



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Análisis de la expresión génica de receptores de leptina, en líneas celulares de cáncer de mama, MCF7, MDA-MB 231 y HCC1937 empleando estándares de leptina y tamoxifeno”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

Presenta:

Q.F.B. Rodolfo López Linares

Asesor académico: Dr. Jonnathan G. Santillán Benítez

Asesor adjunto: Dr. Carlos González Romero

Asesor externo: Dr. Antonio Sandoval Cabrera

Toluca de Lerdo, Estado de México, 2019



El presente proyecto de tesis se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de alta especialidad en Hemato-Oncología del Hospital para el Niño del Instituto Materno Infantil del Estado de México (IMIEM), con dirección en Paseo Colón sin número esquina Paseo Tollocan Colonia Isidro Fabela, C. P. 50170, Toluca, México.

Adicionalmente se llevó a cabo la publicación de los siguientes artículos de revisión:

The Role of Hyperleptinemia in Chronic Degenerative Diseases, en la revista: International Journal of Life Sciences Research, Vol. 5, Issue 4, pp: (1-10), Month: October-December2017

Genes and proteins associated with chemotherapeutic resistance in breast cancer, en la revista: Clinical Oncology and Research, DOI: 10.31487/j.COR.2018.02.006

Se envió y se aceptó para su publicación en el libro "Retos actuales de la farmacia" de la serie "Tópicos selectos en ciencias y tecnología farmacéuticas" del Fondo Editorial de la Universidad Autónoma del Estado de México el capítulo: Análisis de expresión génica en líneas celulares de cáncer de mama

Se envió el artículo de investigación resultante de este proyecto de tesis a la revista: Breast Cancer Research and Treatment, ISSN: 0167-6806

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pág
Resumen.....	6
Abstract	7
Antecedentes.....	8
1. Cáncer de mama	8
1.1 Genes involucrados en el cáncer de mama.....	9
1.2 Líneas celulares de cáncer de mama	9
1.2.1 Línea celular MCF 7.....	10
1.2.2 Línea celular MDA MB 231.....	11
1.2.3 Línea celular HCC 1937	11
2. Obesidad y cáncer	11
3. Leptina	12
3.1 Receptores de leptina	13
3.2 Leptina y cáncer de mama	14
4. Tamoxifeno	16
4.1 Mecanismo de acción del tamoxifeno	16
4.2 Tamoxifeno y leptina	16
Justificación.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Metodología.....	20
1. Cultivo celular	20
1.1 Expansión de las líneas celulares.....	20
1.2 Preservación de las líneas celulares.....	20
2. Extracción de RNA de líneas celulares	21
2.1 Cuantificación de RNA de líneas celulares:.....	21
3. Síntesis de cDNA:.....	22

4. Determinación IC ₅₀ del tamoxifeno	22
5. Ensayo de proliferación	22
6. Análisis de micro-ensayos.....	23
7. ELISA	24
Análisis estadístico.....	25
Resultados.....	26
1. Cultivo celular	26
2. Cuantificación de RNA de líneas celulares:	26
3. Cuantificación de primers	26
4. Caracterización de receptores en líneas celulares por RT-PCR	26
5. Determinación de IC ₅₀ de tamoxifeno en las líneas celulares	27
6.Efecto de la leptina y tamoxifeno en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama MDA MB 231, MCF 7 y HCC 1937	27
7. Expresión relativa del receptor de leptina en líneas celulares de cáncer de mama MDA MB 231, MCF 7 y HCC 1937 expuestas a leptina y tamoxifeno.	29
8. Cuantificación proteica de ObR por ELISA	30
Discusión de resultados.....	30
Conclusiones:	35
Índice de figuras	
Figura 1: Estructura química del tamoxifeno	36
Figura 2: Condiciones de RT-PCR.....	36
Figura 3: Comparación de la morfología de las líneas celulares (MCF7, MDA MB 231 y HCC1937)	37
Figura 4. Bandas de electroforesis para la identificación de los genes ObRt, ObRb y ER en las tres líneas celulares de cáncer de mama.	38
Figura 5. Bandas de electroforesis para la identificación de los genes CYP19A1 y 18s en las tres líneas celulares de cáncer de mama.....	39
Figura 6: Determinación de la IC ₅₀ del tamoxifeno para la línea celular MDA MB 231.....	40
Figura 7: Determinación de la IC ₅₀ del tamoxifeno para la línea celular MCF 7.....	41
Figura 8: Determinación de la IC ₅₀ del tamoxifeno para la línea celular HCC 1937.....	42
Figura 9: Ensayo de proliferación de líneas celulares con tiempo de crecimiento previo a estimulación de 24 horas.....	43

Figura 10: Ensayo de proliferación de líneas celulares con tiempo de crecimiento previo a estimulación de 48 horas.....	44
Figura 11: Expresión relativa de ObR en la línea celular HCC 1937	46
Figura 12: Expresión relativa de ObR en la línea celular MCF 7.....	46
Figura 13: Curva estándar para la calibración de la prueba ELISA para la determinación de ObR	47
Figura 14: Concentración de proteína ObR para la línea celular MDA MB 231.....	47
Figura 15: Concentración de proteína ObR para la línea celular MCF 7.....	48
Figura 16: Concentración de proteína ObR para la línea celular HCC 1937.....	48
Figura 17. Propuesta de mecanismo de resistencia al tamoxifeno en líneas celulares de cáncer de mama triple marcador negativo.	49
Índice de tablas	
Tabla 1: Condiciones de reacción de kit High Capacity RNA to cDNA	50
Tabla 2: Concentraciones de reactivos empleadas para RT-PCR.....	50
Tabla 3. Condiciones óptimas para el cultivo de líneas celulares de cáncer de mama.....	51
Tabla 4: Concentración de RNA de líneas celulares	51
Tabla 5: Concentración final de los primers empleados para RT-PCR.....	52
Tabla 6: Tm obtenida para cada primer empleado para RT-PCR.....	52
Tabla 7: Parámetros empleados para el cálculo de la Tm de los primers.	53
Tabla 8. Caracterización de las líneas celulares para los genes por RT-PCR.....	53
Tabla 9: Cuantificación relativa de ObR en la línea celular HCC 1937	54
Tabla 10: Cuantificación relativa de ObR en la línea celular MCF 7.....	55
Tabla 11: Concentración de proteína ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular MDA MB 231	56
Tabla 12: Concentración de proteína ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular MCF 7	56
Tabla 13: Concentración de proteína ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular HCC 1937	57
Referencias.....	58

Introducción

El cáncer de mama es el principal tipo de cáncer que afecta a las mujeres a nivel mundial; es una patología que se puede desencadenar debido a múltiples factores que conllevan a una proliferación anormal y descontrolada de células que componen la glándula mamaria. Uno de los factores que ha incrementado la incidencia y presenta peor pronóstico de este tipo de cáncer es la obesidad. En esta condición son secretadas altas cantidades leptina, una proteína que presenta actividad proliferativa, mitogénica, antiapoptótica y proinflamatoria que puede resultar antagónica al tratamiento quimioterapéutico.

Objetivo:

El objetivo del proyecto fue identificar la modulación de la expresión génica de receptores de leptina y la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB 231, MCF-7 y HCC1937) como resultado de su estimulación con leptina y tamoxifeno y establecer un modelo de abordaje inicial para el estudio de los subtipos de cáncer de mama y su comportamiento a la respuesta de la acción de las adipocinas y su posible relación con el mecanismo de resistencia a quimioterapéuticos como el tamoxifeno en líneas celulares ER positivo y triple marcador negativo

Material y métodos:

Se realizó la evaluación de la modulación de la expresión del receptor de leptina en presencia de estímulos de leptina y tamoxifeno en las líneas celulares de cáncer de mama MCF 7, MDA MB 231 y HCC 1937 mediante ensayos de proliferación con tinción de cristal violeta, y análisis de la expresión de mRNA del receptor de leptina mediante su transcripción a cDNA, PCR en punto final y RT-PCR, así mismo se evaluó la expresión de la proteína del receptor de leptina mediante ELISA.

Resultados:

Se determinó que la leptina es capaz de modular positivamente la proliferación de las tres líneas celulares de cáncer de mamá y el tamoxifeno es capaz de ejercer un efecto antiproliferativo en las mismas, se identificó que la capacidad del tamoxifeno para disminuir la proliferación de células cancerígenas se ve disminuida en presencia de leptina, aunada a cambios en la modulación de la expresión de su receptor. Del mismo modo se determinó la concentración de la proteína de ObR mediante la técnica de ELISA obteniéndose una mayor concentración en todos los casos en comparación con el control, no obstante la variación no es estadísticamente significativa.

Conclusiones:

El tamoxifeno es un agente quimioterapéutico capaz de inducir una mayor modulación de la expresión del ObRb en las líneas celulares de cáncer de mama, lo cual puede estar relacionado con la disminución de su actividad antiproliferativa, mientras que la leptina genera un efecto proliferativo en las tres líneas celulares, lo cual corresponde con los reportes de su actividad proliferativa, antiapoptótica y mitogénica.

Introduction

Breast cancer is the main type of cancer that affects women worldwide; it's a pathology that can be triggered due to multiple factors that lead to an abnormal and uncontrolled proliferation of cells that make up the mammary gland. One of the factors that has increased the incidence and worse prognosis of this type of cancer is obesity. In this condition, high amounts of leptin are secreted, a protein that has proliferative, mitogenic, antiapoptotic and proinflammatory activity that may be antagonistic to chemotherapeutic treatment.

Objective:

The aim of the project was to identify the modulation of gene expression of leptin receptors and cell proliferation in breast cancer cell lines (MDA-MB 231, MCF-7 and HCC1937) as a result of their stimulation with leptin and tamoxifen and to establish an initial approach model for the study of breast cancer subtypes and their behavior to the action response of adipokines and their possible relationship with the mechanism of resistance to chemotherapeutics such as tamoxifen in ER positive and triple negative cell lines.

Material and methods:

Evaluation of the modulation of leptin receptor expression in the presence of leptin and tamoxifen stimuli was carried out in breast cancer cell lines MCF 7, MDA MB 231 and HCC 1937 by proliferation assays with crystal violet staining, and analysis of leptin receptor mRNA expression by transcription to cDNA, RT-PCR and qPCR, and the expression of leptin receptor protein was also evaluated by ELISA.

Results:

It was determined that leptin is able to positively modulate the proliferation of the three breast cancer cell lines and tamoxifen is able to exert an antiproliferative effect on them, it was identified that the ability of tamoxifen to decrease the proliferation of breast cancer cells was diminished in the presence of leptin, together with changes in the modulation of the expression of its receptor. Similarly, the concentration of ObR protein was determined by the ELISA technique, obtaining a higher concentration in all cases compared to the control, although the variation is not statistically significant.

Conclusions:

Tamoxifen is a chemotherapeutic agent capable of inducing a greater modulation of the expression of ObRb in breast cancer cell lines, which may be related to the decrease of its antiproliferative activity, while leptin generates a proliferative effect in all three cell lines, which corresponds to the reports of its proliferative, antiapoptotic and mitogenic activity.

Antecedentes

1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una patología que ocurre debido a una serie de alteraciones genéticas (mutaciones somáticas) que generan una modificación en el ámbito molecular y funcional de las células mamarias. Este proceso conlleva a un crecimiento anormal y acelerado de células neoplásicas; dichas alteraciones pueden presentarse debido a distintos factores hereditarios y/o epigenéticos, que conllevan al cáncer familiar o el cáncer espontáneo, respectivamente. La glándula mamaria en los humanos está constituida por tres distintos tipos de células: las células mioepiteliales (forman el epitelio de la capa basal de los ductos y alveolos), las células de epitelio ductal (forman la línea del lumen de los ductos) y células de epitelio alveolar. La diversidad fenotípica del cáncer mamario corresponde con su diversidad en los patrones de expresión celular, conocidos también como subtipos intrínsecos, que incluyen al luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo. Dicha diversidad fenotípica se determina mediante la evaluación de los carcinomas mamarios con marcadores inmunohistoquímicos de receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2). (Acosta-Benito & Vich-Pérez, 2016; J. G. Santillán-Benítez, Á. Quiroz-Ordóñezb & Olivánb, 2015; Uusitalo et al., 2017).

Los carcinomas luminal A y B expresan el receptor de estrógeno y el receptor de progesterona, representan alrededor del 40-55% de los carcinomas mamarios y tienden a presentarse en mujeres posmenopáusicas y son, por lo general, de bajo grado. Los carcinomas mamarios HER2 presentan una sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 y representan del 12 al 30% de todos los carcinomas (Acosta-Benito & Vich-Pérez, 2016; Zaharia M, 2013).

Los carcinomas triple negativos no expresan los tres distintos tipos de receptores y representan del 12 al 25% de los casos, corresponden a múltiples subtipos, incluyendo los que tienen un fenotipo basal; estos tumores muestran un mayor grado de daño histológico y un mayor índice de proliferación celular que el resto de los subtipos y por lo tanto son de mayor riesgo (Dent et al., 2007).

1.1 Genes involucrados en el cáncer de mama

Con base a distintos estudios se ha comprobado que los genes de alta penetrancia BRCA1 y BRCA2 son los más implicados en el cáncer de mama familiar, seguidos de los genes: TP53, CDH1 y STK11. Por otro lado en el cáncer de mama desarrollado por factores epigenéticos se han encontrado más comúnmente mutaciones en los genes PICK3A, TP53, AKAT1, GATA3 Y MAP3K1 (Piñero-madrone, Polo-garcía, Alonso-romero, & Salinas-ramos, 2008).

Las alteraciones de los genes antes mencionados, en conjunto con mutaciones, translocaciones y amplificaciones que dañan el genoma de la célula conllevan a que células poco diferenciadas comiencen la transformación y se manifieste el cáncer de mama (Piñero-madrone et al., 2008).

1.2 Líneas celulares de cáncer de mama

Una línea celular es un conjunto de células de un tipo único que se han adaptado para crecer en un cultivo bajo condiciones adecuadas. Existen distintos tipos de líneas celulares, entre ellas se encuentran las líneas celulares continuas o inmortales. Las células inmortales se caracterizan por proliferar indefinidamente y normalmente presentan alteraciones citomorfológicas características: tamaño celular menor, menor adherencia, más redondeadas, mayor relación núcleo/citoplasma y sobre todo un incremento en la tasa de proliferación celular, una reducción del tiempo de duplicación, menor dependencia de suero en el medio de cultivo y mayor facilidad para crecer en suspensión. Se asume que estas líneas inmortales aparecen por anomalías cromosómicas (Neve et al., 2009).

Entre los tipos histológicos de cáncer de mama más frecuentes destacan:

1) Líneas celulares de carcinoma intraductal: en cultivo forman cúmulos o colonias de células epiteliales muy compactos en los cuales es difícil visualizar la estructura interna de las células. Son células con núcleo de gran tamaño, una relación núcleo/citoplasma elevada y presentan varios nucléolos. Generalmente no forman una monocapa completa (Martínez-Carpio & Navarro Moreno, 2003).

2) Líneas celulares de carcinoma ductal con componente papilar: sólo una línea celular (BT-549) ha sido aislada de tejido canceroso primario tipificado como carcinoma papilar intraductal. Forma monocapa en cultivo (Martínez-Carpio & Navarro Moreno, 2003).

3) Líneas celulares de carcinoma ductal, como la línea HCC1937, la cual es triple marcador negativo y posee una mutación de BRCA1 en el nucleótido 5382 (Martínez-Carpio & Navarro Moreno, 2003; Neve et al., 2009).

4) Líneas celulares obtenidas de tejido metastásico: son altamente investigadas desde el punto de vista de su dependencia hormonal, de los receptores de membrana para diferentes factores de crecimiento y de la acción mitogénica o antimitogénica de estos. Entre estas se encuentran las líneas MCF-7(RE+, RP+) y MDA-MB-231(REGF+, RE-). Estas líneas celulares se obtienen a partir de derrames pleurales de pacientes con cáncer de mama avanzado. Se ha descubierto que los derrames pleurales son una excelente fuente de células tumorales mamarias por la alta viabilidad y por la ausencia de fibroblastos. Además, la posibilidad de separar estas células de otros contaminantes resulta sencillo por la gran diferencia en la fuerza de adhesión a la superficie de cultivo (Martínez-Carpio & Navarro Moreno, 2003; Neve et al., 2009).

1.2.1 Línea celular MCF 7

La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 se obtuvo originalmente en la Michigan Cancer Foundation a partir de un derrame pleural maligno de una mujer posmenopáusica con cáncer de mama metastásico que había sido tratada previamente con radioterapia y manipulación hormonal.

Las células expresan receptores y con ello respuestas biológicas a una gran variedad de hormonas que incluyen: estrógeno, andrógeno, progesterona, glucocorticoides, insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, prolactina y hormona tiroidea, lo que le permite ser ampliamente utilizada para estudios de biología del cáncer de mama y mecanismos de acción hormonal (Osborne, I, Trent, & Hobbs, 1987).

Las células MCF-7 muestran muchas características de las células epiteliales mamarias normales, incluida la capacidad de generar agregados 3D multicelulares que pueden madurar y convertirse en esferoides que contienen lumen. Los esferoides del linaje MCF-7 se describen como una masa de células con núcleos desorganizados y fuertes enlaces célula a célula. Estas células se utilizan comúnmente en la investigación para experimentos con células de cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo, además son muy adecuadas para los estudios de resistencia a la terapia anti-hormonal, ya que son fáciles de cultivar y retienen la expresión del receptor de estrógeno cuando fueron tratadas con dicha terapia dirigida (Comsa, Cimpean, & Raica, 2015).

1.2.2 Línea celular MDA MB 231

La línea celular MDA-MB-231 es una línea celular epitelial de cáncer de mama humano, que se estableció a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con un adenocarcinoma mamario metastásico. Es una línea celular de cáncer de mama triple marcador negativo, altamente agresiva, invasiva y poco diferenciada, ya que carece de la expresión del receptor de estrógeno (ER), del receptor de progesterona (PR), y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo dos (HER2) (ATCC® HTB-26™, n.d.).

En esta línea se ha comprobado una altísima actividad transcripcional tanto para diversos factores de crecimiento como para sus receptores, lo que hace pensar que el crecimiento rápido y autónomo que presentan se debe en gran medida a mecanismos autocrinos (Martínez-Carpio & Navarro Moreno, 2003).

El cáncer de mama triple negativo es una forma agresiva de cáncer de mama con opciones de tratamiento limitadas. Por lo tanto, comprender la base molecular del cáncer de mama triple negativo es crucial para el desarrollo efectivo de nuevas terapias contra estos tipos de cáncer de mama, como resultado, se han realizado muchos estudios sobre agentes potencialmente activos para este tipo particular de cáncer de mama utilizando la línea celular MDA-MB-231.

1.2.3 Línea celular HCC 1937

La línea celular HCC1937 (Hamon Cancer Center), se estableció a partir de un tumor de cáncer de mama primario ductal infiltrante de grado III de una paciente de 24 años de edad con una mutación de línea germinal BRCA1. Estas células tumorales crecen como una monocapa adherente y presentan vacuolas (Tomlinson et al., 1998).

