier FA, Bernardes SS, de-Freitas-Junior JC, Morgado-Díaz JA, Luiz RC, Cecchini R, Cecchini AL (2016) **"Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β 1 induction"** *Tumour Biol* 37(4):5337-46
118. Mauro C, Smith J, Cucchi D, Coe D, Fu H, Bonacina F, Baragetti A, Cermenati G, Caruso D, Mitro N, Catapano AL, Ammirati E, Longhi MP, Okkenhaug K, Norata GD, Marelli-Berg FM. **"Obesity-Induced Metabolic Stress Leads to Biased Effector Memory CD4⁺ T Cell Differentiation via PI3K p110 δ -Akt-Mediated Signals"**. *Cell Metab.* 2017 Mar 7;25(3):593-609. doi: 10.1016/j.cmet.2017.01.008. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28190771; PMCID: PMC5355363.
119. Menéndez JA, Martin-Castillo B, Joven J (2016) **"Metformin and cancer: Quo vadis et cui bono?"** *Oncotarget* 7(34):54096-54101
120. Mengoli C, Bonfanti C, Rossi C, Franchini M (2015) **"Blood group distribution and life-expectancy: a single-center experience"** *Blood Transfus* 13(2):313-7
121. Meseguer J, Esteban MA, Mulero V, Cuesta A, Sepulcre MP (2015) **"Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo"** *Rev Eubacteria* 34:1697-0071
122. Miller RA, Birnbaum MJ (2010) **"An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin"** *J Clin Invest* 120(7):2267-70
123. Modzelewska P, Chludzińska S, Lewko J, Reszeć J (2019) **"The influence of leptin on the process of carcinogenesis"** *Contemp Oncol (Pozn)* 23(2):63-68
124. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, Bourdeau V, Pollak MN, Ferbeyre G. **Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation.** *Aging Cell.* 2013 Jun;12(3):489-98. doi: 10.1111/accel.12075. Epub 2013 Apr 23. PMID: 23521863.
125. Mondal S, Samajdar R, Mukherjee S, Bhattacharyya A, Bagchi B **"Towards Understanding the Structure, Dynamics and Bio-activity of Diabetic Drug Metformin"** *J Phys Chem* 2018; B; DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b11928
126. Moreno GM (2012) **"Definición y clasificación de la obesidad"** *Rev Med Clin Las Condes* 23(2):124-128
127. Mueller NT, Differding MK, Zhang M, Maruthur NM, Juraschek SP, Miller ER 3rd, Appel LJ, Yeh HC. **Metformin Affects Gut Microbiome Composition and Function and Circulating Short-Chain Fatty Acids: A Randomized Trial.** *Diabetes Care.* 2021 Jul;44(7):1462-1471. doi: 10.2337/dc20-2257. Epub 2021 May 18. PMID: 34006565; PMCID: PMC8323185.

128. Mutschler NS, Scholz C, Friedl TWP, Zwingers T, Fasching PA, Beckmann MW, Fehm T, Mohrmann S, Salmen J, Ziegler C, Jäger B, Widschwendter P, de Gregorio N, Schochter F, Mahner S, Harbeck N, Weissenbacher T, Jückstock J, Janni W, Rack B (2018) **“Prognostic Impact of Weight Change During Adjuvant Chemotherapy in Patients With High-Risk Early Breast Cancer: Results From the ADEBAR Study”** Clin Breast Cancer 18(2):175-183
129. Nasir Kansestani A, Mansouri K, Hemmati S, Zare ME, Moatafaei A (2019) **“High Glucose-reduced Apoptosis in human breast cancer cells is mediated by activation of NF-κB”** Iran J Allergy Asthma Immunol 18(2):153-162
130. National Heart, Lung, and Blood Institute and The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (2014) **“Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults”**
131. Obara A, Fujita Y, Abudukadier A, Fukushima T, Oguri Y, Ogura M, Harashima S, Hosokawa M, Inagaki N (2015) **“DEPTOR-related mTOR suppression is involved in metformin’s anti-cancer action in human liver cancer cells”** Biochem Biophys Res Commun 460(4):104-52
132. Pajuelo J, Bernui I, Sánchez J, Arbañil H, Miranda M, Cochachin O, Aquino A, Baca J (2018) **“Obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 en adolescentes”** An Fac med 79(3):200-5
133. Petersen MC, Shulman GI (2017) **“Roles of Diacylglycerols and Ceramides in hepatic insulin resistance”** Trends Pharmacol Sci 38(7):649-665
134. Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepiński JK, Angielski S (2010) **“Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes”** Biochem Biophys Res Commun 393(2):268-73
135. Pradère JP, Hernandez C, Koppe C, Friedman RA, Luedde T, Schwabe RF. **Negative regulation of NF-κB p65 activity by serine 536 phosphorylation.** Sci Signal. 2016 Aug 23;9(442):ra85. doi: 10.1126/scisignal.aab2820. PMID: 27555662; PMCID: PMC5327697.
136. Pulito C, Mori F, Sacconi A, Goeman F, Ferraiuolo M, Pasanisi P, Campagnoli C, Berrino F, Fanciulli M, Ford RJ, Levvero M, Pediconi N, Ciuffreda L, Milella M, Steinberg GR, Cioce M, Muti P, Strano S, Blandino G (2017) **“Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities”** Cell Discov 3:17022
137. Queiroz EA, Puukila S, Eichler R, Sampaio SC, Forsyth HL, Lees SJ, Barbosa AM, Dekker RF, Fortes ZB, Khaper N (2014) **“Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3 in MCF-7 breast cancer cells”** PLoS One 9(5):e98207
138. Rädler PD¹, Wehde BL¹, Wagner KU (2017) **“Crosstalk between STAT5 activation and PI3K/Akt functions in normal and transformed mammary epithelial cells”** Mol Cell Endocrinol 451:31-39
139. Raman R, Mott SL, Schroeder MC, Phadke S, El Masri J, Thomas A (2016) **“Effect of Body Mass Index- and Actual Weight-Based Neoadjuvant Chemotherapy Doses on Pathologic Complete Response in Operable Breast Cancer”** Clin Breast Cancer 16(6):480-486
140. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K (2013) **“Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?”** Diabetologia 56(9):1898-906
141. Rinaldi L, Delle Donne R, Borzacchiello D, Insabato L, Feliciello A (2018) **“The role of compartmentalized signaling pathways in the control of mitochondrial activities in cancer cells”** Biochim Biophys Acta Rev Cancer 1869(2):293-302
142. Risso G, Blaustein M, Pozzi B, Mammi P, Srebrow A “Akt/PKB: one kinase, many modifications” Biochem J (2015) 468, 203-214
143. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB (2013) **“Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine”.** Am J Pathol. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.08.002. Epub 2013 Aug 27. PMID: 23993780; PMCID: PMC5691324.
144. Rosebrock AP (2017) **“Methods for Synchronization and Analysis of the Budding Yeast Cell Cycle”** Cold Spring Harb Protoc 2017(1). doi: 10.1101/pdb. top080630

145. Ruíz-Cota P, Bacardí-Gascón M, Jiménez-Cruz A. **Historia, tendencias y causas de la obesidad en México.** JONNPR. 2019;4(7):737-45. DOI: 10.19230/jonnpr.
146. Ryu M, Sung CK, Im YJ, Chun C. **Activation of JNK and p38 in MCF-7 Cells and the In Vitro Anticancer Activity of *Alnus hirsuta* Extract.** Molecules. 2020 Feb 27;25(5):1073. doi: 10.3390/molecules25051073. PMID: 32121012; PMCID: PMC7179116.
147. Salvestrini V, Sell C, Lorenzini A (2019) **“Obesity May Accelerate the Aging Process”** Front Endocrinol (Lausanne) 10:266
148. Sánchez R C, Ibáñez C, Klaassen J. Obesidad y cáncer: la tormenta perfecta **“The link between obesity and cancer”** Rev Med Chil. 2014 Feb;142(2):211-21. Spanish. doi: 10.4067/S0034-98872014000200010. PMID: 24953110.
149. Sánchez-Jiménez F, Pérez-Pérez A, de la Cruz-Merino L, Sánchez-Margalet V (2019) **“Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin”** Front Oncol 18;9:596
150. Santos JM and Hussain F (2019) **“Higher Glucose Enhances Breast Cancer Cell Aggressiveness”** Nutr Cancer 22:1-13
151. Shao F, Sun H, Deng CX (2017) **“Potential therapeutic targets of triple-negative breast cancer based on its intrinsic subtype”** Oncotarget 8(42):73329-73344
152. Schäfer G (1976) **“On the mechanism of action of hypoglycemia-producing biguanides. A reevaluation and a molecular theory”** Biochem Pharmacol 25(18):2005-14
153. Schettini F, Buono G, Trivedi MV, De Placido S, Arpino G, Giuliano M. PI3K/mTOR Inhibitors in the Treatment of Luminal Breast Cancer. Why, When and to Whom? Breast Care (Basel). 2017 Oct;12(5):290-294. doi: 10.1159/000481657. Epub 2017 Oct 19. PMID: 29234247; PMCID: PMC5704698.
154. Schinzari F, Tesauro M, Campia U, Cardillo C. **Increased fractalkine and vascular dysfunction in obesity and in type 2 diabetes. Effects of oral antidiabetic treatment.** Vascul Pharmacol. 2020 May-Jun;128-129:106676. doi: 10.1016/j.vph.2020.106676. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32224233.
155. Selitrennik M & Lev S (2015) **“PYK2 integrates growth factor and cytokine receptor signaling and potentiates breast cancer invasion via a positive feedback loop”** Oncotarget 6(26):22214-26
156. Sonnenblick A, Venet D, Brohée S, Pondé N, Sotiriou C (2019) **“pAkt pathway activation is associated with PIK3CA mutations and good prognosis in luminal breast cancer in contrast to p-mTOR pathway activation”** NPJ Breast Cancer 31:57
157. Stern M, Williams K, González-Villalpando C, Hunt K and Haffner S (2004) **“Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease?”** Diabetes Care, vol. 27 pp. 2676-2681
158. Sun X, Nichols HB, Robinson W, Sherman ME, Olshan AF, Troester MA (2015) **“Post-diagnosis adiposity and survival among breast cancer patients: influence of breast cancer subtype”** Cancer Causes Control 26(12):1803-11
159. Sun W, Lu J, Wu S, Bi Y, Mu Y, Zhao J, Liu C, Chen L, Shi L, Li Q, Yang T, Yan L, Wan Q, Liu Y, Wang G, Luo Z, Tang X, Chen G, Huo Y, Gao Z, Su Q, Ye Z, Wang Y, Qin G, Deng H, Yu X, Shen F, Chen L, Zhao L, Wang T, Sun J, Xu M, Xu Y, Chen Y, Dai M, Zhang J, Zhang D, Lai S, Li D, Ning G, Wang W (2016) **“Association of insulin resistance with breast, ovarian, endometrial and cervical cancers in non-diabetic women”** Am J Cancer Res 6(10):2334-2344
160. Sun Y, Liu B, Snetselaar LG, Wallace RB, Caan BJ, Rohan TE, Neuhaus ML, Shadyab AH, Chlebowski RT, Manson JE, Bao W (2019) **“Association of Normal-weight Central Obesity With All-Cause and Cause-Specific Mortality Among Postmenopausal Women”** JAMA Netw Open 2(7):e197337
161. Syed BM, Green AR, Morgan DAL, Ellis IO, Cheung KL (2019) **“Liver Kinase B1-A Potential Therapeutic Target in Hormone-Sensitive Breast Cancer in Older Women”** Cancers (Basel) 11(2)
162. Tang Z, Ding S, Huang H, Luo P, Qing B, Zhang S, Tang R (2017) **“HDAC1 triggers the proliferation and migration of breast cancer cells via upregulation of interleukin-8”** Biol Chem 398(12):1347-1356

163. Tangvarasittichai S, Pongthaisong S, Tangvarasittichai O (2016) **“Tumor Necrosis Factor-A, Interleukin-6, C-Reactive Protein Levels and Insulin Resistance Associated with Type 2 Diabetes in abdominal Obesity Women”** Indian J Clin Biochem 31(1):68-74
164. Tokunaga E, Hisamatsu Y, Tanaka K, Yamashita N, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y. **“Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer”** Cancer Sci. 2014 Nov;105(11):1377-83. doi: 10.1111/cas.12521. Epub 2014 Oct 29. PMID: 25155268; PMCID: PMC4462367.
165. Trestini I, Carbognin L, Monteverdi S, Zanelli S, De Toma A, Bonaiuto C, Nortilli R, Fiorio E, Pilotto S, Di Maio M, Gasbarrini A, Scambia G, Tortora G, Bria E (2018) **“Clinical implication of changes in body composition and weight in patients with early-stage and metastatic breast cancer”** Crit Rev Oncol Hematol 129_54-66
166. Vademecum (2020) <https://www.vademecum.es/principios-activos-pertuzumab-01xc13>
167. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F (2012) **“Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview”** Clin Sci (Lond) 122(6):253-70
168. Wahdab-Alaswad R, Fan Z, Edgerton SM, Liu B, Deng XS, Arnadottir SS, Richer JK, Anderson SM, Thor AD **“Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy”** Cell Cycle 12(24):3759-69
169. Wei W, Chen ZJ, Zhang KS, Yang XL, Wu YM, Chen XH, Huang HB, Liu HL, Cai SH, Du J, Wang HS (2014) **“The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo”** Cell Death Dis 5:e1428
170. Widschwendter P, Friedl TW, Schwentner L, DeGregorio N, Jaeger B, Schramm A, Bekes I, Deniz M, Lato K, Weissenbacher T, Kost B, Andergassen U, Jueckstock J, Neugebauer J, Trapp E, Fasching PA, Beckmann MW, Schneeweiss A, Schrader I, Rack B, Janni W, Scholz C (2015) **“The influence of obesity on survival in early, high-risk breast cancer: results from the randomized SUCCESS A trial”** Breast Cancer Res 17:129
171. Worsley R, Jane F, Robinson PJ, Bell RJ, Davis SR. **Metformin for overweight women at midlife: a double-blind, randomized, controlled trial.** Climacteric. 2015 Apr;18(2):270-7. doi: 10.3109/13697137.2014.954997. Epub 2014 Oct 21. PMID: 25333776.
172. Wu N, Zhang J, Zhao J, Mu K, Zhang J, Jin Z, Yu J, Liu J. **“Precision medicine based on tumorigenic signaling pathways for triple-negative breast cancer”** Oncol Lett. 2018 Oct;16(4):4984-4996. doi: 10.3892/ol.2018.9290. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30250564; PMCID: PMC6144355.
173. Xie Y, Peng Z, Shi M, Ji M, Guo H, Shi H. **“Metformin combined with p38 MAPK inhibitor improves cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant ovarian cancer”.** Mol Med Rep. 2014 Nov;10(5):2346-50. doi: 10.3892/mmr.2014.2490. Epub 2014 Aug 14. PMID: 25118792; PMCID: PMC4214348.
174. Yamamoto T, Kanaya N, Somlo G, Chen S (2019) **“Synergistic anti-cancer activity of CDK4/6 inhibitor palbociclib and dual mTOR kinase inhibitor MLN0128 in pRB-expressing ER-negative breast cancer”** Breast Cancer Res Treat 174(3):615-625
175. Ye Y, Tang X, Sun Z, Chen S (2016) **“Upregulated WDR26 serves as a scaffold to coordinate PI3K/AKT pathway-driven breast cancer cell growth, migration, and invasion”** Oncotarget 7(14):17854-69
176. Zaharia M, Gómez H (2013) **“Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento”** Rev Peru Med Exp Salud Publica 30(4):649-56
177. Zakikhani M, Blouin MJ, Piura E, Pollak MN (2010) **“Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells”** Breast cancer Res Treat 123(1):271-9
178. Zhang J, Li G, Chen Y, Fang L, Guan C, Bai F, Ma M, Lyu J, Meng Q (2017) **“Metformin Inhibits Tumorigenesis and Tumor Growth of Breast Cancer Cells by Upregulating miR-200c but Downregulating AKT2 Expression”** Journal of Cancer Vol. 8
179. Zhang Y, Xi X, Mei Y, Zhao X, Zhou L, Ma M, Liu S, Zha X, Yang Y (2019) **“High-glucose induces retinal pigment epithelium mitochondrial pathways of apoptosis and inhibits mitophagy by regulating ROS/PINK1/Parkin signal pathway”** Biomed Pharmacother 111:1315-1325

180. Zhang J, Zhang LL, Shen L, Xu XM, Yu HG (2013) **“Regulation of Akt gene expression by cisplatin”** Oncol Lett 5(3):756-760
181. Zhuang Y, Miskimins WK (2011) **“Metformin induces both caspase-dependent and poly (ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells”** Mol Cancer Res 9(5):603-15
182. Zhuang Y, Miskimins K (2008) **“Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1”** Journal of Molecular Signaling 3:18
183. Zimta AA, Tigu AB, Muntean M, Cenariu D, Slaby O, Berindan-Neagoe I (2019) **“Molecular links between central obesity and breast cancer”** Int J Mol Sci 20(21)

11. ANEXO 1

11.1. Caracterización de banda de 48 kDa generada por la estimulación con sueros humanos

Como se describió en el apartado 6.2.1, en la mayoría de las líneas de cáncer de mama utilizadas en este estudio se observó la aparición de una banda extra bajo la estimulación con sueros SNP con el uso del anticuerpo contra pAkt (Ser 473), por lo cual se procedió a realizar la caracterización de esta banda que presentó un peso molecular de 48 kDa.

11.1.1. Evaluación de sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas vs con obesidad por la presencia de una banda de 48 kDa en células MCF-7

Primero determinamos si la aparición de la banda de 48 kDa se presentaba en ambos tipos de sueros humanos. Como se observa en la Figura 32, la banda de 48 kDa solo se observa bajo estimulación con sueros SNP, por lo que la banda se asocia a sueros de mujeres premenopáusicas eutróficas.

