

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA DIABETES EN  
LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA POR MEDIO DE  
INMUNOHISTOQUÍMICA Y CULTIVO CELULAR: ESTUDIO  
PILOTO

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Inés Molina Manrique  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala

2019



DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA DIABETES  
EN LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA POR MEDIO DE  
INMUNOHISTOQUÍMICA Y CULTIVO CELULAR: ESTUDIO  
PILOTO

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

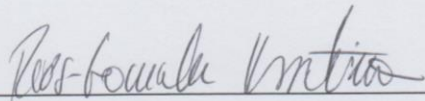


DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA DIABETES EN  
LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA POR MEDIO DE  
INMUNOHISTOQUÍMICA Y CULTIVO CELULAR: ESTUDIO  
PILOTO

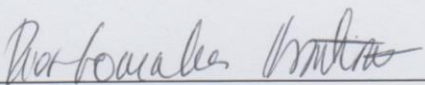
Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Inés Molina Manrique  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y  
Microbiología


Guatemala

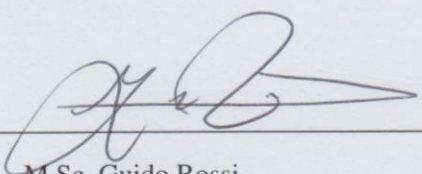
2019

(f)   
Dra. Krisztina Rios

Tribunal Examinador:

(f)   
Dra. Krisztina Rios

(f)   
Dr. Diego Archila

(f)   
M.Sc. Guido Rossi

Fecha de aprobación: Guatemala, 3 de diciembre de 2019

## PREFACIO

El trabajo profesional *Determinación de los efectos de la diabetes en la biología del cáncer de mama por medio de inmunohistoquímica y cultivo celular: estudio piloto* busca brindar algunas de las razones del por qué las mujeres diabéticas tienen más riesgo de mortalidad por cáncer de mama en comparación a las mujeres sin diabetes. Este es un campo de sumo interés a nivel mundial en el área de la salud ya que es necesario generar medicamentos que sean más específicos y efectivos para personas que padezcan las dos enfermedades.

En este trabajo fui capaz de aplicar los conocimientos adquiridos a lo largo de mi carrera, como también fui capaz de aprender nuevos conocimientos y técnicas para aplicarlas en la realización del mismo. Debido a que éste es un estudio piloto, espero que en el futuro se lleven a cabo investigaciones que lo puedan complementar y estudiar aspectos específicos.

Deseo agradecer a todas las personas que me apoyaron durante la realización de este trabajo y que contribuyeron, de forma directa o indirecta, con su tiempo, conocimientos y guía. Principalmente deseo agradecer al Dr. Stefan Ambs, del National Cancer Institute de Estados Unidos, por haberme permitido realizar mi trabajo de graduación en su laboratorio. Asimismo, quisiera agradecer al Dr. Gatikrushna Panigrahi y a Tiffany Dorsey, del mismo instituto, por compartirme mucho de su conocimiento y tiempo. Agradezco también al Dr. Diego Archila por enseñarme Inmunología y a la Dra. Krisztina Rios-Gonzalez por ser mi asesora. Agradezco especialmente a mi familia por su apoyo a lo largo de todo este proceso.

# ÍNDICE

	Página
Lista de cuadros .....	x
Lista de figuras .....	xi
Resumen .....	xii
Abstract.....	xiii
I. Introducción .....	1
II. Objetivos .....	2
A. Objetivo general.....	2
B. Objetivos específicos .....	2
III. Justificación.....	3
IV. Marco teórico .....	4
A. Cáncer de mama.....	4
1. Alteraciones en el cáncer de mama .....	5
2. Detección del cáncer de mama .....	6
3. Tratamientos del cáncer de mama .....	7
B. Diabetes .....	8
1. Detección de diabetes .....	9
2. Tratamientos para diabetes .....	10
C. Relación entre diabetes y cáncer de mama .....	11
1. Fibroblastos y adipocitos como promotores de la progresión tumoral .....	12
D. Inmunohistoquímica .....	12
1. CD39 y CD73 .....	12
2. PPP1R3C .....	13
3. PD-1 y PD-L1 .....	14
E. Técnicas de cultivo celular .....	15

1.	Línea celular 3T3-L1 .....	15
2.	Línea celular MDA MB175.....	16
3.	Línea celular ZR7530 .....	17
4.	Ensayo de proliferación celular CellTiter-Blue ® .....	17
F.	Citoquinas .....	18
1.	Clasificación .....	19
2.	Detección de citoquinas en laboratorio.....	20
V.	Metodología .....	21
A.	Análisis inmunohistoquímico de las muestras de cáncer de mama.....	21
1.	Obtención de muestras .....	21
2.	Evaluación inmunohistoquímica .....	21
3.	Puntuación de inmunohistoquímica.....	22
4.	Consideraciones éticas.....	23
B.	Cultivo celular .....	23
1.	Diferenciación de 3T3-L1 a adipocitos .....	23
2.	Verificación de la obtención de adipocitos con Oil Red-O .....	23
3.	Estimulación de 3T3-L1 y adipocitos con glucosa.....	24
4.	Proteome Profiler™ Array .....	24
5.	Ensayo de proliferación utilizando CellTiter-Blue®.....	24
C.	Análisis de datos .....	25
1.	Diferencia de la expresión de proteínas en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos.....	25
2.	Proliferación de células cancerígenas.....	25
3.	Determinación de citoquinas presentes en medio acondicionado.....	26
VI.	Resultados .....	27
A.	La expresión de las proteínas CD39, CD73 y PD-1 es mayor en tumores mamarios de pacientes diabéticos.....	27



B.	Medio acondicionado alto en glucosa promueve la proliferación celular de las líneas MDA MB175 y ZR7530 .....	29
C.	Alta concentración de glucosa disminuye la secreción de citoquinas en adipocitos y fibroblastos .....	31
VII.	Discusión .....	33
VIII.	Conclusiones .....	39
IX.	Recomendaciones .....	40
X.	Literatura citada.....	41
XI.	Anexos.....	48
A.	Kit de diferenciación de 3T3-L1 .....	48
B.	Proteome Profiler Array.....	50
C.	Citoquinas liberadas por fibroblastos y adipocitos en medio alto y bajo en glucosa .....	66

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Probabilidad por edad de desarrollo invasivo de cáncer de mama en mujeres de EE.UU. ....	4
Cuadro 2. Clasificación de las citoquinas según su función .....	19
Cuadro 3. Información de los anticuerpos detectados .....	22
Cuadro 4. Valor P de la expresión de CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1 en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos .....	27
Cuadro 5. Valor P de la proliferación de células cancerígenas al ser tratadas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa por 24 horas .....	29
Cuadro 6. Citoquinas alteradas en ambiente hiperglucémico .....	37
Cuadro 7. Razón de cambio de las citoquinas liberadas por fibroblastos y adipocitos en medio alto y bajo en glucosa .....	66

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ingreso de glucosa a la célula.....	8
Figura 2. Cambios en los niveles de glucosa en sangre medidos por OGTT.....	10
Figura 3. Inhibición de puntos de control inmunitario PD-1/PD-L1 .....	14
Figura 4. Línea celular 3T3-L1 de fibroblastos y adipocitos .....	16
Figura 5. Línea celular MDA MB175.....	16
Figura 6. Línea celular ZR7530.....	17
Figura 7. Sobreexpresión de CD39 en tumores mamarios de pacientes diabéticos .....	28
Figura 8. Sobreexpresión de CD73 en tumores mamarios de pacientes diabéticos .....	28
Figura 9. Sobreexpresión de PD-1 en tumores mamarios de pacientes diabéticos .....	28
Figura 10. Proliferación de línea celular cancerígena MDA MB175 después de 24 horas al tratarlas con distintos medios acondicionados .....	30
Figura 11. Proliferación de línea celular cancerígena ZR7530 después de 24 horas al tratarlas con distintos medios acondicionados .....	30
Figura 12. Secreción de citoquinas por fibroblastos y adipocitos en medios con baja (LG) y alta (HG) glucosa.....	32

## RESUMEN

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado y es el segundo que más muertes causa entre las mujeres en todo el mundo. La tercera parte de los pacientes con cáncer de mama también padecen diabetes. Muchos estudios han demostrado que la diabetes está asociada con distintos tipos de tumores; sin embargo, la relación con el cáncer de mama permanece inconsistente. Todos los estudios que se han realizado sobre la relación entre diabetes y cáncer de mama corresponden a estudios de meta-análisis, donde se indica que las mujeres con diabetes tienen un 16% más de riesgo de mortalidad por cáncer de mama en comparación a las mujeres sin diabetes.

Debido a la falta de conocimiento sobre los efectos que tiene la diabetes en la biología de las células cancerígenas mamarias, se realizó inmunohistoquímica de las proteínas CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1 para determinar los cambios en la expresión en células cancerígenas mamarias de personas diabéticas. Asimismo, se realizó un experimento con cultivo celular para evaluar las citoquinas secretadas por adipocitos y fibroblastos en un ambiente hiperglucémico y cómo estas afectan la proliferación de las células cancerígenas.

Por medio de inmunohistoquímica se observó que las personas con cáncer de mama y diabetes poseen una mayor expresión de las proteínas CD39, CD73 y PD-1, lo cual está asociado a inmunosupresión y progresión. El ensayo de cultivo celular indicó que existe una tendencia de mayor proliferación de células cancerígenas al ser incubadas con medio acondicionado alto en glucosa obtenido tanto de fibroblastos como de adipocitos. Se pudo determinar que el medio acondicionado alto en glucosa que simula un ambiente diabético suprime la liberación de citoquinas que participan en atraer células del sistema inmune.

La principal limitante fue el bajo número de muestras en la metodología de cultivo celular, por lo que se recomienda incrementarlo. El estudio sobre los efectos que tiene la diabetes en la biología del cáncer de mama es importante ya que puede brindar nuevas dianas terapéuticas para generar medicamentos específicos para las personas que poseen las dos enfermedades.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most diagnosed cancer and the second that causes more deaths among women worldwide. A third part of breast cancer patients also have diabetes. Many studies have shown that diabetes is associated with different types of tumor; however, the relationship with breast cancer remains inconsistent. All studies that have been conducted on the relationship between diabetes and breast cancer correspond to meta-analysis studies, which indicate that women with diabetes have a 16% higher risk of breast cancer mortality compared to women without diabetes.

Due to the lack of knowledge about the effects that diabetes has on the biology of breast cancer cells, immunohistochemistry of the proteins CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1, and PD-L1 was performed to determine changes in the expression of breast cancer cells of diabetic people. Likewise, an experiment with cell culture was carried out to evaluate which cytokines are secreted by adipocytes and fibroblasts in a hyperglycemic environment and how they affect the proliferation of cancer cells.

Through immunohistochemistry it was observed that people with breast cancer and diabetes have higher expression of the proteins CD39, CD73, and PD-1, which is associated with immunosuppression and progression. The cell culture assay indicated that there is a tendency for greater proliferation of cancer cells when incubated with high glucose conditioned media obtained from fibroblasts and adipocytes. It was determined that the high glucose conditioned media that simulated a diabetic environment suppresses the release of cytokines that participate in attracting cells of the immune system.

The main limitation was the low number of samples in the cell culture methodology, so it is recommended to increase it. It is important to study the effects that diabetes has on the biology of breast cancer because it can provide new therapeutic target to generate specific medications for people who have both diseases.

# I. INTRODUCCIÓN

Este trabajo de investigación tiene como finalidad describir algunos de los efectos que tiene la diabetes en la biología de las células cancerígenas mamarias. Existen estudios de meta-análisis que investigan la relación entre diabetes y el cáncer de mama, donde indican que las mujeres con diabetes tienen un 16% más de riesgo de mortalidad por cáncer de mama en comparación a las mujeres sin diabetes (Liao *et al.*, 2011). Sin embargo, no existe suficiente evidencia que indique los motivos biológicos. Por lo tanto, el principal objetivo de este estudio es determinar si las células cancerígenas de mujeres con diabetes tienen una diferencia de expresión de cinco proteínas (CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1) en comparación a las células cancerígenas de mujeres sin diabetes. Además, se busca determinar de manera *in vitro* qué citoquinas son secretadas por adipocitos y fibroblastos en un ambiente hiperglucémico y cómo estas afectan la proliferación de las células cancerígenas. Este es un estudio piloto donde sus aportes permitirán brindar un primer acercamiento a los cambios fisiológicos de células cancerígenas mamarias en personas diabéticas.

Dos metodologías experimentales fueron utilizadas: inmunohistoquímica y cultivo celular. Para inmunohistoquímica se utilizaron muestras colectadas entre febrero de 1993 y agosto de 2003 de mujeres en el área metropolitana de Baltimore, MD, Estados Unidos. La parte experimental se trabajó en el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, en el Laboratorio de Carcinogénesis Humana. La metodología se basa en la utilización de anticuerpos para la determinación de su respectivo antígeno en la superficie de las células cancerígenas. Por otro lado, para el cultivo celular se utilizaron líneas celulares comerciales de fibroblastos y adipocitos; como también las líneas celulares cancerígenas MDA MB175 y ZR7530. Se estimuló a los adipocitos y fibroblastos con medio hiperglucémico y normoglucémico para así analizar y medir la liberación de citoquinas y posteriormente analizar la proliferación de las células cancerígenas cuando se añaden estas citoquinas al medio.

Por medio de inmunohistoquímica se pudo observar que las personas con cáncer de mama y diabetes poseen una mayor expresión de las proteínas CD39 y CD73, lo cual genera una mayor cantidad de adenosina extracelular que suprime las respuestas inmunes. Estas personas también poseen una mayor expresión de PD-1, lo cual permite su unión a PD-L1 de otras células cancerígenas y aumenta la progresión. El ensayo de cultivo celular indicó que existe una tendencia de mayor proliferación de células cancerígenas al ser incubadas con medio acondicionado alto en glucosa obtenido tanto de fibroblastos como de adipocitos. Se pudo determinar que el medio acondicionado alto en glucosa que simula un ambiente diabético suprime la liberación de citoquinas que participan en atraer células del sistema inmune.

## II. OBJETIVOS

### A.OBJETIVO GENERAL

- Determinar los efectos de la diabetes en la biología del cáncer de mama a través de la inmunohistoquímica de los marcadores CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1, así como por medio de la experimentación *in vitro* utilizando las líneas celulares MDA MB175 y ZR7530 en condiciones hiperglucémicas.