Esta línea celular se describe como triple marcador negativo, adicionalmente esta línea celular presenta una mutación adquirida de TP53 con pérdida de alelo de tipo salvaje, una eliminación homocigótica adquirida del gen PTEN y pérdida de heterocigosidad en múltiples loci que se sabe están implicados en la patogénesis del cáncer de mama (ATCC®CRL-2336™, 1997)

2. Obesidad y cáncer

La obesidad se define como la acumulación de grasa anormal o excesiva en el organismo. Ha recibido considerable atención mundial como un grave problema de salud en los últimos años. El desequilibrio entre la ingesta energética y el gasto energético se considera la principal causa de sobrepeso y obesidad. La obesidad se

asocia con una elevada incidencia de enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y también puede ser un importante factor de riesgo para el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.

Existen distintos mecanismos por los que la obesidad se ha relacionado con el cáncer, entre ellos se encuentran el favorecimiento de la inflamación y angiogénesis mediante la liberación de algunas moléculas por los adipocitos como el factor de crecimiento de la placenta, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), angiopoyetina-2, angiostatina, endostatina, trombospondina (TSP-1), resistina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos y leptina (Casanello, Krause, Castro-Rodríguez, & Uauy, 2016; Román, 2016).

El mayor riesgo de recurrencia y mortalidad en pacientes con obesidad y cáncer de mama podría estar relacionado con una menor eficacia de los tratamientos contra el cáncer, esto probablemente debido a las variaciones plasmáticas de los niveles de adipocinas, ya que las mujeres con cáncer de mama y obesidad son menos sensibles a la quimioterapia y presentan tasas de mortalidad más altas (Bougaret et al., 2018).

3. Leptina

La leptina es una hormona polipeptídica de 16 KDa, con 167 aminoácidos en su estructura, codificada en el cromosoma 7q31, que ha sido vinculada con la regulación de la masa corporal. El tejido adiposo blanco es el sitio principal de secreción de leptina, aunque también puede ser secretada por otros tejidos como la grasa interescapular, la placenta, los ovarios, el endometrio, el estómago, el hipotálamo, la pituitaria y las células cancerosas (Ghasemi, Saeidi, Azimi-nejad, & Hashemy, 2019; Román, 2016).

En condiciones fisiológicas normales la leptina mantiene la homeostasis energética al influir en la vía anorexígena central, ya que alcanza el hipotálamo a través de la barrera hematoencefálica y actúa para reducir la ingesta de alimentos y aumentar el metabolismo. Los efectos clásicos de la leptina incluyen la disminución del apetito, el aumento del gasto de energía y la regulación de la homeostasis de la glucosa, independientemente de la implicación de la insulina, además la concentración sérica de leptina se correlaciona con el contenido de grasa corporal (Pan et al., 2018; Ray & Cleary, 2017).

El nivel de leptina en suero sanguíneo se encuentra alrededor de los 10 ng/mL en personas con un IMC normal y puede aumentar hasta 100 ng/mL en personas con

obesidad. Algunas condiciones adicionales que pueden afectar los niveles de leptina son afecciones físicas, fisiológicas, químicas, neurológicas y genéticas, como la alteración en la masa corporal, balance energético, estado nutricional, tabaquismo, ejercicio y niveles séricos de moléculas como insulina, glucocorticoides, estrógenos y testosterona isoproterenol, agonistas del receptor adrenérgico β , factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina (IL) -1 (Ghasemi et al., 2019)

3.1 Receptores de leptina

La leptina ejerce sus efectos biológicos mediante su interacción con los receptores de leptina (ObR) expresados en el cerebro, así como en los tejidos periféricos. Los ObR, pertenecen a la familia de receptores de citoquinas de clase I, se han encontrado en seis isoformas (ObRa – ObRf), que presentan un dominio de unión al ligando extracelular idéntico y difieren en su dominio intracelular (Ghasemi et al., 2019; Santillán Benitez, Ordóñez Quiroz, Mendieta Zerón, & Oliván Gómez, 2012)

La isoforma ObRe, conocida como la isoforma soluble del receptor de leptina no presenta la capacidad de activar vías de señalización, pero se ha determinado que su función principal es controlar los niveles de leptina en suero.

El dominio extracelular de 4 de las isoformas cortas (ObRa, ObRc, ObRd y ObRf) es idéntico, el cual presenta de 816 a 956 aminoácidos, mientras que para el ObRb es de 1165 aminoácidos. Las isoformas cortas se caracterizan por presentar un dominio intracelular formado por un número pequeño de aminoácidos que comprende entre 32 y 40, mientras que en el ObRb la región intracelular es de 306 aminoácidos, lo que le permite activar vías de señalización en el citoplasma mediante el anclaje de proteínas JAK-2 (J. G. Santillán-Benítez, Quiroz-Ordóñez & Oliván, 2015)(Santillán Benitez et al., 2012)

El ObRb, también conocido en humanos como la isoforma larga del receptor de leptina, posee una región intracelular lo suficientemente grande para activar vías de señalización en el citoplasma por lo que se considera es la única isoforma capaz de activar vías de señalización y por lo tanto ejercer acción biológica (Santillán Benitez et al., 2012; Vadillo Buenfil, Vela Ojeda, Galindo Rodríguez, & Salazar Exaire, 2005).

La leptina induce la actividad de distintas vías de señalización, que incluyen la vía canónica y las vías de señalización no canónicas como PKC, JNK y cinasa MAP p38. Estas vías de señalización participan en los efectos estimulantes de la leptina en las características del desarrollo del cáncer, incluida la proliferación celular, la apoptosis,

la migración e invasión celular, la angiogénesis y la estimulación vascular (Ghasemi et al., 2019).

3.2 Leptina y cáncer de mama

La hiperleptinemia es un factor que representa un riesgo mayor a padecer o empeorar el estado del cáncer de mama, ya que la leptina es capaz de regular y activar varias vías de señalización y oncogenes que se encuentran altamente relacionados con dicho padecimiento (Sadim et al., 2017).

Dentro de estas vías de señalización de la vía canónica activadas por la leptina se encuentran: JAK2-STAT3, proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y fosfatidilinositol 3-cinasa / proteína cinasa B (PI3K / AKT) (Giordano et al., 2016).

Se ha identificado que la leptina es capaz de inducir la proliferación de las células cancerosas de mama, pero no lo hace con las células normales de mama, lo cual es indicativo de que la leptina participa de manera directa en el desarrollo del cáncer de mama (Madej et al., 2016).

Los niveles de leptina son correlacionados positivamente con un aumento en la mortalidad del cáncer de mama (Reddy et al., 2013).

Se ha determinado que la presencia de niveles elevados de leptina en sangre conlleva a incrementar la incidencia de tumores metastásicos de cáncer de mama, lo que desencadena un peor pronóstico, mayor índice de reincidencia y de mortalidad, ya que la leptina favorece la proliferación del cáncer de mama al activar distintas funciones celulares como la vía de la ciclina D1 y Cdk2, evitando la apoptosis y favoreciendo los procesos angiogénicos que se encargan de suministrar nutrientes al tumor y con ello su mantenimiento (Samia, Mohamed, & Marwa, 2016).

En un reciente estudio se determinó que la leptina es capaz de inducir a las células a producir aductos carcinógenos de quinona-DNA: N3-adenina y N7-guanina. Esta formación de aductos se debe principalmente a que la leptina actúa incrementando los niveles de CYP1B1, el cual está relacionado con los procesos de metabolismo del estrógeno y favorece la producción de quinonas, además de que la leptina disminuye los niveles de enzimas como la catecol-O-metil transferasa (COMT) y la NADPH quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), que se encargan del proceso de detoxificación de quinonas en el organismo y conllevan a la formación de aductos carcinógenos en el DNA (Samia et al., 2016).

Se ha demostrado que la leptina actúa como mitógeno en las células neoplásicas de cáncer de mama y de otros orígenes. En las células neoplásicas la leptina activa la vía de señalización JAK2/STAT3, la cual termina con la activación de genes como lo son: c-myc (codifica para una proteína MYC que participa en la regulación de la apoptosis alterando el ciclo celular en la fase S), cyclin D1 (forma complejos con CDK4 y CDK6 lo que aumenta al factor E2F en la células permitiendo el paso de fase G1 a S), p21 waf1 (induce resistencia a la apoptosis), c-jun (activa genes que promueven el crecimiento), jun B (genera defectos en la regulación de la mitosis celular), erg-1 (activa factores de crecimiento y angiogénesis) y bcl-2 (inhibe la apoptosis), los cuales están fuertemente involucrados en el crecimiento y proliferación celular (Santillán Benitez et al., 2012; Simone et al., 2016).

Un mecanismo adicional por el que la leptina influye en el cáncer de mama es por la producción de la interleucina 18 (IL-18) mediante la acción de la vía PI3K-AKT/ATF-2, promoviendo metástasis e invasión del tumor. La IL-18 y la acción de los macrófagos asociados a tumor estimulados por acción de la leptina, son indispensables para la invasión y migración de las células de cáncer de mama (Simone et al., 2016).

Existen también algunas condiciones genéticas que pueden influir en la acción de la leptina sobre el cáncer de mama, que pueden conducir a favorecer al desarrollo de cáncer de mama o al caso contrario disminuir el factor de riesgo, ya que por ejemplo el polimorfismo en el SNP rs1045895 presente en el gen del receptor de leptina está asociado con una disminución en el riesgo a padecer cáncer de mama, mientras que el SNP rs7799039 presente en el gen de la leptina, conduce a un riesgo incrementado de padecer cáncer de mama y una vez presentado promueve un mayor tamaño del tumor (Li et al., 2016).

Otro de los mecanismos genéticos asociados con el incremento de leptina en el organismo es la expresión del gen obASC, el cual está estrechamente relacionado con el nivel de leptina en las pacientes con cáncer de mama, ya que genera una sobreexpresión de sus niveles plasmáticos. La expresión de este gen incrementa además la proliferación, migración e invasión del receptor de estrógeno positivo. Se sugiere que la inhibición de la leptina secretada por el gen obASCs puede resultar en la reducción del volumen tumoral y la metástasis a órganos distantes, reduciendo la carga de la obesidad asociada a los cánceres de mama (Strong et al., 2015).

4. Tamoxifeno

El tamoxifeno (2-[4-[(Z)-1,2-di(fenil)but-1-enil]fenoxy]-N,N-dimetiletanamina) (Figura 1) es un modulador selectivo del receptor de estrógenos que pertenece a la familia de los inhibidores de aromatasas, utilizado comúnmente durante las dos últimas décadas para el tratamiento y prevención del cáncer de mama, teniendo una eficacia demostrada en la reducción del riesgo de cáncer de mama del 50 %. Actúa como antiestrogénico en tejido mamario interfiriendo con la actividad de los estrógenos, hormonas que promueven el crecimiento de las células cancerosas en la mama. Debido a su efecto agonista parcial, el tamoxifeno ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y óseo. Su uso durante 5 años en dosis de 20 mg/día es la administración considerada estándar (Fernández-Santander et al., 2007).

4.1 Mecanismo de acción del tamoxifeno

El tamoxifeno al ser un fármaco antiestrógeno, actúa uniéndose con el receptor de estrógeno compitiendo con los estrógenos y anulando los efectos biológicos de estas moléculas (Fernández-Santander et al., 2007).

El complejo tamoxifeno-receptor de estrógeno interacciona con el DNA nuclear y bloquea la acción de los estrógenos inhibiendo la producción de factores de crecimiento. Este mecanismo de acción, puede ser la consecuencia de la incapacidad del complejo receptor antiestrogénico de activar la transcripción del DNA ligando dependiente (Strong et al., 2015).

La administración de tamoxifeno, impide el desarrollo de tumores implantados y previene el desarrollo de tumores inducidos, se considera que su acción es citostática y no citocida. Cuando se adiciona tamoxifeno a cultivos celulares, se produce un bloqueo en el paso de la fase G1 del ciclo celular por inhibición de la proteína cinasa C, lo que se prevé puede ser la causa de la disminución de la proliferación celular (Fernández-Santander et al., 2007).

4.2 Tamoxifeno y leptina

En un estudio reciente se observó que la terapia combinada que involucra el bloqueo del receptor de leptina y el tratamiento con tamoxifeno podría inhibir la proliferación y promover la apoptosis en células de cáncer de mama, lo que sugiere que la supresión de leptina podría ser un nuevo medio de eludir la resistencia al tratamiento antiestrogénico en el cáncer de mama (Dubois et al., 2014; Qian et al., 2015).

La leptina induce la expresión del gen de la aromatasa, elevando su actividad y aumentando la síntesis de estrógenos. También se ha demostrado que la leptina mejora la transcripción dependiente del receptor de estrógeno α , lo cual favorece una mayor expresión de dicho receptor y con la producción *in situ* de estrógenos, potenciar la proliferación de las células cancerosas, e interferir directamente con la acción del tamoxifeno, ya que ambas moléculas tienen como sitio diana al receptor de estrógeno (Yom et al., 2013) .

La leptina se ha caracterizado como un factor de crecimiento para el cáncer de mama y también ha promovido la resistencia al tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama durante el tratamiento endocrino. A pesar de ello, los mecanismos moleculares subyacentes a la conversación cruzada entre la leptina y el tamoxifeno todavía no están claros (Jardé et al., 2009).

Uno de los padecimientos que presenta un elevado índice de prevalencia en la sociedad actual es el cáncer de mama; una patología que se desencadena debido a múltiples factores genéticos que conllevan a una proliferación descontrolada de las células que componen a la glándula mamaria.

Con base a distintos estudios analizados se ha observado que en la terapia con tamoxifeno a pacientes con cáncer de mama, se desarrolla resistencia cuando existe una elevada expresión de los receptores de leptina, lo que afecta su capacidad para reducir el nivel de proliferación de células de cáncer de mama. Mediante el empleo de las líneas celulares MDA-MB 231, MCF-7 y HCC1937 se analizó el efecto que produce la leptina y el tamoxifeno sobre la expresión génica de receptores de leptina, ya que se ha comprobado que la leptina es una hormona que presenta actividad proliferativa, mitogénica, antiapoptótica y proinflamatoria, lo que contribuye al desarrollo de algunos tipos de cáncer.

Estos análisis se ven enfocados a identificar las posibles conexiones existentes entre la leptina, el tamoxifeno, y la expresión génica de los receptores de leptina, lo que permitiría abrir el panorama que se tiene para relacionar los posibles efectos que presenta una sobreexpresión de estos receptores en la resistencia al tratamiento de cáncer de mama con este fármaco, administrado en pacientes con receptor de estrógenos positivo. El estudio también consiste en analizar el efecto de la leptina y el tamoxifeno en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231 y HCC1937), las cuáles no presentan los receptores de estrógeno y progesterona.

Hipótesis

La exposición de cultivos de líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB 231, MCF-7 y HCC1937) a estándares de leptina incrementará la expresión génica de los receptores de leptina.

El aumento de leptina y de la expresión de sus receptores inhibirá el efecto citostático del tamoxifeno, lo que permitirá la proliferación de las células cancerosas.

Objetivo general

Identificar la expresión génica de receptores de leptina y la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB 231, MCF-7 y HCC1937) expuestas a distintos estándares de leptina y tamoxifeno.

Objetivos específicos

Establecer las condiciones óptimas para realizar los cultivos de las distintas líneas celulares de cáncer de mama.

Realizar los ensayos de proliferación celular de cada línea celular y exponer a los estándares de leptina y de tamoxifeno.

Evaluar la proliferación celular de las distintas líneas celulares tras ser expuestas a la leptina, tamoxifeno y en combinación.

Identificar la expresión de receptores de leptina en las líneas celulares después de la exposición a la leptina y tamoxifeno.

Se llevó a cabo un estudio correlacional donde se analizó el efecto de distintas concentraciones de leptina y tamoxifeno sobre la expresión génica de receptores de leptina y la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer de mamá. Para esto se llevaron a cabo las siguientes actividades:

1. Cultivo celular

La proliferación celular se realizó en cajas para cultivo de las líneas celulares: MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Las células se incubaron a 37 grados Celsius en una atmosfera al 5% de CO₂, enriqueciendo el medio de cultivo (RPMI Medium 1640, Gibco® Thermo Fisher Scientific™; Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Caisson Labs, USA) al 10% de Suero Fetal Bovino inactivado con calor (Fetal Bovine Serum, certified, US origin, Gibco® Thermo Fisher Scientific™, USA) y 1% de penicilina-estreptomicina. Adicionalmente, para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231, se enriqueció el medio de cultivo con una concentración 2 mM de piruvato y para la línea HCC 1937 se utilizó una concentración 2 mM de glutamina. El medio de cultivo se cambió cada tercer día.

1.1 Expansión de las líneas celulares

Cuando la confluencia de las células es superior al 80 %, se debe realizar el pasaje de las células a dos cajas nuevas para continuar con el cultivo celular. Este procedimiento se realizó mediante los siguientes pasos:

Retirar el medio de cultivo. Lavar dos veces la placa con 3 mL de PBS (pH: 7.4). Agregar 3 mL de tripsina (Preparada en PBS, 0.5% tripsina, 0.2% EDTA). Incubar 3 minutos. Agregar 3 mL de medio de cultivo. Centrifugar a 800 x g durante 3 minutos. Retirar el sobrenadante. Agregar 10 mL de medio de cultivo y resuspender el botón celular. Colocar 5 mL en cada caja de cultivo p60 e incubar.

1.2 Preservación de las líneas celulares

Retirar el medio de cultivo. Lavar dos veces la placa con 3 mL de PBS (pH: 7.4). Agregar 3 mL de tripsina. Incubar 3 minutos. Agregar 3 mL de medio de cultivo. Centrifugar a 800 x g durante 3 minutos. Retirar el sobrenadante. Agregar 1 mL de medio de cultivo y resuspender el botón celular. Colocar en un crio-vial 1 mL de suspensión celular. Adicionar 100 µL de suero fetal bovino y 100 µL de DMSO. Congelar a -70 grados Celsius.

2. Extracción de RNA de líneas celulares

Se llevó a cabo la extracción de RNA de las líneas celulares: MDA-MB 231, MCF 7 y HCC1937, previo a la exposición a leptina y tamoxifeno, utilizando el reactivo TRIzol, mediante la siguiente metodología:

Lavar la caja de cultivo con PBS (3 mL) por duplicado, dejando 500 μ L de PBS. Retirar las células mecánicamente con la espátula. Colocar la suspensión celular en un tubo Eppendorf y centrifugar 10 segundos. En simultáneo, en la caja de cultivo se colocó 1 mL de reactivo TRIzol, se dejó actuar 1 minuto. Al tubo Eppendorf con la suspensión celular se le retiró el sobrenadante y agregó el mL de reactivo TRIzol, previamente colocado en la caja de cultivo. Llevar al vórtex hasta homogeneizar. Congelar a -70 grados Celsius.