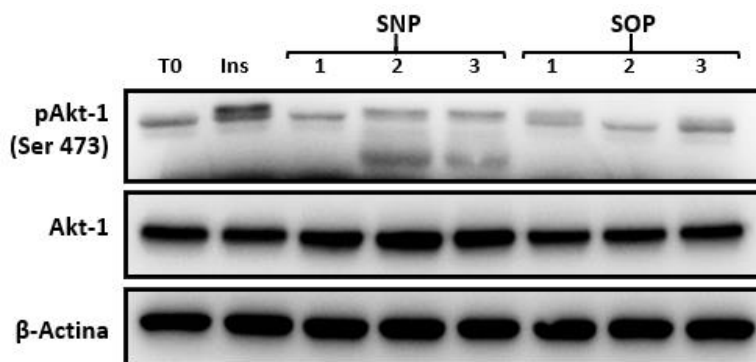


Figura 32. Western Blot de Akt-1 en células MCF-7 estimuladas con sueros humanos con diferente IMC

11.1.2. Evaluación de sueros de mujeres eutróficas con inactivación por calor o dislipidación por la presencia de una banda de 48 kDa en células MCF-7

Al utilizar suero sin inactivación por calor, surgió la duda si la aparición de la banda de 48 kDa podría estar asociada a la presencia del sistema del complemento o a la parte lipídica del suero. Por lo que se evaluó la aparición de la banda de 48 kDa por estimulación con sueros de mujeres normopeso inactivados o dislipidados,

observando que la banda se mantuvo en ambas condiciones a la misma altura que la banda observada en la estimulación con suero sin tratamiento (Figura 33).

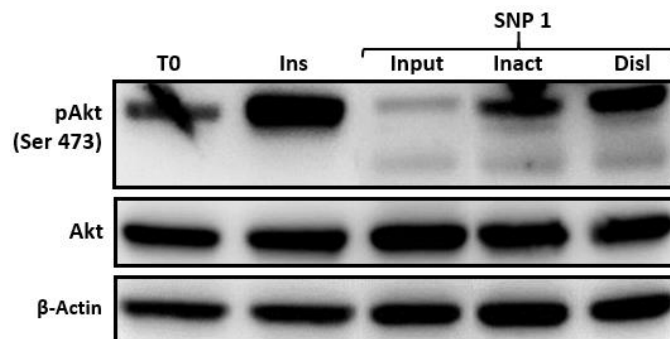


Figura 33. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con suero SNP inactivado o dislipidado.

11.1.3. *Determinación de banda de 48 kDa por el uso de anticuerpos específicos para cada isoforma de Akt*

Ya que la identificación de la banda de 48 kDa bajo estimulación con sueros SNP se realizó por medio de la utilización de un anticuerpo que reconoce las tres isoformas de la proteína, se requería identificar si la banda de 48 kDa se asociaba a una isoforma o era consecuencia de inespecificidad del anticuerpo. Para esta prueba se utilizaron anticuerpos específicos para cada una de las isoformas de la proteína. En la Figura 34 se observa que la banda de 48 kDa fue identificada únicamente con el anticuerpo específico contra pAkt-1 (Ser 473), no así con los anticuerpos anti pAkt-2 ni Akt-3. Por lo que la banda de 48 kDa se asocia únicamente a la isoforma Akt-1.

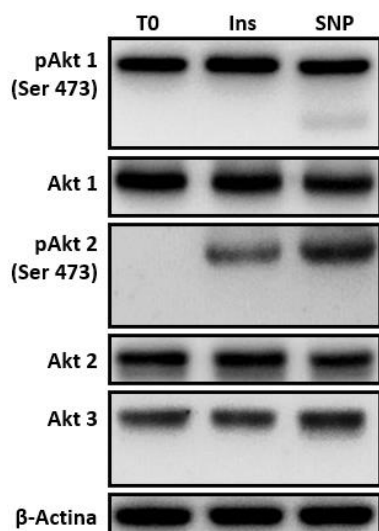


Figura 34. Western Blot de isoformas de Akt en células MCF-7 estimuladas con suero SNP

11.1.4. *Determinación de la aparición de banda de 48 kDa en otros tejidos por estimulación con sueros de mujeres eutróficas*

Como la aparición de la banda de 48 kDa se había observado en la mayoría de las líneas de cáncer de mama que conformaron nuestro panel celular, surgió la duda si era un efecto asociado únicamente a epitelio mamario. Para dilucidar lo anterior evaluamos en distintas líneas de cáncer de pulmón, próstata, colón, cérvix y riñón la aparición de dicha banda. En la Figura 35 se observa que la banda de 48 kDa fue visible en la línea PC3 de cáncer de próstata, en la línea HCT15 de cáncer de colon y en la línea A549 de cáncer de pulmón. Mientras en la línea HeLa de cáncer cervicouterino y en la línea HEK-293 de epitelio de riñón de embrión humano no se observó la banda de 48 kDa bajo la estimulación con suero SNP.

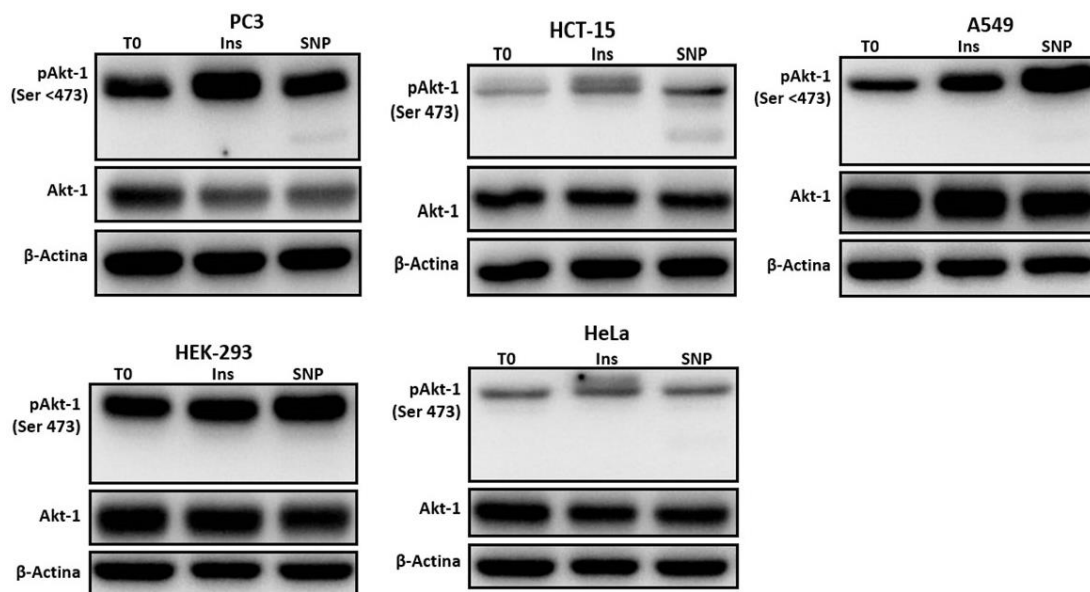


Figura 35. Western Blot de Akt-1 en células tumorales de diferentes tejidos estimuladas con suero SNP

Los resultados anteriores mostraron que la aparición de la banda de 48 kDa bajo estimulación con sueros SNP, no es específico al epitelio mamario, por lo que se requieren mayores estudios.

11.1.5. Evaluación de la aparición de banda de 48 kDa por estimulación con suero de mujer premenopáusica eutrófica en presencia de inhibidores de fosforilación y del proteosoma

Posteriormente para determinar si la aparición de la banda de 48 kDa estaba relacionada con un proceso biológico de la célula, decidimos utilizar algunos inhibidores. Debido a que la banda de 48 kDa fue identificada por el uso de anticuerpos que reconocen la fosforilación de Akt-1 en la Ser 473 se utilizaron inhibidores de fosforilación como la Genisteína (Gen) que inhibe la fosforilación total, la Wortmanina (Wort) que inhibe a PI3K y por consiguiente a Akt, además del uso del Bortezomib como inhibidor del proteosoma debido a la regulación negativa de la vía de señalización.

Como se muestra en la Figura 36 la aparición de la banda de 48 kDa por estimulación con suero SNP fue eliminada por la preincubación con Bortezomib, por lo que la aparición de la banda de 48 kDa fue asociada a la degradación vía proteosomal de pAkt-1.

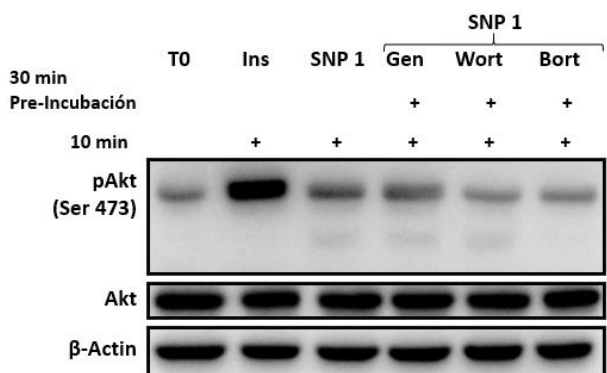


Figura 36. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con suero SNP con inhibidores de fosforilación y proteosoma

11.1.6. Determinación de la fracción de suero ultracentrifugado a la cual se asocia la aparición de banda de 48 kDa

Posteriormente evaluamos las fracciones de los sueros SNP para determinar si la activación del proteosoma observado en el resultado anterior se podía asociar a alguna de las fracciones de suero obtenidas. En la Figura 37 se observa que en las células MCF-7 que fueron estimuladas con el input y el pellet-resuspendido aparece la banda de 48 kDa no así con el sobrenadante. Por lo que la inducción de la

degradación vía proteosomal de pAkt-1 se podría asociar a un componente del pellet de sueros SNP.

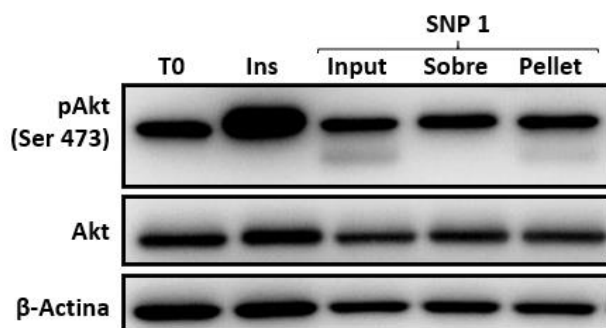


Figura 37. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con fracciones de suero SNP ultracentrifugados

En conjunto los resultados anteriores mostraron que la fracción del sobrenadante de sueros de mujeres normopeso premenopáusicas contiene algún componente que induce la degradación vía proteosomal de pAkt-1 en diferentes tejidos humanos, lo que podría estar asociado al retraso en la señalización observado en el apartado 6.3.1.

12. ANEXO 2

12.1. Determinación de la fracción de suero humano que presenta actividad tumorigénica en células MCF-7 de cáncer de mama

Al comprobar que existe un efecto diferencial en la proliferación y señalización de la vía IR/Akt/p70S6K por estimulación con sueros SOP en comparación a sueros SNP, decidimos realizar una caracterización inicial de estos sueros. Por lo que, se decidió determinar la fracción de suero que presentaba la actividad de inducción de tumorigenicidad. Para ello se realizó una ultracentrifugación (como se describe en materiales y métodos), donde se obtuvieron dos fracciones: sobrenadante y pellet-resuspendido.

12.1.1. Determinación de patrones proteicos de fracciones de sueros ultracentrifugados

Lo primero que evaluamos fue el patrón proteico que presentó cada fracción de suero obtenida. Como muestra la Figura 38, los sueros totales (input), sobrenadantes y pellets-resuspendidos de ambos tipos de sueros presentaron patrones proteicos similares. Mientras que, al comparar el input de ambos tipos de sueros contra sus respectivas fracciones, se observó que los sobrenadantes

presentaron un enriquecimiento de proteínas en un rango de 40 a 50 kDa, el cual fue más significativo en el sobrenadante de sueros SOP respecto a SNP. Mientras los pellets-resuspendidos tuvieron un enriquecimiento de proteínas en un rango de 49 a 206 kDa, donde el pellet-resuspendido de SNP fue el que presentó mayor enriquecimiento en comparación a SOP.

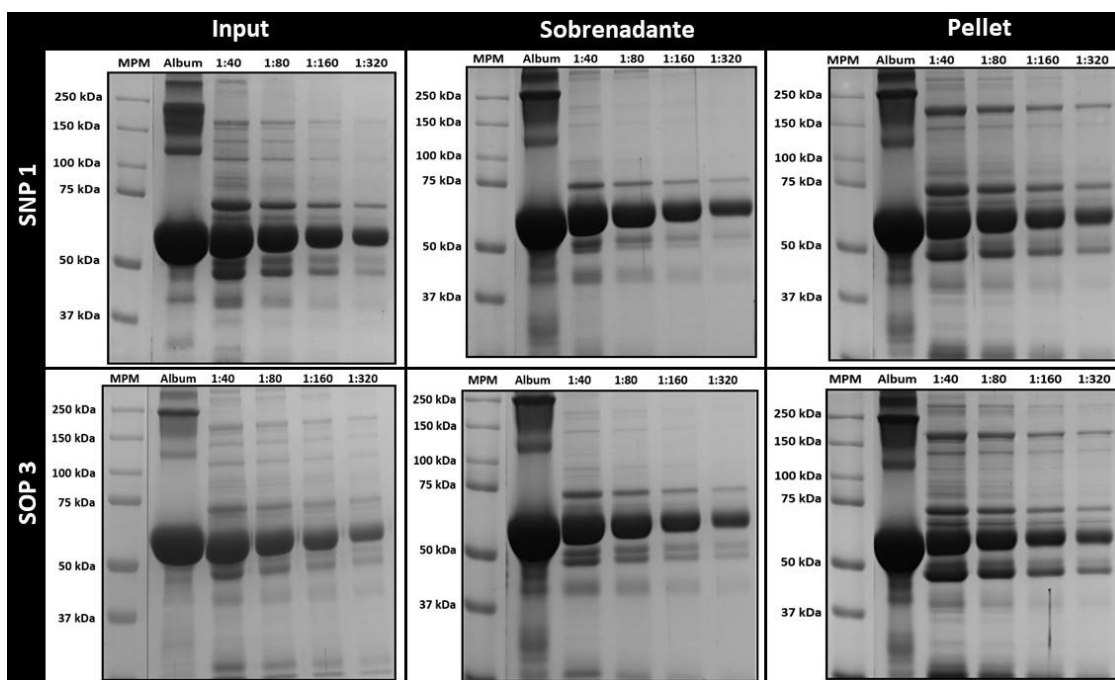
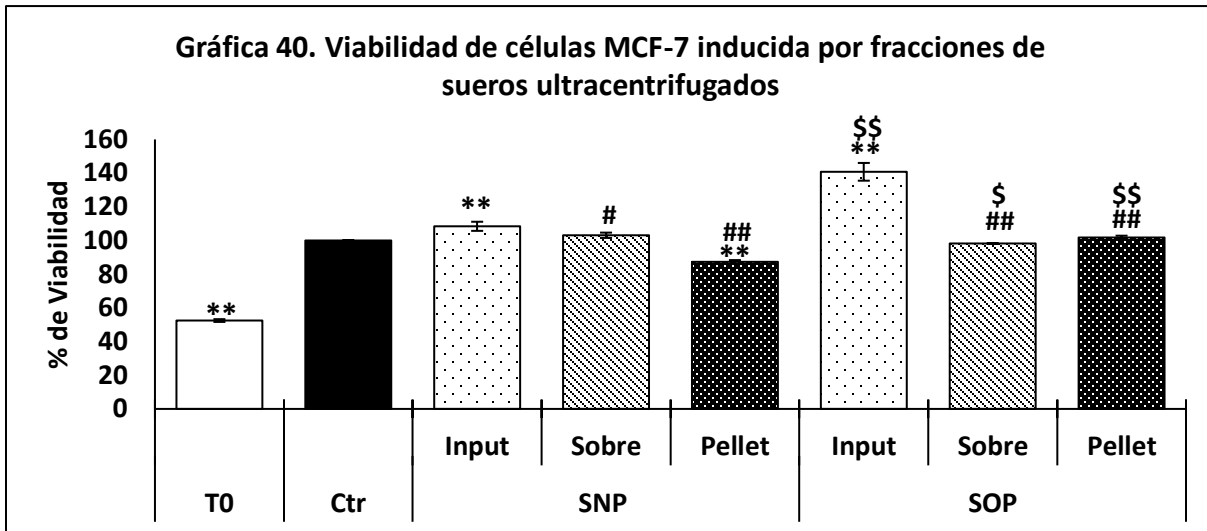


Figura 38. Electroforesis de fracciones de sueros humanos ultracentrifugados

12.1.2. *Evaluación de la viabilidad inducida por fracciones de sueros humanos ultracentrifugados*

Posteriormente evaluamos la viabilidad celular y observamos que hubo una disminución de la viabilidad en las dos fracciones de ambos tipos de sueros en comparación a su respectivo input (Gráfica 40). En el caso de SNP, el sobrenadante presentó una disminución del 5% y el pellet-resuspendido del 21% respecto a su input, por lo que la inducción de la viabilidad podría asociarse al sobrenadante de los sueros SNP. Por otra parte, ambas fracciones de los sueros SOP presentaron una disminución promedio del 40% en comparación a su input y no hubo diferencias significativas entre ambas fracciones.



* Comparación vs T0, # vs Input de cada tipo de suero, \$ vs misma fracción de SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr= control, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

12.1.3. Evaluación de la activación de Akt en células MCF-7 estimuladas con fracciones de sueros ultracentrifugados

Posteriormente se evaluaron los niveles de fosforilación de Akt por estimulación con las diferentes fracciones de los sueros humanos. Como se muestra en la Figura 39 y la Gráfica 41, para los sueros SNP el sobrenadante presentó un incremento en la fosforilación de Akt de 0.47 veces en comparación con su input, por lo que la inducción del incremento de la fosforilación de Akt podría asociarse al sobrenadante. Por otra parte, en el caso de los sueros SOP, se observó que el pellet-resuspendido presentó un incremento en la fosforilación de Akt de 0.25 veces respecto a su input, por lo que la inducción de la fosforilación podría asociarse al pellet-resuspendido.