### B.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si existe una diferencia significativa en la expresión de las proteínas CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1 en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos.
- Tratar adipocitos y fibroblastos con medio hiperglucémico y normoglucémico para evaluar si las citoquinas liberadas pueden promover la proliferación de las células de cáncer de mama.
- Evaluar las citoquinas liberadas por los adipocitos y fibroblastos en medio hiperglucémico y normoglucémico utilizando el Proteome Profiler Array.

### III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de seno es el cáncer más frecuente en las mujeres y el segundo que más muertes causa (Mazumdar *et al.*, 2016). En Estados Unidos el cáncer de mama representa el 15% de los casos de cáncer. Así mismo, 1 de cada 8 mujeres padecerá de cáncer de seno en toda su vida (Ridnour *et al.*, 2012). Esto es causado tanto por factores genéticos como ambientales. El cáncer tiene la capacidad de crecer y evadir el sistema inmune por medio de rutas inmunosupresoras. Estos mecanismos de evasión tienen como objetivo prevenir que las células malignas puedan ser reconocidas como extrañas y puedan ser atacadas por el sistema inmune (Allard, Longhi, Robson, & Stagg, 2017).

La tercera parte de los pacientes con cáncer de mama también padecen diabetes. Un estudio de meta-análisis ha demostrado que las mujeres con diabetes tienen un 16% más de riesgo de mortalidad por cáncer de mama en comparación a las mujeres sin diabetes (Liao *et al.*, 2011). Por esto mismo, estudios sugieren que afecciones como la diabetes pueden tener un impacto negativo en el pronóstico del cáncer de mama (Louwman *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2018). Estos datos se han obtenido a partir de estudios de meta-análisis donde relacionan la diabetes con el cáncer de mama. Sin embargo, en la actualidad no se cuentan con estudios donde investiguen la diferencia entre la biología de una célula cancerígena mamaria de un paciente con diabetes en comparación a un paciente sin diabetes.

Los marcadores son proteínas que se utilizan como indicadores de procesos biológicos patógenos o normales, o una respuesta farmacológica a un medicamento (Hilmenyuk *et al.*, 2018). Por esto mismo, es importante determinar si hay diferencia de expresión de proteínas específicas en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos. Debido a que este es un estudio piloto, al identificar una diferencia de expresión, dichas proteínas se podrán utilizar para investigaciones posteriores con el fin de poderse utilizar como dianas terapéuticas y brindar así una ruta a posibles tratamientos de la enfermedad. Así mismo, es importante comprender cómo un ambiente de diabetes afecta a los adipocitos y fibroblastos ya que éstas son células capaces de secretar citoquinas capaces de cambiar el comportamiento de las células cancerígenas circundantes.



## IV. MARCO TEÓRICO

### A. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de seno es el cáncer más diagnosticado y es el segundo que más muertes causa entre las mujeres (Mazumdar *et al.*, 2016). El cáncer de mama ocurre cuando las células del seno comienzan a crecer de forma rápida y descontrolada (Dai, Cheng, Bai, & Li, 2017). En la mayoría de los casos, el cáncer de mama se origina en las glándulas que producen leche. Sin embargo, también puede generarse en los conductos que llevan la leche al pezón, pero estos son menos comunes (American Cancer Society, 2018). El crecimiento de dichas células forma un tumor que tiene la capacidad de penetrar e invadir tejidos cercanos generando metástasis. El cáncer es capaz de crecer y cambiar las vías inmunosupresoras para evitar que las células malignas sean reconocidas como peligrosas o extrañas. Esto evita que el sistema inmune pueda detectar y eliminar las células cancerígenas, lo cual genera que la enfermedad progrese (Allard *et al.*, 2017)

Cuadro 1. Probabilidad por edad de desarrollo invasivo de cáncer de mama en mujeres de EE.UU.

<b>Current age</b>	<b>10-year probability:</b>	<b>or 1 in:</b>
20	0.1%	1,567
30	0.5%	220
40	1.5%	68
50	2.3%	43
60	3.4%	29
70	3.9%	25
<b>Lifetime risk</b>	<b>12.4%</b>	<b>8</b>

Note: Probability is among those free of cancer at beginning of age interval. Based on cases diagnosed 2012-2014. Percentages and "1 in" numbers may not be numerically equivalent due to rounding.

©2017, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

(American Cancer Society, 2018)

En el Cuadro 1 se muestra el aumento en la incidencia y muerte por cáncer de mama con la edad. Durante 2010 y 2014, el cáncer de mama fue diagnosticado a una edad media de 62 años. Una mujer que vive en los EE.UU. tiene un 12.4% o 1 en 8 de probabilidad de ser diagnosticada con cáncer de mama durante toda su vida. Esto se puede atribuir al aumento en la ingesta de hormonas exógenas, prevalencia de obesidad, cambios en el patrón de reproducción, entre otros factores (American Cancer Society, 2018).

La probabilidad de una mujer a padecer cáncer de mama puede ser incrementada debido a factores genéticos, como lo son mutaciones heredadas en *BRCA1*, *BRCA2* y otros genes susceptibles a cáncer de mama, como *Tp53*, *ATM*, *PTEN*, *LKB1*, entre otros (de Jong *et al.*, n.d.). Sin embargo, el cáncer de mama

por historial familiar solo contribuye al 5%-10% de los casos. La elevada incidencia de cáncer de mama se atribuye a la prevalencia de factores de riesgo, como lo es una temprana menstruación, una tardía menopausia, edad avanzada al primer nacimiento, menor número de hijos, ingesta de hormonas exógenas, consumo de alcohol y sobrepeso. Así mismo, se ha visto que factores como amamantar y realizar ejercicio actúan como factores protectores (Bray *et al.*, 2018).

## 1. Alteraciones en el cáncer de mama

Debido a la alta tasa de proliferación de las células tumorales, estas necesitan reprogramar su metabolismo energético para poder cubrir sus necesidades y poder crecer rápidamente (Bastid *et al.*, 2015). Los tumores en general, poseen una alta tasa de captación y consumo de glucosa. Debido a que las células cancerígenas proliferan rápidamente, estas se distancian de las venas que proveen oxígeno y se genera un ambiente anaeróbico (Adekola, Rosen, & Shanmugam, 2012). Cuando esto sucede, la glucosa adentro de la célula cancerígena se convierte a piruvato y consiguientemente en ácido láctico. Las células cancerígenas utilizan la vía de la fermentación de piruvato aún en presencia de oxígeno (Liberti & Locasale, 2016). A este cambio en el metabolismo de las células cancerígenas se le denomina efecto Warburg. Por el contrario, en células no cancerígenas, el piruvato es transportado a la mitocondria donde entra al ciclo de Krebs y participa en la fosforilación oxidativa, brindando así una mayor cantidad de ATP (Fadaka *et al.*, 2017). A pesar que la fermentación genera una cantidad menor de ATP, las células cancerígenas utilizan esta vía para así generar Acetil-CoA, el cual se utiliza para formar componentes de las células como la pared celular y así las células pueden crecer y dividirse (Poff *et al.*, 2019).

Se ha visto que la hiperglucemia modula la migración, adhesión y proliferación de células cancerígenas mamarias, lo cual genera un aumento en la mortalidad de pacientes con cáncer de mama (S. K. Lee *et al.*, 2015). Las células cancerígenas son capaces de sobrepasar regulaciones metabólicas ya que adquieren mutaciones en genes que normalmente actúan como supresores tumorales. Por otro lado, estas mutaciones también les permiten activar a oncogenes (Fadaka *et al.*, 2017). Algunas de las alteraciones genéticas en el cáncer de mama son mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, encontrados en el cromosoma 17 y 13, respectivamente. Cuando una persona hereda mutaciones en estos dos genes, tiene un riesgo más alto de presentar cáncer de mama (Bièche & Lidereau, 1995). Existen otros genes menos conocidos que también se han visto que están involucrados en el cáncer de mama. Algunos de estos genes son Tp53, ATM, PTEN, entre otros (de Jong *et al.*, n.d.).

## 2. Detección del cáncer de mama

Existen distintas técnicas para el diagnóstico del cáncer de mama. Para las mujeres con un alto riesgo, la Asociación Americana de Cáncer recomienda realizarse mamografías e imagen por resonancia magnética anualmente. La mamografía es una baja dosis de rayos X que permite la visualización de estructuras internas de los senos. Esta técnica tiene limitaciones para detectar tumores en tejido mamario denso, sin embargo, individualmente es el método más efectivo para una detección temprana (Boyd *et al.*, 2007). La Imagen por Resonancia Magnética (MRI) utiliza campos magnéticos para producir imágenes muy detalladas de secciones del cuerpo. Para poder realizar esto es necesario inyectar un medio de contraste intravenoso. El MRI no debe de reemplazar la mamografía, sino que debe de utilizarse como un método complementario (American Cancer Society, 2018).

Los ultrasonidos de mama se utilizan para evaluar anomalías encontradas en una mamografía o MRI. Estudios han demostrado que el ultrasonido es más efectivo para detectar tumores en mamas con tejido denso ya que esta técnica es capaz de detectar tumores pequeños no invasivos (Boyd *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012). Las mujeres también pueden realizarse auto exámenes en casa. La Asociación Americana de Cáncer recomienda que mensualmente se realicen un examen de palpado de las mamas para detectar alguna anomalía o masa. Así mismo, se recomienda que las mujeres se familiaricen con la apariencia y sensación de sus senos y reporten a su médico cualquier cambio que ocurra (American Cancer Society, 2018).

Cuando se detecta alguna masa o anomalía en el seno por alguno de los métodos mencionados anteriormente y se sospecha que pueda ser maligno, se recomienda realizar una biopsia. Durante la biopsia, una muestra se toma de células del área sospechoso y se investigan en el laboratorio para determinar si son cancerígenas. Esto se puede realizar utilizando una aguja o realizando un corte en la piel (American Cancer Society, 2018).

En la mayoría de casos se utilizan dos o más de los métodos mencionados anteriormente para brindar un diagnóstico certero. Es muy importante una detección temprana del cáncer de mama ya que va a permitir tener más opciones de tratamientos como también realizarse cirugías menos invasivas (Zhang *et al.*, 2012).

### 3. Tratamientos del cáncer de mama

El tratamiento para el cáncer de mama varía según la etapa de la enfermedad, las características biológicas del cáncer, así como también la edad del paciente, estado en la reproducción y los riesgos y beneficios de cada opción. Entre los tratamientos más comunes se encuentra la cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia de hormonas (Bray *et al.*, 2018). En los últimos años se han desarrollado inmunoterapias con células T con Receptor de Antígeno Quimérico (CAR), lo cual consiste en modificar genéticamente las células T autólogas de un paciente para que exprese un CAR específico para un antígeno tumoral. Posteriormente se realiza una expansión celular *ex vivo* y se readministra al paciente (Graham, Hewitson, Pagliuca, & Benjamin, 2018; June, O'Connor, Kawalekar, Ghassemi, & Milone, 2018).

La cirugía se utiliza para remover el cáncer y determinar la etapa en la que está. Los tipos de cirugía se clasifican según la cantidad de tejido a remover (Louwman *et al.*, 2005). La mastectomía es la cirugía donde se conserva las mamas ya que solo el tejido cancerígeno y tejido normal circundante es removido. La mastectomía total es cuando la mama completa es removida, además de nódulos linfáticos axilares (Giordano, Hortobagyi, Kau, Theriault, & Bondy, 2005). La radioterapia se utiliza comúnmente después de la cirugía para eliminar a las células cancerígenas restantes en la mama y la pared del pecho (American Cancer Society, 2018).

Las terapias sistémicas son los tratamientos que viajan por el flujo sanguíneo y llegan a casi todo el cuerpo (Giordano *et al.*, 2005). Entre las terapias sistémicas está la quimioterapia y la terapia de hormonas. La administración de quimioterapia va a depender de la presencia de receptores en las células cancerígenas. En estudios anteriores se ha observado que una combinación de medicamentos es más efectiva en comparación a un solo medicamento (Giordano *et al.*, 2005; Waks & Winer, 2019). La terapia hormonal se utiliza para disminuir los niveles de estrógeno para bloquear los efectos en el crecimiento de las células cancerígenas (American Cancer Society, 2018).

En los últimos años se han desarrollado las inmunoterapias para generar un tratamiento más eficaz ya que se modifica el sistema inmune del paciente para combatir el cáncer. Esto se realiza ya sea estimulando al sistema inmune para que pueda detectar las células cancerígenas y las rechace o bloqueando las rutas supresoras (Allard *et al.*, 2017).

## B. DIABETES

La diabetes es un conjunto de enfermedades metabólicas que dan como resultado hiperglicemia que puede ser causada por defectos en la secreción de insulina, en la función de la insulina o ambos (Knight & Nigam, 2017). La glucosa proveniente de la alimentación debe ser ingresada a las células del cuerpo, lo cual se lleva a cabo por la hormona insulina. En una persona sin diabetes, las células beta del páncreas producen la insulina. Al ingresar glucosa al cuerpo, la insulina es liberada por el páncreas y circula por todas las células del cuerpo. Posteriormente se une a los receptores de insulina presentes en todas las células humanas y el transportador de glucosa Glut4 se mueve a la superficie celular para permitir que la glucosa pueda entrar a la célula (Figura 1). La mayor parte de la glucosa ingerida entra al hígado y a las células del músculo para ser almacenada como glucógeno (A. Iyer, Jeyalatha, & Sumbaly, 2015).

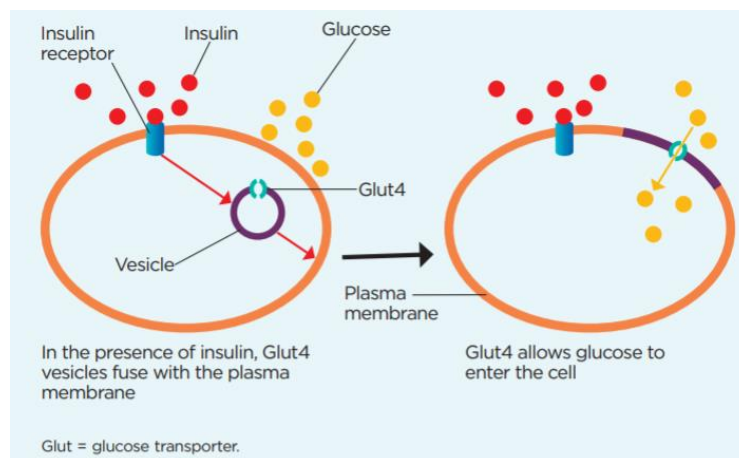


Figura 1. Ingreso de glucosa a la célula

Leyenda: en presencia de glucosa, insulina es liberada y es reconocida por los receptores. El transportador de glucosa Glut4 se fusiona con la membrana plasmática, lo cual permite que la glucosa pueda entrar a la célula.