Separación de fase: Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL de reactivo TRIzol utilizado. Agitar el tubo vigorosamente durante 15 segundos. Incubar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar la muestra a 12,000 x g durante 15 minutos, a 4 grados Celsius. La mezcla se separa en una fase de fenol-cloroformo de color rojo en la parte inferior, una interfase y una fase acuosa superior incolora. El RNA permanece en la fase acuosa. Retirar la fase acuosa de la muestra, cuidando de no tocar la interfase. La fase fenol-cloroformo contiene DNA y proteínas.

Aislamiento: Agregar 0.5 mL de isopropanol al 100% a la fase acuosa, por cada mL de reactivo TRIzol. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugar a 12,000 x g durante 10 minutos a 4 grados Celsius. Observar la formación de un pellet en el fondo del tubo

Lavado: Retirar el sobrenadante del tubo dejando sólo el sedimento de RNA. Agregar al pellet 1 mL de etanol al 75%, por cada mL de reactivo TRIzol usado. Dejar secar el pellet.

2.1 Cuantificación de RNA de líneas celulares:

Una vez extraído el RNA de cada una de las líneas celulares, previo a su exposición a leptina y tamoxifeno, se cuantificó en un nanofotómetro (IMPLEN), utilizando el factor de dilución LID 50 y 1 μ L de muestra.

3. Síntesis de cDNA:

Se llevó a cabo la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de 2µg de mRNA extraído de cada línea celular, previo a la exposición a leptina y tamoxifeno, por medio de la reacción de transcriptasa reversa, de acuerdo al protocolo de uso del kit High Capacity RNA to cDNA (Thermo Fisher Scientific) emulando las condiciones que se muestran en la Tabla 1.

Se incubó la reacción a 37 grados Celsius durante 60 minutos. Se detuvo la reacción calentando a 95 grados Celsius durante 5 minutos y posteriormente se enfrió a 4 grados Celsius para su preservación.

4. Determinación IC₅₀ del tamoxifeno

Se llevó a cabo la proliferación celular de 5,000 células de MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 (n=3) en placas de 96 pozos durante 48 horas. Posteriormente cada 24 horas durante 48 horas se lavaron las células con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco (suplementado al 10% de SFB). Se colocaron las siguientes concentraciones de tamoxifeno: 0.002 µM, 0.02 µM, 0.2 µM, 2 µM, 20 µM y 200 µM.

Al término de las 48 horas de estímulo se fijaron las células con glutaraldehído (Glutardialdehyd 25% Lösung in Wasser, Merck Germany) al 1.1% durante 15 minutos y se adicionó PBS. Las células fijadas se tiñeron con Cristal Violeta durante 15 minutos, se lavó la placa con agua y se adicionó a cada pozo ácido acético al 10%.

La placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de emisión de 630 nm en un lector de micro-placas (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology Inc.). Posteriormente se analizaron los resultados de absorbancia obtenidos en cada pocillo, se obtuvo el porcentaje de crecimiento celular y se determinó mediante una curva dosis respuesta la IC₅₀ de tamoxifeno para cada línea celular.

5. Ensayo de proliferación

Se llevó a cabo la proliferación celular de 5,000 células de MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 (n=3) en placas de 96 pozos durante 24h y 48h. Posteriormente cada 24h durante 72h se lavaron las células con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco (suplementado al 5% de SFB) con estímulo de leptina (10ng/mL, 100ng/mL y 200 ng/mL). Adicionalmente se realizó otro ensayo empleando dichas concentraciones de leptina más un estándar correspondiente con la IC₅₀ de tamoxifeno obtenida experimentalmente para cada una de las líneas celulares y otro únicamente con el estándar de tamoxifeno. La disminución del SFB se realizó para disminuir los factores de crecimiento que pudieran interferir con la acción de la leptina (Recom Hu Leptin

Active, Sino Biological, Thermo Fisher Scientific™, USA) y el tamoxifeno (Sigma-Aldrich Co. LLC) (Jardé et al., 2009).

Cada 24h posterior al estímulo se fijaron las células con glutaraldehído (Glutardialdehyd 25% Lösung in Wasser, Merck Germany) al 1.1% durante 15 minutos y se adicionó PBS. Al término de las 96h de estímulo las células fijadas se tiñeron con Cristal Violeta durante 15 minutos, se lavó la placa con agua y se adicionó a cada pozo ácido acético al 10%.

La placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de emisión de 630 nm en un lector de micro-placas (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology Inc.). Se analizaron los resultados de absorbancia obtenidos en cada pocillo, se obtuvo el porcentaje de crecimiento celular y se realizaron gráficas que nos permitieron deducir el efecto producido por la leptina y el tamoxifeno en la proliferación celular de las distintas líneas celulares de cáncer de mama.

6. Análisis de micro-ensayos

La regulación de la expresión génica de los receptores de Leptina, se evaluó por medio de adición de leptina y tamoxifeno en las líneas celulares, mediante la siguiente metodología propuesta por Jardé y colaboradores (Jardé et al., 2009), con algunas modificaciones.

Se sembraron 20,000 células de MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 (n=3) en placas de 24 pozos durante 48 horas. Después de 24 horas, 48 horas y 72 horas se lavaron las células con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco (suplementado al 5% de SFB) con estímulo de leptina (10 ng/mL, 100 ng/mL y 200 ng/mL), otro ensayo con las mismas concentraciones de leptina más un estándar de tamoxifeno y otro ensayo empleando únicamente el estándar de tamoxifeno. Al término del estímulo se retiró el medio de cultivo y se adicionó 750 μ L de TRIzol® Reagent para llevar a cabo la extracción de mRNA de acuerdo al protocolo de uso (Ambion™).

Una vez obtenido el mRNA se llevó a cabo la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de 2 μ g de mRNA por medio de la reacción de transcriptasa reversa de acuerdo al protocolo de uso (High Capacity RNA-to-cDNA kit, Applied Biosystems) obteniendo 20 μ L de cDNA. El cDNA de los controles de cada línea celular se utilizó para determinar por RT-PCR (HotStarTaq DNA Polymerase, QIAGEN, Alemania), la presencia de mRNA de ObRb (Fw: 5'-GATAGAGGCCAGGCAT TTTTTA-3', Rv: 5'-ACACCACTCTCTCTTTTTGATTGA-3'), ObRt, (Fw: 5'-CATTT

TATCCCCATTGAGAAGTA-3', Rv: 5'-CTGAAAATTAAGTCCTTGTGCCCA-3'), ER (Fw: 5'-GTGTACAACCTACCCCGAGGGC-3', Rv: 5'-AAACCCCCCAGGCCGTTG GAG-3') y aromatasa (Fw: 5'-CAAGGTTATTTTGATGCATGG-3', Rv: 5'-AATCCTT GACAGACTTCTCAT-3'), usando como control el gen 18-s (Fw: 5'-GTCTGTGATGCCCTTAGATG-3', Rv: 5'-AGCTTATGACCCGCACTTAC-3'). El proceso de la RT-PCR se llevó a cabo según las condiciones establecidas en la Figura 2 y Tabla 2.

Así mismo el cDNA obtenido a partir de los estímulos se utilizó para realizar la determinación de la expresión génica de los receptores de leptina por PCR en tiempo real (TaqMan Universal Mix II, with UNG) utilizando sondas TaqMan® (Gene Expression Assays, Applied Biosystems) para ObR (Hs00174497_m1) y como gen control el 18s (Hs03003631_g1) siguiendo las instrucciones del termociclador LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics).

El programa que se utilizó para realizar la RT-PCR será a 50 grados Celsius por 2 minutos, 95 grados Celsius por 10 minutos y 40 ciclos a 95 grados Celsius por 15 segundos y 60 grados Celsius por 1 minuto. Para la determinación del grado de expresión genética de los receptores de leptina se utilizó el método de cuantificación relativa de Pfaffl, basado en la comparación del CT de un gen constitutivo 18s contra el gen problema tomando el valor de sus diferencias contra la línea control para cada muestra (se realizó por duplicado) (Pfaffl, 2004).

7. ELISA

Se realizó utilizando el kit para receptor de leptina humano (Human Leptin receptor ELISA Kit. DEIA8050 Creative Diagnostics) con el siguiente protocolo: Colocar 100 µL de la muestra diluida en solución buffer a la placa prerrecubierta con anticuerpo anti-receptor de leptina humano, incubar una hora, vaciar la placa y eliminar el líquido residual. Agregar 300 µL de solución de bloqueo a cada pocillo. Incubar durante 15 minutos, vaciar la placa y eliminar el líquido residual.

Agregar 100 µL de solución de anticuerpo anti-receptor de leptina humano biotinilado a cada pocillo. Incubar una hora a temperatura ambiente, vaciar la placa y eliminar el líquido residual. Llenar cada pozo con solución de lavado, vaciar la placa y eliminar el líquido residual. Repetir de 3 a 5 veces. Incubar 5 minutos con solución de lavado; eliminar el líquido residual.

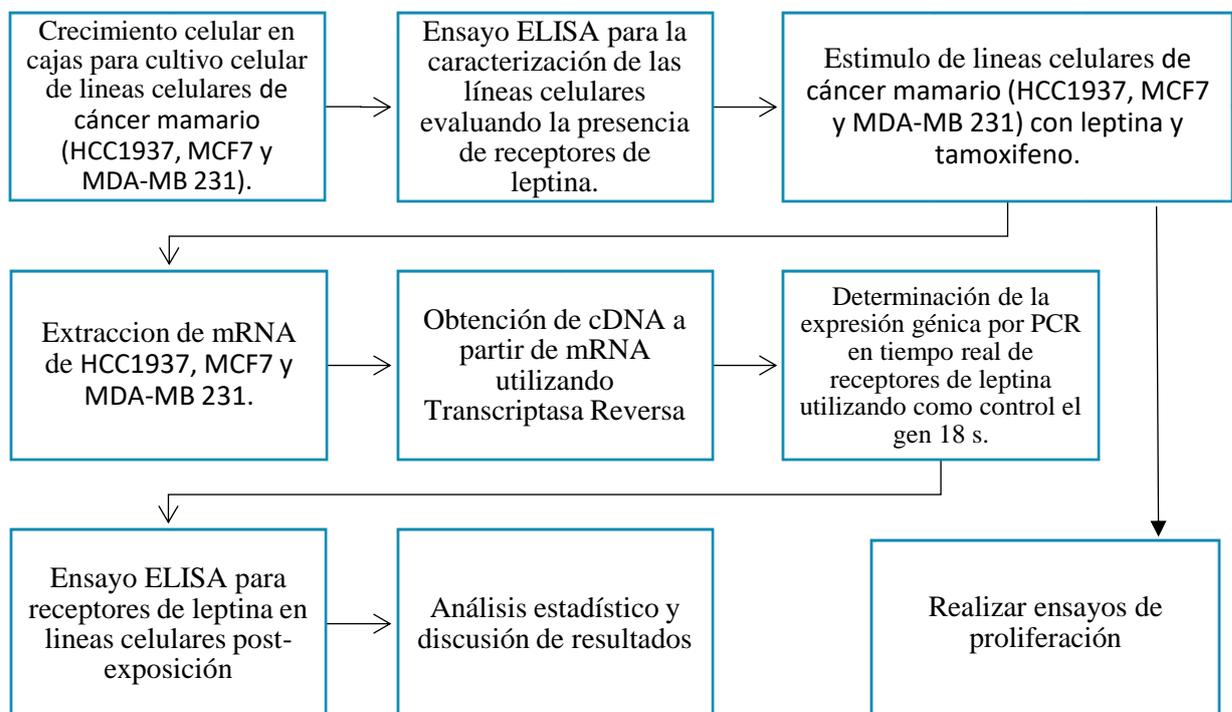
Colocar 100 μ L de complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) a cada pocillo, vaciar la placa. Agregar 100 μ L de agente de revelado de color TMB, vaciar la placa. Agregar 100 μ L de solución de paro TMB a cada pocillo. Leer la placa con el lector de microplacas (Stat Fax 2100 Microplate Reader, Awareness Technology Inc.) a una longitud de onda de 450 nm. Se realizó una curva estándar de concentraciones conocidas de receptor de leptina (proteína) y se interpolaron las absorbancias obtenidas en cada pocillo, para obtener la concentración de receptor en cada prueba.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizará utilizando ANOVA para las curvas de crecimiento de cada línea celular. El valor de $P < 0.05$ será considerado como estadísticamente significativo. Se emplearán tablas de contingencia y análisis de correlación.

Para los ensayos de expresión génica se prevee realizar el test de normalidad usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, se realizará la prueba t de Student para las variables paramétricas y la prueba U de Mann-Whitney para las variables no paramétricas con un valor $p > 0.05$ para cada una.

Diagrama de flujo del estudio de receptores de leptina en líneas celulares



Resultados

1. Cultivo celular

Se llevó a cabo la proliferación celular en cajas para cultivo (p60) de las líneas celulares: MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937, obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC).

Las células se incubaron con las condiciones establecidas en la metodología y resumidas en la Tabla 3. y su morfología. Las características morfológicas de las líneas celulares se compararon con las otorgadas por la ATCC (Figura 3) comprobándose que correspondían a las especificaciones de cada una. Para acondicionar las líneas celulares se empleó el medio RPMI 1640 como se recomienda según las indicaciones de la ATCC, así mismo se realizó una suplementación con glutamina o piruvato según los requerimientos especiales de cada línea celular.

El uso de suero fetal bovino se empleó para aportar nutrientes esenciales y factores de crecimiento útiles para el mantenimiento y crecimiento celular, así mismo se empleó el antibiótico penicilina-estreptomicina.

Con estas suplementaciones se obtuvieron los mejores resultados en el mantenimiento y proliferación de las líneas celulares, obteniéndose las necesarias para los distintos ensayos a realizar.

2. Cuantificación de RNA de líneas celulares:

Los resultados obtenidos de la cuantificación de RNA de cada línea celular mediante el nanofotómetro INPLEN son los que se muestran en la Tabla 4.

La relación A260/A280 se descarta contaminación con proteínas, mientras que la relación A260/A230 descarta contaminación con compuestos aromáticos empleados durante la extracción. Para garantizar buena pureza del RNA extraído la relación A260/A280 y A260/A230 debe ser mayor a 1.8.

3. Cuantificación de primers

Se realizó la cuantificación de cada uno de los primers solicitados (Integrated DNA Technologies) y se determinó su molaridad para la estandarización de la PCR, arrojando los resultados mostrados en la Tabla 5.

Se determinó la temperatura de alineamiento (T_m) para cada primer, los resultados se pueden observar en la Tabla 6. Esto se realizó utilizando la herramienta OligoAnalyzer 3.1, desarrollada por Integrated DNA Technologies bajo las condiciones mostradas en la Tabla 7.

4. Caracterización de receptores en líneas celulares por RT-PCR

En las figuras 4 y 5 se observan las bandas electroforéticas obtenidas mediante RT-PCR para cada uno de los genes de interés que nos permitieron caracterizar las

distintas líneas celulares y corroborar sus características de expresión de algunos receptores (Tabla 8).

La línea celular MDA MB 231 fue positiva para la expresión a mRNA del receptor de leptina homólogo para las seis distintas isoformas, y para el gen control 18s, por otra parte fue negativa para la isoforma larga del receptor de leptina, para el receptor de estrógeno y para el gen de aromatasa.

La línea celular MCF 7 fue positiva para la expresión de mRNA de los cinco genes probados.

La línea celular HCC 1937 fue positiva para la expresión de mRNA de ambos genes del receptor de leptina y el gen control 18s, mientras que fue negativa para la expresión del receptor de estrógeno y el gen de aromatasa.

5. Determinación de IC50 de tamoxifeno en las líneas celulares

Se analizaron los resultados de absorbancia obtenidos en cada pocillo, se obtuvo el porcentaje de crecimiento celular y se determinó mediante una curva dosis respuesta la IC50 de tamoxifeno para cada línea celular, arrojando los siguientes resultados:

La IC50 de tamoxifeno para la línea celular MDA MB 231 fue de 2.23 μM , (Figura 6) para MCF 7 fue de 10.045 μM (Figura 7) y para la línea HCC1937 fue de 4.579 μM (Figura 8), estos resultados varían en comparación a los expresados en la literatura, ya que al ser un fármaco antiestrogénico solo se ha calculado para la línea MCF 7 donde se reportó una IC50 de 7.09 μM (Center for Molecular Therapeutics, Massachusetts General Hospital Cancer Center, USA), la variación corresponde a las características intrínsecas del cultivo celular empleado, la pureza del tamoxifeno y el método de determinación, no obstante el resultado obtenido el similar al reportado.

6. Efecto de la leptina y tamoxifeno en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama MDA MB 231, MCF 7 y HCC 1937

Se llevó a cabo la proliferación de 5,000 células de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 231 y HCC1937 (n=3) estimulándose dadas las condiciones establecidas en el apartado de ensayos de proliferación, obteniéndose los siguientes resultados:

De manera general en los cultivos de las tres distintas líneas celulares de cáncer de mama se observó un efecto proliferativo positivo, al ser estimuladas con leptina, ya que se observó incrementada la proliferación celular, mientras que al ser estimuladas con tamoxifeno se encontró un efecto antiproliferativo.

En el caso del grupo de células estimuladas posterior a 24 horas de crecimiento (Figura 9) se encontró que para la línea celular MDA MB 231, al ser estimuladas con leptina se produjo un efecto antiproliferativo en las primeras 24 horas de estimulación, ya que la población celular disminuyó un 11.12 % para la concentración de leptina de 10 ng/mL, 21.42 % para 100 ng/mL y 17.85% para 200 ng/mL, en todos los casos sin

significancia estadística (ns), posteriormente a partir de las 48 horas de estimulación se observó el efecto contrario pues la proliferación celular aumento un 20.13% ($p < 0.001$) para 10 ng/mL, 33 % (ns) para 100 ng/mL y 43.41 % ($p < 0.01$) para 200 ng/mL y este mismo efecto se encontró a las 72 horas de estimulación con leptina pues la proliferación celular se vio incrementada en 4.65% ($p < 0.01$) para 10 ng/mL, 21 % ($p < 0.0001$) para 100 ng/mL y 54.3 % ($p < 0.0001$) para 200 ng/mL.

El estímulo con tamoxifeno genera una disminución de la proliferación celular en un 37.9% a las 24 horas, 65.1% a las 48 horas y 67.3% a las 72 horas, en todos los casos sin significancia estadística. La combinación leptina-tamoxifeno genera una disminución de la proliferación celular, pero no tan marcada como lo hace el estímulo únicamente de tamoxifeno, para este caso el mayor efecto se encuentra a las 72 horas donde existió una disminución del 69.9% ($p < 0.0001$) para 10 ng/mL de leptina mas tamoxifeno, 60.6% ($p < 0.0001$) para 100 ng/mL de leptina mas tamoxifeno y 42.3% ($p < 0.0001$) para 200 ng/mL de leptina mas tamoxifeno.