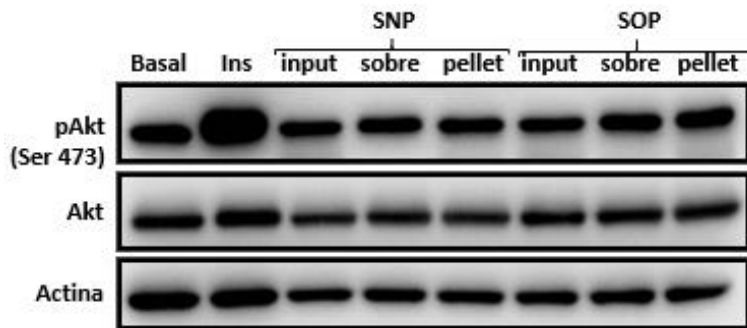
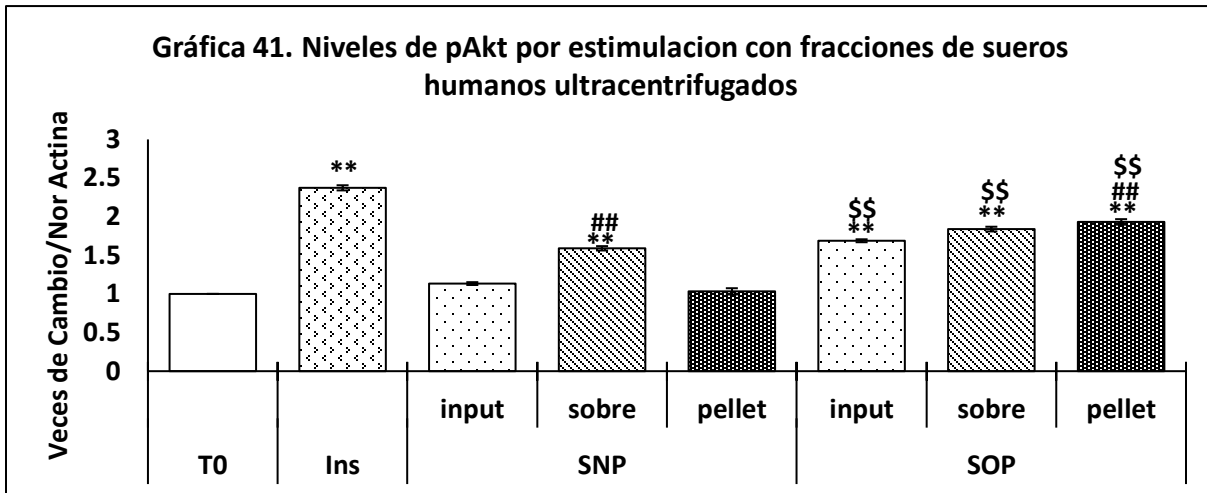


Figura 39. Western Blot de Akt en células MCF-7 estimuladas con fracciones de sueros SNP o SOP ultracentrifugados



* Comparación vs T0, # vs Input de cada tipo de suero, \$ vs misma fracción de SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$.
 Ins=insulina, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

12.1.4. Evaluación de la formación de esferoides de células MCF-7 expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados

Otro de los ensayos utilizados para evaluar la tumorigenicidad es la formación de esferoides, pero en el caso de la línea MCF-7 bajo nuestras condiciones de cultivo únicamente se formaron agregados mostrados en la Figura 40. Se observó que en ambos tipos de sueros se presentaron los mismos patrones de agregados en cada tipo de fracción evaluada. En el caso de los inputs de los dos tipos de sueros (SNP y SOP) se generaron agregados en forma tubular, los sobrenadantes formaron agregados semicirculares con bodes irregulares y los pellets-resuspendidos formaron múltiples aglomerados.

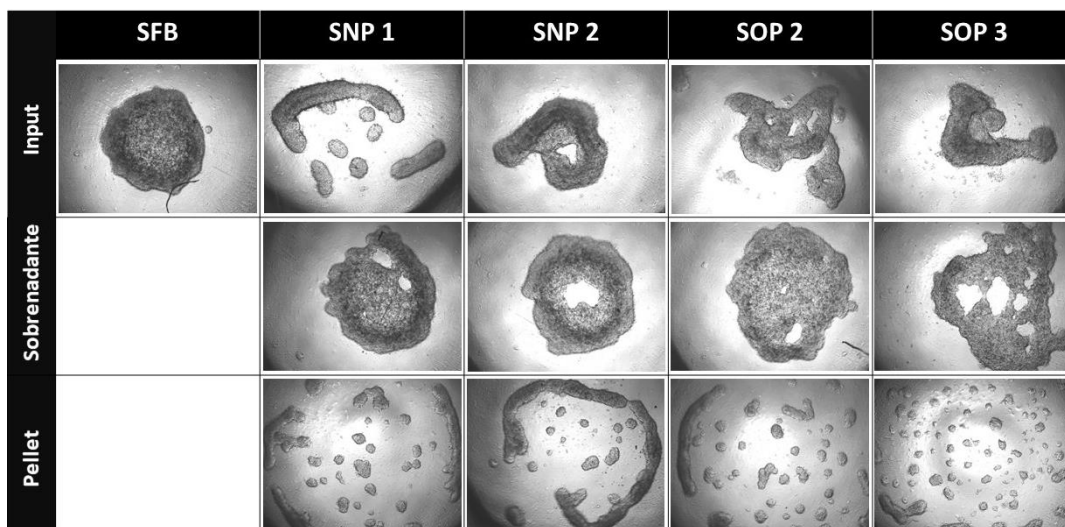
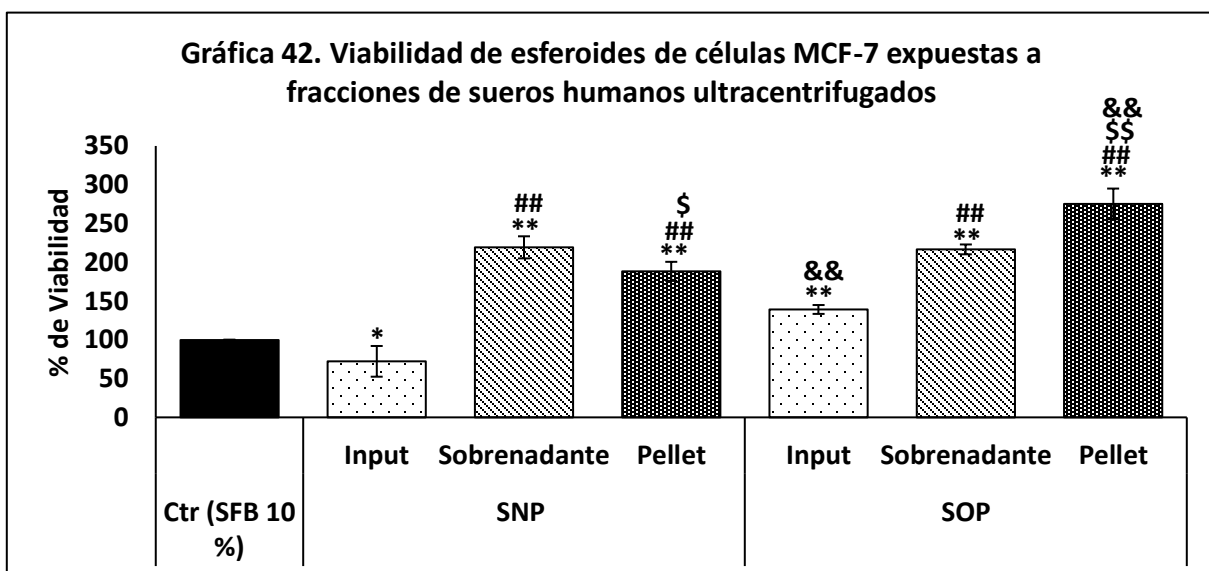


Figura 40. Agregados de células MCF-7 en presencia de fracciones de sueros humanos ultracentrifugados

Por otra parte, el ensayo de viabilidad de los esferoides (Gráfica 42) mostró que el cultivo con el input de sueros SOP indujo un incremento del 39% y SNP redujo la viabilidad 28% respecto a Ctr, mientras al comparar entre ambos tipos de sueros el cultivo con sueros SOP incremento 67% la viabilidad en comparación a SNP. En tanto los sobrenadantes de ambos tipos de sueros (SNP y SOP) presentaron un incremento del 27% y 39% respecto a Ctr, pero al comparar contra su respectivo input se observó un incremento en la viabilidad de 147% en SNP y 77% en SOP. En el caso de los pellets-resuspendidos hubo un incremento en la viabilidad respecto de Ctr del 88% en SNP y 175% en SOP, mientras al comparar entre los pellets-resuspendidos de ambos tipos de suero se observó un incremento del 87% por SOP respecto a SNP (&&), pero al comparar contra sus respectivos inputs se observa que SNP presentó un incremento de 136% y SOP 116%, respecto a los sobrenadantes se observó una reducción del 30% en SNP y un incremento del 58% en SOP.



* Comparación vs Ctr, # vs Input de cada tipo de suero, \$ vs sobrenadante, && vs misma fracción de SNP. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ctr= control, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

En los dos tipos de suero se observó que la formación de agregados semicirculares por la suplementación con el sobrenadante se asoció a una mayor tumorigenicidad. Sin embargo, se observaron dos comportamientos en la viabilidad, mientras el sobrenadante de SNP indujo una mayor viabilidad, el pellet-resuspendido de SOP fue el que promovió mayor viabilidad en este tipo de suero.

12.1.5. Evaluación de la migración de células MCF-7 transfectadas con GFP expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados

Posteriormente evaluamos la migración celular por estimulación con las diferentes fracciones de sueros humanos. Como muestra la Figura 41 y Gráfica 43, al comparar los inputs de ambos tipos de sueros, se observó un incremento de 231% bajo suplementación con SOP respecto a SNP. Al comparar las diferentes fracciones de sueros SNP no se observaron diferencias significativas respecto al input, ni entre el sobrenadante y el pellet-resuspendido. Mientras las diferentes fracciones de sueros SOP mostraron una reducción en la migración del 209% en el sobrenadante y 223% en el pellet-resuspendido respecto al input.

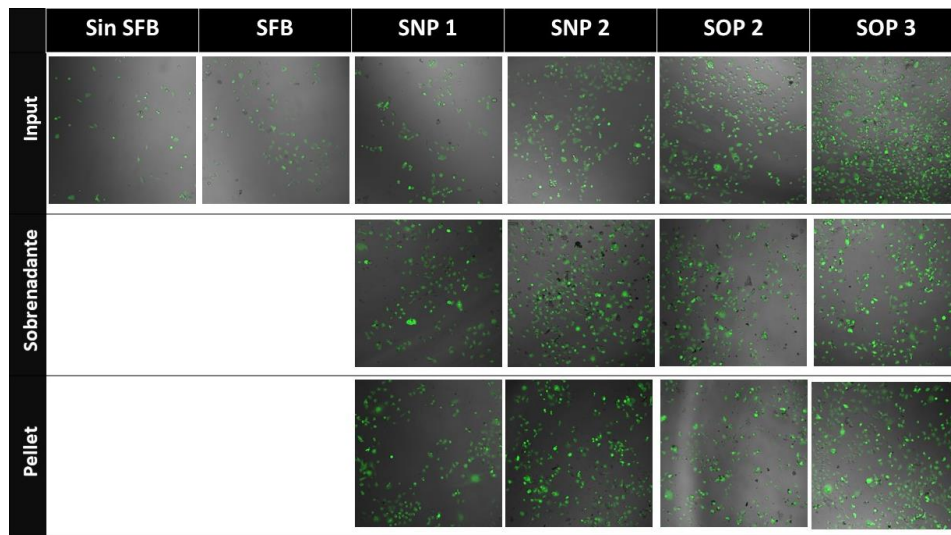
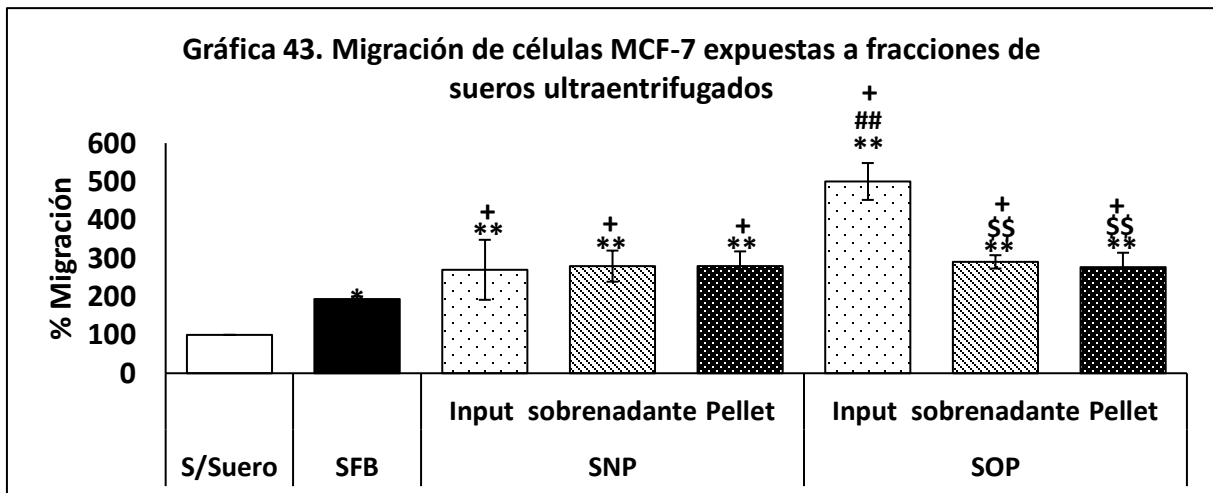


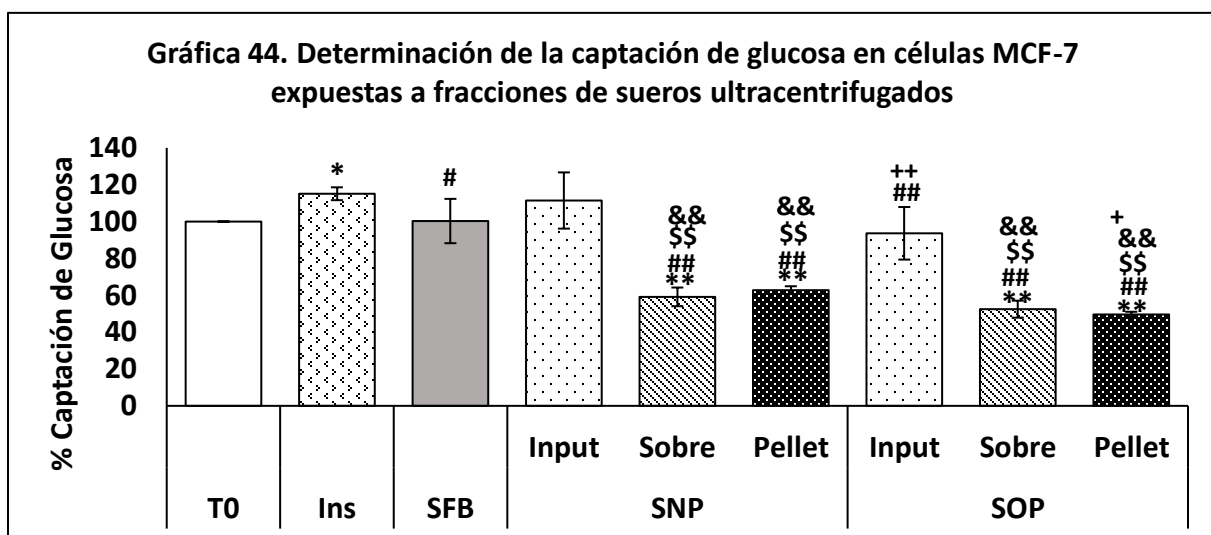
Figura 41. Células MCF-7 migradas por estimulación con fracciones de sueros humanos ultracentrifugados



* Comparación vs S/Suero, + vs SFB, # vs misma fracción de SNP, \$ vs Input. * p≥0.05, ** p≥0.005. SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

12.1.6. Determinación de la captación de glucosa en células MCF-7 expuestas a fracciones de sueros ultracentrifugados

Posteriormente evaluamos la captación de glucosa para determinar si este efecto estaba asociado a alguna de las fracciones de los sueros humanos. Como se observa en la Gráfica 44, tanto los inputs como las fracciones de sueros SOP presentaron porcentajes de captación de glucosa menores en comparación a SNP. En ambos tipos de suero se observó que las dos fracciones presentaron menores porcentajes de captación de glucosa, que fue aproximadamente del 50% en comparación con sus respectivos inputs, por lo que la captación de glucosa en ambos tipos de suero podría depender de los componentes de ambas fracciones.



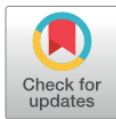
* Comparación vs S/Suero, + vs SFB, # vs misma fracción de SNP, \$ vs Input. * $p \geq 0.05$, ** $p \geq 0.005$. Ins= insulina, SFB= suero fetal bovino, SNP= sueros de mujeres normopeso premenopáusicas, SOP= sueros de mujeres con obesidad premenopáusicas

En conjunto los resultados anteriores mostraron que el sobrenadante de sueros SNP es la fracción con capacidad tumorigénica al inducir un incremento en la viabilidad celular, fosforilación de Akt y formación de esferoides. Mientras la fracción del pellet-resuspendido de sueros SOP induce la formación de esferoides, mientras para el resto de los efectos biológicos analizados en nuestro estudio se requiere la presencia de ambas fracciones.