(Knight & Nigam, 2017)

En el 2012, aproximadamente 9.3% de la población de EE.UU. había sido diagnosticada con diabetes, lo cual la hace la enfermedad endócrina más común (A. Iyer *et al.*, 2015). Desde 1980, la prevalencia de la diabetes ha aumentado de un 4.7% a un 8.5% en la población adulta (Knight & Nigam, 2017). Existen dos principales tipos de diabetes, tipo 1 y tipo 2, donde el tipo 2 representa el 95% de todos los diagnósticos clínicos. (Shao *et al.*, 2018).

La diabetes tipo 1 se cataloga como una enfermedad autoinmune y normalmente se diagnostica en la niñez, entre los 4 y 5 años o en la adolescencia. Este tipo se caracteriza por la destrucción de las células beta

del páncreas que producen la insulina, lo cual resulta en una ausencia total o muy baja cantidad de insulina (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014). Debido a la falta de insulina, el transportador Glut4 permanece en la célula y la glucosa no es capaz de entrar a las células, lo cual resulta en hiperglicemia extracelular. Padecer este tipo de diabetes está influenciado por factores genéticos ya que se han encontrado muchos genes relacionados con esta enfermedad autoinmune (Knight & Nigam, 2017).

La diabetes tipo 2 es la más común y está caracterizada por una resistencia a la insulina. Este tipo de diabetes afecta más que todo a personas mayores y no se considera una enfermedad autoinmune, más bien se cataloga como un estado inflamatorio. En este tipo de diabetes las células beta del páncreas sí son capaces de producir insulina; sin embargo, esta hormona no es capaz de unirse a los receptores de las células (Atkinson *et al.*, 2014). Existen dos hipótesis para la resistencia a insulina. La primera consiste en que hay una interferencia en el receptor de la insulina. Dicha interferencia puede ser causada por un anticuerpo, virus o proteína que bloquea el receptor y previene que la insulina se pueda unir. La segunda hipótesis consiste en mutaciones de genes que generan un cambio de forma del receptor de insulina, lo cual dificulta su unión (Knight & Nigam, 2017). Existen algunos factores que pueden llevar a padecer este tipo de diabetes como lo son el sobrepeso, sedentarismo y la edad (A. Iyer *et al.*, 2015).

Algunos de los síntomas de padecer diabetes pueden incluir: orinar frecuente, hambre excesiva, sed excesiva, lento proceso de sanación de heridas, visión borrosa, fatiga, entre otras (A. Iyer *et al.*, 2015). Todos los casos de diabetes generan la misma consecuencia, la cual es un aumento en los niveles de glucosa en la sangre. La hiperglicemia crónica a largo plazo puede causar daños en órganos como los ojos, riñones, corazón, nervios y venas (Atkinson *et al.*, 2014).

## 1. Detección de diabetes

La detección de la diabetes se realiza a través de pruebas de orina y sangre para determinar si hay un exceso de glucosa en el cuerpo. Las pruebas más comunes para determinar son la prueba A1C, prueba de glucosa en plasma en ayunas (FPG) y la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) (Punthakee, Goldenberg, & Katz, 2018). Se considera que una persona sufre de diabetes cuando los niveles de azúcar en sangre están por encima de los valores normales (4.4 a 6.1 mmol/L o 79.27 a 109.89 mg/dL) (A. Iyer *et al.*, 2015). La prueba A1C permite conocer el promedio de la glucosa en la sangre de 3 meses pasados ya que mide la hemoglobina glucosilada. Se basa en que la glucosa se une a la hemoglobina de las células sanguíneas, por lo que a mayor nivel de glucosa en sangre, mayor glucosa será unida a la hemoglobina (Owora, 2018). La prueba FPG revela el nivel de glucosa en sangre en ayunas. Con esta prueba solo se puede saber el valor de glucosa en el momento que se está haciendo la medición (Punthakee *et al.*, 2018). La prueba OGTT es la prueba estándar y más utilizada para el diagnóstico de diabetes. Esta prueba consiste en hacer ayuno por 8

horas tener una medición de la glucosa en sangre. Posteriormente se consume una solución oral con 75g de glucosa y se realizan mediciones de los niveles de glucosa en sangre cada 30 minutos por un período de 2 horas (Knight & Nigam, 2017). Al consumir la solución oral se espera que la concentración de glucosa en sangre se eleve pero que, al transcurrir una hora, ésta comience a disminuir hasta llegar al nivel inicial que se tenía en ayunas. Sin embargo, en las personas con diabetes el nivel de glucosa en sangre tarda más de dos horas en regresar al valor inicial (Figura 2).

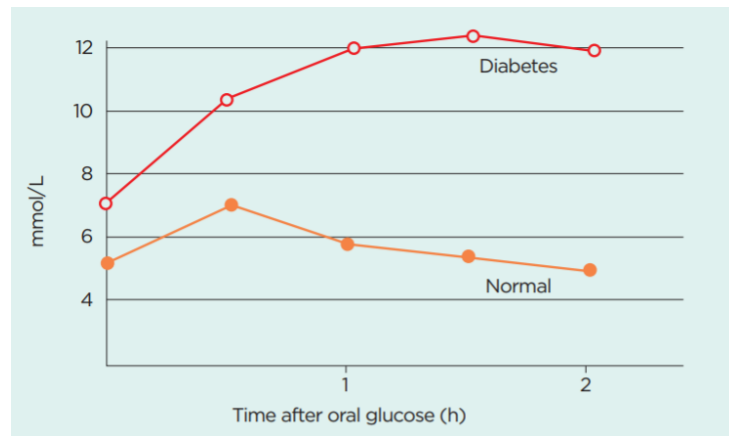


Figura 2. Cambios en los niveles de glucosa en sangre medidos por OGTT

Leyenda: en el eje X se muestra el tiempo en horas después del consumo de glucosa y en el eje Y la concentración en mmol/L. En el caso de una persona sana, al cabo de las 2 horas el nivel de glucosa regresa a ser iguales a los del inicio. Por otro lado, en una persona diabética, el nivel de glucosa permanece alto luego a las 2 horas.

(Knight & Nigam, 2017)

## 2. Tratamientos para diabetes

Tanto la diabetes tipo 1 como la tipo 2 no tienen cura y solamente pueden ser controladas y tratadas con dietas especiales, ejercicio o inyecciones de insulina (A. Iyer *et al.*, 2015). El tratamiento a utilizar depende del tipo de diabetes que la persona posea. Debido a que las personas con diabetes tipo 1 no producen insulina, el tratamiento consta de inyecciones de insulina para normalizar la glucosa en la sangre (Knight & Nigam, 2017).

Por otro lado, las personas con diabetes tipo 2 tienen una resistencia a la insulina, el tratamiento consta de dieta, ejercicio, pérdida de peso o farmacológico. Así mismo, estas personas también utilizan inyecciones de insulina para regular su glucosa (Knight & Nigam, 2017).

## C.RELACIÓN ENTRE DIABETES Y CÁNCER DE MAMA

La diabetes y el cáncer de mama son enfermedades graves que causan la muerte en todo el mundo. Muchos estudios han demostrado que la diabetes está asociada con muchos tipos de tumores (Shao *et al.*, 2018); sin embargo, la relación con el cáncer de mama permanece inconsistente. Por esto mismo, muchas investigaciones se han basado en encontrar una relación entre la diabetes y el cáncer de mama por medio de estudios de meta-análisis (Liao *et al.*, 2011). Sin embargo, la limitante principal de estos estudios es la obtención de resultados generalizados y no se llega a conocer la razón particular del suceso. Por esto, es importante realizar estudios funcionales para comprobar los resultados obtenidos con meta-análisis.

Algunos estudios sugieren que algunas condiciones como la diabetes pueden impactar de forma negativa el pronóstico del cáncer de mama (Liao *et al.*, 2011). La asociación entre diabetes y la sobrevivencia de cáncer de mama ha sido inconsistente en la literatura, sin embargo, un estudio de cohorte prospectivo de un millón de adultos de EE.UU. ha demostrado que las mujeres con diabetes tienen un 16% más de riesgo de mortalidad por cáncer de mama en comparación a las mujeres sin diabetes (Shao *et al.*, 2018). El estudio conducido por Shao *et al.* demostró que hay un aumento en el riesgo de muerte asociado a diabetes tipo 2 sin importar si fue diagnosticada antes o después del diagnóstico de cáncer de mama. Esto indica que los factores relacionados a diabetes pueden influenciar directamente en el cáncer de mama.

La razón por la que la diabetes puede cambiar la incidencia y mortalidad del cáncer de mama puede ser debido a mecanismos biológicos que no han sido claramente establecidos; sin embargo, se tienen tres principales hipótesis. La primera es que existe una activación de la ruta de la insulina que incrementa la unión de la insulina con sus receptores la cual activa la fosfatidilinositol 3-quinasa. Esta activa la vía AKT, la cual juega un rol importante en la formación tumoral. La segunda es que existe una activación en la vía del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). El IGF se puede unir tanto al receptor de la insulina como al receptor de IGF, lo cual genera un mecanismo en cascada que finalmente estimula el desarrollo del cáncer de mama. Y la tercera es que existe una regulación de hormonas sexuales endógenas (Liao *et al.*, 2011).

Como consecuencia de la resistencia a la insulina, las personas desarrollan la hiperinsulinemia (Louwman *et al.*, 2005). Esta condición a su vez está asociada con altas concentraciones de estrógeno y bajos niveles de globulina fijadora de hormonas sexuales, lo cual lleva a un aumento en la disposición de estradiol. En estudios se ha visto que un elevado nivel de estradiol está asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama (Cauley *et al.*, 1999; Mallick & Taylor, 2019).



## 1. Fibroblastos y adipocitos como promotores de la progresión tumoral

Las células que componen el estroma tumoral están asociadas a la progresión del cáncer (Wang *et al.*, 2012). Los fibroblastos asociados al cáncer promueven la progresión tumoral ya que secretan factores de crecimiento como quimioquinas, citoquinas y compuestos que aumentan la migración y contribuyen a la modificación de la matriz extracelular (Bochet *et al.*, 2013). Los adipocitos también son capaces de secretar hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y adipoquinas, las cuales influyen en el comportamiento del tumor. Entre las adipoquinas se encuentra la leptina, adiponectina y el factor de crecimiento de hepatocito (Bochet *et al.*, 2013). Estos se ha visto que estimulan el crecimiento y proliferación hasta de las células cancerígenas ER-. Un aumento en leptina y una disminución en niveles de adiponectina se han visto en personas con diabetes tipo 2, lo cual también puede contribuir a un aumento en el riesgo de cáncer de mama (Liao *et al.*, 2011).

En estudios anteriores se ha observado que los adipocitos que rodean al tumor muestran cambios fenotípicos tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual puede promover la invasión y metástasis de las células tumorales (BOTA, AUTIER, & BOYLE, 2018; Dirat *et al.*, 2011). Estos adipocitos también muestran una disminución en el contenido de lípidos y una activación en la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias (Bochet *et al.*, 2013).

## D. INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es una técnica altamente sensible y específica que emplea las disciplinas de la inmunología, histología y química. Es utilizada para detectar antígenos en secciones de tejidos mediante el uso de anticuerpos específicos (Linnoila & Petrusz, 1984). La ventaja que posee esta técnica sobre otros métodos de detección inmunológica (e.g. ELISA, inmunocromatografía) es la capacidad de brindar la ubicación del antígeno en el tejido o célula. Esto permite correlacionar la ubicación del antígeno con su posible función en tejidos normales y patológicos (Ramos-Vara, 2011).

### 1. CD39 y CD73

Las enzimas CD39 y CD73 son ectonucleotidasas presentes en la superficie de distintos tipos de células así como endoteliales e inmunes en la mayoría de tejidos (B. Zhang, 2010). La ruta CD39/CD73 se encarga de hidrolizar el ATP y ADP extracelular para generar adenosina (Bastid *et al.*, 2015). Cuando el ATP es liberado al ambiente extracelular, éste se une a receptores que desencadenan una respuesta inflamatoria (Zhao, Bo, Kang, & Li, 2017). La proteína CD39 realiza el paso limitante de la hidrólisis convirtiendo el

ATP y ADP en AMP, lo cual luego es convertido a adenosina por medio de la proteína CD73 (Allard *et al.*, 2017a; Antonioli, Pacher, Vizi, & Haskó, 2013).

La adenosina extracelular se une a receptores de adenosina e inhibe las respuestas de las células T y las Natural Killer (NK), generando así una supresión del sistema inmune. En estudios anteriores se ha visto que la expresión de CD39 es mayor en tejidos cancerígenos en comparación a tejidos sanos. Las células cancerígenas CD39<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> inhiben la proliferación de células T CD4 y CD8 y la generación de células T CD8 citotóxicas (Bastid *et al.*, 2015; Hilmenyuk *et al.*, 2018).

La ruta CD39/CD73 cambia según el contexto fisiopatológico de la persona. En estudios previos se ha determinado que generar cambios y alterar esta ruta puede cambiar el curso de varias enfermedades autoinmunes, infecciones, cáncer, entre otras (Allard, Longhi, Robson, & Stagg, 2017b; Antonioli *et al.*, 2013; Goueli & Hsiao, 2018).

Estudios anteriores demuestran que la proteína CD73 está implicada en la resistencia a medicamentos y al desarrollo tumoral. Utilizando citometría de flujo se ha demostrado que la proteína CD73 como la CD39 están sobre expresadas en tejidos cancerígenos. Además, se ha determinado que la alta expresión de dichas proteínas está asociada con la invasión y metástasis del cáncer de seno promoviendo así una mayor migración y adhesión de las células cancerígenas (B. Zhang, 2010).

## 2. PPP1R3C

La proteína fosfatasa 1 con subunidad reguladora 3C (PPP1R3C) es un gen que codifica a una proteína de unión a carbohidratos que es una subunidad del complejo de proteína fosfatasa 1 (PP1) (Shen, Zhang, Liu, & Zhang, 2010). PP1 cataliza la fosforilación reversible de proteínas, lo cual es utilizado en actividades celulares como la generación de ATP. PPP1R3C es una enzima intracelular que se une a la proteína fosfatasa 1 (PP1) como un regulador. El rol principal de PPP1R3C está asociado a la síntesis de glucógeno activando la glucógeno sintasa. Esta proteína también limita la degradación de glucógeno al reducir la actividad de glucógeno fosforilasa (S. K. Lee *et al.*, 2015; J. Pelletier *et al.*, 2012). En estudios anteriores se ha visto que la sobreexpresión de este gen aumenta el almacenamiento de glucógeno. Así mismo, cuando PPP1R3C es silenciado, el nivel de glucógeno celular es suprimido. Se ha observado que la proteína PPP1R3C induce la acumulación de glucógeno a través de la vía HIF1  $\alpha$  (Factor inducible por hipoxia 1-alfa) durante hipoxia en las células cancerígenas (S. K. Lee *et al.*, 2015).