En la línea celular MCF7 no se encontró un efecto estadísticamente significativo en la proliferación celular durante las primeras 24 y 48 horas de estimulación, pero durante las 72 horas posteriores se observó un incremento de 31.17 % ($p < 0.0001$) para 10 ng/mL, 37.9 % ($p < 0.0001$) para 100 ng/mL y 44.3 % ($p < 0.0001$) para 200 ng/mL. En cuanto a la estimulación con tamoxifeno el efecto antiproliferativo fue más marcado en comparación con las otras dos líneas celulares, alcanzándose una disminución de hasta el 76.12% (ns) en la proliferación celular, la combinación leptina y tamoxifeno tuvo un efecto antiproliferativo, pero en menor proporción comparado con el efecto del estímulo únicamente de tamoxifeno, en este caso no se encontró significancia estadística.

En la línea celular HCC 1937 se observó un efecto proliferativo al ser estimuladas con leptina desde las 24 horas de crecimiento, presentando el mayor crecimiento a las 72 horas de estimulación alcanzando un aumento de 27.2 % para 10 ng/mL, 127.22 % para 100 ng/mL y 147.77 % para 200 ng/mL, en todos los casos sin significancia estadística. En esta línea celular el efecto del tamoxifeno fue antiproliferativo, pero no tan marcado, encontrándose una disminución de la proliferación celular del 36.51% sin significancia estadística, en cuanto al estímulo combinado de leptina con tamoxifeno se observa un efecto proliferativo, inhibiendo la acción del tamoxifeno.

Para el grupo de células estimuladas posterior a 48 horas de crecimiento (Figura 10) se encontró que en la línea celular MDA MB 231 el estímulo de leptina en cualquiera de sus concentraciones ocasiona un efecto proliferativo desde las 24 horas de estimulación, alcanzando un aumento de la población celular de 27.18% (ns) para 10 ng/mL, 10.75 % para 100 ng/mL y 21.12 % para 200 ng/mL, en todos los casos sin significancia estadística, este incremento de la proliferación celular se vio aumentado por el tiempo de exposición al estímulo de leptina, a las 48 horas solo se encontró un incremento estadísticamente significativo en el estímulo con leptina a una concentración de 10 ng/mL, alcanzando un aumento de 153.24% ($p < 0.001$), el mayor efecto a las 72 horas, encontrándose un aumento de 166.6% ($p < 0.001$) para 10 ng/mL, 272.22 % ($p < 0.0001$) para 100 ng/mL y 308.33 % ($p < 0.0001$) para 200 ng/mL, con esta concentración se encontró una diferencia en la proliferación celular entre las 24 y 72 horas de estímulo ($p < 0.0001$) y entre las 48 y 72 horas ($p < 0.0001$).

Por otro lado al emplear el tamoxifeno se observó una disminución en la proliferación celular que fue mayor conforme aumentaba el tiempo de estimulación, pero sin significancia estadística, y se percibió que al combinar leptina con tamoxifeno se presenta un incremento en la proliferación, inhibiendo la capacidad del tamoxifeno para disminuirla, pues se encontró a las 72 horas de estimulación que la proliferación celular se incrementó en 241.66 % ($p < 0.0001$) para 10 ng/mL leptina más tamoxifeno, 419.44 % ($p < 0.0001$) para 100 ng/mL leptina más tamoxifeno y 327.778 % ($p < 0.0001$) para 200 ng/mL leptina más tamoxifeno.

En la línea celular MCF7 se observó un aumento de la proliferación celular al ser estimuladas con leptina, sin embargo no se encontró un efecto en la proliferación celular durante las primeras 24 horas de estimulación con leptina, durante las 48 posteriores se encontró un incremento pero sin significancia estadística y a las 72 horas posteriores se observó un incremento de 232.2 % ($p < 0.0001$) para 10 ng/mL, 215 % ($p < 0.0001$) para 100 ng/mL y 210 % ($p < 0.0001$) para 200 ng/mL.

En esta línea celular es más evidente la acción del tamoxifeno, el cual redujo la población celular en los tres tiempos de estimulación pero sin significancia estadística, posteriormente se puede observar que cuando se administra tamoxifeno en combinación con leptina, la proliferación celular es mayor que con el grupo únicamente expuesto a tamoxifeno en el estímulo a 72 horas ya que la proliferación se incrementa un 43.88 % (ns).

En la línea celular HCC 1937 se observa un incremento de la proliferación celular al ser estimuladas con leptina, alcanzando un máximo efecto a las 24 horas de estimulación con un incremento de 71.74% para 10 ng/mL, 57.302 % para 100 ng/mL y 70.31 % para 200 ng/mL en comparación al control, a partir de las 48 horas se observa una decremento de la proliferación.

En esta línea celular el tamoxifeno disminuye la proliferación alcanzando el máximo efecto a las 72 horas donde se encontró una disminución del 66.7% (ns). Se puede apreciar el mismo efecto que las dos líneas celulares anteriores, donde al combinarse leptina con tamoxifeno, la proliferación celular es mayor que donde solo se estimula con tamoxifeno. En esta línea celular no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de estimulación.

7. Expresión relativa del receptor de leptina en líneas celulares de cáncer de mama MDA MB 231, MCF 7 y HCC 1937 expuestas a leptina y tamoxifeno.

La expresión de mRNA del receptor de leptina (ObRb) se determinó en las distintas líneas celulares que se estimularon con leptina a concentraciones diferentes (0 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/ml y 200 ng/ml), con tamoxifeno (IC50 determinada para cada línea celular) y en combinación leptina en sus distintas concentraciones con tamoxifeno, mediante qRT-PCR, empleando la sonda Taqman ObR (Hs00174497_m1) y como gen control el 18s (Hs99999901_s1), obteniéndose la expresión relativa del ObRb, como se muestra en las Figuras 11 y 12.

En la línea celular MCF-7 (Tabla 9), la expresión del ObRb tuvo un aumento del 71.86% (10 ng/mL) en las células tratadas con leptina con respecto al control, no obstante se observa una disminución de la expresión del ObRb del 56% para el estímulo de 100 ng/mL de leptina ($P < 0.001$). Para el estímulo de tamoxifeno se

observa un aumento del 37.2% en la expresión del gen, con respecto al control, mientras que para los estímulos de combinación de leptina con tamoxifeno se identificó una disminución de la expresión del gen.

En la línea celular HCC 1937 (Tabla 10) se identificó una disminución de la expresión relativa del ObRb todos los casos, notándose que conforme se incrementa la concentración del estímulo de leptina es mayor dicho efecto, alcanzándose la máxima disminución con el estímulo de 200 ng/mL de leptina que redujo un 68 % la expresión relativa de ObRb, pero sin significancia estadística ($P= 0.0763$) ..

8. Cuantificación proteica de ObR por ELISA

Se llevó a cabo la determinación y cuantificación de la proteína del receptor de leptina en el sobrenadante de cada uno de los cultivos estimulados mediante la técnica de ELISA. Para realizar en el ensayo se utilizó el kit comercial: Human Leptin receptor ELISA Kit. DEIA8050 Creative Diagnostics, obteniéndose los resultados mostrados a continuación, donde cabe aclarar que a pesar de observarse modificaciones en la concentración de la proteína del receptor, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. La curva estándar (Figura 12) así como los resultados de cada medición se realizaron por triplicado.

En la línea celular MDA MB 231 (Figura 13) se encontró una mayor concentración de la proteína del ObR en todos los grupos de células estimuladas en comparación con el control, alcanzando la mayor concentración en los estímulos que incluyen 100 ng/mL de leptina y 100 ng/mL de leptina más tamoxifeno, con una concentración de 147.3 pg/mL.

En la línea celular MCF 7 (Figura 14) se encontró una mayor expresión de la proteína del ObR en todos los casos donde se agregó estímulo, sin embargo es de gran interés que el estímulo que presentó una mayor concentración de la proteína fue en el que se agregó únicamente el tamoxifeno obteniéndose una concentración de 407.7 pg/mL, mientras que en los ensayos que incluyen leptina se encuentra algo similar a la línea MDA MB 231 ya que los estímulos que generaron una mayor una expresión de la proteína fueron los de 100 ng/mL de leptina y 100 ng/mL de leptina más tamoxifeno, con concentraciones de 183.1 pg/mL y 215.3 pg/mL respectivamente.

En la línea celular HCC 1937 (Figura 15) se encontró una mayor expresión de la proteína ObR en los estímulos correspondientes a 200 ng/mL de leptina más tamoxifeno y solo tamoxifeno, donde se alcanzó la concentración de 385.7 pg/mL y 397.5 pg/mL respectivamente. Un comportamiento distinto se identificó en el estímulo que corresponde a 200 ng/mL de leptina ya que se observó una disminución en la expresión de la proteína ObR, encontrándose una concentración de 110.1 pg/mL lo que es menor a la concentración identificada en el control que fue de 225.3 pg/mL

Discusión de resultados

La leptina es una proteína de 16 kDa sintetizada principalmente por los adipocitos, que mantiene la homeostasis energética al influir en la vía anorexigénica central, sin embargo, en la obesidad, el incremento de los niveles de leptina en el organismo participa en distintos procesos fisiopatológicos. La leptina actúa a través de receptores transmembranales (ObR), que incluyen 6 isoformas empalmadas alternativamente, considerándose a la isoforma larga del receptor de leptina (ObRb) como la más importante para los efectos de regulación de la actividad biológica de la leptina (Ray & Cleary, 2017).

La determinación de la expresión de mRNA por RT-PCR se realizó para la isoforma larga del receptor de leptina (ObRb), región homóloga para cualquiera de las seis distintas isoformas del receptor de leptina (ObRt), receptor de estrógeno (ER), aromatasa (CYP19A1) y el gen 18s en las tres líneas celulares de cáncer de mama, como parte de la caracterización previa a la estimulación con leptina y tamoxifeno se determinó que en la línea celular MCF7 se expresa el mRNA de los cinco genes de interés, lo cual es consistente con la descripción de esta línea celular, ya que como característica de identificación expresa el receptor de estrógeno y por ende se encuentra la presencia de CYP19A1, una enzima que participa en la biosíntesis de estrógenos, del mismo modo se encontró la presencia de mRNA del receptor de leptina, tanto en la forma homóloga para cualquiera de las seis distintas isoformas del receptor, como para la isoforma larga (ObRb), la cual es de interés ya que se considera como la isoforma que presenta mayor actividad y capacidad de activar vías de señalización como JAK2/STAT3 debido a los residuos intracitoplasmáticos que presenta (J. G. Santillán-Benítez, Á. Quiroz-Ordóñezb & Olivánb, 2015)

En la línea celular MCF7 se identificó el máximo aumento de la proliferación de las células cancerosas al ser estimuladas con leptina durante 72 horas, posterior a un crecimiento previo a estimulación de 48 horas, alcanzando un incremento de la proliferación del 232.22% para 10 ng/mL, 315 % para 100 ng/mL y 310 % para 200 ng/mL, lo que indica que la leptina genera un incremento en la proliferación de esta línea celular y que después de los 100 ng/mL ya no se encuentra un incremento significativo, el incremento de la proliferación celular corresponde con las características reportadas acerca de la activación de las vías de señalización de la leptina, las cuales contribuyen a la progresión del cáncer a través de múltiples mecanismos, ya que se sabe que la leptina activa diversas cascadas de señalización, como las vías JAK / STAT, MAPK y PI3 quinasa / AKT, la mayoría de las cuales están implicadas en la diferenciación y proliferación de células cancerosas. Además de que se ha demostrado que el tratamiento con leptina suprime la apoptosis y acelera la progresión del ciclo celular a través de la inducción de los genes relacionados con el mismo (Raut et al., 2017).

En esta línea celular se observa un mayor efecto anti proliferativo del tamoxifeno en comparación con las otras líneas celulares (MDA MB 231 y HCC 1937), alcanzando una disminución del 76.12% en la proliferación celular, esto debido a que el tamoxifeno es un fármaco antiestrógeno que actúa uniéndose con el receptor de estrógeno compitiendo con los estrógenos y anulando los efectos biológicos de estas

moléculas, el complejo tamoxifeno-receptor de estrógeno interacciona con el DNA nuclear y bloquea la acción de los estrógenos inhibiendo la producción de factores de crecimiento, lo cual repercute negativamente en la proliferación celular, ya que las células cancerígenas dependientes de estrógenos lo utilizan como factor de estimulación de proliferación y mantenimiento celular (Fernández-Santander et al., 2007).

Existen otro tipo de líneas celulares que pertenecen al tipo de cáncer de mama triple marcador negativo, el cual es una forma agresiva que se caracteriza por la ausencia de algunos receptores de membrana como el ER, PR y Her-2, lo que conlleva a que presente opciones de tratamiento limitadas. Por lo tanto, para comprender la base molecular de este tipo de cáncer es crucial el análisis del comportamiento *in vitro* de líneas celulares triple marcador negativo, en este estudio se emplearon las líneas MDA MB 231 y HCC 1937.

En la línea celular MDA MB 231 no se encontró la presencia de mRNA del receptor de estrógeno, ni de CYP19A1, esto es consistente con la característica de la línea celular de pertenecer al tipo de cáncer triple marcador negativo, por lo cual carece de la expresión del receptor de estrógeno, progesterona y Her-2. En cuanto a la presencia de mRNA del receptor de leptina, se encontró únicamente para la forma homóloga general del receptor, por lo que no se puede establecer cuál de las seis distintas isoformas del receptor es la que se está expresando en esta línea celular.

En la línea celular HCC 1937, la cual posee una mutación en el gen BRCA1 se encontró la presencia de la expresión de mRNA del receptor de leptina en las dos isoformas analizadas (isoforma larga y homóloga), al igual que en la línea celular MDA MB 231 no se encontró presencia de la expresión del receptor de estrógeno ni de CYP19A1, al ser también una línea celular de cáncer de mama triple marcador negativo.

En las dos líneas de cáncer triple marcador negativo se identificó un incremento en la proliferación celular al ser estimuladas con leptina, lo que sugiere que al igual que en la línea celular MCF 7, la leptina participa activando vías de señalización que le dan mayor capacidad proliferativa a este tipo de células, una de estas vías es la relacionada con Wnt / β -catenina, la cual es clave en el desarrollo de varios tipos de cáncer, ya que la transducción de señales Wnt / β -catenina cumple funciones fundamentales en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células cancerígenas. La activación de la vía de Wnt / β -catenina se enriquece en diferentes tipos de cáncer de mama. En un estudio reciente Liang *et al.*; identificaron resultados similares a los obtenidos en este estudio al encontrar un aumento de la proliferación celular en las líneas MCF 7 y MDA MB 231 al ser estimuladas con leptina y así mismo se identificó un aumento de los niveles de β -catenina (Liang et al., 2018)

En ambas líneas celulares triple marcador negativo se identificó que el tamoxifeno genera un efecto citostático en la proliferación celular, lo cual es interesante ya que el tamoxifeno es un fármaco antiestrogénico y su diana molecular es el receptor de estrógeno, el cual está ausente en estas líneas celulares, estudios recientes han identificado que el tamoxifeno muestra una tasa de respuesta del 10% al 15% en tumores sin expresión de ER, estos hallazgos sugieren que el tamoxifeno tiene ciertas

propiedades anticancerígenas independientes del ER. Uno de estos mecanismos es el que involucra la disminución de la regulación del inhibidor cancerígeno de la proteína fosfatasa 2^a (CIP2A) y p-Akt, lo que se correlaciona con la apoptosis inducida por tamoxifeno en células de cáncer de mama ER-negativo, el posible mecanismo que contempla la interacción entre la leptina y el tamoxifeno en estas líneas celulares se muestra en la Figura 17 (Liu et al., 2014).

En cuanto a la expresión relativa del ObR en las líneas celulares determinadas por qPCR, se encontró que en la línea celular MCF 7 existe un aumento de la expresión del receptor en un 71.86% en comparación con el control para la concentración de 10 ng/mL de leptina, para las concentraciones de 100 y 200 ng/mL la expresión se ve disminuida seguramente por un bloqueo de la expresión debido a la saturación del receptor por acción de la leptina, es importante notar que cuando la línea celular se estimula con tamoxifeno se encuentra también un aumento de la expresión del receptor, esto posiblemente debido a que las células cancerígenas inducen una mayor expresión del receptor de leptina para mantener su viabilidad y proliferación, ya que se ha determinado que las células cancerígenas de mama utilizan las vías de señalización de la leptina como parte fundamental del mantenimiento de su proliferación (Haque et al., 2018)

En la línea celular HCC 1937 se encontró una disminución de la expresión del ObR en todos los casos de estimulación en comparación con el control, esto debido a que al encontrarse una mayor expresión de la proteína del ObR en esta línea celular, la expresión de mRNA se ve disminuida, mientras que para la línea celular MDA MB 231 no se identificó la amplificación del ObR por qPCR, esto debido a que la sonda empleada no amplifica la secuencia deseada en esta línea celular, ya que está enfocada a la detección de ObRb, el cual por RT-PCR si fue determinado en las líneas celulares MCF 7 y HCC1937, pero de igual manera no se detectó en MDA MB 231.

Los niveles de proteína del ObR obtenidos mediante la técnica de ELISA muestran que para las líneas celulares MCF 7 y MDA MB 231 se obtuvo mayor concentración en comparación con el control en todos los estímulos, mientras que en la línea celular HCC 1937 se obtuvo incremento de la concentración de la proteína al ser estimuladas con leptina (10 ng/mL) y con leptina más tamoxifeno en sus distintas concentraciones, en el caso del estímulo de leptina a 100 y 200 ng/mL se obtuvo una menor concentración de la proteína en comparación con el control, lo que permite definir que la expresión de la proteína del ObR se sobre expresa en condiciones fisiológicas normales y no en un aumento marcado de la concentración de leptina . Es importante destacar que en este estudio se determinó que en las tres líneas celulares se observa una mayor concentración de la expresión de la proteína de ObR al ser estimuladas con tamoxifeno, esto corresponde probablemente a la capacidad de las células ER positivo (MCF 7) y triple marcador negativo (HCC 1937 y MDA MB 231) de incrementar la expresión del ObR como mecanismo de supervivencia ante el daño ocasionado por el agente quimioterapéutico (Haque et al., 2018; Zheng et al., 2013).

La presencia del ObR en las tres líneas celulares corresponde a lo reportado en la literatura donde se menciona que el ObR es necesario para el mantenimiento y la renovación de las células cancerosas (Zheng et al., 2013). Es de gran interés la

evidencia encontrada acerca de que cuando se coloca el estímulo de tamoxifeno en combinación con leptina en las tres líneas celulares se observa mayor proliferación celular que cuando se agrega únicamente el tamoxifeno, por lo que se puede definir que probablemente las variaciones plasmáticas de los niveles de leptina en mujeres con cáncer de mama y obesidad participan en generar menor sensibilidad a la quimioterapia y esto conlleva a que se presenten tasas de mortalidad más altas..