RESEARCH ARTICLE

Sera from women with different metabolic and menopause states differentially regulate cell viability and Akt activation in a breast cancer *in-vitro* model

Laura C. Flores-García^{1,2}, José L. Ventura-Gallegos^{1,2,3}, Sandra L. Romero-Córdoba^{1,2,3}, Alfredo J. Hernández-Juárez², María A. Naranjo-Meneses⁴, Eduardo García-García⁴, Juan Pablo Méndez⁵, Alberto J. Cabrera-Quintero⁶, Antonio Ramírez-Ruiz², Sigifredo Pedraza-Sánchez², Noemi Meraz-Cruz⁶, Felipe Vadillo-Ortega⁶, Alejandro Zentella-Dehesa⁶^{1,2,3*}



OPEN ACCESS

Citation: Flores-García LC, Ventura-Gallegos JL, Romero-Córdoba SL, Hernández-Juárez AJ, Naranjo-Meneses MA, García-García E, et al. (2022) Sera from women with different metabolic and menopause states differentially regulate cell viability and Akt activation in a breast cancer *in-vitro* model. PLoS ONE 17(4): e0266073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073>

Editor: Abdelilah Aboussekhra, King Faisal Specialist Hospital and Research Center, SAUDI ARABIA

Received: September 28, 2021

Accepted: March 13, 2022

Published: April 12, 2022

Copyright: © 2022 Flores-García et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: AZD Science frontiers grant 733 (2015) Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología <https://conacyt.mx/>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

1 Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, **2** Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico, **3** Programa Institucional de Cáncer de Mama, IIBO, UNAM, Mexico City, Mexico, **4** Clínica de Obesidad y Trastornos de la Conducta Alimentaria, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico, **5** Unidad de Investigación en Obesidad, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico, **6** Unidad de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

* azentell@biomedicas.unam.mx

Abstract

Obesity is associated with an increased incidence and aggressiveness of breast cancer and is estimated to increment the development of this tumor by 50 to 86%. These associations are driven, in part, by changes in the serum molecules. Epidemiological studies have reported that Metformin reduces the incidence of obesity-associated cancer, probably by regulating the metabolic state. In this study, we evaluated in a breast cancer *in-vitro* model the activation of the IR- β /Akt/p70S6K pathway by exposure to human sera with different metabolic and hormonal characteristics. Furthermore, we evaluated the effect of brief Metformin treatment on sera of obese postmenopausal women and its impact on Akt and NF- κ B activation. We demonstrated that MCF-7 cells represent a robust cellular model to differentiate Akt pathway activation influenced by the stimulation with sera from obese women, resulting in increased cell viability rates compared to cells stimulated with sera from normal-weight women. In particular, stimulation with sera from postmenopausal obese women showed an increase in the phosphorylation of IR- β and Akt proteins. These effects were reversed after exposure of MCF-7 cells to sera from postmenopausal obese women with insulin resistance with Metformin treatment. Whereas sera from women without insulin resistance affected NF- κ B regulation. We further demonstrated that sera from post-Metformin obese women induced an increase in p38 phosphorylation, independent of insulin resistance. Our results suggest a possible mechanism in which obesity-mediated serum molecules could enhance the development of luminal A-breast cancer by increasing Akt activation. Further, we provided evidence that the phenomenon was reversed by Metformin treatment in a subgroup of women.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: NWSPre, Normal-weight premenopausal women/woman; NWSPPost, Normal-weight postmenopausal woman; OSPPre, Obese premenopausal women; OSPPost, Obese postmenopausal women; Ins, Insulin; Metf, Metformin; FBS, Fetal bovine serum; BMI, Body mass index; AKT, Akt Gene; Akt, Akt mRNA; Akt, Akt protein.

Background

Obesity has become a global epidemic and is an important risk factor for the development of different types of tumors, including breast cancer [1, 2]. According to GLOBOCAN 2018 [3], 2 088 849 new cases and 626 679 breast cancer deaths were reported worldwide, representing 46.3% of all female neoplasms, making breast cancer a relevant public health problem.

Relevantly, obesity, among other intrinsic and non-intrinsic risk factors, increases the risk of developing breast cancer by 50 to 86%, depending on the degree of obesity in women [2]. Likewise, obese women have a 41% risk of dying compared to normal-weight women, associated with a 46% increased risk of developing metastasis in these women [2].

Several serum molecules associated with obesity provide a molecular link to breast cancer, including increased circulating levels of insulin, glucose, hormones, adipokines, and inflammatory mediators that could affect breast tissue. For example, by altering relevant oncogenic pathways such as the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling, which is activated by insulin, Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), estrogens, progesterone, leptin, among others, which increases the risk of breast cancer development [4–17].

The Insulin Receptor β (IR- β)/PI3K/Akt signaling pathway begins with insulin/IGF-1 binding to IR- β allowing its activation and PI3K coupling, generating the Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1), Phosphoinositide-dependent kinase-2 (PDK2) and Akt recruitment [18–20]. This promotes Akt activation, resulting in the phosphorylation of mammalian Target of Rapamycin (mTOR) and subsequent Ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K) activation, inducing the translation of proteins that affect carcinogenesis [20–22]. Therefore, the inhibition of the PI3K/Akt pathway is a relevant therapeutic target.

Interestingly, Metformin, a drug used to treat diabetes mellitus and metabolic control in obese patients, has recently shown an antitumor effect through IR- β and Akt inhibition [23–25]. Moreover, clinical experience and epidemiological associations have reported a lower incidence of invasive breast cancer in people with Metformin treatment [26, 27]. It has also been reported that Metformin exerts an effect in the serum of treated patients by reducing circulating levels of glucose, insulin, IGF-1, and triglycerides [28–30].

In the present study, we used a luminal A breast cancer *in vitro* model (MCF-7 cells) exposed to sera from pre- and postmenopausal women with different body mass indexes (BMIs). This allowed us to investigate how the systemic factors associated with obesity affect Akt in a tumoral cell model. Our analysis revealed an early and sustained increase in Akt expression and activation after exposing MCF-7 cells with sera from obese women, resulting in a higher viability rate. These effects were reversed after exposure of MCF-7 cells to sera from obese women with insulin resistance who received a brief treatment with Metformin (10 weeks).

Our findings provide information on a possible mechanism in which obesity may contribute to the development of luminal A subtype breast cancer and that Metformin treatments reverse this effect in a subgroup of women.

Materials and methods

Public transcriptomic and proteomic data

TGCA transcriptomic and reverse-phase protein arrays (RPPA) data were downloaded from the public repository Xena Browser (<https://xenabrowser.net/datapages>, GDC TCGA and TCGA Breast Cancer). RNA-seq expression data were processed from RNA-seq counts, normalized, and compared for differentially expressed patterns through the Deseq2 R/Bioconductor package [31]. Proteomic data generated by RPPA, using 225 antibodies targeting total

(n = 166), cleaved (n = 2), acetylated (n = 1) and phosphorylated (n = 56) proteins, were retrieved at normalized level 3.

Raw microarray data were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE102088, GSE789588 and GSE24185). The signal intensities of the Affymetrix Arrays were background corrected by RMA and normalized by quantile algorithm with the Oligo Bioconductor library on R environment [32]. Affymetrix probes were mapped with biomaRt [33] R package, and duplicated genes were collapsed by selecting the probe with the higher interquartile range. Normalized data from GSE33526 were directly downloaded from GEO and processed for further analysis.

PI3K/AKT/mTOR pathway signatures

We applied public signatures described by Zhang *et al.* [34]. AKT, PI3K and mTOR pathway signature were scored based on the RPPA data, computed as the sum of normalized phosphoprotein levels of Akt (S473 and T308 RPPA expression levels), GSK3 (S9 and S21/S9), and PRAS40 pT246. Additionally, mTOR pathway signature included mTOR, 4EBP1 (S65, T37/T46, and T70), RICTOR (T3135) and S6 (S235/S236 and S240/S244) phospho-proteins. Each signature was defined as the sum of phosphoprotein levels evaluated for each pathway.

For gene transcriptional signatures of the AKT pathway we first defined the differentially expressed genes between TCGA protein phosphorylated samples vs non-phosphorylated samples, for each of the Akt phospho-protein (AktS473 and T308). Then, a correlation analysis between messenger RNA (mRNA) and protein level was performed. Only those genes differentially expressed and positive or negative correlated ($p \leq 0.05$) were included in the final signature.

For a given gene transcription signature, we extracted the normalized expression values, then: (1) mean values were independently computed for “up” (μ UP) and “down-modulated” genes (μ DW). We later divided mean of up-regulated genes by mean of down-modulated gene (2) score = 1, (3). We finally scale score 1 values by z-score (Final score) among the total number of samples in each of the evaluated cohorts. Once mRNA signatures were determined, a Wilcoxon analysis was performed between the molecular signatures. Data were plotted with ggplot on R.

Blood samples

Blood samples under the BQO-2044-17-18-1 protocol were obtained, approved by the Research Ethics Committee and the Research Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), following the Declaration of Helsinki and good clinical practices. We obtained the informed consent before participation. To maintain confidentiality samples were coded. The donors were grouped according to the BMI category (normal weight 20–24.9 kg/m², stage I obesity 30–34.9 kg/m², stage II obesity 35–39.9 kg/m² and stage III obesity ≥ 40 kg/m²). Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 30 min at 4°C. The serum obtained was labeled and stored at -70°C until use.

For identification of the cellular model, we used sera from pre and postmenopausal normal-weight and obese women. For Metformin treatment we carried out a prospective controlled, non-randomized, and single-blind study, which included obese patients without a diagnosis of diabetes mellitus, who received 2550 mg/day of Metformin for ten weeks. Using the G Power program (version 3.19.4), we determined a sample size of 10 sera per group to ensure a one-tail test with $\alpha = 0.05$ and 80% statistical power (S8 Fig).

Cell line

Cell line MCF-7 (HTB-22) from ATCC was used. The MCF-7 line was maintained in RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% FBS at 37°C, 5% CO₂ in a humidified atmosphere.

Reagents and antibodies

RPMI-1640 culture medium and Fetal Bovine Serum were purchased from Gibco-Thermo Fisher Scientific. RPMI-1640 medium without phenol red, sodium chloride, potassium chloride, disodium phosphate, monopotassium phosphate, Nonidet 40, SDS, Na₃VO₄, PMSF, NaF, cOmplete cocktail 25x, crystal violet, EDTA, methanol, glycine, Tris-Base, NaOH, glutaraldehyde, acetic acid, beta-mercaptoethanol, bromophenol blue, glycerol, ammonium persulfate, TEMED, Tween-20, 1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride, wortmannin, genistein were from Sigma Aldrich. 30% Acrylamide/Bisacrylamide Solution and Quick Start Bradford Protein Assay Dye Reagent from Biorad. Bortezomib was from Sandoz. Fast-acting recombinant human insulin (100 UI/ml) of PiSA. Recombinant human TNF- α of R&D Systems. Antibodies against IR- β (sc-81465), pIR- β (Tyr 1162–1163) (sc-25103), Akt-1 (sc-1618-R), pAkt (Ser 473) (sc-81433), p70S6K (sc-8418), pp70S6K (Thr 389) (sc-8416), Erk (sc-271269), pp38 (Tyr 182) (sc-166182), p38 (sc-7972), p65 (sc-372) and β -Actin (sc-47778) were from Santa Cruz Biotechnology. Antibody to pp65 (Ser 536) (93H1) and pErk (Thr 202-Tyr 204) (4370) of Cell Signaling Technology. Antibody to IKB- α (610690) of BD Transduction Laboratory. Anti-Mouse HRP and anti-Rabbit HRP secondary antibodies were of Invitrogen-Thermo Fisher Scientific. Oligos for RT-PCR were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT).

Fetal bovine serum reduction protocol

To sensitize the cells to human serum, a gradual reduction of FBS was carried out in all the experiments, as reported by Arellano-Plancarte *et al.* (2010) [35]. Cells were seeded with RPMI-1640 medium with 10% FBS for 24 h, then changed to RPMI-1640 medium with 2% FBS for 16 h. Finally, the cells were changed to RPMI-1640 medium without phenol red with 0% FBS for 4 h before starting the experiment.

Viability assay

In culture plates, we sowed 15 000 cells/cm², which were subjected to the FBS reduction process. Subsequently, MCF-7 cells were exposed for 48 h to RPMI medium supplemented with 10% FBS, 5% FBS, or 5% human sera. After the exposure time, the cells were fixed for 15 min with DMEM medium containing 2% FBS and 1% glutaraldehyde. Afterwards the cells were dyed with 0.5% crystal violet for 15 min and the absorbed dye was dissolved in 500 μ l of 10% acetic acid. Absorbance was measured at 590 nm using a microplate reader (SkanIt Re).

Western blot

The cells were seeded in 100 mm cell culture dishes at the same cell density described in the viability assay and subjected to FBS reduction. After serum deprivation, RPMI-1640 medium without phenol red was added with 0.5 UI/ml insulin for 10 min or 5% human serum (normal-weight or obese, pre or postmenopausal, with or without Metformin treatment) for 5, 10, 30 or 60 min. For the assay with inhibitors, cells were pre-incubated for 30 min with 200 mM Genistein, 100 nM Wortmannin or 80 nM Bortezomib. For NF- κ B signaling, 10 ng/ml of TNF- α was used as a positive activation control. After the stimulation time elapsed, protein extraction was performed using RIPA lysis buffer with protease and phosphatase inhibitors. The protein concentration was determined by the Bradford method. Samples were electrophoresed on 8 or 12% acrylamide SDS-PAGE gels and transferred to Immobilon-P PVDF membranes from Merck Millipore in a wet transfer system. The transferred membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against pIR- β (Tyr 1162–1163), IR- β , pAkt (Ser 473), Akt-1, pp70S6K (Thr 389), p70S6K, IKB α , p65, pp65 (Ser 536), Erk, pErk (Thr

202-Tyr 204), p38 (Tyr 182), p38 and β -Actin. Primary antibodies were washed with TBS-Tween-20 before adding secondary antibodies for 30 min. Subsequently, the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were added for 1 h at room temperature. The bands were revealed by Super Signal West Pico PLUS chemiluminescent Substrate kit (Thermo Scientific). Images were obtained using the Fusion Fx imaging system from Vilber Lourmant; densitometry was quantified using Image J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA). The densitometric analysis was performed first adjusting with β -Actin both total and phosphorylated protein and then phosphorylated protein was adjusted with total protein.

RT-PCR

Cells were seeded as described in the viability assay and subjected to the FBS reduction protocol described above. Stimulation with 5% human sera in RPMI-1640 without phenol red was carried out for 10 min. After the stimulation time, total RNA was isolated using Tripure Isolation Reagent (Roche) and quantified on the SkanIt RE spectrophotometer. RNA integrity was determined using a denaturing formaldehyde-agarose gel. Reverse transcription was performed with the M-MLV Reverse Transcriptase system (Promega) that lasted 5 min at 70°C and 45 min at 42°C. PCR was performed using the Hot Start Master Mix Kit on Thermal Cycler-100 (MJ Research) starting at 95°C for 15 min, followed by 30 seconds at 94°C, 1 minute at 52°C and 1 min at 72°C per cycle, finally at 72°C for 10 min. The primer sequences were as follows:

Primer	Sequence	TM	# Cycles	Amplicon
Akt-1 Forward	5' -TCAAGAATGATGGCACCTTCATTG-3'	52°C	32	1008
Akt-1 Reverse	5' -CCTCCATGAGGATGAGCTCAAAA-3'			
Akt-2 Forward	5' -ATGAATGAGGTGTCTGTCATCAAAG-3'	52°C	32	856
Akt-2 Reverse	5' -CTTTGTCCAGCATGAGGTTT-3'			
Akt-3 Forward	5' -TTGTGAAAGAAGTTGGGTTTCAG-3'	52°C	32	552
Akt-3 Reverse	5' -CTTCATCCTTTGCAATAATGACTTC-3'			
PPIA Forward	5' -GTTTACCCTGATCGTCAGCAG-3'	52°C	32	475
PPIA Reverse	5' -CGAGTTGTCCACAGTCAGCAATG-3'			

The PCR products were separated on 1.5% agarose gels in TAE, soaked with ethidium bromide, and the base pair marker pUCmix was used. The amplicons were imaged using a Vilber Lourmat Fusion Fx imaging system and the bands were quantified using Image J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

ELISA Bio-PLEX

To determine the concentration of serum molecules, we took 100 μ l of serum from each patient treated with Metformin at 0 weeks (0W) and 10 weeks (10W) of treatment. Samples were added in triplicate to 96-well plates containing polystyrene beads from the 39-analyte assay kit (Millipore MILLIPLEX that includes: interferon γ (IFN- γ), interleukin 1 α (IL-1 α), interleukin 1 β (IL-1 β), IL-1 receptor antagonist (IL-ra), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), interleukin 10 (IL-10), interleukin 17 (IL-17), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), inflammatory protein of macrophages 1 β (MIP-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin 12p40 (IL-12p40), interleukin 7 (IL-7), eotaxin 1 (CCL11), protein 10

induced by interferon gamma (IP-10), interleukin 2 receptor antagonist (IL-2ra), interleukin 3 (IL-3), interleukin 12p70 (IL-12p70), interleukin 16 (IL-16), interleukin 18 (IL-18), CC motif chemokine ligand 27 (CTACK), GRO α , hepatocyte growth factor (HGF), monocyte chemoattractant protein 3 (MCP-3), Leukemia inhibitory factor (LIF), interferon α -2 (IFN- α 2), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), macrophage migration inhibitory factor (MIF), monokine induced by interferon-gamma (MIG), nerve growth factor (b-NFG), stem cell factor (SCF), stem cell growth factor β (SCGF- β), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), tumor necrosis factor β (TNF- β) and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). After incubation, the beads were washed twice with Bio-Plex buffer and were retained through a filter using a vacuum manifold (Millipore, Bedford, MA). A standard curve was prepared for each of the 39 human analytes in a concentration range of 0.2 to 32,000 pg/mL and added to the antibody-conjugated beads. Plates with beads, sera, and standards were incubated in the dark on a platform shaker for 30 min. After incubation, the solutions with the sera and standards were vacuum aspirated, and again, the beads were washed three times with Bio-Plex wash buffer and retained by filtration. A 1:50 dilution of biotinylated detection antibody was then added to the washed beads, followed by incubation in the dark on a platform shaker for 30 min. Once again, the beads were washed three times and incubated with a 1:100 dilution of streptavidin-phycoerythrin (PE) for 10 min. The beads were washed three times as described above, re-suspended in Bio-Plex assay buffer, and analyzed on a Bio-Plex plate reader.

Statistical analysis

For statistical analysis, we used one or two-way ANOVA with Dunnett, LSD, or Games-Howell post-test, using SPSS version 25 (Armonk, NY: IBM Corp.), $p < 0.05$ was considered significant. Data were plotted with ggplot on R.

Results

In silico exploration of Akt phosphorylation through gene expression signatures in normal and tumor breast tissue of pre and postmenopausal women with different BMIs

Due to the lack of information on the use of tumor cells for human sera comparison with different metabolic characteristics and considering the large number of altered molecules associated with obesity, we decided to focus on the evaluation of the activation of the IR- β /Akt axis. Therefore, Akt protein was our starting point to determine if there was a differential activation due to BMI differences. On account of this, our objective was to perform an in-silico analysis to compare Akt expression and activation in breast-normal and tumoral tissues from women with different BMIs.