### 3. PD-1 y PD-L1

La proteína de la muerte celular programada 1 (PD-1) es expresada en la superficie de células del sistema inmune como lo son las células T y B. Esta proteína induce y mantiene la tolerancia periférica inmune y protege a los tejidos de ataques inmunes. PD-1 tiene dos ligandos naturales; PD-L1 y PD-L2, los cuales son responsables de regular el balance entre la activación de células T, tolerancia e inmunopatología. El ligando PD-L1 es expresado en células normales y tumorales, y estudios recientes revelan que la proteína PD-1 también es expresada en melanoma y algunos otros cánceres (Yao, Wang, Li, Fang, & Xu, 2018a). Cuando PD-1 se une a su ligando PD-L1, esto suprime la actividad de destrucción de tumores de las células T y disminuye la respuesta de dichas células, lo cual evita que las células T destruyan a las células cancerígenas (Figura 3, Izquierda). Cuando hay un bloqueo en esta unión, esto permite que las células T destruyan a las células tumorales (Figura 3, Derecha). Esto genera que la ruta PD-1/PD-L1 sea un punto de control presente en las células T y células cancerígenas (National Cancer Institute, 2018).

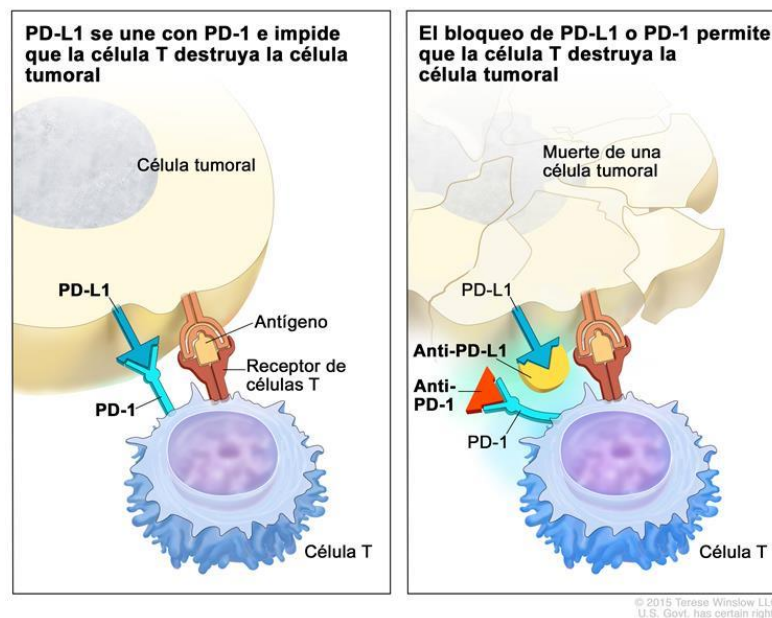


Figura 3. Inhibición de puntos de control inmunitario PD-1/PD-L1

(National Cancer Institute, 2018)

## E. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

El cultivo celular es una técnica que se utiliza ampliamente en la biología celular y molecular para estudiar la biología, fisiología y bioquímica de las células (Hudu, Alshrari, Syahida, & Sekawi, 2016). Es un excelente modelo donde se utilizan células de animales o plantas y se crecen en un ambiente artificial favorable. Se utiliza para determinar los efectos que tienen distintos compuestos como drogas, toxinas, medicamentos, entre otros, en las células y así poder investigar su mutagénesis o carcinogénesis (Phelan & May, 2015).

Las células pueden obtenerse por actividad enzimática o mecánica a partir del tejido original, a lo cual se le conoce como cultivo primario. Al realizar un subcultivo del cultivo primario, se generan clones o copias, a lo cual se le denomina línea celular (Hudu *et al.*, 2016). Las líneas celulares derivadas de cultivos primarios tienen una vida limitada. Cada vez que éstas son pasadas a otro recipiente, las células con la mayor capacidad de crecimiento van a predominar y se generará una uniformidad fenotípica y genotípica (Phelan & May, 2015).

Las células también pueden ser derivadas de una línea celular que ya ha sido establecida. Estas líneas celulares comerciales son transformadas química o viralmente para conferirles la capacidad de dividirse indefinidamente y así tener una línea celular continua (Phelan & May, 2015).

### 1. Línea celular 3T3-L1

3T3-L1 es una línea celular derivada de ratón que se utiliza ampliamente en la investigación del tejido adiposo. Esta línea celular es de fibroblastos (Figura 4 A) pero tiene la capacidad de diferenciarse en adipocitos. El proceso de diferenciación es acelerado con la presencia de insulina, indometacina y cAMP. Las células 3T3-L1 de adipocitos tienen un aumento en la síntesis y acumulación de triglicéridos, lo cual le da una apariencia más circular y con acumulación de gotas de lípidos (Figura 4 B) (T. H. Chang & Polakis, 1978; Mukhopadhyay, 2015).

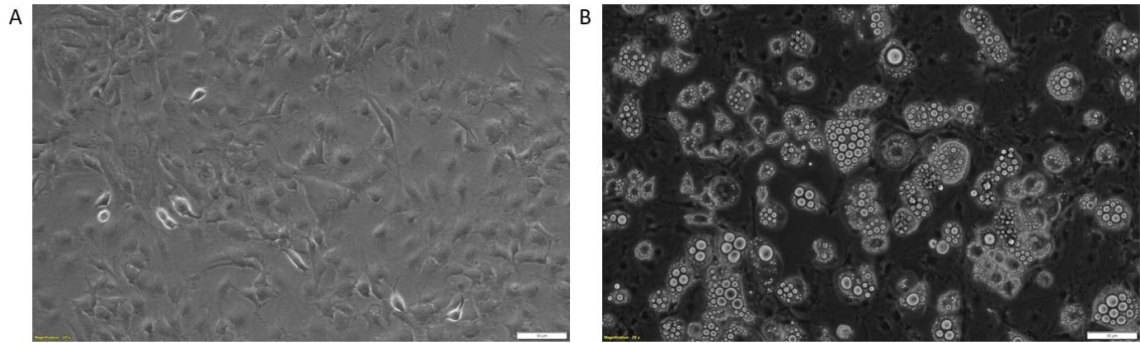


Figura 4. Línea celular 3T3-L1 de fibroblastos y adipocitos.  
Observado en Microscopio invertido a 100X

Figura propia

## 2. Línea celular MDA MB175

MDA MB175 es una línea celular cancerígena mamaria proveniente de una mujer afrodescendiente. Esta línea celular es del subtipo de Luminal A y expresa receptor de estrógeno positivo (ER+), receptor de progesterona negativo (PR-), receptor epitelial humano 2 negativo (HER2-) y la mutación en el gen BRCA1 no fue determinada (Dai *et al.*, 2017). Esta línea celular se adhiere a la superficie porosa de las placas para poder crecer y llegar a ser confluyente en 2-3 días.

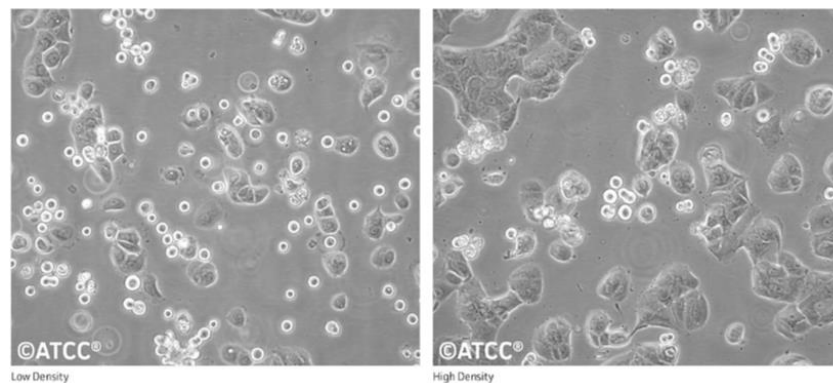


Figura 5. Línea celular MDA MB175

(ATCC, 2019)

### 3. Línea celular ZR7530

ZR7530 es una línea celular cancerígena mamaria de una mujer de raza negra. Esta línea celular tiene muy poca expresión de la proteína p53, la cual es supresora tumoral (Smith *et al.*, 2017). Además, esta línea celular es Luminal B y expresa ER+, PR-, HER2+ y no contiene una mutación en el gen BRCA1 (Dai *et al.*, 2017). . La sobre expresión del receptor HER2 tiene un rol importante en la metástasis de adenocarcinomas de mama (American Association for Cancer Research. *et al.*, 2005). Esta línea celular se adhiere a la superficie porosa de las placas para crecer y llegar a ser confluyente en 5-6 días. Posee un crecimiento más lento que la línea celular MDA MB175.

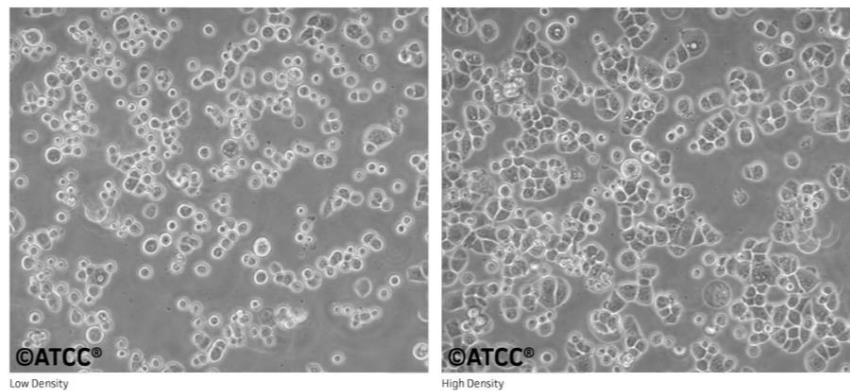


Figura 6. Línea celular ZR7530

(ATCC, 2019)

### 4. Ensayo de proliferación celular CellTiter-Blue ®

Los ensayos de proliferación celular son ampliamente utilizados para verificar la función celular y su viabilidad al estar en contacto con algún estímulo o sustancia. Algunos de los ensayos para verificar la viabilidad celular incluyen el conteo celular ya sea manual o automático. El conteo manual en microscopio es sensible, pero requiere de mucho tiempo. El conteo automático computarizado es caro en términos de equipo pero es más rápido y brinda un conteo más preciso (Posimo *et al.*, 2014). Anteriormente se utilizaban radioisótopos como timidina para determinar la proliferación celular ya que éste es un componente del ADN genómico por lo que al ser incorporado en el ADN durante la división celular, puede ser capaz de reflejar la proliferación. Sin embargo, por las restricciones en desechos de radioactivos se ha elegido utilizar pruebas colorimétricas basadas en MTT, WST-1 y resazurina, las cuales brindan resultados muy precisos (Koyanagi, Kawakabe, & Arimura, 2016).

El ensayo de proliferación CellTiter-Blue ® es basado en colorimetría por resazurina. Es un método fluorométrico utilizado para estimar el número de células viables en un plato de múltiples pocillos. Se basa en que las células viables tienen la capacidad de reducir resazurina en resorufina, el cual es un compuesto altamente fluorescente. Las células que no son viables pierden esa capacidad metabólica por lo que no producen una señal fluorescente (Promega, 2016).

## F. CITOQUINAS

Las citoquinas son pequeñas proteínas de bajo peso molecular liberadas por células que permiten la interacción y comunicación entre las células (J.-M. Zhang & An, 2007). Estas son mensajeras moleculares que permiten que las células del sistema inmune se puedan comunicar entre sí para generar una respuesta coordinada y robusta a la hora de atacar un antígeno. Esto lo hacen uniéndose a receptores específicos en las células de interés (S. Lee, Margolin, Lee, & Margolin, 2011). Diferentes tipos de células pueden secretar la misma citoquina o una misma citoquina puede actuar en diferentes tipos de células. Así mismo, diferentes citoquinas pueden tener una función muy similar (Taghavi, Hassanshahi, Kounis, Koniari, & Khorramdelazad, 2019). Comúnmente la forma de actuar de las citoquinas es en cascada ya que cuando una citoquina se une al receptor, esto genera que se produzcan más citoquinas (J.-M. Zhang & An, 2007).

Las citoquinas pueden tener efectos tanto pro como anticancerígenos. Esto va a depender del grado y ambiente del tumor (Kalvakolanu, 2019). Durante las últimas dos décadas se ha buscado caracterizar e investigar toda la red de señalización de las citoquinas para así poder desarrollar tratamientos contra el cáncer (S. Lee *et al.*, 2011).

## 1. Clasificación

Las citoquinas pueden clasificarse de distintas maneras; tomando en cuenta su estructura secundaria, función o receptores. En este apartado se abarcará la clasificación de las citoquinas según su función, mencionando a las citoquinas más importantes de la respuesta inmune (Kalvakolanu, 2019).

Cuadro 2. Clasificación de las citoquinas según su función

<b>Citoquinas proinflamatorias</b>
TNF
IL-1
IL-6
Quimioquinas
<b>Citoquinas antiinflamatorias</b>
IL-10
IL-1ra
TGF- $\beta$
<b>Citoquinas activadoras de macrófagos</b>
IFN- $\gamma$
<b>Citoquinas activadoras de células B</b>
IL-4
IL-5
IL-6
IL-21
<b>Citoquinas activadoras de células T</b>
IL-2
IL-4
IL-12
IFN- $\gamma$
<b>Citoquinas activadoras de eosinófilos y mastocitos</b>
IL-3
IL-4
IL-13
IL-5

(S. Lee *et al.*, 2011)



## 2. Detección de citoquinas en laboratorio

Existen distintos métodos para detectar citoquinas, así como ELISPOT, ELISA, citometría de flujo, matrices de anticuerpos y ensayos basados en perlas. El mejor método a elegir depende del experimento, la aplicación y la especificidad requerida ya que cada método cuenta con fortalezas y limitaciones. Todos los métodos se basan en la utilización de anticuerpos que van a detectar o unirse a las citoquinas de interés. Los ensayos ELISA y ELISPOT cuentan con una especificidad muy alta, sin embargo, requieren de mucho tiempo (Beveridge *et al.*, 2008). Ensayos como citometría de flujo, matrices de anticuerpos y ensayos con perlas requieren una menor cantidad de tiempo y son capaces de detectar distintas citoquinas en el mismo ensayo (Lambert *et al.*, 2019).