Conclusiones:

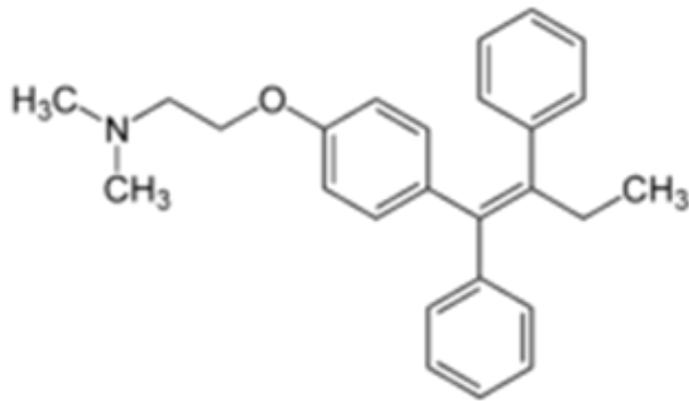
En este estudio se determinó que la leptina favorece la proliferación de las líneas celulares MCF 7, HCC 1937 y MDA MB 231, notándose un efecto tiempo-dosis dependiente; asimismo se determinó que el tamoxifeno es capaz de generar su efecto antiproliferativo en las tres líneas celulares, siendo el efecto más notorio en la línea celular MCF7, la cual es ER positivo.

Se puede observar que la administración de tamoxifeno en las tres líneas celulares favorece una mayor expresión de la proteína del ObR.

A nivel de mRNA no se puede corroborar un mismo comportamiento, ya que se observa una mayor expresión en la línea celular MCF7, mientras que en la línea celular HCC1937 se observa una disminución de la expresión del receptor, esto relacionado con el incremento de la expresión de la proteína y en la línea celular MDA MB 231 no pudo ser determinada la expresión de mRNA del ObR debido a que en esta línea celular no se obtuvo el amplificado por la sonda Taqman.

Se observa que la combinación del estímulo leptina-tamoxifeno genera una disminución de la capacidad antiproliferativa del tamoxifeno, lo que conlleva a proponer que la leptina participa en el mecanismo de resistencia al tratamiento con tamoxifeno, comúnmente observado en pacientes que presentan cáncer de mama y obesidad.

Figura 1: Estructura química del tamoxifeno



Representación de la estructura molecular del tamoxifeno (Fernández-Santander et al., 2007)

Figura 2: Condiciones de RT-PCR

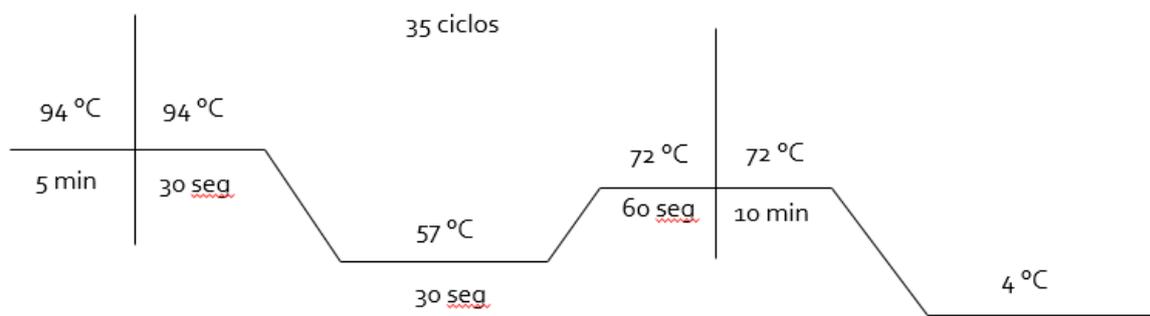
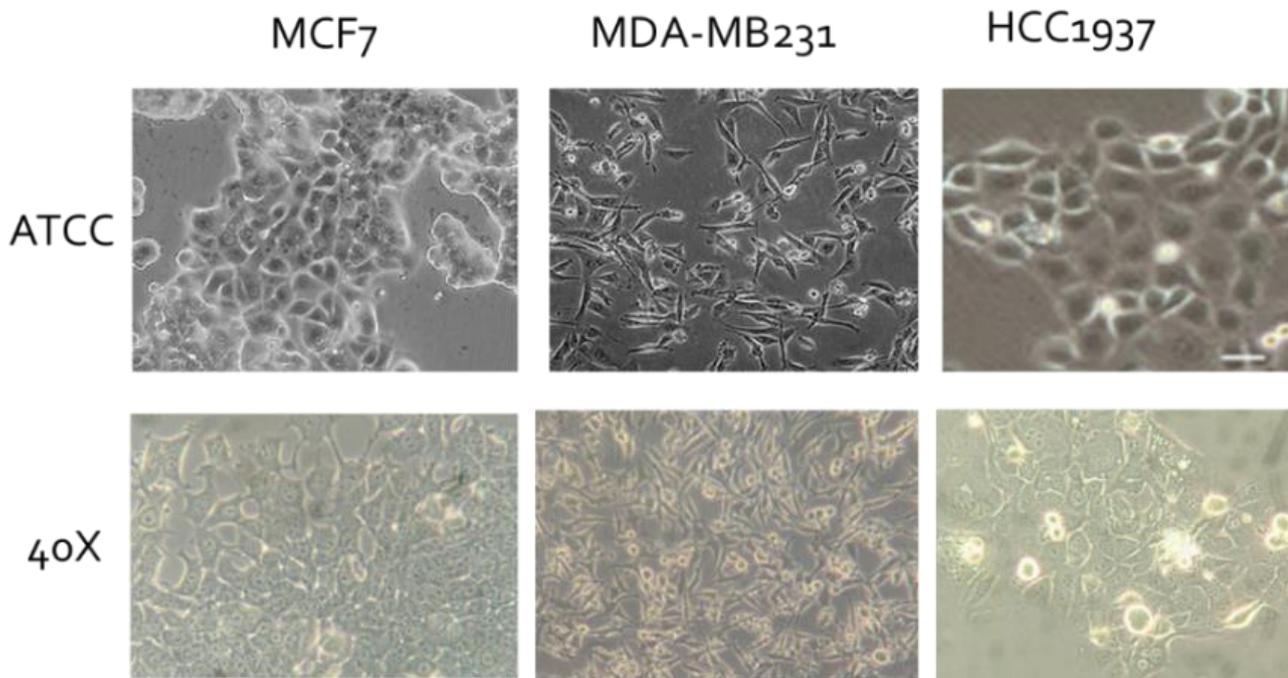


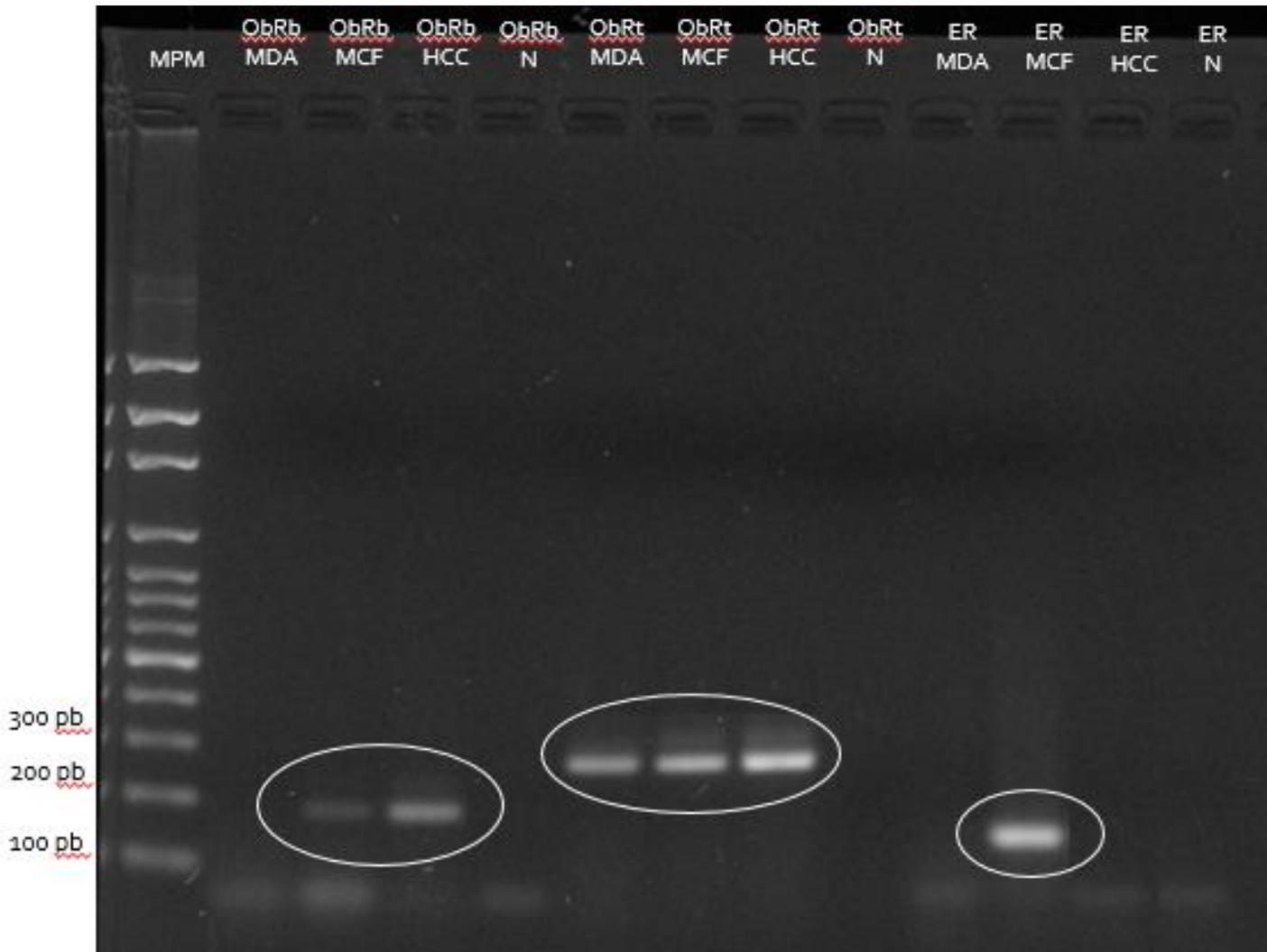
Diagrama que esquematiza las condiciones del termociclador para llevar a cabo la RT-PCR, destacándose la duración y temperatura empleadas en cada ciclo de amplificación

Figura 3: Comparación de la morfología de las líneas celulares (MCF7, MDA MB 231 y HCC1937)



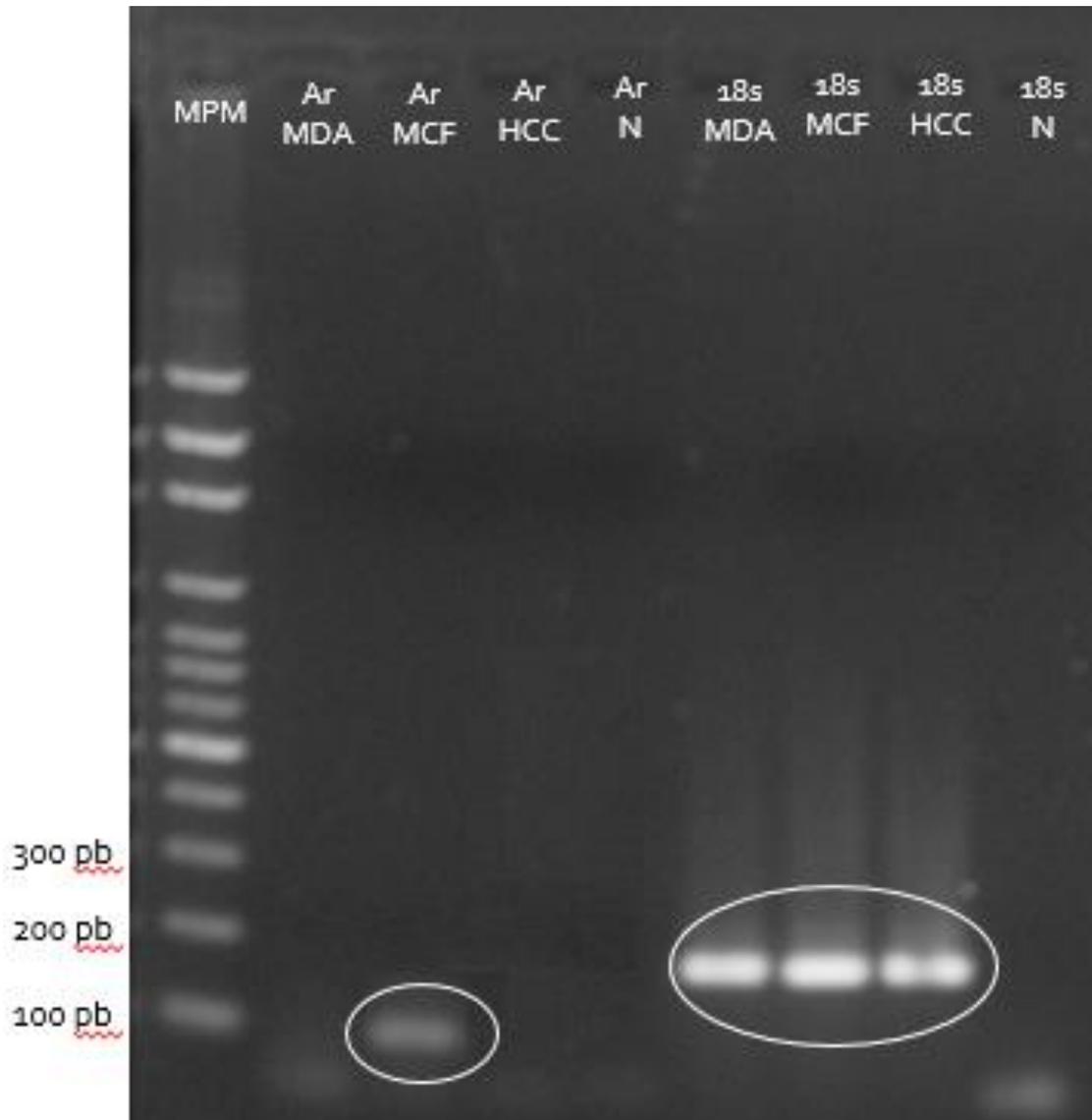
Comparación de la morfología de las líneas celulares (MCF7, MDA MB 231 y HCC1937) entre imágenes obtenidas del ATCC (<https://www.atcc.org>) y fotos propias tomadas en el microscopio a un aumento de 40X, de los cultivos realizados en este proyecto.

Figura 4. Bandas de electroforesis para la identificación de los genes ObRt, ObRb y ER en las tres líneas celulares de cáncer de mama.



Fotografía del gel de electroforesis donde se observan las bandas obtenidas de la reacción por RT-PCR de los genes ObRb, ObRt y ER para cada línea celular, incluyéndose un control negativo. En el elipse blanco se resaltan los resultados positivos ya que se observa la banda correspondiente al tamaño de pares de bases esperado para cada gen a identificar

Figura 5. Bandas de electroforesis para la identificación de los genes CYP19A1 y 18s en las tres líneas celulares de cáncer de mama.



Fotografía del gel de electroforesis donde se observan las bandas obtenidas de la reacción por RT-PCR de los genes CYP19A1 (Ar) y el gen constitutivo 18s, para cada línea celular, incluyéndose un control negativo. En el elipse blanco se resaltan los resultados positivos ya que se observa la banda correspondiente al tamaño de pares de bases esperado para cada gen a identificar.

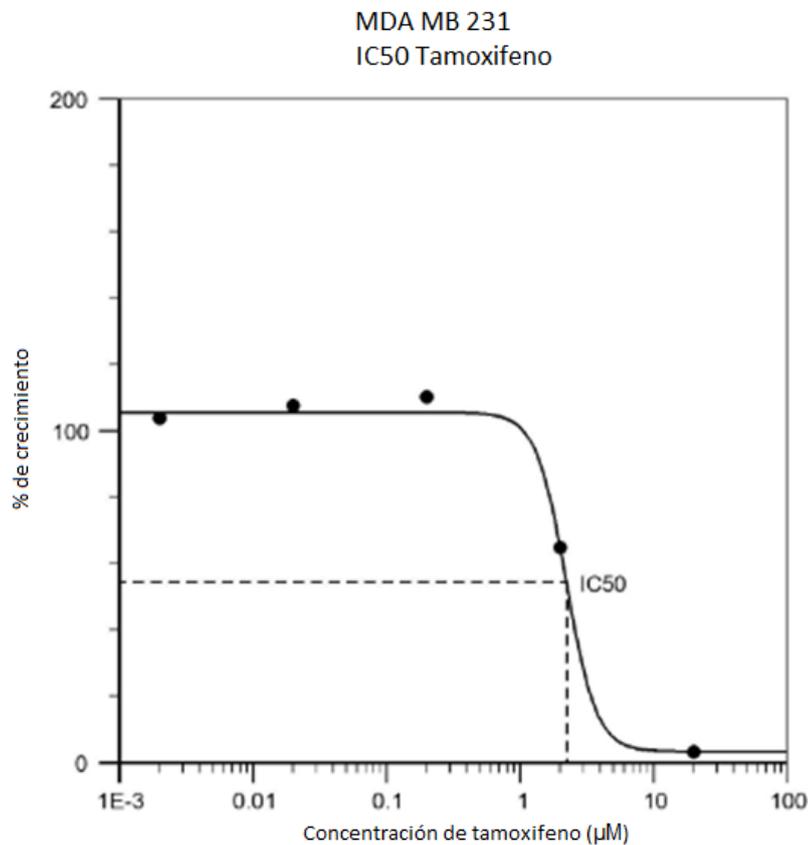
Figura 6: Determinación de la IC50 del tamoxifeno para la línea celular MDA MB 231

MDA MB 231

Concentración (μM)	% de crecimiento
0	100
0.002	103.7950049
0.02	107.5737918
0.2	110.2821927
2	64.87187804
20	3.243593902
200	6.487187804

$IC_{50} = 2.230$

$$y = 3.220 + \frac{(105.415 - 3.220)}{1 + \left(\frac{x}{2.230}\right)^{3.858}}$$



Se muestra la tabla con los resultados del porcentaje de crecimiento para cada estimulación con tamoxifeno en la línea celular MDA MB 231, así mismo se muestra la curva dosis-respuesta, con la interpolación y la ecuación que describe la IC50 del tamoxifeno para esta línea celular