First, we examined The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets from pre-menopause (<49 years old, $n = 243$) breast cancer patients with available gene expression information and reverse-phase protein array (RPPA) data, which evaluated the expression of a set of proteins and phosphorylated modifications. RPPA publicly available signatures for PI3K/AKT and mTOR, as well as their summarization in activity scores, were applied (S1A Fig) [34]. We observed a high correlation between AKT protein-derived signature and the Akt (Ser 473 and Thr 308) phospho-protein levels ($R \sim 95\%$, $p \leq 0.05$). Similarly, PI3K/AKT activity scores were highly correlated ($R: 0.84$, $p < 0.05$), with the Akt protein signature, while mTOR activity score showed a more moderate correlation ($R: 0.29$, $p < 0.05$) (S1B Fig). Through this analysis, we defined a correlative relationship that enabled us to examine human breast tumors correlations in the context of PI3K/AKT/mTOR axis.

As a means of identifying a transcriptional (mRNA) signature associated with the PI3K/*Akt* (1,2,3) phosphorylated state to greater extend our analysis in the setting of human breast tissues under different BMI biological contexts, we took advantage of previously reported signatures [22] and an in-house transcriptional signature, developed based on messenger RNA genes up-modulated or down-modulated in tumors with high levels of Akt (Ser 473) and Akt (Thr 308) phosphorylation (S1 Table). We observed a strong significant correlation between the PI3K/AKT transcriptional signatures and PI3K/*Akt* phosphorylation state measured by RPPA (S1C Fig), as well as a differential expression pattern between samples with high vs low levels of Akt (Ser 473) and Akt (Thr 308), both at protein and mRNA level (S1D Fig). Multi-omic characterization of TCGA samples and their integration through molecular signatures allowed us to identify transcriptional patterns to assess the role of PI3K/AKT/mTOR pathway activation. Most of the correlations observed in our analysis are in line with the understanding of PI3K/AKT/mTOR signaling. Above all, we conclude that the derivate mRNA-signatures highly correlate with and described Akt phosphorylation status.

For statistical analysis, those patients with available BMI information were classified as normal-weight ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$), overweight ($BMI 25\text{--}29.9 \text{ kg/m}^2$) or obese ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$). Through bioinformatic analysis of the transcriptional scores compared with the above-described signatures, we observed that normal tissue of premenopausal obese women presented a significant up-modulation of Akt activation, and increased phosphorylation levels of Akt (Ser 473) and Akt (Thr 308) ($p < 0.05$), corroborated in two datasets of normal mammary gland tissue (GSE102088 and GSE33526, $n = 163$) (Fig 1A).

Furthermore, when scoring breast tumor tissues (GSE789588, $n = 424$) for the above signatures, divided or not based on inferred premenopausal status (< 49 years old), a substantial fraction of obese cancer patients showed lower Akt activation scores (Fig 1B upper panel) ($p < 0.05$), in comparison to normal-weight or overweight individuals, in contrast to what was observed in normal breast epithelium. However, this trend was not corroborated in independent data and no significant differences were observed among the BMI groups (Fig 1B lower panel), suggesting multiple heterogeneous mechanisms for Akt pathway activation.

Overall, these data highlight the possible role of Akt activation and phosphorylation mediated by obese-derived molecules and its potential impact on the normal mammary epithelium, which resulted enriched in Akt-activated states that might trigger oncogenic programs, a phenomenon that needs to be further investigated.

MCF-7 cell line as a response model to human sera

Our bioinformatics analysis revealed a differential expression and phosphorylation in Akt protein modulated by BMI (Fig 1). We hypothesized that the exposure of tumor cells to human sera could lead us to identify biological changes due to molecules altered by the presence of obesity.

There is limited information about the use of human sera in culture of human breast cancer cell lines [5, 36–38]. Whereby, we first selected an optimal cell model that allows us to compare the effect of sera from normal-weight and obese women. To preserve the effect of heat-sensitive serum molecules that could affect the IR- β /Akt pathway, we began by evaluating the use of human serum with or without heat-inactivation (S2A Fig), as well as tolerance to human serum without heat-inactivation (S2B Fig). On the other hand, although the IR- β /Akt/p70S6K pathway has a relevant role in breast cancer, we did not know which lines in our panel would present activation of the signaling pathway with human sera. Therefore, we also tested the activation of the PI3K/*Akt* signaling pathway by insulin (Ins) or serum from a normal-weight premenopausal woman (NWSPre) (S3 Fig). Finally, we use cell viability as a way to differentiate

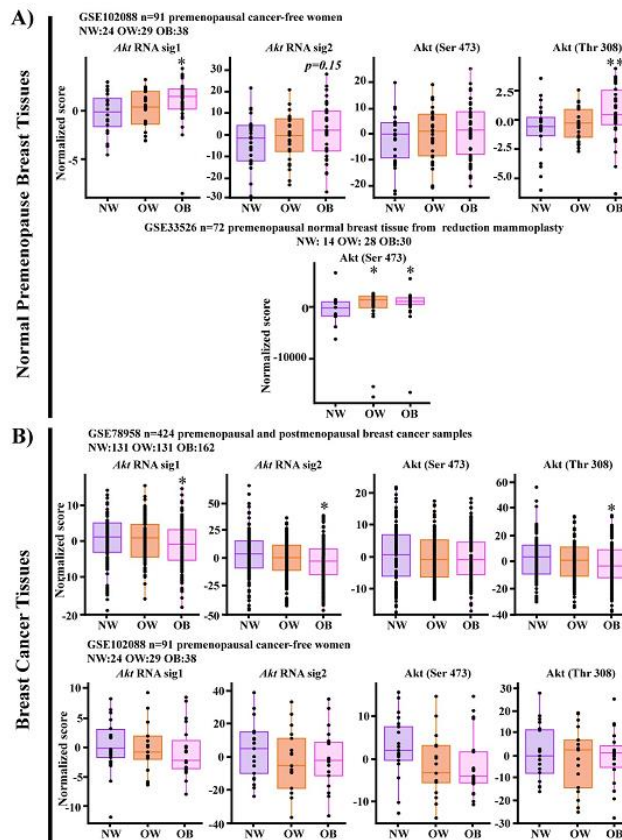


Fig 1. Akt phosphorylation landscape evaluated through gene expression signatures in non-tumoral or tumor breast tissues of women with different BMI. Bioinformatic analysis of the mRNA gene expression signatures that mirrored the phosphorylation of Akt in Ser 473 and Thr 308 in public datasets recovered from the GEO database in breast tissue of normal-weight (NW), overweight (OW) and obese (OB) women. A) RNA gene signature scores describing Akt activation (*Akt* sig 1 –in-house signature- and sig 2) or Akt phosphorylation in non-tumoral breast tissue from premenopausal women. B) RNA gene signature scores describing Akt activation (*Akt* sig 1 –in-house signature- and sig 2) or Akt phosphorylation in tumors of pre and postmenopausal women (upper panel) or breast tumors from premenopausal women (lower panel). * < 0.05 ** < 0.005 comparisons between groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.g001>

sera with different BMI (S4 Fig). Of the 9 human tumor cell lines tested, the MCF-7 line proved to be the most robust cell model for evaluating human sera, so we decided to use this line as our *in vitro* model.

Evaluation of MCF-7 cells in response to human sera with different BMIs

According to our bioinformatics analysis, in premenopausal women, it was observed that the presence of obesity was associated with an increase in Akt's expression and phosphorylation. To corroborate if our cellular model could differentiate between sera from women with different BMI, we initially tested the cellular and molecular changes on MCF-7 cells when exposed to sera from premenopausal women.

When evaluating cell viability, we observed that the MCF-7 line under supplementation with sera from obese premenopausal women (OSPre), presented an increase in cell viability of 20% ($p = 0.04$) compared to the control (Ctr), while compared to the NWSPre sera the increase was 29% ($p = 0.05$) (Fig 2A).

Subsequently, we determined the optimal stimulation time for the activation of the IR- β /Akt/p70S6K pathway by exposure to human sera through a time course. A mild increase in phosphorylation of pIR- β (Tyr 1162–1163) was induced within the first 5 min of

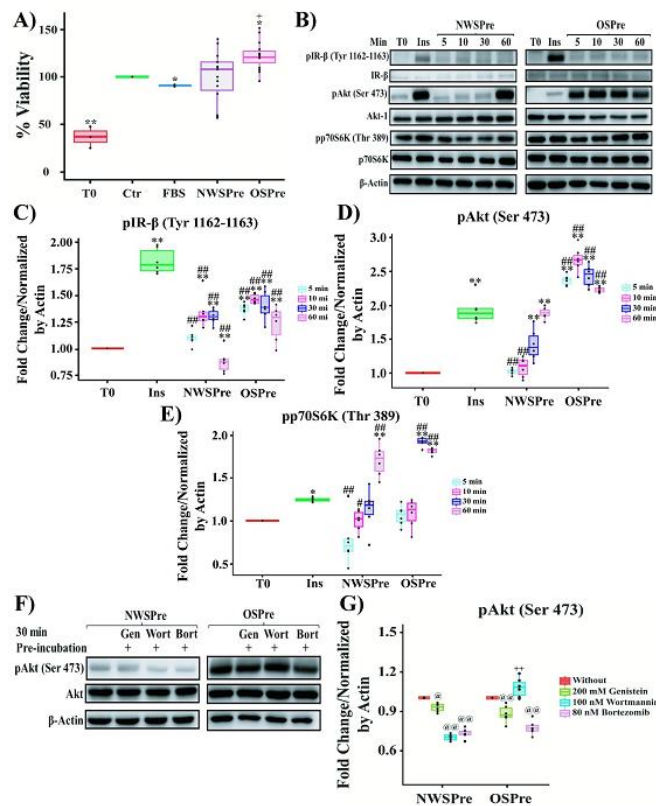


Fig 2. Effect of human sera on MCF-7 line. A) Viability of MCF-7 cells stimulated with sera from women with different BMI. B) Western Blot of the time course of IR- β /Akt/p70S6K pathway activation under stimulation with sera from women with different BMI. C) Group analysis of densitometric quantification stratified by sera condition of pIR- β (Tyr 1162–1163). D) Group analysis of densitometric quantification stratified by sera condition of pAkt (Ser 473). E) Group analysis of densitometric quantification stratified by sera condition of pp70S6K (Thr 389). F) Western Blot of Inhibition of Akt activation by stimulation with sera from women with different BMI. G) Group analysis of densitometric quantification of Inhibition of Akt activation by stimulation with sera from women with different BMI. For viability assay, the MCF-7 cells were treated with 10% inactivated fetal bovine serum (Ctr), 5% FBS or 5% sera from normal-weight premenopausal women (NWSPre) or sera from obese premenopausal women (OSPre). T0 corresponds to the viability at the time the different sera were added, and normalized against Ctr. For Western Blot, the cells were stimulated for 10 min with recombinant human insulin (Ins) (0.5 UI/ml) (positive control for activation), 5% NWSPre or 5% OSPre. T0 represents the phosphorylation level before stimulation with Ins or human sera. All experiments were carried out in triplicate ($n = 9$) for each serum evaluated. Comparison of means ** $P < 0.005$, * $P < 0.05$. ** Ctr or T0, ## 5% FBS or Ins, ++ NWSPre, @@ Without inhibitors.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.g002>

stimulation with OSPre serum (0.38-fold, $p = 0.000002$) and remained until 60 min (0.27-fold, $p = 0.003$) compared to T0 (Fig 2B and 2C). For pAkt (Ser 473), stimulation with OSPre serum induced a 1.39-fold ($p = 3.7278E-8$) increase in phosphorylation with respect to T0 within the first 5 min of stimulation and remained above the signal at T0 up to 60 min (1.22-fold, $p = 3.728E-8$) (Fig 2B and 2D). Phosphorylation of Akt was higher than that observed under stimulation with Ins. Relevantly, even when phosphorylation of pAkt (Ser 473) reached a higher level in the first 5 min after stimulation with OSPre serum, pp70S6K (Thr 389) phosphorylation increased 0.83-fold ($p = 3.7295E-8$) at 60 min (Fig 2B and 2E). In conclusion, OSPre sera led to differential activation of the IR- β /Akt/p70S6K pathway, with clear early Akt activation. Differences in the signals induced by insulin result from adjustments of the time of exposure to avoid saturation, both IR- β and Akt reach similar intensities when simultaneously developed.

Next, we examined if only the IR- β /PI3K pathway played a role in Akt phosphorylation by exposure to human sera. We investigated the cellular response to Genistein that interferes with global phosphorylation, Wortmannin that effectively inhibits PI3K and Bortezomib, a proteasome inhibitor. Under stimulation with OSPre, the pre-incubation with Genistein (0.119-fold, $p = 0.000714$) and Bortezomib (0.224-fold, $p = 1.3218E-9$) lead to a significant pAkt (Ser 473) decrease compared to OSPre without inhibitors (Fig 2F and 2G). While under NWSPre stimulation, the suppressive effect of Wortmannin (0.3-fold, $p = 4.2422E-13$) and Bortezomib (0.26-fold, $p = 8.2452E-12$) on pAkt (Ser 473) was much stronger than the effect of Genistein (Fig 2F and 2G). Showing that Akt activation induced by OSPre sera is mainly explained by a less PI3K-dependent signaling pathway. This suggests that Akt activation is less associated with the presence of insulin/IGF-1 in sera of obese premenopausal women.

Taken together, these results show that stimulation with sera from obese women produces a differential activation mechanism compared to sera from normal-weight women.

Evaluation of MCF-7 cells in response to human sera with different BMIs and hormonal states

Accumulating evidence has revealed an interaction between obesity and hormonal status in breast cancer patients. For example, postmenopausal women are more likely to develop obesity than premenopausal women, this effect is attributed to estrogen depletion, aging, and lifestyle practices [39–42]. Also, the obesity-breast cancer association varies between pre and postmenopausal women [43]. To understand how the menopausal state impacts the effects of obesity-associated serum molecules, we analyzed a set of sera collected from pre and postmenopausal women with different BMIs.

The characteristics of the study groups are described in Table 1, where triglycerides presented a statistically significant difference between normal-weight compared to obese women of the same age group.

We first evaluated if there was a differential effect on MCF-7 cell viability due to sera stimulation from women with different BMIs and menopausal statuses. Fig 3A shows that OSPre sera induced a significant increment in cell viability compared to Ctr (12.7%, $p = 0.00011$), 5% FBS (19%, $p = 0.000001$), and NWSPre (19%, $p = 0.00005$). Similarly, OSPPost (sera from obese postmenopausal women) sera produced higher increment on cell viability when compared to Ctr (7%, $p = 0.016$), 5% FBS (13.5%, $p = 0.000116$) and NWSPre (13%, $p = 0.005$).

Subsequently, we evaluated the variations in the activation of IR- β /Akt/p70S6K under the stimulation with human sera. The Western Blot analysis revealed an increase in pIR- β (Tyr 1162–1163) phosphorylation in response to OSPPost stimulation compared to NWSPre

Table 1. Anthropometric and biochemical characteristics of the serum of women with different BMIs and hormonal states.

	Premenopausal		Postmenopausal	
	Normal-Weight	Obese	Normal-Weight	Obese
	n = 10 (NWSPre)	n = 10 (OSPre)	n = 2 (NWSPost)	n = 10 (OSPost)
Age	31±6.5	31.8±4.5	52±4.2	55.6±3.8
Weight (Kg)	56±4.2	84.6±13.5**	56.5±6.3	98±12.3**
Glucose (mg/dL)	84.6±9.7	86.3±4.1	92.1±8.1	91.2±7.2
Total Cholesterol (mg/dL)	167.1±11.6	173.6±39	154±9.15	172.1±30.9
Cholesterol HDL (mg/dL)	48.6±8.1	56.6±26.7	55±3.6	43.9±8.9*
Cholesterol LDL (mg/dL)	101.6±7.5	98.8±21.7	94±7.2	106.5±31.1
Triglycerides (mg/dL)	86.9±14.9	160.3±13.5**	101±5.2	148.9±31.6*

** P < 0.005, * P < 0.05. ** Normal-weight vs Obese.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.t001>

(0.87-fold, $p = 0.0003$), OSPre (0.6-fold, $p = .007$) and NWSPost (sera from normal-weight postmenopausal women) (0.81-fold, 0.0016) (Fig 3B and 3C). Moreover, OSPost exposition led to a more significant pAkt (Ser 473) phosphorylation than that observed under the stimulation with NWSPre (0.86-fold, $p = 0.00002$), OSPre (0.5-fold, $p = 8.2361E-7$) and NWSPost (0.8-fold, $p = 0.05$) (Fig 3B and 3D). Contrary to what was expected, pp70S6K (Thr 389) showed a lower phosphorylation level on OSPre (0.11-fold, $p = 0.003$) and OSPost (0.09-fold, $p = 0.01$) as opposed to NWSPre (Fig 3B and 3E).

Later we evaluated the expression of the three Akt mRNA isoforms under stimulation with sera from women with different BMI and hormonal states, considering that the Akt family members regulate distinct physiological functions [44–48]. We observed that NWSPre sera decreased 0.25-fold ($p = 0.0031$) in *Akt-1* mRNA, while we observed an increase with OSPre (0.9-fold, $p = 1.4063E-12$), OSPost (1.2-fold, $p = 2.2983E-22$) and NWSPost (1.9-fold, $p = 1.1426E-27$) compared to T0 (Figs 3F and S5). *Akt-2* mRNA decreased 0.36-fold ($p = 7.3146E-8$) by stimulation with NWSPre sera, contrary to the increase under stimulation with OSPre (0.78-fold, $p = 2.4309E-8$) and NWSPost (0.24-fold, $p = 0.0043$) respect to T0 (Figs 3G and S5). Finally, *Akt-3* mRNA decreased 0.18-fold ($p = 0.0084$) due to exposure to NWSPre sera, while only OSPre increased 0.41-fold ($p = 2.4338E-8$) compared to T0 (Figs 3H and S5).