### a. Método de detección de citoquinas Proteome Profiler™ Array

El Proteome Profiler Array es un método para determinar los niveles relativos de varias distintas citoquinas humanas en sobrenadantes de cultivo celular, lisados celulares, lisados de tejidos, plasma, saliva, orina y leche materna. Dependiendo del kit a utilizar, este método puede detectar desde 36 hasta 125 citoquinas al mismo tiempo. Este método consta de un kit que se basa en la utilización de una membrana de nitrocelulosa que contiene puntos con anticuerpos. La muestra a analizar es diluida y mezclada con un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados. Posteriormente la muestra es incubada con las membranas y el complejo de citoquina-anticuerpo es unido a la membrana. Se utiliza la unión de estreptavidina con la enzima peroxidasa para generar una emisión quimioluminiscente y medirla ya que la cantidad de luz producida en cada punto será proporcional a la cantidad de citoquina unida (R&D Systems, 2019).

## V. METODOLOGÍA

### A. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE CÁNCER DE MAMA

#### 1. Obtención de muestras

Se trabajó con muestras de biopsias quirúrgicas en parafina de casos de cáncer de mama proporcionadas por el Laboratorio de Carcinogénesis Humana (LHC) del Instituto Nacional de Cáncer parte de los Institutos Nacionales de Salud (NCI-NIH) de Maryland, Estados Unidos. Las mismas fueron recolectadas entre febrero de 1993 y agosto de 2003 de mujeres de descendencia afroamericana y caucásica en el área metropolitana de Baltimore. Los pacientes eran elegibles si el cáncer de mama había sido diagnosticado en los últimos 6 meses, había sido patológicamente confirmado y no tenían historial previo de cáncer de mama. Se excluyeron los pacientes si portaban HIV (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), HCV (Virus de la Hepatitis C) o HBV (Virus de la Hepatitis B), eran usuarios de drogas intravenosas o eran física o mentalmente incapaces de completar y firmar el consentimiento y cuestionario. Se obtuvo el historial médico y reportes patológicos que indicaban el índice de masa corporal, el tamaño del tumor, estado de los ganglios, estado de la enfermedad, tratamiento y supervivencia. Así mismo, para algunos pacientes se obtuvo información de otras enfermedades que portaban, así como diabetes. La colección de los tumores, datos de la encuesta, la información clínica y patológica fue revisado y aprobado por la Junta de Revisión de la Universidad de Maryland (UMD protocolo # 0298229) (Ridnour *et al.*, 2012).

Para este estudio se utilizaron solamente las muestras de las personas de quienes se tenía conocimiento sobre su presencia o ausencia de diabetes.

#### 2. Evaluación inmunohistoquímica

Se evaluó la expresión de cinco proteínas (CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1) en las muestras de biopsias quirúrgicas en parafina de los casos de cáncer de mama. En el Cuadro 3 se puede observar el número de muestras que se contaba para cada proteína, como también todas las especificaciones del anticuerpo primario utilizado. Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Dako. Cuando no sea este el caso, se especificará el fabricante. Asimismo, se utilizó el protocolo de dicho fabricante, con algunas modificaciones según se detalla a continuación.

Cuadro 3. Información de los anticuerpos detectados

Anticuerpo	Muestras	Origen del anticuerpo	Clonalidad	Dilución	Tiempo DAB (seg)	Control positivo	Fabricante	Número de catálogo
CD39	106	Conejo	Policlonal	1:400	60	Placenta	Sigma	HPA014067
CD73	111	Ratón	Monoclonal	1:2000	30	Pulmón	abcam	ab91086
PPP1R3C	115	Conejo	Policlonal	1:100	60	Corazón	Novus bio	NBP1-87236
PD-1	111	Ratón	Monoclonal	1:100	60	Amígdala	abcam	ab52587
PD-L1	108	Conejo	Monoclonal	1:250	60	Amígdala	abcam	ab213524

Los portaobjetos con las muestras en parafina fueron desparafinados dejándolos en xileno durante la noche y posteriormente fueron rehidratados con etanol al 100%, al 95% y agua destilada; estos tres pasos por 3 minutos cada uno. Los portaobjetos fueron calentados a 95°C por 24 minutos en el buffer para la recuperación de antígenos. La peroxidasa endógena fue bloqueada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se preparó la dilución del anticuerpo primario como se muestra en el Cuadro 1, y este se dejó incubar durante 12 horas a 8°C. Posterior a la incubación, los portaobjetos fueron lavados y se incubaron con el anticuerpo secundario por 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó el anticuerpo secundario según la naturaleza del huésped del anticuerpo primario. Las muestras fueron teñidas con el kit de cromógeno y posteriormente fueron vueltas a teñir utilizando hematoxilina y la solución Tacha de BioCare Medical. Se dejaron secar las muestras y se cubrieron utilizando pegamento.

### 3. Puntuación de inmunohistoquímica

Las muestras se mandaron a un patólogo donde se les colocó una puntuación de 1-7 evaluando su intensidad como su distribución en la célula. Se combinó la puntuación de intensidad y distribución para categorizar la tinción de inmunohistoquímica (IHC) para la expresión de proteínas. La intensidad recibió una puntuación de 0-3 si la tinción era negativa, débil, moderada o fuerte. La distribución recibió una puntuación de 0-4 si la distribución de la tinción era menor a 10%, 10-30%, 30-50%, 50-80% o 80-100% de células positivas. La suma de estos dos factores fue dividida en cuatro grupos: (i) negativo = 0-1, (ii) débil = 2-3, (iii) moderado = 4-5 y (iv) fuerte = 6-7, de acuerdo a los protocolos estándar para el análisis de IHC (Ridnour *et al.*, 2012).

#### 4. Consideraciones éticas

Durante el desarrollo de este estudio no se realizó ninguna recolección de muestras por lo que el estudio no tuvo contacto con sujetos humanos. Se trabajó con una base de datos donde las muestras estaban codificadas y no se tuvo contacto con información privada e identificable de los pacientes. Las muestras con las que se trabajó ya contaban con la autorización de la Junta de Revisión de la Universidad de Maryland (UMD protocolo # 0298229). La aprobación de la Junta de Revisión Institucional también se obtuvo en todas las instituciones donde se recolectaron las muestras (Centro Médico de Veteranos, Hospital Union Memorial, Centro Médico Mercy y Hospital Sinai). La recolección de las muestras también fue aprobada por la Oficina de Investigación de Sujetos Humanos del NIH (OHSR #2248) (Ridnour *et al.*, 2012).

## B. CULTIVO CELULAR

### 1. Diferenciación de 3T3-L1 a adipocitos

Se trabajó con la línea celular 3T3-L1 obtenida de American Type Culture Collection (ATCC). Se utilizó el medio DMEM con 10% de FBS para mantenerlas y se les cambió cada 2-3 días. Las células fueron mantenidas en un incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizó el kit de diferenciación de 3T3-L1 a adipocitos de Sigma Aldrich con número de catálogo DIF001. El cóctel de diferenciación, el medio para preadipocitos, el medio de diferenciación y el medio de mantenimiento se preparó como se indica en el protocolo de dicho kit. Así mismo, se siguió el procedimiento establecido en la documentación del kit (Anexo A). El medio de mantenimiento fue elaborado utilizando 1µL de insulina por cada 1mL de DMEM con 10% de FBS. El medio se cambió cada 2-3 días y las células fueron mantenidas en un incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, 2014).

### 2. Verificación de la obtención de adipocitos con Oil Red-O

La naturaleza de los adipocitos fue verificada 10 días después de su diferenciación utilizando la tinción con Oil Red-O (Sigma-Aldrich O1391). Se preparó una solución fresca utilizando 6.0mL de la solución Oil Red O y 4mL de agua destilada. Esta mezcla fue filtrada utilizando un filtro estéril de 0.45µm para remover cualquier precipitado. Se preparó una solución fijadora utilizando 5.4mL de formaldehído al 37% y 14.6mL de PBS 1X para obtener una concentración final de 10%. Se removió completamente el medio de las células y se lavaron con PBS 1X. Se aspiró completamente el PBS y se añadió suficiente solución fijadora para cubrir las células. Las células se dejaron incubando a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego de la incubación

se lavaron 2 veces con PBS 1X y se aspiró completamente. Se añadió suficiente solución fresca de Oil Red-O para cubrir las células y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. La solución de tinción fue removida y se lavó 3 veces con PBS 1X. Se observó la tinción en el microscopio y fueron mantenidas en PBS a 4°C (Kang & Song, 2016).

### 3. Estimulación de 3T3-L1 y adipocitos con glucosa

La estimulación de fibroblastos y adipocitos con glucosa se realizó de la misma manera. Se utilizaron platos de 6 pocillos donde se colocaron  $1 \times 10^5$  células en cada pocillo en el medio de mantenimiento respectivo. Se dejaron incubando por 24 horas para permitir la adherencia al plato. Posteriormente se removió el medio de mantenimiento y se agregó medio DMEM alto en glucosa con una concentración de 25mM y medio DMEM bajo en glucosa con una concentración de 5.5mM. La estimulación de ambos tipos de células se realizó sin añadir FBS al medio. Las placas se incubaron por 48 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar las 48 horas de tratamiento se recolectó el medio acondicionado de la estimulación con alta y baja glucosa. Se centrifugó el medio acondicionado a 3000g por 5 minutos y el sobrenadante se almacenó a -80°C.

### 4. Proteome Profiler™ Array

Se utilizó el Proteome Profiler™ Array de Bio-techné® para analizar la matriz de 36 citoquinas humanas en el medio acondicionado. Se siguió el protocolo de dicho ensayo con catálogo número ARY005B (Anexo B). Las imágenes de la matriz fueron fotografiadas y procesadas con el equipo ChemiDoc™ MP de Bio-Rad. Para analizar las imágenes se utilizó el software Image Lab™ 6.0.1 de Bio-Rad.

### 5. Ensayo de proliferación utilizando CellTiter-Blue®

Este ensayo se realizó con las células cancerígenas MDA MB175 y ZR7530 obtenidas de ATCC. Se utilizó un plato de 96 pocillos donde se colocaron 5,000 células en cada pocillo con 100µL de medio RPMI con 10% de FBS. Se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para permitir la adherencia al plato. Posteriormente se removió el medio de mantenimiento y se agregó 100µL de medio acondicionado. Después de 24 horas de exposición, la proliferación fue estimada añadiendo 20µL de CellTiter-Blue® del ensayo de viabilidad Promega (Ref G8081). Se dejó incubando por 2 horas y se utilizó el equipo FLUOstar Omega de BMG Labtech para medir la fluorescencia a 544/590nm.

## C. ANÁLISIS DE DATOS

### 1. Diferencia de la expresión de proteínas en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos

Se utilizó la prueba no paramétrica Wilcoxon para determinar si existe una diferencia de expresión de los 5 marcadores en tumores mamarios de personas diabéticas y no diabéticas. El análisis estadístico se realizó utilizando R i386 3.5.2 y GraphPad Prism 8. Se rechazó la hipótesis nula si el valor p es menor que alfa de 0.05.

#### a. Hipótesis nula

No existe diferencia significativa en la expresión de los marcadores en los tumores de mama de mujeres con diabetes en comparación a las mujeres sin diabetes.

#### b. Hipótesis alternativa

Existe diferencia significativa en la expresión de los marcadores en los tumores de mama de mujeres con diabetes en comparación a las mujeres sin diabetes.

### 2. Proliferación de células cancerígenas

Según la normalidad de cada set de datos se utilizó la prueba T de Welch o la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar si hay una diferencia en la proliferación de células cancerígenas al tratarlas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa. El número de muestra para cada medio acondicionado fue de 12. El análisis estadístico se realizó utilizando R i386 3.5.2 y GraphPad Prism 8. Se rechazó la hipótesis nula si el valor p es menor que alfa de 0.05.

#### a. Hipótesis nula

No existe diferencia significativa en la proliferación de células cancerígenas al tratarlas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa.

#### b. Hipótesis alternativa

Existe diferencia significativa en la proliferación de células cancerígenas al tratarlas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa.

### 3. Determinación de citoquinas presentes en medio acondicionado

Debido al bajo número de réplicas ( $n=2$ ), no se pudo realizar ninguna prueba estadística. Se calculó la razón de cambio de las citoquinas liberadas en alta glucosa y baja glucosa (alta glucosa/baja glucosa) tanto para fibroblastos como para adipocitos. Para una mayor secreción de citoquinas en alta glucosa se consideró una razón de cambio mayor o igual a 1.5. Por otro lado, para una menor secreción de citoquinas en alta glucosa se consideró una razón de cambio menor o igual a 0.5.

## VI. RESULTADOS

### A.LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CD39, CD73 Y PD-1 ES MAYOR EN TUMORES MAMARIOS DE PACIENTES DIABÉTICOS

Se utilizó inmunohistoquímica con el fin de determinar si existe una diferencia de expresión de las proteínas CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1 en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos. En el Cuadro 4 se encuentran los valores P de la expresión de las 5 proteínas mencionadas anteriormente. Las proteínas CD39, CD73 y PD-1 poseen un valor P menor a 0.05, lo cual indica que si existe una diferencia significativa en la expresión de estas proteínas en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos.

Cuadro 4. Valor P de la expresión de CD39, CD73, PPP1R3C, PD-1 y PD-L1 en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos

<b>Antígeno</b>	<b>CD39</b>	<b>CD73</b>	<b>PPP1R3C citoplasmático</b>	<b>PPP1R3C nuclear</b>	<b>PD-1</b>	<b>PD-L1</b>
<b>Valor P</b>	0.002053*	0.01703*	0.8489	0.5081	0.0187*	0.3747

\*El valor P es menor a 0.05, existe una diferencia significativa en la expresión de las proteínas en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos.

\*\*Todos los datos fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica Wilcox.