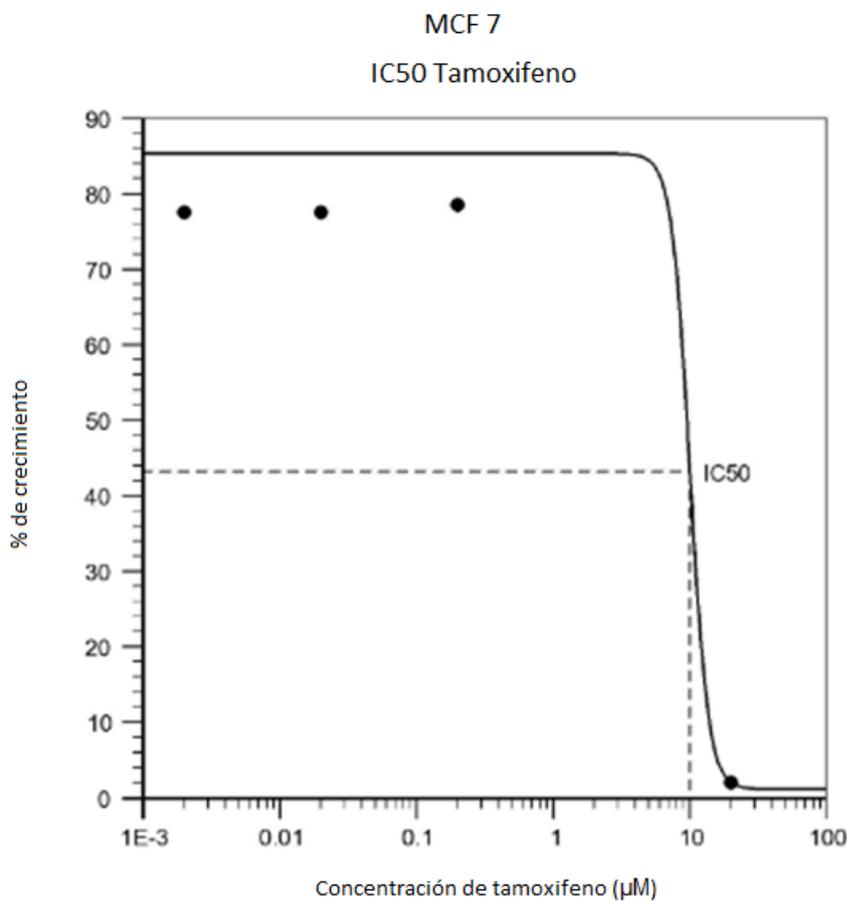
Figura 7: Determinación de la IC50 del tamoxifeno para la línea celular MCF 7

MCF 7

$IC_{50} = 10.045$

Concentración (μM)	% de crecimiento
0	100
0.002	77.55102041
0.02	77.55102041
0.2	78.57142857
2	92.85714286
20	2.040816327
200	3.06122449

$$y = 1.146 + \frac{(85.307 - 1.146)}{1 + \left(\frac{X}{10.045}\right)^{6.541}}$$



Se muestra la tabla con los resultados del porcentaje de crecimiento para cada estimulación con tamoxifeno en la línea celular MCF 7, así mismo se muestra la curva dosis-respuesta, con la interpolación y la ecuación que describe la IC50 del tamoxifeno para esta línea celular

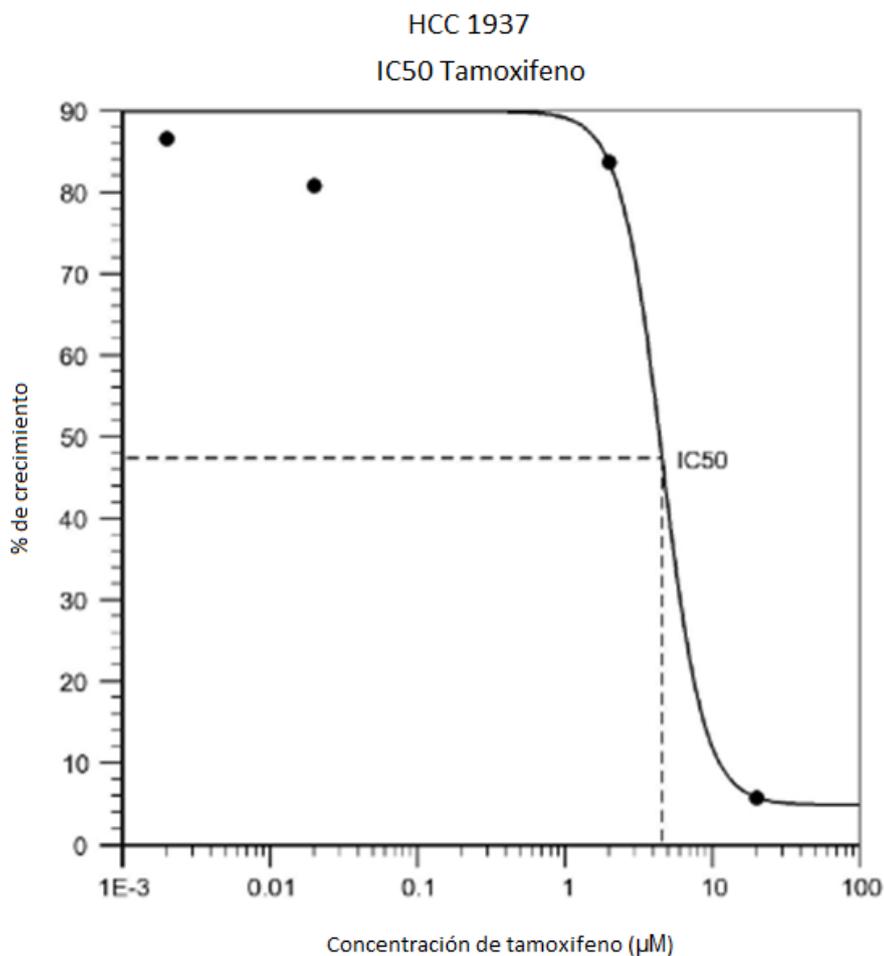
Figura 8: Determinación de la IC50 del tamoxifeno para la línea celular HCC 1937

HCC 1937

IC₅₀ = 4.579

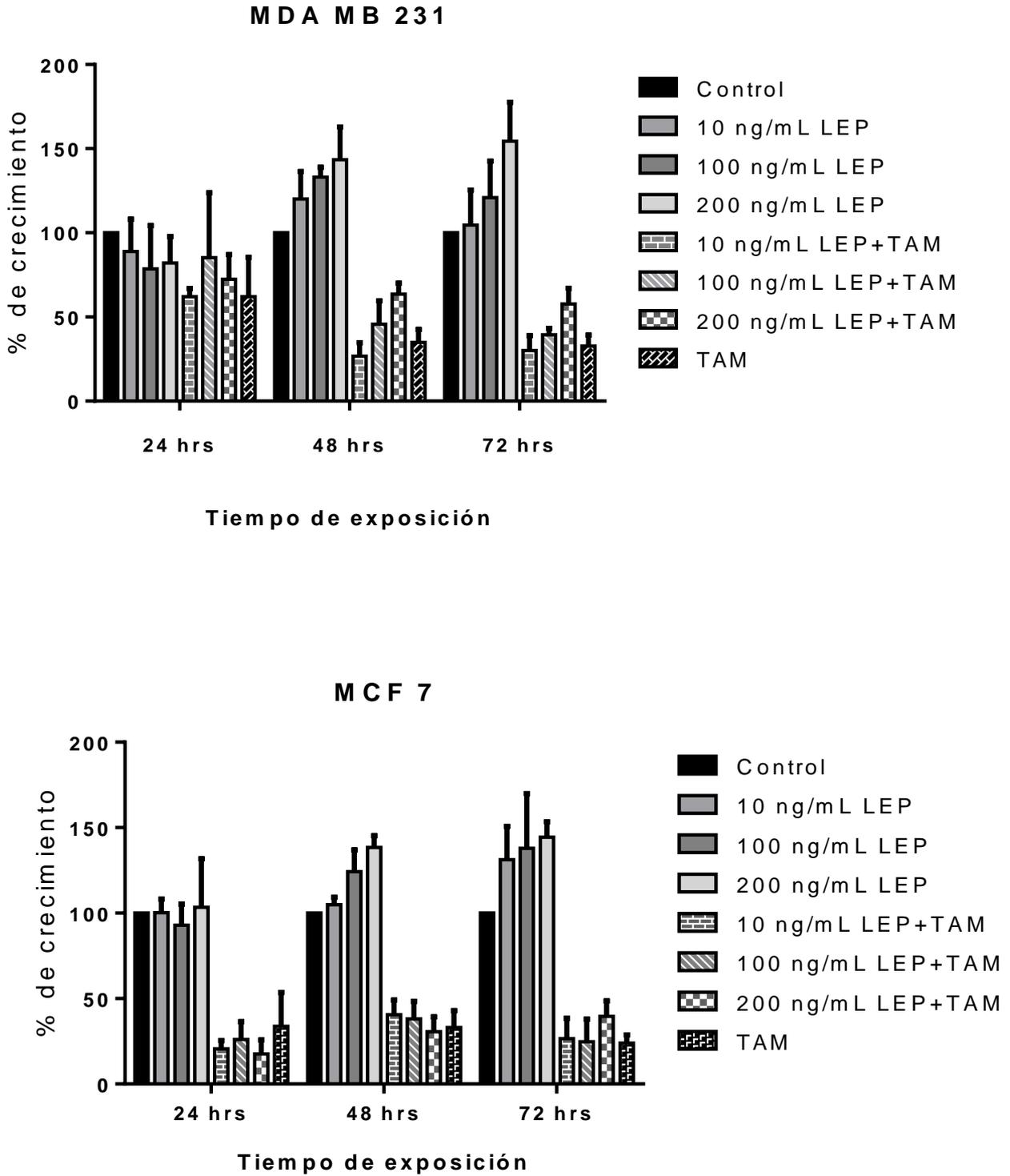
Concentración (μM)	% de crecimiento
0	100
0.002	86.55510675
0.02	80.7847663
0.2	92.3254472
2	83.66993653
20	5.77034045

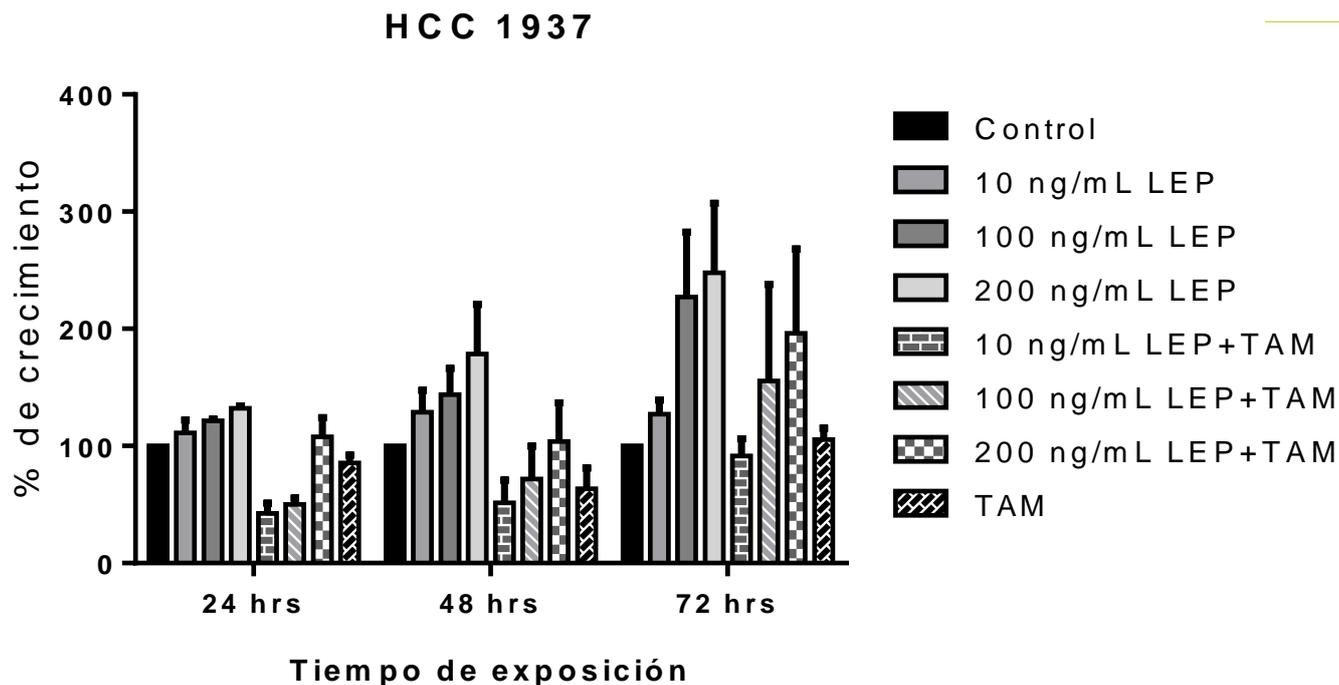
$$y = 4.849 + \frac{(89.916 - 4.849)}{1 + \left(\frac{x}{4.579}\right)^{3.062}}$$



Se muestra la tabla con los resultados del porcentaje de crecimiento para cada estimulación con tamoxifeno en la línea celular HCC 1937, así mismo se muestra la curva dosis-respuesta, con la interpolación y la ecuación que describe la IC50 del tamoxifeno para esta línea celular

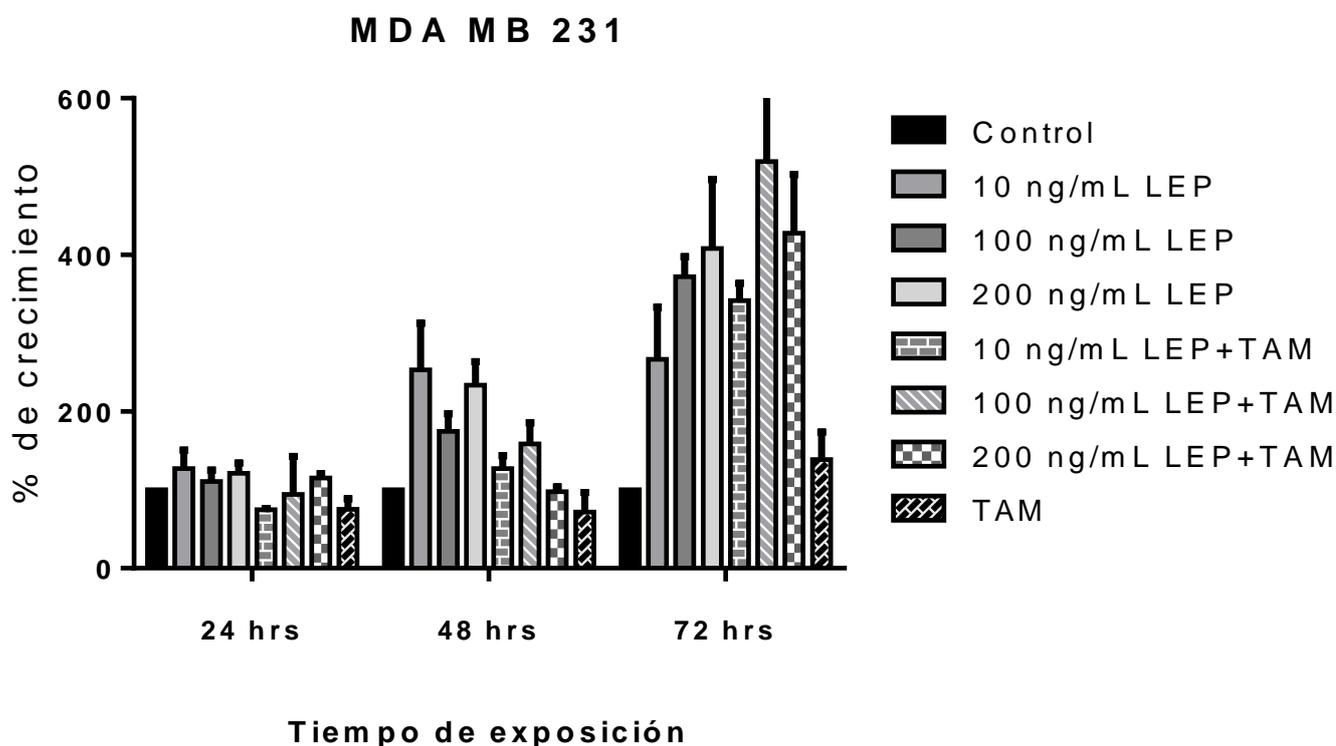
Figura 9: Ensayo de proliferación de líneas celulares con tiempo de crecimiento previo a estimulación de 24 horas.



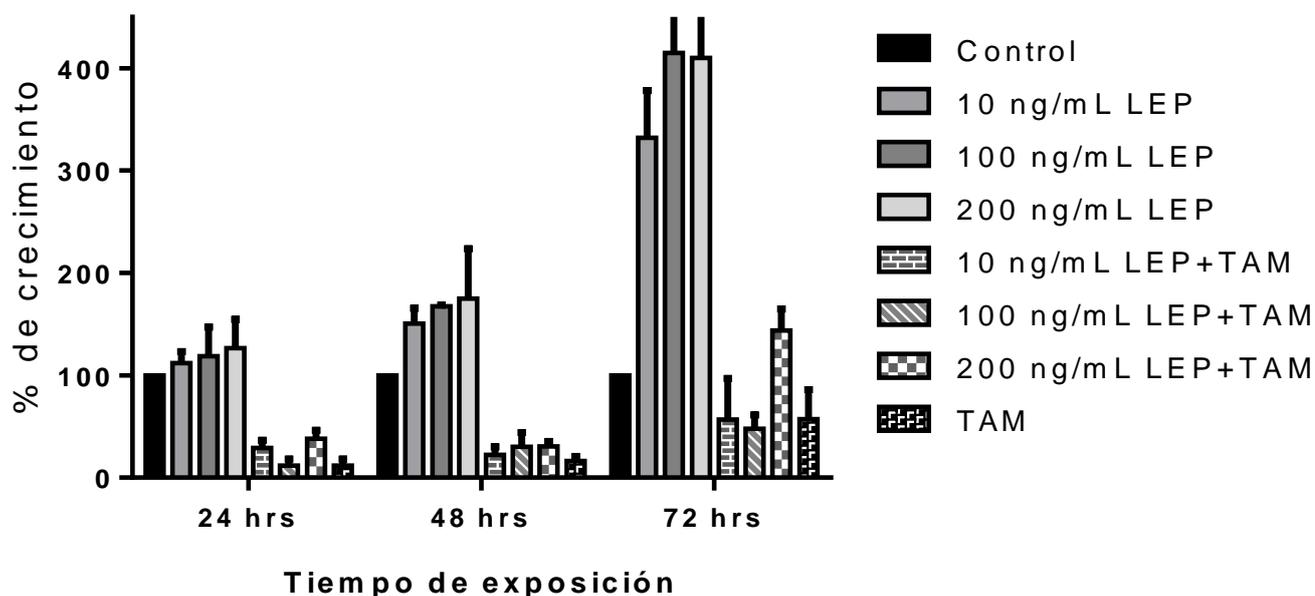


Proliferación de líneas celulares con tiempo de crecimiento previo a estimulación de 24 horas y posterior estímulo con leptina y tamoxifeno durante 24, 48 y 72 horas, donde se puede observar el porcentaje de crecimiento de cada línea celular (n=3), empleando ANOVA de dos vías como herramienta de análisis estadístico.