These data collectively suggest that serum from obese women, mainly from postmenopausal women, might contribute to an increase in the viability levels of tumoral cells, associated with an increase in phosphorylation of IR- β and Akt. These last results and the fact that a higher incidence of breast cancer in obese postmenopausal women has been reported led us to focus on this group to perform a pharmacological intervention with Metformin and determine if the effect on the tumor cell could be reversed.

Effect of sera from obese postmenopausal women treated with Metformin on MCF-7 cells

Retrospective studies have reported a lower incidence of invasive breast cancer in patients with Metformin treatment [23–26], this could be explained, in part, by changes in circulating molecules contained in the sera from obese women exerted by the pharmacological intervention. Taking advantage of an ongoing study at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), we collected 64 sera from obese postmenopausal women with no previous diabetes diagnosis and undergoing Metformin treatment with 2550 mg/day.

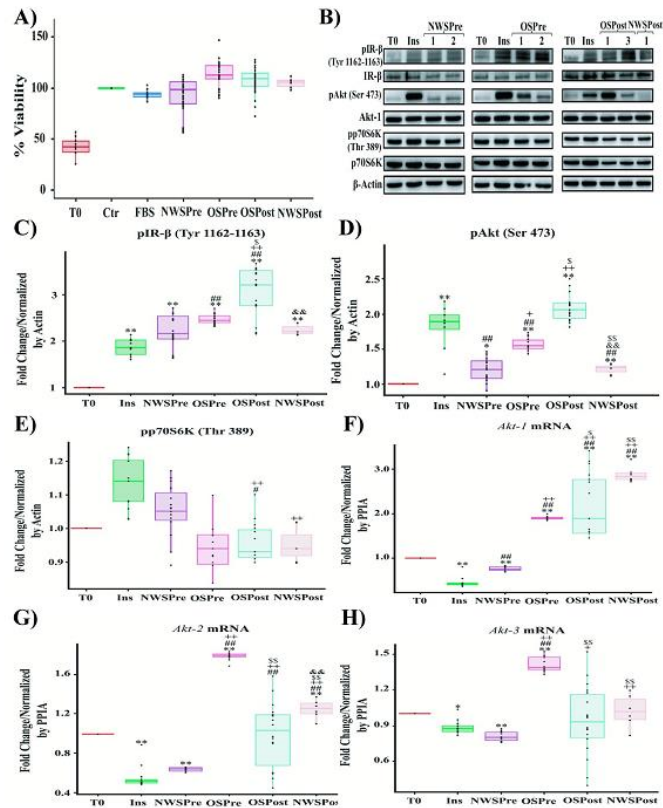


Fig 3. Effect on the viability and activation of the IR- β /Akt/p70S6K pathway of MCF-7 cells by stimulation with human sera from normal-weight and obese women with different hormonal states. A) Viability of MCF-7 cells exposed to sera from women with different BMIs and hormonal states. B) Western Blot of IR- β /Akt/p70S6K pathway members on MCF-7 cells exposed to sera from women with different BMIs and hormonal states. C) Group analysis of densitometric quantification stratified by serum condition of pIR- β (Tyr 1162–1163). D) Group analysis of densitometric quantification stratified by serum condition of pAkt (Ser 473). E) Group analysis of densitometric quantification stratified by serum condition of pp70S6K (Thr 389). F) *Akt-1* expression levels on MCF-7 cells stimulated with human sera. G) *Akt-2* expression levels on MCF-7 cells stimulated with human sera. H) *Akt-3* expression levels on MCF-7 cells stimulated with human sera. For viability assay, the MCF-7 cells were treated with 10% inactivated fetal bovine serum (Ctr), 5% FBS, sera from normal-weight premenopausal women (NWSPre), sera from obese premenopausal women (OSPre), sera from obese postmenopausal women (OSPost) or sera from normal-weight postmenopausal women (NWSPost). For Western Blot test the cells were stimulated with recombinant human insulin (Ins) (0.5 UI/ml) (positive control for activation of the IR- β /Akt pathway) or 5% NWSPre, OSPre, OSPost or NWSPost. Labels of Western Blot as described in Fig 2. RT-PCR for Akt isoforms: Akt-1, Akt-2, Akt-3, and peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as constitutive control. Western blot armed image. All experiments were carried out in triplicate (n = 9) for each serum evaluated. Comparison of means ** P < 0.005, * P < 0.05. ** Ctr or T0, ## 5% FBS or Ins, ++ NWSPre, \$\$ OSPre, && OSPost.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.g003>

After ten weeks, 30 patients completed the treatment. We used these sera to determine if the metabolic control generated by the drug was capable of reversing the phenotype observed in the tumor cells, resulting from the exposure to serum from obese women.

The anthropometric and biochemical characteristics are described in Table 2. Our data show that there was a reduction in weight of 5% after treatment with Metformin and only

Table 2. Anthropometric characteristics, blood chemistry and HOMA of postmenopausal women treated with Metformin for 10 weeks.

	Total Population		HOMA<3		HOMA>3	
	n = 30		n = 21		n = 9	
Age	53.4±11.65		52±13.5		56.6±3.7	
	0 Weeks	10 Weeks	0 Weeks	10 Weeks	0 Weeks	10 Weeks
BMI (Kg/m ²)	40.2±7.2	39.1±6.7	39.5±7.7	38.9±7.7	42.1±5.8	39.6±4.6
Glucose (mg/dL)	92.6±8.4	90.7±10.4	89.7±5.9	91.4±9.5	98.7±9.8	88.5±7.6
Total Cholesterol (mg/dL)	185±34.2	183.6±31	187.2±35	183.5±33	179.8±33	184±31.1
Cholesterol HDL (mg/dL)	46.8±11.5	49.2±18.3	49±11.5	49±6.97	41.7±10.2	38.5±7.1
Cholesterol LDL (mg/dL)	118±30.7	116±31.9	116.7±34	115.2±35	120.8±22	118.5±23
Triglycerides (mg/dL)	150.1±60	159.6±67	144.5±57	135.7±51	163±67.7	143.5±47
HOMA-IR	2.3±1.45	2.1±1	1.4±0.4	1.9±0.9	4.15±0.9	3±0.6*
Weight (Kg)	102.3±17	99.6±13	99.9±19.9	100.4±16	97.3±16.5	92.4±16.2
% Weight Change	-5.1±3.7		-4.7±2.5		-5.1±2.2	
Obesity Grade	I	n = 12	I	n = 9	I	n = 3
	II	n = 5	II	n = 4	II	n = 1
	III	n = 13	III	n = 8	III	n = 5

** P <0.005, * P <0.05. ** 0 Weeks vs 10 Weeks.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.t002>

patients with insulin resistance (Homeostatic Model Assessment HOMA>3) presented a reduction of 1.15 in HOMA-IR.

To evaluate the effect of sera from patients under Metformin treatment, we determined cell viability and levels of pAkt (Ser 473) phosphorylation on MCF-7 cells in equivalent experiments to those presented in Fig 3. We used the serum of each patient collected before initiating Metformin treatment (0 Weeks) as their control.

The MCF-7 line did not show significant changes in cell viability or pAkt (Ser 473) phosphorylation levels after exposure to sera of patients with ten weeks of treatment with Metformin (S6A and S6B Fig). However, when the population was analyzed by the HOMA score, we observed that the serum of patients with HOMA>3 induced a reduction in viability (21%, $p = 5.5E-7$) and pAkt (Ser 473) phosphorylation at 10 Weeks compared to 0 Weeks (0.8-folds, $p = 3.3E-7$) (Fig 4A–4C).

On the other hand, to determine if the viability induced by the sera of women with HOMA<3 was a product of the activation of the MAPK kinase pathway, we evaluated the phosphorylation of pERK (Thr 202-Tyr 204). However, although a slight increase was observed, it was not statistically significant (Fig 4B and 4C lower panel).

We subsequently evaluated the expression of the three *Akt* mRNA isoforms on MCF-7 cells exposed to sera obtained before and after 10 weeks with Metformin treatment. For *Akt-1* mRNA, a 0.7-fold ($p = 0.008$) increase was observed at ten weeks of treatment with Metformin (10W) compared to 0W (S6C Fig). When dividing our cohort by HOMA, women with HOMA<3 presented a 1-fold ($p = 0.01$) increase at 10W compared to their 0W (Fig 4D upper left panel). Whereas the expression of *Akt-2* mRNA decreased 0.4-fold ($p = 0.03$) under stimulation of 10W sera in comparison to 0W (S6C Fig). But the supplementation with sera from women with HOMA>3 induced a 0.75-fold ($p = 0.000019$) increase at 10W respect their 0W (Fig 4D central right panel). Finally, *Akt-3* mRNA did not present significant changes in the total population or subgrouping it by HOMA (Figs S6C and 4D lower panel).

In obese patients, several studies have shown an increased production of inflammatory cytokines [49–51], so we aimed to measure the cytokines in sera from patients after Metformin

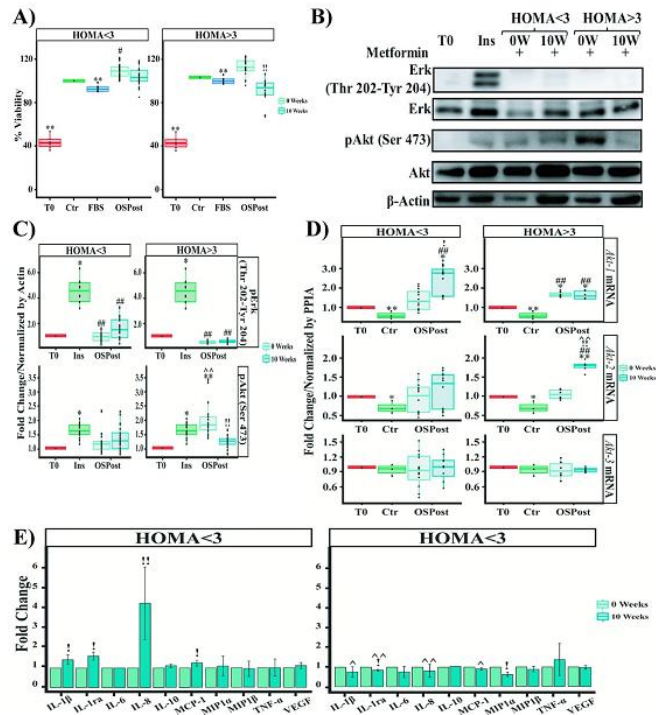


Fig 4. Effect of sera from Metformin-treated postmenopausal obese women on MCF-7 cells. A) Viability of MCF-7 cells exposed to OSPost serum without insulin resistance (HOMA<3) and OSPost serum with insulin resistance (HOMA>3). B) Western Blot of MCF-7 cells exposed to OSPost serum without insulin resistance (HOMA<3) and OSPost serum with insulin resistance (HOMA>3). C) Western Blot's Densitometry of pErk (Thr 202-Tyr204) and pAkt (Ser 473) of MCF-7 divided by the presence of insulin resistance. D) Akt Isoforms expression levels on MCF-7 cells stimulated with OSPost at 0 and 10 weeks of Metformin treatment. E) Determination of serum molecule levels in postmenopausal obese women treated at 0 and 10 weeks of treatment with Metformin. Labels of Western Blot as described in Fig 2. Labels of RT-PCR as described in Fig 3. Western blot armed image. The plotted data correspond to three independent experiments (n = 3) for each serum evaluated. Comparison of means ** P < 0.005, * P < 0.05. ** Ctr or T0, ## 5% FBS or Ins, !! W0, ^^ respect HOMA<3 vs HOMA>3.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.g004>

treatment. As part of an initial characterization of sera from obese patients treated with Metformin, we performed an ELISA BioPLEX immunoassay (see [Materials and methods](#)). Only IL-8 showed a 1.5-fold increase (p = 5.8E-7) at 10W weeks of treatment with Metformin ([S6D Fig](#)). When the population was divided according to HOMA score (HOMA>3), it was observed that after 10 weeks of drug treatment, the patients who presented decreased viability and pAkt (Ser 473) phosphorylation showed a reduction in IL-1ra (0.2-fold, p = 3.3e-02) and MIP-1α (0.4-fold, p = 1.1e-01) levels. Contrary to the increase in IL-1β (0.4-fold, p = 0.01), IL-1ra (0.55-fold, p = 0.0081), IL-8 (3.2-fold, p = 1.82e-10) and MCP-1 (0.22-fold, p = 0.013) levels in patients who had no change at ten weeks of treatment were observed ([Fig 4E](#)).

The changes in pro-inflammatory cytokines, after 10 weeks of treatment with Metformin, led us to evaluate NF-κB, which is activated by IL-8 [[52](#), [53](#)]. On the other hand, in some cases it has been reported that the activation of NF-κB requires the activation of p38 as a cofactor [[54](#)], which has been reported to be regulated by Metformin [[55](#)]. Contrary to expectations,

stimulation with sera from women with HOMA<3 induced a differential regulation in NF-κB (nuclear factor κB) signaling. At 10 min of stimulation, sera from patients with 10 weeks of Metformin treatment (HOMA<3-10W) did not induce changes in pp38 (Tyr 182) phosphorylation (Fig 5A left panel and 5B upper left panel). Although IκBα degradation increased 0.25-fold (p = 0.03) compared to 0W (HOMA<3) (Fig 5A-left panel and 5B-middle left). While pp65 (Ser 536) phosphorylation increased 0.45-fold (p = 0.035) under stimulation with 10 W sera (HOMA<3) compared to 0 W (Fig 5A-left panel and 5B-lower left panel). On the other hand, after 30 min of exposure with 10W sera (HOMA<3) there was an increase of 1.45-fold (p = 4.6E-5) in the phosphorylation of pp38 (Tyr 182) and 0.3-fold (p = 3E-6) in IκBα compared to 0W (HOMA<3) (Fig 5A-right and 5C- upper and middle right panels). But in pp65 (Ser 536) there were no statistically significant changes and the phosphorylation levels were similar to those observed at 10 min of stimulation (Fig 5A-left panel and 5C-right panel). It is worth mentioning that a 3.3-fold increase (p = 2E-8) in pp38 (Tyr 182) phosphorylation was observed at 30 min of stimulation with sera from women with HOMA>3-10W compared to 0W (HOMA>3) (Fig 5A and 5B-upper right panel).

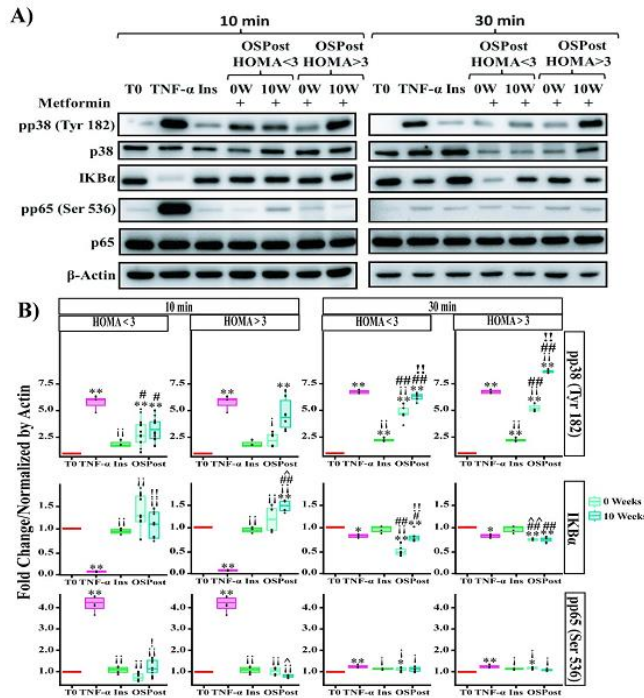


Fig 5. Effect of sera from Metformin-treated postmenopausal obese women on NF-κB signaling in MCF-7 cells. A) Western Blot of pp38 (Tyr 182), IκBα and pp65 (Ser 536) under stimulation with OSPost serum without insulin resistance (HOMA<3) and OSPost serum with insulin resistance (HOMA>3) at 10 and 30 min of stimulation. B) Group analysis of densitometric quantification of pp38 (Tyr 138), IκBα and pp65 (Ser 536) by stimulation with OSPost serum without insulin resistance (HOMA<3) and OSPost serum with insulin resistance (HOMA>3) at 10 min and 30 min. Labels of Western Blot as described in Fig 2. Western blot armed image. The plotted data correspond to three independent experiments (n = 3) for each serum evaluated. Comparison of means ** P <0.005, * P <0.05). ** T0, ii TNF-α, ## Ins, !! W0, ^^ respect HOMA<3 vs HOMA>3.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.g005>

Overall, Metformin pharmacological intervention in obese postmenopausal women with insulin resistance was able to modify the patients' sera and attenuated the effects observed in our study on cell viability and Akt phosphorylation on MCF-7 cells, related to obesity-associated phenotypes. This finding reinforces the concept that cell viability and Akt activation are relevant indicators of the link between circulating molecules associated to obesity in front of the activation of the oncogenic pathway.

Discussion

Obesity is associated with an increased risk of mortality regardless of BMI [56]. It has been postulated that the secretion of adipocytokines, establishes the connection between obesity and breast cancer [57]. Consequently, identifying how these obesity-associated serum molecules drive carcinogenic processes can help to clarify the mechanisms that connect obesity and breast cancer incidence.

Even though it presents high promiscuity to multiple processes and molecules, we decided to focus on Akt and its isoforms due to its relevant role in the relationship between obesity and breast cancer, acting as an integration center for multiple signaling pathways.

Different strategies to assess the relationship between breast cancer and obesity have been used. One of them focuses on the use of sera from patients with breast cancer, but in this approach, a variety of elements may alter the Akt's expression and activity, such as chemotherapy, hormonal therapy, and target therapy present in the serum of these patients [58–61]. The strategy adopted in our study focuses on the effects of serum molecules associated with obesity in individuals free of breast cancer.

The epidemiology in retrospective studies indicated that obesity has a protective effect in premenopausal women, but in recent years an increase in triple-negative breast cancer incidence has been observed in this population [43, 62, 63]. On the other hand, obesity is mainly associated with the incidence of luminal subtype of breast cancer in postmenopausal women [64, 65]. Increased Akt phosphorylation was reported in both subtypes of breast cancer [34]. However, our in-silico analysis did not show an association between obesity and increased expression and phosphorylation of Akt in tumor tissue. The lack of classification in the different subtypes of breast cancer in the two different data sets used may explain the absence of association.