En la Figura 7 se muestra que la expresión de CD39 es mayor en tumores mamarios de pacientes diabéticos ( $p = 0.002$ ) en comparación a pacientes no diabéticos. Este comportamiento se repite al evaluar la expresión de CD73 (Figura 8,  $p = 0.017$ ) y con PD-1 (Figura 9,  $p = 0.019$ ). Por otro lado, la expresión para el resto de proteínas en tumores mamarios evaluados, no existe una diferencia significativa entre pacientes diabéticos y no diabéticos



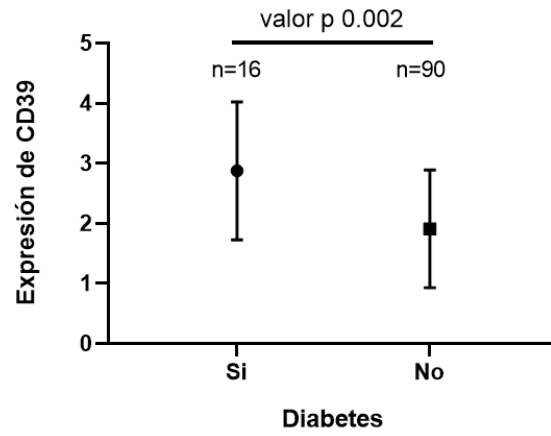


Figura 7. Sobreexpresión de CD39 en tumores mamarios de pacientes diabéticos

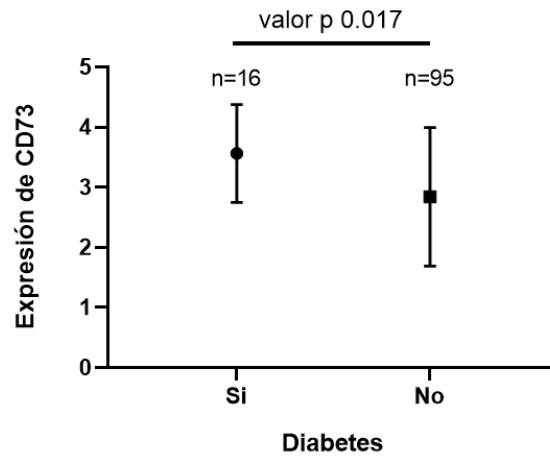


Figura 8. Sobreexpresión de CD73 en tumores mamarios de pacientes diabéticos

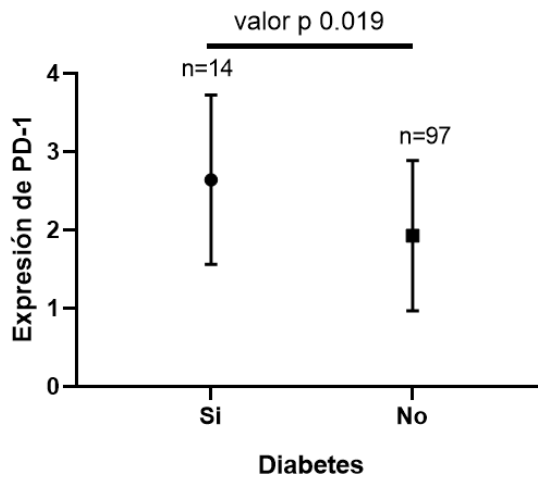


Figura 9. Sobreexpresión de PD-1 en tumores mamarios de pacientes diabéticos

## B. MEDIO ACONDICIONADO ALTO EN GLUCOSA PROMUEVE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS LÍNEAS MDA MB175 Y ZR7530

Se utilizó un ensayo de proliferación con el fin de determinar si al tratar células cancerígenas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa se aumentaba o disminuía la proliferación de dichas células. En el Cuadro 5 se muestra marcado con un (\*) los valores P menores a 0.05. Al ser menores a este valor, esto indica que si existe una diferencia significativa en la proliferación de las células cancerígenas al ser tratadas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa.

Cuadro 5. Valor P de la proliferación de células cancerígenas al ser tratadas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa por 24 horas

Línea celular	Medio acondicionado		
	Control	Fibroblastos	Adipocitos
MDA MB175	0.4634	0.01128*	1.926 x10 <sup>-5</sup> *
ZR7530	0.03582*	0.5732	0.002869*

\*El valor P es menor a 0.05, existe diferencia significativa en la proliferación de células cancerígenas al tratarlas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa.

\*\*Según la normalidad de cada set de datos se utilizó la prueba T de Welch o la prueba no paramétrica de Wilcox.

En la Figura 10 se muestra que la línea celular MDA MB175 presenta una diferencia significativa de proliferación en los medios acondicionados obtenidos de fibroblastos y adipocitos. En el eje Y se muestra la fluorescencia, la cual es directamente proporcional a la proliferación celular. En el eje X se muestran los distintos medios acondicionados en los que se cultivaron las células cancerígenas. Con esta línea celular se obtuvo la tendencia esperada, ya que se obtuvo una mayor proliferación celular en el medio acondicionado alto en glucosa tanto de fibroblastos como de adipocitos.

Por otro lado, tal y como se muestra en la Figura 11, la línea celular ZR7530 presentó diferencia significativa de proliferación al ser cultivada con el medio acondicionado alto y bajo en glucosa obtenido de los adipocitos. Asimismo, también mostró una diferencia significativa en el experimento control, lo cual no se esperaba que fuera así, debido a que este medio no contenía citoquinas.

### Proliferación de MDA MB175 después de 24h

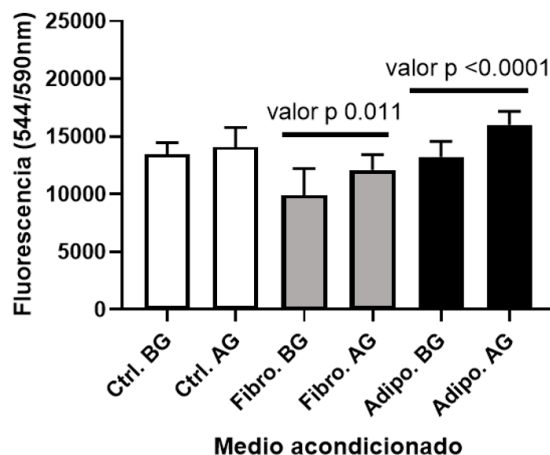


Figura 10. Proliferación de línea celular cancerígena MDA MB175 después de 24 horas al tratarlas con distintos medios acondicionados

Leyenda: Ctrl.BG= Control de Baja Glucosa, Ctrl.AG= Control de Alta Glucosa, Fibro.BG= Medio acondicionado de Fibroblastos en Baja Glucosa, Fibro.AG= Medio acondicionado de Fibroblastos en Alta Glucosa, Adipo.BG= Medio acondicionado de Adipocitos en Baja Glucosa, Adipo.AG= Medio acondicionado de Adipocitos en Alta Glucosa.

### Proliferación de ZR7530 después de 24h

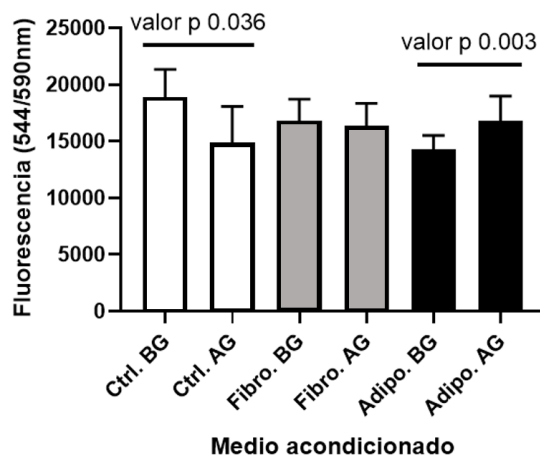


Figura 11. Proliferación de línea celular cancerígena ZR7530 después de 24 horas al tratarlas con distintos medios acondicionados

Leyenda: Ctrl.BG= Control de Baja Glucosa, Ctrl.AG= Control de Alta Glucosa, Fibro.BG= Medio acondicionado de Fibroblastos en Baja Glucosa, Fibro.AG= Medio acondicionado de Fibroblastos en Alta Glucosa, Adipo.BG= Medio acondicionado de Adipocitos en Baja Glucosa, Adipo.AG= Medio acondicionado de Adipocitos en Alta Glucosa.

## C.ALTA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA DISMINUYE LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS EN ADIPOCITOS Y FIBROBLASTOS

Se utilizó el ensayo comercial Proteome Profiler™ Array de Bio-techne® para analizar la matriz de 36 citoquinas humanas en los medios acondicionados obtenidos al estimular fibroblastos y adipocitos con medios alto y bajo en glucosa. En la Figura 12 se muestra un mapa de calor de la expresión de las citoquinas presentes en los medios acondicionados, donde la intensidad de azul indica una mayor secreción y una menor intensidad indica una menor secreción de citoquinas.

Se puede observar que el medio bajo en glucosa obtenido de fibroblastos presenta una mayor secreción de citoquinas, en comparación al medio alto en glucosa obtenido de fibroblastos. Este comportamiento se presenta también en medios obtenidos de adipocitos, sin embargo, la diferencia en la expresión es más evidente. En el medio acondicionado con alta glucosa hay una disminución importante de la secreción de citoquinas. Los valores numéricos de estas secreciones dadas en razón de cambio (alta glucosa/baja glucosa) se encuentran en el Cuadro 7 del Anexo C.

En el caso del medio acondicionado alto en glucosa obtenido de adipocitos, las citoquinas que se vieron menos secretadas fueron principalmente CCL5, CXCL11, G-CSF, GM, CSF, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-27, IL-12, IL-21 y TREM-1. En el caso del medio acondicionado obtenido de fibroblastos, solo se encontraron citoquinas que estaban más secretadas en alta glucosa, las cuales principalmente son MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$  e IL-2.

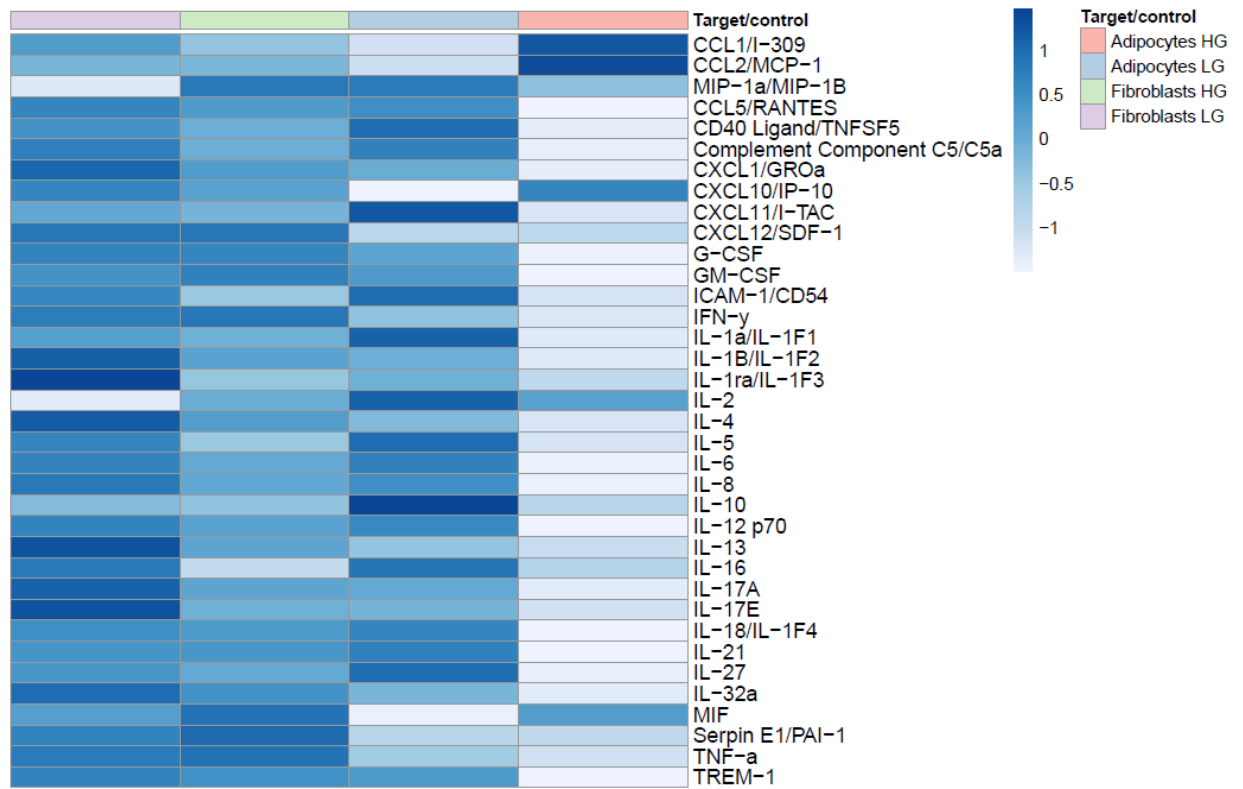


Figura 12. Secreción de citoquinas por fibroblastos y adipocitos en medios con baja (LG) y alta (HG) glucosa

Leyenda: El replicado de detección de cada citoquina fue de 2. El nivel de citoquina mostrado es el promedio de los 2 cultivos.

## VII. DISCUSIÓN

Muchos tumores mamarios están infiltrados por células del sistema inmune, como los son las células T citotóxicas y las Natural Killer (NK); sin embargo, no ocurre una respuesta antitumoral efectiva. En los últimos años se ha conocido que las células cancerígenas tienen la capacidad de evadir al sistema inmune por medio de distintos mecanismos. Esto genera que exista una mayor proliferación celular y disminución en la tasa de supervivencia. Por otro lado, se sabe que la tercera parte de los pacientes con cáncer de mama también padecen diabetes y que debido a padecer estas dos patologías, estas mujeres tienen un 16% más de riesgo de mortalidad por cáncer de mama en comparación a las mujeres que no padecen diabetes (Shao *et al.*, 2018). A continuación se discuten algunos de los mecanismos biológicos que generan que la diabetes afecte de una forma negativa el pronóstico del cáncer de mama. Entre estos mecanismos se encuentra el cambio de expresión de proteínas de membrana en células cancerígenas, la regulación positiva de múltiples reguladores negativos de la respuesta inmune y la liberación de citoquinas por parte de células adyacentes al tumor.