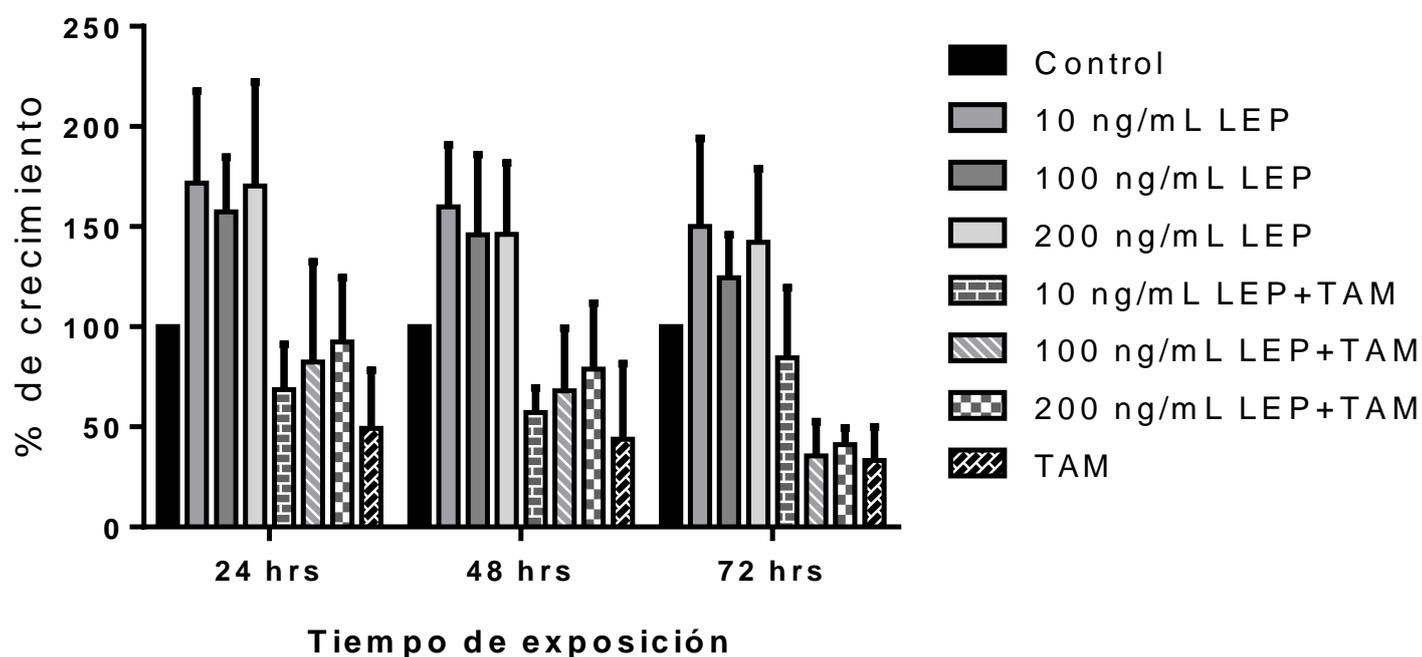
Figura 10: Ensayo de proliferación de líneas celulares con tiempo de crecimiento previo a estimulación de 48 horas



MCF 7



HCC 1937



Proliferación de líneas celulares con tiempo de crecimiento previo a estimulación de 48 horas y posterior estímulo con leptina y tamoxifeno durante 24, 48 y 72 horas, donde se puede observar el porcentaje de crecimiento de cada línea celular ($n=3$), empleando ANOVA de dos vías como herramienta de análisis estadístico.

Figura 11: Expresión relativa de ObR en la línea celular HCC 1937

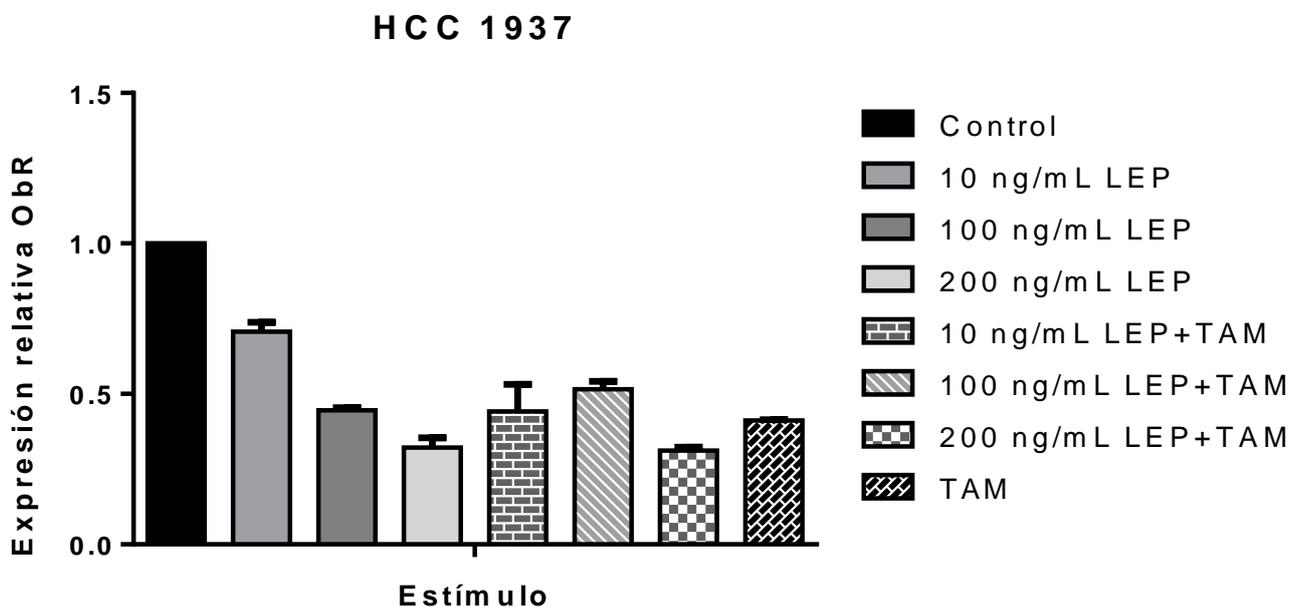


Gráfico que muestra la expresión relativa del ObR en la línea celular HCC 1937, obtenida por qPCR.

Figura 12: Expresión relativa de ObR en la línea celular MCF 7

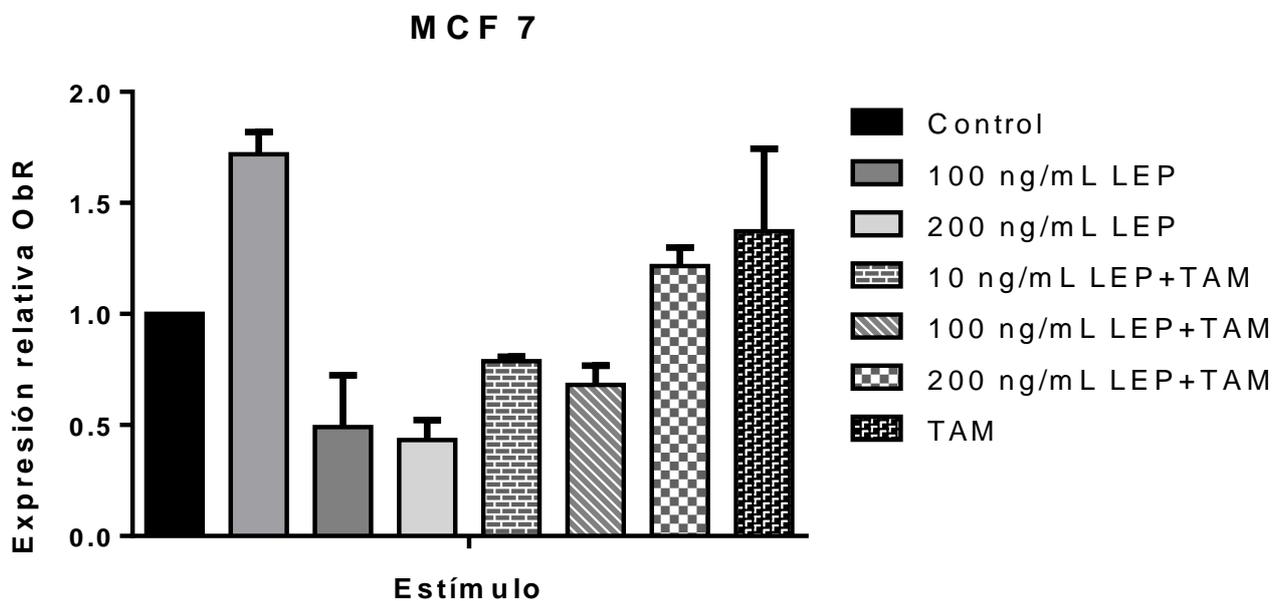


Gráfico que muestra la expresión relativa del ObR en la línea celular MCF 7, obtenida por qPCR

Figura 13: Curva estándar para la calibración de la prueba ELISA para la determinación de ObR

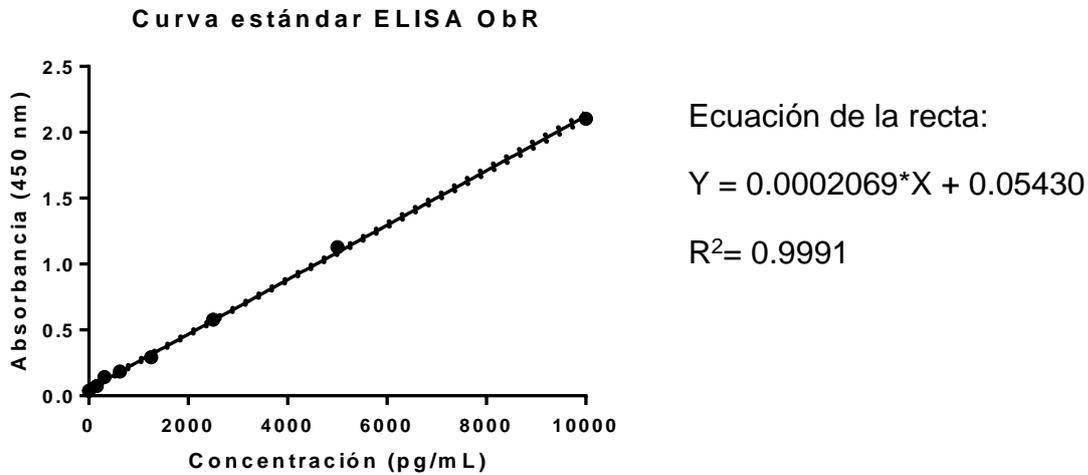


Gráfico de la curva estándar para la determinación de la proteína del ObR mediante la técnica ELISA, las determinaciones se realizaron por triplicado.

Figura 14: Concentración de proteína ObR para la línea celular MDA MB 231

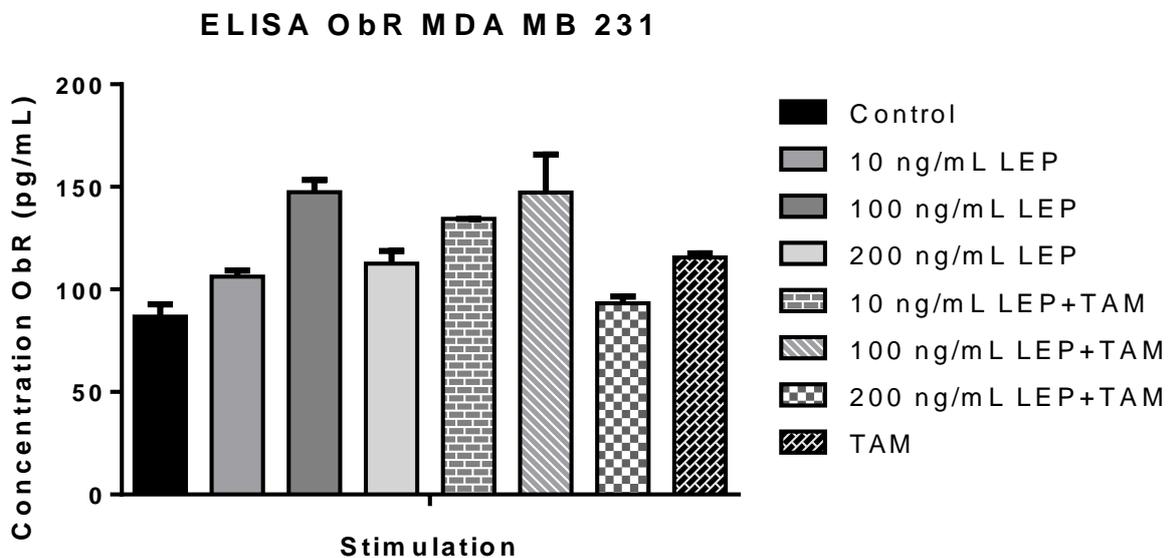


Gráfico que muestra la concentración de la proteína del ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular MDA MB 231 (n=3)

Figura 15: Concentración de proteína ObR para la línea celular MCF 7

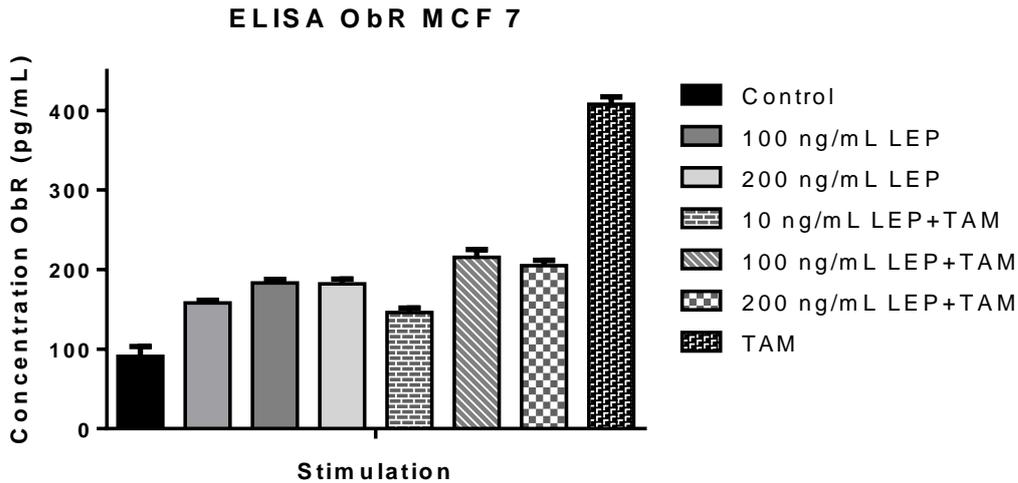


Gráfico que muestra la concentración de la proteína del ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular MCF 7 (n=3)

Figura 16: Concentración de proteína ObR para la línea celular HCC 1937

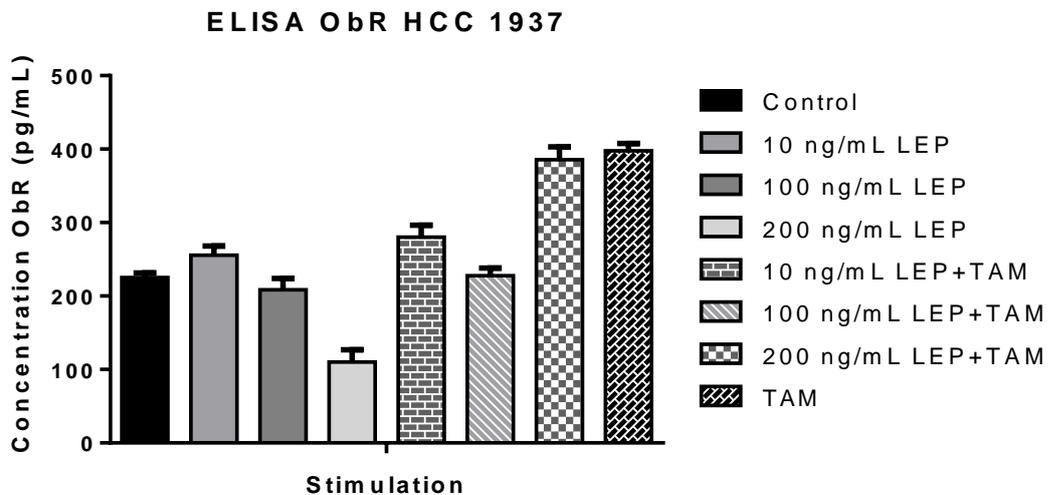
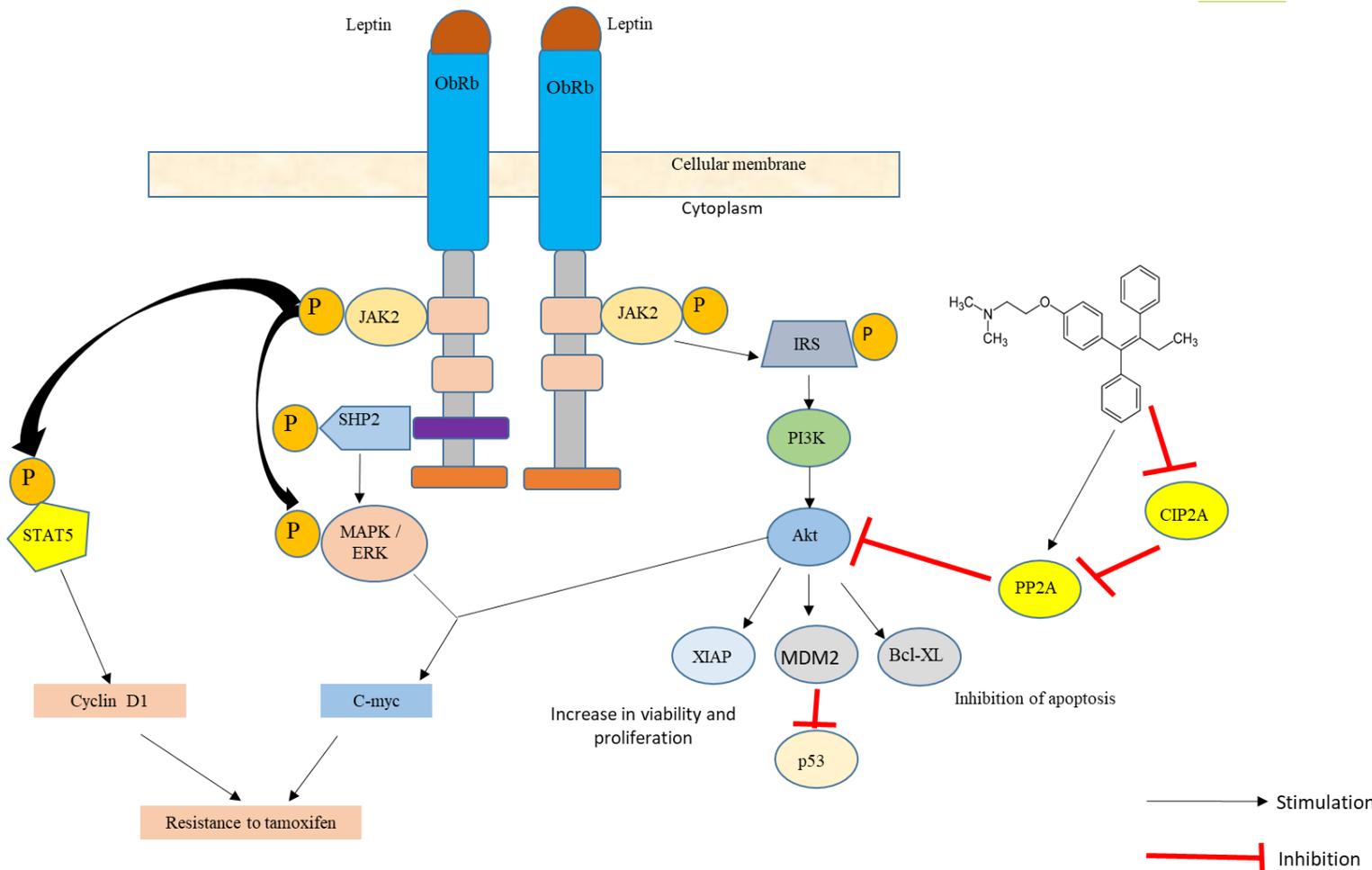


Gráfico que muestra la concentración de la proteína del ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular HCC 1937 (n=3)

Figura 17. Propuesta de mecanismo de resistencia al tamoxifeno en líneas celulares de cáncer de mama triple marcador negativo.