Bowers *et al.* [5, 36, 37] have used cultures of breast cancer cells exposed to sera from breast cancer patients with and without obesity. Similarly, we have characterized different phenotypes of MCF-7 cells generated by exposition to sera from obese and normal-weight women without breast cancer. The most significant change that we observed was that the serum of obese women induced earlier and sustained Akt activation associated with cell vitality.

The lack of concordance between increased phosphorylation of IR- β and Akt, and the fact that different inhibitors of the IR- β /Akt pathway do not prevent phosphorylation of Akt, suggests that serum from obese women contains molecules other than insulin or IGF [66, 67] that contribute to Akt activation; such as leptin, estrogens, pro-inflammatory cytokines, and triglycerides [5, 66–69].

The lack of normal-human ductal and lobular primary culture prevented us from having an ideal control for non-tumor mammary epithelium. However, normal mammary immortalized epithelium cells (MCF-10A) could be used for that purpose. Although the bioinformatics analysis showed that normal breast tissue presented the highest increase in Akt activation mediated by obesity, MCF-10A cells were discarded, since they did not show adequate activation of the IR- β /Akt/p70S6K pathway by stimulation with human serum (S3A Fig), nor could they differentiate between sera from different BMI (S4A Fig).

In the search for an adequate breast cancer in vitro model, we screened different cell lines from each molecular subtype of breast cancer: luminal (MCF-7, ZR-75-30), Her2+ (SKBR-3, SKBR-3R) and triple-negative (MDA-MB-231, MDA-MB-468). From this panel, MCF7 cells were the most sensitive to human sera of the different BMI groups by presenting greater differences in the percentages of viability, probably associated with the higher concentration of estrogens present in the sera of women with obesity and the sensitivity of MCF-7 cells to this molecule [5, 11, 40]. MDA-MB-231 cells are the second most studied breast cancer cellular model. However, although these cells showed the same trend in increasing viability and Akt activation under stimulation with sera from obese women these changes did not reach statistical significance (S4E Fig).

Even with the limited number of samples included in this pilot study, we observed variability between sera from women with the same BMI. Possibly by the existence of obese individuals with a "healthy" metabolic state and normal-weight individuals with a "sick" metabolic state [70]. In the case of normal-weight women, the sera that had high levels of triglycerides also presented higher levels of Akt phosphorylation. To validate this hypothesis more patients have to be analyzed.

Diabetes adds complexity and confounding variables to the changes in human serum, for this reason, we excluded patients with this condition. Using a glucose tolerance test, we certified that none of the patients included in our study had diabetes, but 30% were women with a HOMA score higher than three, which was taken as the reference value to determine insulin resistance. After treatment with Metformin and regardless of the degree of obesity, there was a positive effect on the metabolism of the patients with $HOMA > 3$, these sera being the ones that decreased their ability to induce viability in MCF-7 cells through Akt. On the other hand, although it was expected that in patients without insulin resistance ($HOMA < 3$), the increase in proliferation would be mediated through the MAPK pathway, no changes were observed after Metformin treatment in Erk phosphorylation. Therefore, in addition to insulin resistance, other metabolic and physiological alterations could be responsible for the observed effects on MCF-7 cells in these two subgroups of obese women.

Our initial characterization of the sera following Metformin treatment showed insulin and $MIP1\alpha$ reduction in women who presented $HOMA > 3$, which could partly explain Akt phosphorylation reduction [64, 71]. However, although a reduction in IL-6, MCP-1, TNF- α , INF- γ , GM-CSF, and IL-17 has been reported after Metformin treatment [72–74], we did not observe significant changes in any of them. Also, we cannot rule out the influence of other molecules that we did not evaluate and that are regulated by drug treatment, such as adiponectin and leptin [75, 76]. For MCP-1, TNF- α and VEGF, the reduction in concentration after treatment with Metformin was only observed in women with grade III obesity, suggesting that these changes depend on the degree of obesity (S7 Fig).

In breast cancer, Akt activation induces the activation of multiple pathways, including the NF- κ B pathway [75–77]. On the other hand, among the antitumor mechanisms of Metformin are the inhibition of Akt and NF- κ B signaling [54, 78–84]. While in women whose sera did not induce changes in viability and Akt phosphorylation after treatment with Metformin, we observed a reduction in I κ B α degradation and an increase in p65 phosphorylation, independently of phosphorylation of p38, which could indicate that treatment with Metformin in patients with $HOMA < 3$ has an anti-apoptotic effect, although we do not rule out that the observed NF- κ B activation could have an anti-tumor effect as has been reported in multiple studies [85–88]. In addition, an increase in p38 phosphorylation was observed in women with and without insulin resistance after treatment with Metformin, which corroborates what was previously reported on an antitumor effect of Metformin through p38 activation [89–91]. These results could indicate that

Metformin has two independent effects on the tumor cell: i) The first by regulating Akt in women with insulin resistance, ii) The second to regulate NF-κB independently of Akt in women without insulin resistance.

This study represents the starting point for an in-depth characterization of human sera. Our preliminary results provide novel knowledge about the biological panorama in breast cancer cells established by stimulation with human sera with different metabolic characteristics. Furthermore, our study supports the notion that modulating metabolism through pharmacological interventions affects the molecular serum profile and consequently the breast cancer phenotype.

Certainly, there are limitations associated with the small number of sera evaluated for each group. However, the cellular phenotype that we observed was robustly maintained in the different groups of BMI and hormonal states. Another limitation was the use of a single breast cancer line, which prevents us from examining other possible cellular models. In general, our findings add new data to the growing body of evidence showing that serum's molecular profile of obese women may be pro-tumorigenic through its signaling activity. Besides, it warrants more studies to understand the mechanism by which some Metformin users have a "protective" effect against the development of breast cancer.

Conclusions

Our study showed that *in vitro* cultured tumor cells can be used as a cellular model to identify changes in serum molecules associated with different metabolic states. These alterations in serum molecules associated with obesity, both in pre and postmenopausal women, induced an increase in Akt phosphorylation, promoting an increase in the viability of luminal A subtype breast cancer cells. Such effect was reversed with brief Metformin treatment in postmenopausal women with insulin resistance (Fig 6).

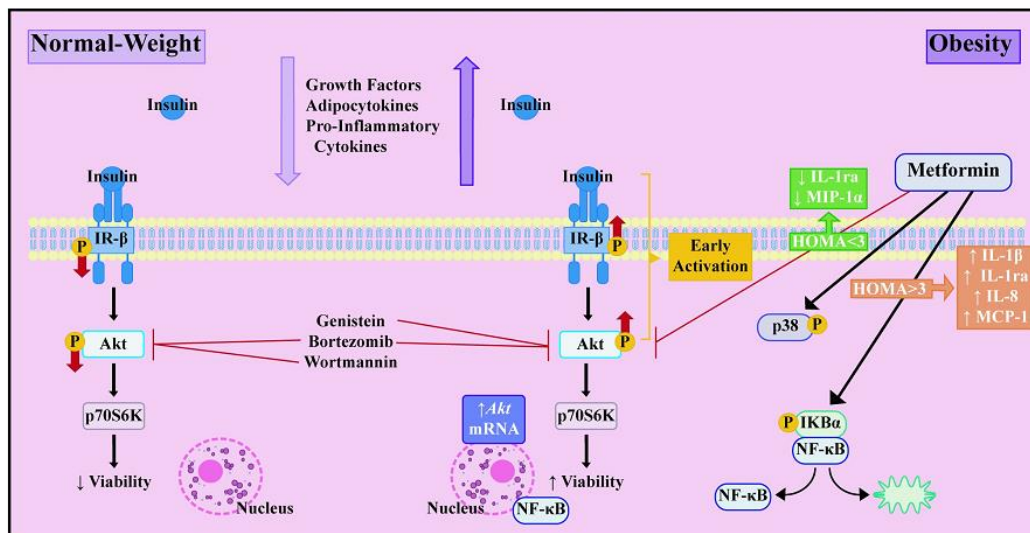


Fig 6. Schematic representation of the activation of the IR-β/Akt/p70S6K pathway in MCF-7 cells exposed to human sera with different metabolic characteristics and effect of Metformin treatment in obese patients.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266073.g006>

Supporting information

S1 Table. Gene transcription signatures associated with AKT pathway activations computed in the TCGA and GEO public available gene expression profiles of breast normal and tumoral tissue. Related to Additional file 2 and [Fig 1](#).

(XLSX)

S1 Fig. Comparison of TCGA vs gene expression data set and reverse phase protein matrix data in mammary tumors of premenopausal women. **A)** PI3K/Akt and mTOR signatures of public RPPA and summary of activity scores. **B)** PI3K/Akt and mTOR signatures correlation of public RPPA. **C)** Correlation of transcriptional signature (mRNA) associated with PI3K/AKT phosphorylation state. **D)** Comparison of mRNA and Protein expression pattern in samples with high vs low levels of AktSer473 and AktThr308.

(PDF)

S2 Fig. Viability rate of breast cancer cells seeded in sera human sera. **A)** Viability rate of breast cancer cells seeded in sera with or without heat-inactivation. **B)** Tolerance of breast cancer cell lines to human serum without heat-inactivation. All experiments were performed in triplicate (n = 9). The data shows an average +/- SD (** P < 0.05 to Ctr).

(PDF)

S3 Fig. Activation of IR/Akt/p70S6K pathway by stimulation with normal weight serum premenopausal in breast cancer cell lines. Cells were stimulated for 10 min with Human Recombinant Insulin (Ins) (0.5 U/ml) (positive control of activation of IR/Akt/p70S6K pathway) or 5% Normal Weight Serum Premenopausal (NWSPre). Western Blot against elements of IR/Akt/p70S6K pathway: Insulin beta receptor (IR- β), Phosphorylated beta insulin receptor in tyrosine residues 1162–1163 (pIR- β Tyr 1162–1163), Total Akt-1 (Akt-1), phosphorylated pan-Akt in Serine 473 residue (pAkt Ser 473), beta actin (β -actin) as a constitutive control. **A)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of MCF-10A cells. **B)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of MCF-7 cells. **C)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of ZR-75-30 cells. **D)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of BT-474 cells. **E)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of BT474R cells. **F)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of SKBR-3. **G)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of SKBR-3R. **H)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of MDA-MB-231. **I)** Representative Western blot of elements of IR/Akt pathway of MDA-MB-468.

(PDF)

S4 Fig. Effect of human sera with different metabolic characteristics on viability in breast cancer cells. Breast cancer cells were treated for 48 hours with heat-inactivated fetal bovine serum supplemented with 10% (Ctr), 5% FBS or 5% sera from normal-weight premenopausal women (NWSPre) or sera from obese premenopausal women (OSPre). Boxplot shows the group analysis of cell viability effect on **A)** MCF-7, **B)** MCF-10A, **C)** ZR75-30, **D)** SKBR-3 and **E)** MDA-MB-231 lines seeded with NWSPre or OSPre. T0 corresponds to viability at time the different sera were added. Viability was determined by violet crystal technique and normalizing against Ctr. All experiments were performed by triplicate (n = 9) for each serum evaluated. ** P < 0.05.

(PDF)

S5 Fig. Expression levels of Akt Isoforms in MCF-7 cells by stimulation of with human sera. MCF-7 cells stimulated for 10 minutes with recombinant human insulin (Ins) (0.5 U/ml)

(positive control of activation of IR/Akt pathway) and 5% NWSPre or OSPre or OSPPost or NWSPPost after 10 min. RT-PCR for Akt isoforms: Akt isoform 1 (Akt-1), Akt isoform 2 (Akt-2), Akt isoform 3 (Akt-3) and Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as constitutive control. (PDF)

S6 Fig. Effect of serum from postmenopausal obese women with Metformin treated on MCF-7 cells. The viability and phosphorylation levels of MCF-7 cells exposed to OSPPost sera with Metformin treatment at 0 and 10 weeks were evaluated. **A)** Viability of MCF-7 cells. **B)** Western Blot Densitometry of pAkt (Ser473) of MCF-7 cells. **C)** Akt Isoforms expression levels on MCF-7 cells stimulated with OSPPost at 0 and 10 weeks of Metformin treatment. **D)** Determination of serum molecule levels in postmenopausal obese women treated at 0 and 10 weeks of treatment with Metformin. The plotted data correspond to three independent experiments (n = 3) for each serum evaluated. ** P<0.005. (PDF)

S7 Fig. Effect of the grade of obesity on the expression of serum molecules after treatment with Metformin. **A)** MCP-1 levels at T0 and T10 weeks of Metformin treatment in women with grade I obesity. **B)** MCP-1 levels at T0 and T10 weeks of Metformin treatment in women with grade III obesity. **C)** MIP-1beta levels at T0 and T10 weeks of Metformin treatment in women with grade I obesity. **D)** MIP-1beta levels at T0 and T10 weeks of Metformin treatment in women with grade III obesity. **E)** TNFalpha levels at T0 and T10 weeks of treatment with Metformin in women with grade I obesity. **F)** TNFalpha levels at T0 and T10 weeks of treatment with Metformin in women with grade III obesity. **G)** VEGF levels at T0 and T10 weeks of Metformin treatment in women with grade I obesity. **H)** VEGF levels at T0 and T10 weeks of Metformin treatment in women with grade III obesity. (PDF)

S8 Fig. Sample size calculation by G power program. (PDF)

S1 Raw images. Western blots: Representative western blot images used for the creation of figures. (PDF)

Acknowledgments

L.C.F.G. was supported in her PhD studies by the graduate program Posgrado en Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Thanks to Silanes Laboratory for its support in supplying the drug Metformin used in this project.

Author Contributions

Conceptualization: José L. Ventura-Gallegos, Alejandro Zentella-Dehesa.

Data curation: Sandra L. Romero-Córdoba.

Formal analysis: Laura C. Flores-García.

Funding acquisition: Alberto J. Cabrera-Quintero, Alejandro Zentella-Dehesa.

Investigation: Laura C. Flores-García, José L. Ventura-Gallegos, Alfredo J. Hernández-Juárez, Alejandro Zentella-Dehesa.

Methodology: Laura C. Flores-García, José L. Ventura-Gallegos, María A. Naranjo-Meneses, Eduardo García-García, Juan Pablo Méndez, Antonio Ramírez-Ruiz, Sigifredo Pedraza-Sánchez, Noemi Meraz-Cruz, Felipe Vadillo-Ortega.

Project administration: Alejandro Zentella-Dehesa.

Supervision: José L. Ventura-Gallegos.

Writing – original draft: Laura C. Flores-García, José L. Ventura-Gallegos, Sandra L. Romero-Córdoba, Alejandro Zentella-Dehesa.

Writing – review & editing: Laura C. Flores-García, José L. Ventura-Gallegos, Sandra L. Romero-Córdoba, Alberto J. Cabrera-Quintero, Sigifredo Pedraza-Sánchez, Alejandro Zentella-Dehesa.

References

1. Soto T and Lagos E. Obesidad y cáncer: un enfoque epidemiológico. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* (2009) LXVI(587), 27–32.
2. Barone I, Giordano C, Bonfiglio D, Andò S, Catalano S. The weight of obesity in breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2020 Feb; 60:274–284. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.001> PMID: 31491560
3. Aguilar MJ, Neri M, Padilla CA, Pimentel ML, García A, Muy N. Sobre peso/obesidad en mujeres y su implicación en el cáncer de mama; edad de diagnóstico. *Nutr Hosp* (2012) 27(5):1643–1647. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.5.5998> PMID: 23478718
4. GLOBOCAN (2018) <https://gco.iarc.fr/>
5. Bowers L, Cavazos D, Maximo I, Brenner A, Hursting S, deGraffenried L. Obesity enhances nongenomic estrogen receptor crosstalk with the PI3K/Akt and MAPK pathways to promote in vitro measures of breast cancer progression. *Breast Cancer Research* (2013) 15:R59. <https://doi.org/10.1186/bcr3453> PMID: 23880059
6. Sánchez C, Ibáñez C, Klaassen J. Obesidad y Cáncer: la tormenta perfecta. *Rev Med Chile* (2014) 142:211–221. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014000200010> PMID: 24953110
7. Allott E & Hursting S. Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. *Endocr Relat Cancer* (2015) 22(6): R365–R386. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0400> PMID: 26373570
8. Dietze E, Chavez T, Seewaldt V. Obesity and Triple-Negative Breast Cancer: Disparities, Controversies, and Biology. *The American Journal of Pathology* (2017) 9.pii:S0002-9440(17)30396-6b. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.018> PMID: 29128565
9. Chen Y, Wen Y, Li Z, Luo D, Zhang X. The molecular mechanisms between metabolic syndrome and breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016) 471 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.034> PMID: 26891869
10. Argolo DF, Iyengar NM, Hudis CA. Obesity and Cancer: Concepts and Challenges. *Indian J Surg Oncol* (2015) 6(4):390–398. <https://doi.org/10.1007/s13193-015-0483-z> PMID: 27081257
11. Gérard C & Brown K. Obesity and breast cancer—role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2017) <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.014> PMID: 28919302
12. Amadou A, Hainaut P, Romieu I. Role of Obesity in the Risk of Breast Cancer: Lesson from Anthropometry. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Oncology* (2013) ID 906495. <https://doi.org/10.1155/2013/906495> PMID: 23431300
13. Agnoli C, Grioni S, Sieri S, Sacerdote C, Ricceri F, Tumino R, et al. Metabolic Syndrome and Breast Cancer Risk: A Case-Cohort Study Nested in a Multicenter Italian Cohort. *PLoS ONE* (2015) 10(6): e0128891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128891> PMID: 26030767
14. Borengasser A, Karbassi B, Hedges R, Rogers L, Kadlubar S, Emmons T. Adipocyte hypoxia promotes epithelial-mesenchymal transition-related gene expression and estrogen receptor negative phenotype in breast cancer cells. *Oncology Reports* (2015) 33: 2689–2694. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3880> PMID: 25823469
15. Feola A, Ricci S, Kouidhi S, Rizzo A, Penon A, Formisano P, et al. Multifaceted breast cancer: the molecular connection with obesity. *Journal of Cellular Physiology* (2016) <https://doi.org/10.1002/jcp.25475> PMID: 27363538