### **Diferencia de expresión de proteínas en tumores mamarios de pacientes diabéticos y no diabéticos**

Estudios anteriores indican que proteínas de membrana como CD39 y CD73 están sobre expresadas en algunos tipos de cáncer (Bastid *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2007). En las Figuras 7 y 8 se pudo observar que CD39 y CD73, respectivamente, están mayormente expresadas en células cancerígenas mamarias de mujeres diabéticas. CD39 y CD73 son dos proteínas de membrana ectonucleotidasas capaces de convertir el ATP extracelular en adenosina extracelular. CD39 convierte ATP en AMP, siendo éste el paso limitante y posteriormente CD73 convierte el AMP en adenosina (Antonioni *et al.*, 2013). Normalmente el ATP se encuentra adentro de la célula ya que es utilizado como energía para llevar a cabo ciertos procesos como biosíntesis, transporte activo y motilidad celular. Sin embargo, en respuesta a algún daño o estrés, el ATP es liberado y actúa como señal para atraer a los fagocitos al sitio de inflamación y así eliminar a las células dañadas. Esta serie de pasos también ocurre cuando hay un tumor. La liberación de ATP genera una respuesta pro-inflamatoria provocando la liberación de citoquinas que inducen la inflamación. Cuando el ATP se encuentra en el espacio extracelular, éste es convertido a adenosina por medio de la maquinaria CD39/CD73 de las células cancerígenas (Bono, Fernández, Flores-Santibáñez, Roseblatt, & Sauma, 2015). Un ambiente hiperglucémico puede contener mayor daño en los tejidos por lo que va a existir una mayor liberación de ATP en el espacio extracelular. Por esto mismo, las células cancerígenas de una persona diabética deben de expresar mayor cantidad de proteínas CD39 y CD73 para poder convertir todo el ATP en adenosina. Por el contrario, la acumulación de adenosina extracelular tiene una función anti-inflamatoria ya que inhibe a las células inmunes activas. El objetivo de esto es prevenir daño adicional al tejido ya que funciona para reportar el exceso de tejido dañado. La concentración extracelular de adenosina depende de tres factores: el equilibrio

entre su liberación por las células, la recaptación por los procesos bidireccionales de transporte de adenosina y su generación por medio de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Bono *et al.*, 2015).

Debido a la alta presencia de las proteínas CD39 y CD73 en la superficie de las células cancerígenas, los tumores son muy eficientes para convertir el ATP en adenosina. (Allard *et al.*, 2017). En este estudio se pudo observar que las células cancerígenas mamarias de una persona diabética poseen aún más expresión de estas dos proteínas en comparación a una persona no diabética, lo cual genera una mayor concentración de adenosina extracelular. Como se mencionó anteriormente, esta adenosina extracelular genera un ambiente de inmunosupresión que promueve el desarrollo y progresión del cáncer. Además, aumenta el crecimiento tumoral y favorece la infiltración a otros sitios. El complejo CD39/CD73 participa en el proceso donde el tumor escapa del sistema inmune ya que inhibe la activación, expansión clonal y acción de las células T específicas de tumores; especialmente las T colaboradoras y T citotóxicas. Por otro lado, la adenosina promueve que los macrófagos tipo 1 se conviertan en macrófagos promotores de tumores tipo II. Por lo mencionado anteriormente, CD39 y CD73 son las principales enzimas metabolizadoras de nucleótidos que regulan la inmunidad e inflamación (Antonioli *et al.*, 2013).

En estudios anteriores se encontró que PD-1 se encuentra expresado en la superficie solo de las células inmunes, como las células T y B. Sin embargo, estudios recientes han revelado que esta proteína también se ha encontrado expresada en algunos tipos de cáncer. Esto lo han encontrado por medio del reanálisis de datos de proteómica y transcriptómica (Yao *et al.*, 2018). En este estudio se comprobó por medio de inmunohistoquímica que las células del cáncer de mama expresan PD-1 en su superficie. Además, se pudo ver que las células cancerígenas mamarias de una persona diabética poseen una mayor expresión de PD-1 en comparación a una persona que no es diabética; tal y como se muestra en la Figura 9.

El rol de PD-1 en el cáncer de mama todavía no se conoce a profundidad. Esto es debido a que la expresión de PD-1 en células tumorales ha sido descubierta muy recientemente y no ha podido ser caracterizada. En estudios anteriores se ha visto que la función de PD-1 no es la misma en todos los tipos de cáncer. Se ha visto que en melanoma y en cáncer hepático PD-1 juega un rol oncogénico y promueve la formación de tumores, por lo que al tratar a los pacientes con una terapia anti-PD-1, esto ayuda a combatir el cáncer. Por otro lado, cuando el cáncer de pulmón se trata con la misma terapia anti-PD-1, ese bloqueo genera que el cáncer se promueva y haya crecimiento tumoral (Yao *et al.*, 2018). Según un estudio reciente realizado en cáncer de mama de ratón, se pudo observar que al tratarlos con anti-PD-1, esto revertía la inmunosupresión y permitía la eliminación del tumor (Kaplanov *et al.*, 2019). Esto indica que PD-1 en el cáncer de mama tiene una función oncogénica. La expresión de PD-1 en las células cancerígenas mamarias le permite unirse a PD-L1 de otra célula cancerígena y promover la proliferación tumoral. El mecanismo por el que se lleva a cabo esto no se conoce a profundidad, pero se cree que la unión activa la señalización por mTOR. Esto se lleva a cabo

ya que mTOR es una kinasa que regula el crecimiento celular; por lo tanto, al activarse se promueve el crecimiento tumoral y metástasis (Yao *et al.*, 2018).

### **Proliferación de células cancerígenas al tratarlas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa**

En estudios anteriores se ha determinado que las células adyacentes a un tumor juegan un rol activo en la progresión tumoral (Maziveyi & Alahari, 2015). El tipo de célula más abundante que rodean a las células cancerígenas mamarias son las que componen al tejido adiposo mamario, las cuales principalmente son adipocitos maduros y progenitores, como lo son los fibroblastos. Se ha observado claramente que los fibroblastos relacionados al cáncer son modificadores importantes de la progresión del cáncer de mama. El tejido adiposo mamario no solamente afecta a la progresión tumoral sino que también a la respuesta a los tratamientos (Wang *et al.*, 2012).

Se utilizó un ensayo de proliferación con el fin de determinar si al tratar células cancerígenas con medio acondicionado alto y bajo en glucosa aumentaba o disminuía la proliferación de las mismas. Se esperaba que, al tratar las células con medio acondicionado alto en glucosa, esto aumentara la proliferación celular. En la Figura 10 se puede observar que ocurrió una mayor proliferación de células cancerígenas MDA MB175 al ser cultivadas en el medio acondicionado alto en glucosa obtenido tanto de adipocitos como de fibroblastos. Esta línea celular mostró la tendencia esperada, según la literatura (Wang *et al.*, 2012). Por el contrario, en la Figura 11 se puede ver que la línea celular ZR7530 mostró la tendencia esperada solamente en los medios acondicionados obtenidos de adipocitos. A lo largo de los ensayos se notó que la línea celular MDA MB175 crecía más rápido que la línea ZR7530. Esta diferencia en la velocidad de crecimiento pudo afectar en el ensayo debido a que para MDA MB175 si fueron suficiente 24 horas para observar una tendencia. Por el contrario, debido a que la línea celular ZR7530 crece más despacio, las 24 horas del ensayo no fueron suficiente para observar una tendencia.

En este estudio se pudo determinar que la línea celular MDA MB175 mostró una mayor proliferación en un ambiente hiperglucémico. Esto se debe a que los fibroblastos y adipocitos cambian su comportamiento al ser estimulados con alta glucosa y pueden secretar mayor o menor cantidad de citoquinas que impactan en la proliferación de las células cancerígenas. Por esto mismo, el último ensayo consistió en analizar las citoquinas que fueron secretadas por los adipocitos y fibroblastos al estimularlos con alta y baja glucosa para así entender por qué razón existe una mayor proliferación de células cancerígenas en un ambiente hiperglucémico.



### **Determinación de citoquinas presentes en medio acondicionado alto y bajo en glucosa**

Las citoquinas que secretan las células circundantes a un tumor pueden influir en el comportamiento de las células cancerígenas y células del sistema inmune. Por esto mismo, se realizó un análisis de citoquinas para encontrar cuáles estaban siendo notablemente alteradas en un ambiente de diabetes. En la Figura 12 se puede observar un mapa de calor de la expresión de citoquinas en los cuatro distintos medios acondicionados. Lo primero que se puede observar es que los adipocitos fueron más alterados en un ambiente de diabetes en comparación a los fibroblastos. En el caso de los fibroblastos, la secreción de citoquinas permaneció muy parecida en el medio de alta glucosa y baja glucosa. Las únicas citoquinas que se encontraron más secretadas en alta glucosa fueron MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$  e IL-2. La primera, respectivamente, tiene como función principal promover la infiltración de macrófagos. Si los macrófagos infiltrados son Tipo 1, estos van a ser capaces de combatir las células cancerígenas. Por el contrario, si son Tipo 2, podrían aumentar la progresión de células cancerígenas debido a su naturaleza de promotores de tumor (T. T. Chang, Lin, & Chen, 2019). La segunda participa del crecimiento y activación celular (S. Waters, Perry, Han, Bielekova, & Gedeon, 2018). Por el contrario, los fibroblastos no disminuyeron su secreción de citoquinas en el ambiente hiperglucémico.

En el caso de los adipocitos, en la Figura 12 se puede observar claramente que existe una menor secreción de citoquinas en el medio alto en glucosa en comparación al medio bajo en glucosa. En el Cuadro 6 se puede observar la función principal de las citoquinas que fueron mayor o menormente secretadas en un ambiente hiperglucémico. Es evidente que los adipocitos disminuyeron la secreción de diversas citoquinas en lugar de aumentarla. Se puede ver también que la mayoría de citoquinas que se dejaron de liberar tienen un papel importante en atraer a células del sistema inmune.

Cuadro 6. Citoquinas alteradas en ambiente hiperglucémico

Fibroblastos					
Up-regulated en hiperglucemia			Down-regulated en hiperglucemia		
Citoquina	Función	Cita	Citoquina	Función	Cita
MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$	Pro-inflamatoria. Induce producción de ROS.	(T. T. Chang <i>et al.</i> , 2019)			
IL-2	Promueve el crecimiento de linfocitos	(Waters, Perry, Han, Bielekova, & Gedeon, 2018)			
Adipocitos					
Up-regulated en hiperglucemia			Down-regulated en hiperglucemia		
Citoquina	Función	Cita	Citoquina	Función	Cita
CCL1/I-309	Pro-inflamatoria. Apoptosis y angiogénesis.	(Denis <i>et al.</i> , 2012)	CCL5/RANTES	Inflamatoria. Induce migración de células cancerígenas mamarias.	(Vaday, Peehl, Kadam, & Lawrence, 2006)
CCL2/MCP-1	Atrae monocitos y macrófagos.	(Taghavi <i>et al.</i> , 2019)	Complement Component C5/C5a	Inflamatoria. Promueve el reclutamiento y activación de neutrófilos y monocitos.	(Horiuchi & Tsukamoto, 2016)
CXCL10/IP-10	Activa linfocitos T, NK, células B, macrófagos y células dendríticas.	(Liu, Guo, & Stiles, 2011)	CXCL11/I-TAC	Atrae a linfocitos T, células B y NK.	(Petkovic, Moghini, Paoletti, Ugucioni, & Gerber, 2004)
MIF	Inflamatoria, respuesta inmune y crecimiento tumoral.	(Nishihira, 2000)	G-CSF	Participa en la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de los granulocitos.	(Roberts, 2005)
			GM-CSF	Induce activación de monocitos y macrófagos.	(Ushach & Zlotnik, 2016)
			IL-1 $\beta$ /IL-1F2	Inflamatoria. Participa en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis.	(Mattii <i>et al.</i> , 2013)
			IL-5	Mantiene las funciones de las células B y eosinófilos.	(Takatsu, 2011)
			IL-6	Inflamatoria. Diferenciación de células T y producción de anticuerpos.	(Tanaka, Narazaki, & Kishimoto, 2014)
			IL-8	Inflamatoria. Atrae leucocitos.	(David, Dominguez, Hamilton, & Palena, 2016)

Adipocitos					
Up-regulated en hiperglucemia			Down-regulated en hiperglucemia		
Citoquina	Función	Cita	Citoquina	Función	Cita
			IL-10	Anti-inflamatoria. Previene patologías autoinmunes.	(S. S. Iyer & Cheng, 2012)
			IL-12 p70	Desarrollo de Th1	(Zundler & Neurath, 2015)
			IL-18/IL-1F4	Inflamatoria. Relacionada a IL-12.	(Biet, Locht, & Kremer, 2002)
			IL-21	Modula las funciones de células T, B y NK. Es un agente anti-tumoral.	(M. Pelletier & Girard, 2007)
			IL-27	Anti-inflamatorio. Activa células T CD8+ y NK.	(Abdalla, Li, Xie, & Xie, 2015)
			IL-32 $\alpha$	Inflamatoria. Implicado en el desarrollo tumoral.	(Yan <i>et al.</i> , 2018)
			TREM-1	Inflamatorio.	(Carla Bosco, Raggi, & Varesio, 2017)

Los ensayos de cultivo celular contaron con una limitante. Los adipocitos utilizados en los ensayos fueron diferenciados *in vitro* a partir de fibroblastos. La morfología de éstos eran células que adentro poseían varias gotas de lípidos. Por el contrario, la morfología del tejido adiposo mamario normal consiste en que cada célula contiene solamente una gota lipídica. A la presencia de varias gotas de lípidos se le denomina una diferenciación incompleta. Esto conlleva a que exista una menor expresión de genes y secreción de citoquinas (Wang *et al.*, 2012).

## VIII. CONCLUSIONES

- Las personas con cáncer de mama y diabetes poseen una mayor expresión de las proteínas CD39 y CD73, las cuales participan en la generación de adenosina extracelular, la cual está asociada a una supresión del sistema inmune.
- Las células cancerígenas de una persona diabética contienen mayor expresión de PD-1, lo cual está asociado a la progresión de células cancerígenas.
- Existe una tendencia de mayor proliferación de células cancerígenas al ser incubadas con medio acondicionado alto en glucosa obtenido tanto de fibroblastos como de adipocitos.
- Un ambiente de diabetes suprime la liberación por adipocitos de citoquinas que participan en atraer células del sistema inmune.

## IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un ensayo de migración de células cancerígenas para complementar el de proliferación debido a que las citoquinas liberadas por adipocitos y fibroblastos al ser tratados con alta glucosa pueden influenciar más en la migración de las células cancerígenas que en su proliferación.
- Se recomienda aumentar el número de muestras en el ensayo de proliferación de células cancerígenas para así tener resultados más representativos.
- Para el ensayo de proliferación de células cancerígenas se recomienda incubar por más tiempo la línea celular ZR7530 debido a que ésta se divide más lentamente y 24 horas de incubación no fueron suficientes para observar una tendencia.
- Se recomienda aumentar el número de muestras en el ensayo de análisis de citoquinas para poder aplicar una prueba estadística.
- Se recomienda realizar análisis individuales de citoquinas que se observaron notablemente alteradas para validar los resultados.