Propuesta de mecanismo de resistencia al tamoxifeno en líneas celulares de cáncer de mama triple marcador negativo. El tamoxifeno puede ejercer acción antiproliferativa sobre las líneas celulares triple marcador negativo al estimular la expresión de PP2A, una proteína supresora de tumor e inhibir la actividad de CIP2A, la cual favorece la proliferación de las células cancerígenas. Existen distintas vías de señalización por las que la leptina podría participar en el desarrollo a resistencia al tratamiento con tamoxifeno, entre ellas JAK2/STAT5, MAPK/ERK, PI3K/AKT y la activación de genes como C-myc, XIAP, MDM2, Bcl-XL, etc. (Liu et al., 2014; Santillán Benitez et al., 2012)

Tablas

Tabla 1: Condiciones de reacción de kit High Capacity RNA to cDNA

Componente	Volumen/reacción (µL)	
	+ RT	-RT
2x RT Buffer	10.0	10.0
20x RT Enzyme mix	1.0	-
Nuclease free H ₂ O	Q.S. 20 µL	Q.S. 20 µL
Muestra (RNA)	9 µL	9 µL
Total	20 µL	20 µL

Tabla 2: Concentraciones de reactivos empleadas para RT-PCR

	[] inicial	[]	1x (µL)
Buffer*	2x	1x	12.5
H ₂ O	-	-	9.5
Oligo Fw	12.5 µM	0.5 µM	1
Oligo Rv	12.5 µM	0.5 µM	1
cDNA	2.5 µg RNA/20µL	-	1

*El Buffer contiene: 50 u/MI Taq DNA polimerasa, 400 Mm de DATP, DGTP, DCTP, DTTP, 3 Mm MgCl₂)

Tabla 3. Condiciones óptimas para el cultivo de líneas celulares de cáncer de mama

Línea celular	Cantidad de medio RPMI 1640	Antibiótico	Suplemento
HCC 1937	5 mL	1% penicilina-estreptomicina	2 mM de glutamina, 10% suero fetal bovino
MCF 7	5 mL	1% penicilina-estreptomicina	2 mM de piruvato, 10% suero fetal bovino
MDA MB 231	5 mL	1% penicilina-estreptomicina	2 mM de piruvato, 10% suero fetal bovino

Tabla 4: Concentración de RNA de líneas celulares

Línea celular	Concentración de RNA (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
MDA MB 231	1113	1.942	2.230
MCF 7	955	1.945	2.148
HCC 1937	676	1.944	2.012

Tabla 5: Concentración final de los primers empleados para RT-PCR

Primer	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	PM (g/mol)	Molaridad (μM)
Fw Ob-Rb	0.747	7078.6	105.5293
Rv Ob-Rb	0.910	7822.1	116.3370
Fw Ob-Rt	0.974	6997.6	139.1905
Rv Ob-Rt	0.979	7641	128.1245
Fw ER	0.987	6416.2	153.8293
Rv ER	1.046	6401.2	163.4068
Fw Ar	1.040	6491.3	160.2144
Rv Ar	1.030	6340.2	162.4554
Fw 18s	1.000	6139	162.8929
Rv 18s	1.003	6037	166.1421

Tabla 6: Tm obtenida para cada primer empleado para RT-PCR

Primers	Tm ($^{\circ}\text{C}$)
Fw Ob-Rb	64.4
Rv Ob-Rb	65.6
Fw Ob-Rt	60.2
Rv Ob-Rt	65.4
Fw ER	67.4
Rv ER	72.2
Fw Ar	59.8
Rv Ar	60.7
Fw 18s	61.5
Rv 18s	63.5

Tabla 7: Parámetros empleados para el cálculo de la Tm de los primers.

Parámetros	
Tipo de objetivo	DNA
Oligo conc.	0.5 μ M
Na ⁺ conc.	50 mM
Mg ⁺⁺ conc.	3 mM
dNTPs conc.	0.4 mM

Parámetros empleados en la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) para el cálculo de la Tm de cada primer

Tabla 8. Caracterización de las líneas celulares para los genes por RT-PCR

Gen	Tamaño de amplicón (pb)	MCF 7	MDA MB 231	HCC 1937
ObRb	186	+	-	+
ObRt	273	+	+	+
ER	140	+	-	-
CYP19A1	100	+	-	-
18s	177	+	+	+

Resultados de la caracterización de las líneas celulares para los genes ObRt, ObRb, ER, CYP19A1 y 18s por RT-PCR

Tabla 9: Cuantificación relativa de ObR en la línea celular HCC 1937

C _T	ObRb	18S	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT
Ctrl 1	30.68	9.3	21.38	-0.03
Ctrl 1.1	30.75	9.32	21.43	0.02

C _T	ObRb	18S	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Expresión Relativa ObR
Ctl			21.41	0.00	1.00000
10 LEP	31.26	9.31	21.95	0.55	0.68539
10 LEP	31.16	9.3	21.86	0.45	0.72951
100 LEP	30.71	8.16	22.55	1.15	0.45219
100 LEP	30.75	8.16	22.59	1.19	0.43982
200 LEP	33.81	10.87	22.94	1.54	0.34508
200 LEP	34.04	10.89	23.15	1.75	0.29833
TAM	31.88	9.19	22.69	1.29	0.41037
TAM	31.95	9.27	22.68	1.28	0.41323
10 LEP TAM	31.82	9.01	22.81	1.41	0.37762
10 LEP TAM	31.57	9.18	22.39	0.98	0.50523
100 LEP TAM	31.64	9.33	22.31	0.91	0.53403
100 LEP TAM	31.8	9.39	22.41	1.01	0.49827
200 LEP TAM	34.28	11.23	23.05	1.65	0.31975
200 LEP TAM	34.35	11.23	23.12	1.72	0.30460

Resultados de los CT obtenidos por qPCR para el gen del receptor de leptina y el gen 18s (ObRb) en la línea celular HCC 1937. Se muestran los resultados de los cálculos de Δ CT y $\Delta\Delta$ CT empleados para obtener la expresión relativa del ObR mediante el método de Pfaffl.

Tabla 10: Cuantificación relativa de ObR en la línea celular MCF 7

C _T	ObRb	18S	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT
Ctl 1	27.86	7.17	20.69	-1.38
Ctl 1.1	30.65	7.2	23.45	1.38

C _T	ObRb	18S	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Expresión Relativa ObR
Ctl			22.07	0.00	1.00000
10 LEP	30.84	9.49	21.35	-0.72	1.64718
10 LEP	30.63	9.4	21.23	-0.84	1.79005
100 LEP	32.6	9.92	22.68	0.61	0.65520
100 LEP	33.59	9.9	23.69	1.62	0.32534
200 LEP	33.05	9.54	23.51	1.44	0.36857
200 LEP	32.71	9.63	23.08	1.01	0.49655
TAM	30.28	8.92	21.36	-0.71	1.63580
TAM	30.84	8.92	21.92	-0.15	1.10957
10 LEP TAM	30.46	8.07	22.39	0.32	0.80107
10 LEP TAM	30.65	8.21	22.44	0.37	0.77378
100 LEP TAM	32.78	10.28	22.50	0.43	0.74226
100 LEP TAM	33.16	10.4	22.76	0.69	0.61985
200 LEP TAM	30.82	8.96	21.86	-0.21	1.15669
200 LEP TAM	30.9	9.18	21.72	-0.35	1.27456

Resultados de los CT obtenidos por qPCR para el gen del receptor de leptina y el gen 18s (ObRb) en la línea celular MCF 7. Se muestran los resultados de los cálculos de Δ CT y $\Delta\Delta$ CT empleados para obtener la expresión relativa del ObR mediante el método de Pfaffl.

Tabla 11: Concentración de proteína ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular MDA MB 231

Estímulo	ABS	Concentración ObR (pg/mL)	Concentración final ObR(X2) (pg/mL)
Control	0.0475	43.33	86.66
10 LEP	0.05	54.16	108.33
100 LEP	0.054	71.5	143
200 LEP	0.05	54.16	108.33
10 LEP TAM	0.053	67.16	134.33
100LEP TAM	0.053	67.16	134.33
200LEP TAM	0.0485	47.66	95.33
TAM	0.051	58.5	117

Tabla 12: Concentración de proteína ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular MCF 7

Estímulo	ABS	Concentración ObR (pg/mL)	Concentración final ObR (X2) (pg/mL)
Control	0.048	45.5	91
10 LEP	0.0555	78	156
100 LEP	0.059	93.16	186.33
200 LEP	0.0585	91	182
10 LEP TAM	0.055	75.83	151.66
100LEP TAM	0.062	106.16	212.33
200LEP TAM	0.061	101.83	203.66
TAM	0.0955	206.10	412.20

Tabla 13: Concentración de proteína ObR obtenida mediante la prueba ELISA para la línea celular HCC 1937

Estímulo	ABS	Concentración ObR (pg/mL)	Concentración final ObR (X2) (pg/mL)
Control	0.0635	112.66	225.33
10 LEP	0.067	127.83	255.66
100 LEP	0.0615	104	208
200 LEP	0.063	110.5	221
10 LEP TAM	0.07	140.83	281.66
100LEP TAM	0.064	114.83	229.66
200LEP TAM	0.0875	187.88	375.76
TAM	0.092	198.13	396.26

- Acosta-Benito, M. Á., & Vich-Pérez, P. (2016). Cáncer de intervalo, cribado y marcadores de riesgo en neoplasias mamarias. TT - [Interval cancer, screening, and risk markers in breast tumours]. *Semergen*, 42(8), e154–e156. <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2016.01.015>
- ATCC ® HTB-26™. (n.d.). *MDA -MB -231*.
- Bougaret, L., Delort, L., Billard, H., Le Huede, C., Line Boby, C., De La Foye, A., ... Caldefie-Chezet, F. (2018). Adipocyte/breast cancer cell crosstalk in obesity interferes with the anti-proliferative efficacy of tamoxifen. *PLoS ONE*, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191571>
- Casanello, P., Krause, B. J., Castro-Rodríguez, J. A., & Uauy, R. (2016). Epigenética y obesidad. *Revista Chilena de Pediatría*, 87(5), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2016.08.009>
- Comsa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35, 3147–3154. <https://doi.org/10.1038/430021a>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Dubois, V., Jardé, T., Delort, L., Billard, H., Bernard-Gallon, D., Berger, E., ... Caldefie-Chezet, F. (2014). Leptin induces a proliferative response in breast cancer cells but not in normal breast cells. *Nutrition and Cancer*, 66(4), 645–655. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.894104>
- Fernández-Santander, A., Tejerina Gómez, A., Tejetina Bernal, A., Gómez-Gallego, F., Santiago Dorrego, C., & Bandrés Moya, F. (2007). *Aspectos Farmacogenéticos en el tratamiento del cáncer de mama con tamoxifeno. Biological Sciences*. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=GanArxPeUeAC&i=fnd&pg=PA5&dq=Aspectos+farmacogenéticos+en+el+tratamiento+del+cáncer+de+mama+con+Tamoxifeno&ots=P2jmC77GWg&sig=Wxp_taJbt5AJiCdE3MHLyfUZUg%5Cnhttp://books.google.com/bo
- Ghasemi, A., Saeidi, J., Azimi-nejad, M., & Hashemy, S. I. (2019). Leptin-induced signaling pathways in cancer cell migration and invasion. *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00428-0>
- Giordano, C., Chemi, F., Panza, S., Barone, I., Bonofiglio, D., Lanzino, M., ... Andò, S. (2016). Leptin as a mediator of tumor-stromal interactions promotes breast cancer stem cell activity. *Oncotarget*, 7(2), 1262–1275. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6014>
- Haque, I., Ghosh, A., Acup, S., Banerjee, S., Dhar, K., Ray, A., ... Banerjee, S. K. (2018). Leptin-induced ER- α -positive breast cancer cell viability and migration is mediated by suppressing CCN5-signaling via activating JAK/AKT/STAT-pathway. *BMC Cancer*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-3993-6>
- J. G. Santillán-Benítez, Á. Quiroz-Ordóñezb, H. M.-Z. y L. M. G.-, & Olivánb. (2015). Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. “El camino

- Jardé, T., Caldefie-Chézet, F., Goncalves-Mendes, N., Mishellany, F., Buechler, C., Penault-Llorca, F., & Vasson, M. P. (2009). Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: Clinical and in vitro studies. *Endocrine-Related Cancer*, 16(4), 1197–1210. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0043>
- Li, K., Wei, L., Huang, Y., Wu, Y., Su, M., Pang, X., ... Chen, T. (2016). Leptin promotes breast cancer cell migration and invasion via IL-18 expression and secretion. *International Journal of Oncology*, 48(6), 2479–2487. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3483>
- Liang, X., Wang, S., Wang, X., Zhang, L., Zhao, H., & Zhang, L. (2018). Leptin promotes the growth of breast cancer by upregulating the wnt/ β -catenin pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(2), 767–771. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6212>
- Liu, C. Y., Hung, M. H., Wang, D. S., Chu, P. Y., Su, J. C., Teng, T. H., ... Chen, K. F. (2014). Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 16(5), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0431-9>
- Madej, P., Franik, G., Kurpas, P., Owczarek, A., Chudek, J., & Olszanecka-Glinianowicz, M. (2016). Evaluation of Adipokines, Inflammatory Markers, and Sex Hormones in Simple and Complex Breast Cysts' Fluid. *Disease Markers*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5174929>
- Martínez-Carpio, P. A., & Navarro Moreno, M. A. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Revista de Oncología*, 5(4), 184–191.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Frederick, L., Fevr, T., ... Berkeley, L. (2009). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally. *Cancer Cell*, 10(6), 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008.A>
- Osborne, C. K., I, K. H., Trent, J. J. M., & Hobbs, K. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Research and Treatment*, 9(2), 111–121. <https://doi.org/10.1007/BF01807363>
- Pan, H., Deng, L. L., Cui, J. Q., Shi, L., Yang, Y. C., Luo, J. H., ... Wang, L. (2018). Association between serum leptin levels and breast cancer risk. *Medicine (United States)*, 97(27). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000011345>
- Pfaffl, M. W. (2004). Relative quantification. *Real-Time PCR*, 63–82. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-3-5>
- Piñero-madrona, A., Polo-garcía, L., Alonso-romero, J. L., & Salinas-ramos, J. (2008). Características inmunohistoquímicas del cáncer de mama : ¿ hacia una nueva clasificación ?, 84(3).
- Qian, Y., Shi, D., Qiu, J., Zhu, F., Qian, J., He, S., ... Chen, X. (2015). ObRb downregulation increases breast cancer cell sensitivity to tamoxifen. *Tumor Biology*, 36(9), 6813–6821. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3375-5>
- Raut, P. K., Choi, D. Y., Kim, S. H., Hong, J. T., Kwon, T. K., Jeong, J. H., & Park,

P.-H. (1094). Estrogen receptor signaling mediates leptin-induced growth of breast cancer cells via autophagy induction. *Oncotarget*, 8(65), 109417–109435. 60
<https://doi.org/10.1016/j.bandl.2005.10.007>

Ray, A., & Cleary, M. P. (2017). The potential role of leptin in tumor invasion and metastasis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 38, 80–97.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.11.002>

Reddy, S. M., Sadim, M., Li, J., Yi, N., Agarwal, S., Mantzoros, C. S., & Kaklamani, V. G. (2013). Clinical and genetic predictors of weight gain in patients diagnosed with breast cancer. *British Journal of Cancer*, 109(4), 872–881.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2013.441>

Román, G. E. R. (2016). Obesidad y cáncer gastrointestinal, 81(Supl 1), 1–3.

Sadim, M., Xu, Y., Selig, K., Paulus, J., Uthe, R., Agarwl, S., ... Kaklamani, V. G. (2017). A prospective evaluation of clinical and genetic predictors of weight changes in breast cancer survivors. *Cancer*, 123(13), 2413–2421.
<https://doi.org/10.1002/cncr.30628>

Samia, S., Mohamed, W., & Marwa, K. (2016). Leptin influences estrogen metabolism and increases DNA adduct formation in breast cancer cells. *Cancer Biology & Medicine*, 13(4), 505. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0079>

Santillán Benitez, J. G., Ordóñez Quiroz, Á., Mendieta Zerón, H., & Oliván Gómez, L. M. (2012). La leptina en la carcinogénesis mamaria Vías de señalización Leptin role in the development of neoplastic cells of breast cancer Signaling pathway and Molecular Mechanism. *Revista Química Viva -Número*, 2(11), 91–111.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-7445.2006.tb00191.x>

Simone, V., D'Avenia, M., Argentiero, A., Felici, C., Rizzo, F. M., De Pergola, G., & Silvestris, F. (2016). Obesity and Breast Cancer: Molecular Interconnections and Potential Clinical Applications. *The Oncologist*, 21(4), 404–417.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0351>

Strong, A. L., Ohlstein, J. F., Biagas, B. A., Rhodes, L. V., Pei, D. T., Tucker, H. A., ... Bunnell, B. A. (2015). Leptin produced by obese adipose stromal/stem cells enhances proliferation and metastasis of estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0622-z>

Uusitalo, E., Kallionpää, R. A., Kurki, S., Rantanen, M., Pitkäniemi, J., Kronqvist, P., ... Peltonen, J. (2017). Breast cancer in neurofibromatosis type 1: Overrepresentation of unfavourable prognostic factors. *British Journal of Cancer*, 116(2), 211–217. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.403>

Vadillo Buenfil, M., Vela Ojeda, J., Galindo Rodríguez, G., & Salazar Exaire, D. (2005). Leptina y su influencia en los principales padecimientos ginecoobstétricos. *Ginecología y Obstetricia de Mexico*, 73(2), 99–104.

Yom, C. K., Lee, K. M., Han, W., Kim, S. W., Kim, H. S., Moon, B. I., ... Noh, D. Y. (2013). Leptin as a potential target for estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Breast Cancer*, 16(2), 138–145.
<https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.2.138>

Zaharia M, G. H. (2013). Cancer De Mama Triple Negativo. *Rev Peru Med Exp*

Zheng, Q., Banaszak, L., Fracci, S., Basali, D., Dunlap, S. M., Hursting, S. D., ... Reizes, O. (2013). Leptin receptor maintains cancer stem-like properties in triple negative breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 20(6), 797–808. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0329>