16. Cantor J & Sabatini D. Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discovery* (2012) <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0345> PMID: 23009760
17. Belfiore A, Malaguamera R, Nicolosi ML, Lappano R, Ragusa M, Morrione A, et al. A novel functional crosstalk between DDR1 and the IGF axis and its relevance for breast cancer. *Cell Adh Migr* (2018) 12(4):305–314. <https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1445953> PMID: 29486622
18. García-Castro A, Zonca M, Florindo-Pinheiro D, Carvalho-Pinto CE, Cordero A, Gutiérrez del Fernando B, et al. APRIL promotes breast tumor growth and metastasis and is associated with aggressive basal breast cancer. *Carcinogenesis* (2015) 36(5):574–84. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv020> PMID: 25750171
19. Bastarrachea RA, Montero JC, Saavedra-Gajardo V, Cerda-Flores R, Machado-Domínguez A, Comusie AG. Objetivos moleculares para diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Rev méd. Chile* (2008) 136(1): 107–117. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872008000100014>. PMID: 18483661
20. Kink GJ, Hilkens J. Insulin receptor substrate 4 (IRS4) is a constitutive active oncogenic driver collaborating with HER2 and causing therapeutic resistance. *Mol Cell Oncol* (2017) 4(2): e1279722. <https://doi.org/10.1080/23723556.2017.1279722> PMID: 28401183
21. Dey N, Williams C, Leyland-Jones B, De P. A critical role for HER3 in Her2-amplified and non-amplified breast cancer: function of a kinase-dead RTK. *Am J Transl Res* (2015) 7(4):733.50. PMID: 26064441
22. Sonnenblick A, Venet D, Brohé S, Pondé N, Sotiriou C. pAkt pathway activation is associated with PIK3CA mutations and good prognosis in luminal breast cancer in contrast to p-mTOR pathway activation. *NPJ Breast Cancer* (2019) 31:57. <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0102-1> PMID: 30729154
23. Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res* (2007) 67(22):10804–12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2310> PMID: 18006825
24. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?. *Diabetologia* (2013) 56(9):1898–906 <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2991-0> PMID: 23835523
25. Pimentel I, Lohmann AE, Ennis M, Dowling RJO, Cescon D, Elser C, et al. A phase II randomized clinical trial of the effect of metformin versus placebo on progression-free survival in women with metastatic breast cancer receiving standard chemotherapy. *Breast*. 2019 Dec; 48:17–23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.08.003> Epub 2019 Aug 22. PMID: 31472446.
26. Dowling RJ, Niraula S, Chang MC, Done SJ, Ennis M, McCready DR, et al. Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res*. 2015 Mar 3; 17(1):32. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0540-0> PMID: 25849721; PMCID: PMC4381495.
27. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* (2005) 330(7503):1304–5. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7> PMID: 15849206
28. An H, He L. Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol* (2016) 228(3): R97–106. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0447> PMID: 26743209
29. Taubes G. Cancer research. Unraveling the obesity-cancer connection. *Science*. 2012 Jan 6; 335(6064):28, 30–2. <https://doi.org/10.1126/science.335.6064.28> Erratum in: *Science*. 2012 Jan 20; 335(6066):286. PMID: 22223787.
30. Cohen DH, LeRoith D. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Sep 5; 19(5):F27–45. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0374> PMID: 22593429.
31. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* (2014) 15, 550 <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> PMID: 25516281
32. Carvalho BS, Irizarry RA. A Framework for Oligonucleotide Microarray Preprocessing. *Bioinformatics* (2010) 26(19), 2363–7. ISSN 1367-4803. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq431> PMID: 20688976
33. Durinck S, Spellman P, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols* (2009), 4, 1184–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97> PMID: 19617889
34. Zhang Y, Knowk-Shing Ng P, Kucherlapati M, Chen F, Liu Y, Tsang YH, et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. *Cancer Cell* (2017) 31(6):820–832. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.013> PMID: 28528867
35. Arellano-Plancarte A, Hernandez-Aranda J, Catt KJ, Olivares-Reyes JA. Angiotensin-induced EGF receptor transactivation inhibits insulin signaling in C9 hepatic cells. *Biochem Pharmacol* (2010) 79(5):733–45. Angiotensin-induced EGF receptor transactivation inhibits insulin signaling in C9 hepatic cells. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.10.014> PMID: 19879250

36. Bowers LW, Wiese M, Brenner AJ, Rossi EL, Tekmal RR, Hursting SD, et al. Obesity Suppresses Estrogen Receptor Beta Expression in Breast Cancer Cells via a Her2-Mediated Pathway. *PLoS One* (2015) 10(12):e0145452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145452> PMID: 26709918
37. Bowers LW, Brenner AJ, Hursting SD, Tekmal RR, deGraffenried LA. Obesity-associated systemic interleukin-6 promotes pre-adipocyte aromatase expression via increased breast cancer cell prostaglandin E2 production. *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 149(1):49–57. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3223-0> PMID: 25476497
38. Lizcano F, Guzmán G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. *Biomed Res Int* (2014) 2014:757461. <https://doi.org/10.1155/2014/757461> PMID: 24734243
39. Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Pezzino V, Squatrito S, Belfiore A, et al. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch Physiol Biochem.* 2008 Feb; 114(1):23–37. <https://doi.org/10.1080/13813450801969715> PMID: 18465356
40. Maltais ML, Desroches J, Dionne IJ. Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculoskelet Neuronal Interact* (2009) 9(4):186–97. PMID: 19949277
41. McInnes KJ, Andersson TC, Simonytė K, Söderström I, Mattsson C, Seck JR, et al. Association of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I expression and activity with estrogen receptor β in adipose tissue from postmenopausal women. *Menopause* (2012) 19(12):1347–52. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e318258aad7> PMID: 23190557
42. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2000) 24(2):226–31. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801118> PMID: 10702775
43. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin* (2017) 67(5):378–397. <https://doi.org/10.3322/caac.21405> PMID: 28763097
44. Zhang W, Borchherding N, Kolb R. IL-1 Signaling in Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1240:1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38315-2_1 PMID: 32060884
45. Ye Y, Tang X, Sun Z, Chen S. Upregulated WDR26 serves as a scaffold to coordinate PI3K/ AKT pathway-driven breast cancer cell growth, migration, and invasion. *Oncotarget.* 2016 Apr 5; 7(14):17854–69. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7439> PMID: 26895380; PMCID: PMC4951255.
46. Rädler PD, Wehde BL, Wagner KU. Crosstalk between STAT5 activation and PI3K/AKT functions in normal and transformed mammary epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Aug 15; 451:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.025> Epub 2017 May 8. PMID: 28495456; PMCID: PMC5515553.
47. Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal.* 2019 Nov 21; 17(1):154. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0450-3> PMID: 31752925; PMCID: PMC6873690.
48. Clark AR, Tokar A. Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem Soc Trans.* 2014 Oct; 42(5):1349–55. <https://doi.org/10.1042/BST20140160> PMID: 25233414.
49. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2001 Aug; 60(3):349–56. <https://doi.org/10.1079/pns2001110> PMID: 11681809.
50. Atoum MF, Alzoughool F, Al-Hourani H. Linkage Between Obesity Leptin and Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 2020 Jan 10; 14:1178223419898458. <https://doi.org/10.1177/1178223419898458> PMID: 31975779; PMCID: PMC6956603.
51. Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran SM. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Dec; 24(6):503–13. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.10.001> Epub 2013 Oct 21. PMID: 24210902.
52. Song YH, Chai Q, Wang NL, Yang FF, Wang GH, Hu JY. X-rays induced IL-8 production in lung cancer cells via p38/MAPK and NF- κ B pathway. *Int J Radiat Biol.* 2020 Nov; 96(11):1374–1381. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1683643> Epub 2020 Jan 6. PMID: 31729901.
53. Guo Y, Zang Y, Lv L, Cai F, Qian T, Zhang G, et al. IL-8 promotes proliferation and inhibition of apoptosis via STAT3/AKT/NF- κ B pathway in prostate cancer. *Mol Med Rep.* 2017 Dec; 16(6):9035–9042. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7747> Epub 2017 Oct 10. Erratum in: *Mol Med Rep.* 2019 Apr; 19(4):2970. PMID: 29039490.
54. Hoessel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013 Aug 2; 12:86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86> PMID: 23915189; PMCID: PMC3750319.
55. Lei Y, Yi Y, Liu Y, Liu X, Keller ET, Qian CN, et al. Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer.* 2017 Jan 26; 36(1):17. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0184-9> PMID: 28126011; PMCID: PMC5270304.
56. Sun Y, Liu B, Snetselaar LG, Wallace RB, Caan BJ, Rohan TE, et al. Association of Normal-Weight Central Obesity With All-Cause and Cause-Specific Mortality Among Postmenopausal Women. *JAMA*

- Netw Open. 2019 Jul 3; 2(7):e197337. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.7337> PMID: 31339542; PMCID: PMC6659146.
57. Li J, Han X. Adipocytokines and breast cancer. *Curr Probl Cancer*. 2018 Mar-Apr; 42(2):208–214. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2018.01.004> Epub 2018 Jan 8. PMID: 29433827.
 58. Kim CS, Kim IJ, Choi JS, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Tamoxifen ameliorates obstructive nephropathy through Src and the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Biol Cell*. (2019) 111(1):18–27. <https://doi.org/10.1111/boc.201800040> PMID: 30304547
 59. Jabbarzadeh Kaboli P, Salimian F, Aghapour S, Xiang S, Zhao Q, Li M, et al. Akt-targeted therapy as a promising strategy to overcome drug resistance in breast cancer—A comprehensive review from chemotherapy to immunotherapy. *Pharmacol Res*. (2020) 156:104806. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104806> PMID: 32294525
 60. Li F, Miao L, Xue T, Qin H, Mondal S, Thompson PR, et al. Inhibiting PAD2 enhances the anti-tumor effect of docetaxel in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. (2019) 10; 38(1):414. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1404-8> PMID: 31601253
 61. Shah KN, Mehta KR, Peterson D, Evangelista M, Livesey JC, Faridi JS. AKT-induced tamoxifen resistance is overturned by RRM2 inhibition. *Mol Cancer Res*. (2014) 12(3):394–407. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0219> PMID: 24362250
 62. Wang J, Yang D, Chen Z, Gou B (2016) "Associations of body mass index with cancer incidence among populations, genders, and menopausal status: A systematic review and meta-analysis". *Cancer Epidemiology* 42.
 63. Dowsett M, Folkler E. Reduced progesterone levels explain the reduced risk of breast cancer in obese premenopausal women: a new hypothesis. *Breast Cancer Res Treat*. (2015) 149(1):1–4. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3211-4> PMID: 25414027
 64. Laudisio D, Muscogiuri G, Barrea L, Savastano S, Colao A. Obesity and breast cancer in premenopausal women: Current evidence and future perspectives. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018 Nov; 230:217–221. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.03.050> Epub 2018 Mar 27. PMID: 29730021.
 65. Luque RM, López-Sánchez LM, Villa-Osaba A, Luque IM, Santos-Romero AL, Yubero-Serrano EM, et al. Breast cancer is associated to impaired glucose/insulin homeostasis in premenopausal obese/overweight patients. *Oncotarget*. (2017) 8(46):81462–81474. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20399> PMID: 29113405
 66. Boonyaratankornkit V, Pateetin P. The role of ovarian sex steroids in metabolic homeostasis, obesity, and postmenopausal breast cancer: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Biomed Res Int*. (2015) 140196. <https://doi.org/10.1155/2015/140196> PMID: 25866757
 67. Chu DT, Phuong TNT, Tien NLB, et al. The Effects of Adipocytes on the Regulation of Breast Cancer in the Tumor Microenvironment: An Update. *Cells*. (2019) 8(8):857. <https://doi.org/10.3390/cells8080857> PMID: 31398937
 68. Zhang J, Zhang LL, Shen L, Xu XM, Yu HG. Regulation of Akt gene expression by cisplatin. *Oncol Lett* (2013) 5(3):756–760. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1132> PMID: 23426872
 69. Barone I, Giordano C, Bonfiglio D, And'ò S, Catalano S. The weight of obesity n breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives. *Semin Cancer Biol* (2019) pii: S1044-579X (19)30194-4. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.001> PMID: 31491560
 70. Omiste A. Enfermedad metabólica en el paciente con normopeso. *UMA* (2017)
 71. Luo A, Meng M, Wang G, Han R, Zhang Y, Jing X, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Recruited by Chemokine (C-C Motif) Ligand 3 Promote the Progression of Breast Cancer via Phosphoinositide 3-Kinase-Protein Kinase B-Mammalian Target of Rapamycin Signaling. *J Breast Cancer*. (2020) 10; 23(2):141–161. <https://doi.org/10.4048/jbc.2020.23.e26> PMID: 32395374
 72. Amoani B, Sakyi SA, Mantey R, Laing EF, Ephraim RD, Sarfo-Katanka O, et al. Increased metformin dosage suppresses pro-inflammatory cytokine levels in systemic circulation and might contribute to its beneficial effects. *J Immunoassay Immunochem*. (2021); 42(3):252–264. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1862861> PMID: 33444083
 73. Su JR, Lu ZH, Su Y, Zhao N, Dong CL, Sun L, et al. Relationship of Serum Adiponectin Levels and Metformin Therapy in Patients with Type 2 Diabetes. *Horm Metab Res*. (2016) 48(2):92–8. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569287> PMID: 26808583
 74. Ida S, Murata K, Kaneko R. Effects of metformin treatment on blood leptin and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes*. (2017) 9(5):526–535. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12445> PMID: 27380451
 75. Chen W, Liu X, Ye S. Effects of metformin on blood and urine pro-inflammatory mediators in patients with type 2 diabetes. *J Inflamm (Lond)*. (2016); 13:34. <https://doi.org/10.1186/s12950-016-0142-3> PMID: 27904436

76. Finnberg N, El-Deiry WS. Activating FOXO3a, NF-kappaB and p53 by targeting IKKs: an effective multi-faceted targeting of the tumor-cell phenotype? *Cancer Biol Ther*. 2004 Jul; 3(7):614–6. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.7.1057> Epub 2004 Jul 24. PMID: [15254408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15254408/).
77. Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: it's role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression. *IUBMB Life*. 2005 Jun; 57(6):441–7. <https://doi.org/10.1080/15216540500159424> PMID: [16012053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16012053/).
78. Ukaji T, Umezawa K. Novel approaches to target NF-kB and other signaling pathways in cancer stem cells. *Adv Biol Regul*. 2014 Sep; 56:108–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.06.001> Epub 2014 Jul 1. PMID: [25128192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25128192/).
79. Zakikhani M, Blouin M, Piura E, Pollak M. Metformin and rapamycin have distinct effects on the Akt pathway and proliferation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* (2010) 123:271–279. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0763-9> PMID: [20135346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20135346/)
80. Bost F, Sahra I, Tant J. Prevention of Mutagenesis: New Potential Mechanisms of Metformin Action in Neoplastic Cells. *Cancer Prev Res* (2012) 5(4). <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0085> PMID: [22491515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22491515/)
81. Obara A, Fujita Y, Abudukadier A, Fukushima T, Oguri Y, Ogura M, et al. DEPTOR-related mTOR suppression is involved in metformin's anti-cancer action in human liver cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2015) 460 1047e1052. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.148> PMID: [25843797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25843797/)
82. Hatoum D & McGowan E. Recent Advances in the Use of Metformin: Can Treating Diabetes Prevent Breast Cancer?. *BioMed Research International* (2015) ID 548436. <https://doi.org/10.1155/2015/548436> PMID: [25866793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25866793/)
83. Al-Zaidan L, El Ruz R, Malki A. Screening Novel Molecular Targets of Metformin in Breast Cancer by Proteomic Approach. *Front. Public Health* (2017) 5:277. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00277> PMID: [29085821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29085821/)
84. Esparza-López J, Alvarado-Muñoz JF, Escobar-Arriaga E, Ulloa-Aguirre A, de Jesús Ibarra-Sánchez M. Metformin reverses mesenchymal phenotype of primary breast cancer cells through STAT3/NF-kB pathways. *BMC Cancer*. 2019 Jul 23; 19(1):728. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5945-1> PMID: [31337349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337349/)
85. Kim HG, Hien TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, et al. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF-kB pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *Br J Pharmacol*. 2011 Mar; 162(5):1096–108. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01101.x> PMID: [21054339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21054339/)
86. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kB activation. *Aging Cell*. 2013 Jun; 12(3):489–98. <https://doi.org/10.1111/ace1.12075> Epub 2013 Apr 23. PMID: [23521863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23521863/).
87. Messmer UK, Pereda-Fernandez C, Manderscheid M, Pfeilschifter J. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol*. 2001 Jun; 133(4):467–76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704093> PMID: [11399663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11399663/); PMCID: [PMC1572806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1572806/).
88. Mitre-Aguilar IB, Barrios-García T, Ruiz-Lopez VM, Cabrera-Quintero AJ, Mejía-Dominguez NR, Ventura-Gallegos JL, et al. Glucocorticoid-dependent expression of IAP participates in the protection against TNF-mediated cytotoxicity in MCF7 cells. *BMC Cancer*. 2019 Apr 15; 19(1):356. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5563-y> PMID: [30987626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30987626/); PMCID: [PMC6466787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6466787/).
89. Xie Y, Peng Z, Shi M, Ji M, Guo H, Shi H. Metformin combined with p38 MAPK inhibitor improves cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Mol Med Rep*. 2014 Nov; 10(5):2346–50. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2490> Epub 2014 Aug 14. PMID: [25118792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25118792/); PMCID: [PMC4214348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4214348/).
90. Batlle R, Andrés E, Gonzalez L, Llonch E, Igea A, Gutierrez-Prat N, et al. Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal-endothelial transition by p38α through TGF-β and JNK signaling. *Nat Commun*. 2019 Jul 11; 10(1):3071. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10946-y> PMID: [31296856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31296856/); PMCID: [PMC6624205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6624205/).
91. Ryu M, Sung CK, Im YJ, Chun C. Activation of JNK and p38 in MCF-7 Cells and the In Vitro Anticancer Activity of *Alnus hirsuta* Extract. *Molecules*. 2020 Feb 27; 25(5):1073. <https://doi.org/10.3390/molecules25051073> PMID: [32121012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32121012/); PMCID: [PMC7179116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7179116/).