## X. LITERATURA CITADA

- Abdalla, A. E., Li, Q., Xie, L., & Xie, J. (2015, January 5). Biology of il-27 and its role in the host immunity against mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10464>
- Adekola, K., Rosen, S. T., & Shanmugam, M. (2012, November). Glucose transporters in cancer metabolism. *Current Opinion in Oncology*. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e328356da72>
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews*, 276(1), 121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- American Association for Cancer Research., L. M., International Cancer Research Foundation., G., William H. Donner Foundation., B., Koeppen, H., Sliwkowski, M. X., Schwall, R. H., & Ross, S. (2005). *Cancer research : the official organ of the American Association for Cancer Research, Inc. Cancer Research* (Vol. 65). Waverly Press. Retrieved from [http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/9\\_Supplement/253.2](http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/9_Supplement/253.2)
- American Cancer Society. (2018). *Breast Cancer Risk Factors 12*. Retrieved from <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>
- Antonlioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 19(6), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>
- ATCC. (2019a). MDA-MB-175-VII ATCC ® HTB-25™ Homo sapiens mammary gland; br. Retrieved March 30, 2019, from <https://www.atcc.org/products/all/HTB-25.aspx>
- ATCC. (2019b). ZR-75-30 ATCC ® CRL-1504™ Homo sapiens mammary gland/breast. Retrieved March 30, 2019, from <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1504.aspx#culturemethod>
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Bastid, J., Regairaz, A., Bonnefoy, N., Dejou, C., Giustiniani, J., Laheurte, C., ... Eliaou, J.-F. (2015). Inhibition of CD39 Enzymatic Function at the Surface of Tumor Cells Alleviates Their Immunosuppressive Activity. *Cancer Immunology Research*, 3(3), 254–265. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0018>
- Beveridge, N. E. R., Fletcher, H. A., Hughes, J., Pathan, A. A., Scriba, T. J., Minassian, A., ... McShane, H. (2008). A comparison of IFN $\gamma$  detection methods used in tuberculosis vaccine trials. *Tuberculosis*, 88(6), 631–640. <https://doi.org/10.1016/J.TUBE.2008.06.005>
- Bièche, I., & Lidereau, R. (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 14(4), 227–251. <https://doi.org/10.1002/gcc.2870140402>

- Biet, F., Locht, C., & Kremer, L. (2002). Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0307-1>
- Bochet, L., Lehu Ed E, C., Ephanie Dauvillier, S., Wang, Y. Y., Eatrice Dirat, B., Laurent, V., ... Muller, C. (2013). Adipocyte-Derived Fibroblasts Promote Tumor Progression and Contribute to the Desmoplastic Reaction in Breast Cancer. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>
- Bono, M. R., Fernández, D., Flores-Santibáñez, F., Roseblatt, M., & Sauma, D. (2015). CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters*, 589(22), 3454–3460. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2015.07.027>
- BOTA, M., AUTIER, P., & BOYLE, P. (2018). The Risk of Breast Cancer in Women with Diabetes. *Diabetes*, 67(Supplement 1), 180–OR. <https://doi.org/10.2337/db18-180-or>
- Boyd, N. F., Guo, H., Martin, L. J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., ... Yaffe, M. J. (2007). Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 356(3), 227–236. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062790>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Carla Bosco, M., Raggi, F., & Varesio, L. (2017). Therapeutic Potential of Targeting TREM-1 in Inflammatory Diseases and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 22(41), 6209–6233. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160826110539>
- Cauley, J. A., Lucas, F. L., Kuller, L. H., Stone, K., Browner, W., & Cummings, S. R. (1999). Elevated Serum Estradiol and Testosterone Concentrations Are Associated with a High Risk for Breast Cancer. *Annals of Internal Medicine*, 130(4\_Part\_1), 270. [https://doi.org/10.7326/0003-4819-130-4\\_Part\\_1-199902160-00004](https://doi.org/10.7326/0003-4819-130-4_Part_1-199902160-00004)
- Chang, T. H., & Polakis, S. E. (1978). Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. Effect of insulin and indomethacin on the levels of insulin receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(13), 4693–4696. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/659443>
- Chang, T. T., Lin, L. Y., & Chen, J. W. (2019). Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  improves endothelial progenitor cell function and ischemia-induced angiogenesis in diabetes. *Angiogenesis*, 22(1), 53–65. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9636-3>
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- David, J. M., Dominguez, C., Hamilton, D. H., & Palena, C. (2016, September 1). The IL-8/IL-8R axis: A double agent in tumor immune resistance. *Vaccines*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/vaccines4030022>
- de Jong, M. M., Nolte, I. M., te Meerman, G. J., A van der Graaf, W. T., Oosterwijk, J. C., Kleibeuker, J. H., ... E de Vries, E. G. (n.d.). *Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer*

- susceptibility*. Retrieved from [www.jmedgenet.com](http://www.jmedgenet.com)
- Denis, C., Deiteren, K., Mortier, A., Tounsi, A., Fransen, E., Proost, P., ... Lambeir, A. M. (2012). C-terminal clipping of chemokine ccl11/i-309 enhances ccr8-mediated intracellular calcium release and anti-apoptotic activity. *PLoS ONE*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034199>
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., ... Muller, C. (2011). Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Research*, *71*(7), 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>
- Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I., & Emuwohochere, R. (2017). Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, *3*(2), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.06.002>
- Giordano, S. H., Hortobagyi, G. N., Kau, S.-W. C., Theriault, R. L., & Bondy, M. L. (2005). Breast cancer treatment guidelines in older women. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(4), 783–791. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.175>
- Goueli, S. A., & Hsiao, K. (2018). Abstract 3871: Monitoring CD73 and CD39 ectonucleotidase activities and their modulation by antibodies and small molecules inhibitors. *Cancer Research*, *78*(13 Supplement), 3871–3871. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-3871>
- Graham, C., Hewitson, R., Pagliuca, A., & Benjamin, R. (2018). Cancer immunotherapy with CAR-T cells - Behold the future. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, *18*(4), 324–328. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-4-324>
- Hilmenyuk, T., Kallert, S., Klar, R., Hinterwimmer, L., Schell, M., Ark, M. Van, ... Jaschinski, F. (2018). Abstract 5909: Inhibition of Cd39 and Cd73 by 3<sup>rd</sup>-generation antisense oligonucleotides to improve immunity against tumors. *Cancer Research*, *78*(13 Supplement), 5909–5909. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-5909>
- Horiuchi, T., & Tsukamoto, H. (2016). Complement-targeted therapy: development of C5- and C5a-targeted inhibition. *Inflammation and Regeneration*, *36*(1). <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0013-6>
- Hudu, S. A., Alshrari, A. S., Syahida, A., & Sekawi, Z. (2016, March 1). Cell culture, technology: Enhancing the culture of diagnosing human diseases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15837.7460>
- Invitrogen. (2017). *CELL CULTURE BASICS Handbook Cell Culture Basics Cell Culture Basics Cell Culture Basics* / i. Retrieved from [www.invitrogen.com/cellculturebasics](http://www.invitrogen.com/cellculturebasics)
- Iyer, A., Jeyalatha, S., & Sumbaly, R. (2015). DIAGNOSIS OF DIABETES USING CLASSIFICATION MINING TECHNIQUES. *International Journal of Data Mining & Knowledge Management Process (IJDKP)*, *5*(1). <https://doi.org/10.5121/ijdkp.2015.5101>
- Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, *32*(1), 23–63. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30>
- June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S., & Milone, M. C. (2018, March 23). CAR T



- cell immunotherapy for human cancer. *Science*. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aar6711>
- Kalvakolanu, D. V. (2019). The “Yin-Yang” of cytokines in cancer. *Cytokine*. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.12.013>
- Kaplanov, I., Carmi, Y., Kornetsky, R., Shemesh, A., Shurin, G. V, Shurin, M. R., ... Apte, R. N. (2019). Blocking IL-1 $\beta$  reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(4), 1361–1369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812266115>
- Knight, J., & Nigam, Y. (2017). Diabetes management 1: disease types, symptoms and diagnosis. *Nursing Times*, 4(113), 4. Retrieved from <http://cronfa.swan.ac.uk/Record/cronfa32919>
- Koyanagi, M., Kawakabe, S., & Arimura, Y. (2016). A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells. *Cytotechnology*, 68(4), 1489–1498. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9909-2>
- Lambert, J., Zarozinski, C., Johnson, J., Yan, Y., Rissin, D., Stadler, P., & Ball, A. (2019). Development of a high sensitivity 10-plex human cytokine assay using Simoa Planar Array technology. *The Journal of Immunology*, 202(1 Supplement).
- Lee, S. K., Moon, J. W., Lee, Y. W., Lee, J. O., Kim, S. J., Kim, N., ... Park, S.-H. (2015). The effect of high glucose levels on the hypermethylation of protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C (PPP1R3C) gene in colorectal cancer. *Journal of Genetics*, 94(1), 75–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25846879>
- Lee, S., Margolin, K., Lee, S., & Margolin, K. (2011). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 3(4), 3856–3893. <https://doi.org/10.3390/cancers3043856>
- Liao, S., Li, J., Wei, W., Wang, L., Zhang, Y., Li, J., ... Sun, S. (2011). Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 12(4), 1061–1065. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21790252>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016, March 1). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Linnoila, I., & Petrusz, P. (1984). Immunohistochemical techniques and their applications in the histopathology of the respiratory system. *Environmental Health Perspectives*, 56, 131–148. <https://doi.org/10.1289/ehp.8456131>
- Liu, M., Guo, S., & Stiles, J. K. (2011). The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncology Letters*, 2(4), 583–589. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.300>
- Louwman, W. J., Janssen-Heijnen, M. L. G., Houterman, S., Voogd, A. C., van der Sangen, M. J. C., Nieuwenhuijzen, G. A. ., & Coebergh, J. W. W. (2005). Less extensive treatment and inferior prognosis for breast cancer patient with comorbidity: A population-based study. *European Journal of Cancer*, 41(5), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.12.025>
- Mallick, A., & Taylor, S. (2019). Therapeutic potential of estradiol in treating breast cancer. *Breast Cancer*

- Management*, 8(2), BMT27. <https://doi.org/10.2217/bmt-2019-0013>
- Mattii, M., Ayala, F., Balato, N., Filotico, R., Lembo, S., Schiattarella, M., ... Balato, A. (2013). The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is crucial in human allergic contact dermatitis pathogenesis: the role of IL-1 family members. *Experimental Dermatology*, 22(12), 813–819. <https://doi.org/10.1111/exd.12272>
- Maziveyi, M., & Alahari, S. K. (2015, October 15). Breast cancer tumor suppressors: A special emphasis on novel protein nischarin. *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1395>
- Mazumdar, A., Poage, G. M., Shepherd, J., Tsimelzon, A., Hartman, Z. C., Den Hollander, P., ... Brown, P. H. (2016). Analysis of phosphatases in ER-negative breast cancers identifies DUSP4 as a critical regulator of growth and invasion. *Breast Cancer Research and Treatment*, 158(3), 441–454. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3892-y>
- Mukhopadhyay, R. (2015). Generations: Generating the 3T3 cell line, the oncogene hypothesis and horses. Retrieved March 28, 2019, from <http://www.asbmb.org/asbmbtoday/201501/Generations/3T3/>
- National Cancer Institute. (2018). Definición de inhibidor de puntos de control inmunitario - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute. Retrieved March 26, 2019, from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/inhibidor-de-puntos-de-control-inmunitario>
- Nishihira, J. (2000). Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Its Essential Role in the Immune System and Cell Growth. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 20(9), 751–762. <https://doi.org/10.1089/10799900050151012>
- Owora, A. H. (2018). Commentary: Diagnostic Validity and Clinical Utility of HbA1c Tests for Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 14(2), 196–199. <https://doi.org/10.2174/1573399812666161129154559>
- Pelletier, J., Bellot, G., Gounon, P., Lacas-Gervais, S., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2012). Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. *Frontiers in Oncology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00018>
- Pelletier, M., & Girard, D. (2007, October 22). Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. *TheScientificWorldJournal*. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.275>
- Petkovic, V., Moghini, C., Paoletti, S., Uguccioni, M., & Gerber, B. (2004). I-TAC/CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), 701–708. <https://doi.org/10.1189/jlb.1103570>
- Phelan, K., & May, K. M. (2015). Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. In *Current Protocols in Cell Biology* (Vol. 66, p. 1.1.1-1.1.22). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0101s66>
- Poff, A., Koutnik, A. P., Egan, K. M., Sahebjam, S., D'Agostino, D., & Kumar, N. B. (2019, June 1). Targeting the Warburg effect for cancer treatment: Ketogenic diets for management of glioma.

- Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.12.011>
- Posimo, J. M., Unnithan, A. S., Gleixner, A. M., Choi, H. J., Jiang, Y., Pulugulla, S. H., & Leak, R. K. (2014). Viability assays for cells in culture. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (83), e50645. <https://doi.org/10.3791/50645>
- Promega. (2016). *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Instructions for Use of Products G8080, G8081 and G8082*. Retrieved from [www.promega.com](http://www.promega.com)
- Punthakee, Z., Goldenberg, R., & Katz, P. (2018). 2018 Clinical Practice Guidelines Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome Diabetes Canada Clinical Practice Guidelines Expert Committee. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.10.003>
- R&D Systems. (2019). Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit ARY005B: R&D Systems. Retrieved March 29, 2019, from [https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-cytokine-array-kit\\_ary005b](https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-cytokine-array-kit_ary005b)
- Ramos-Vara, J. A. (2011). Principles and Methods of Immunohistochemistry. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 691, pp. 83–96). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5)
- Ridnour, L. A., Barasch, K. M., Windhausen, A. N., Dorsey, T. H., Lizardo, M. M., Yfantis, H. G., ... Wink, D. A. (2012). Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-mediated Akt activation. *PLoS One*, 7(9), e44081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044081>
- Roberts, A. W. (2005). G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, 23(1), 33–41. <https://doi.org/10.1080/08977190500055836>
- S. Waters, R., Perry, J. S. A., Han, S. P., Bielekova, B., & Gedeon, T. (2018). The effects of interleukin-2 on immune response regulation. *Mathematical Medicine and Biology*, 35(1), 79–119. <https://doi.org/10.1093/imammb/dqw021>
- Shao, S., Gill, A. A., Zahm, S. H., Jatoi, I., Shriver, C. D., McGlynn, K. A., & Zhu, K. (2018). Diabetes and Overall Survival among Breast Cancer Patients in the U.S. Military Health System. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 27(1), 50–57. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0439>
- Shen, G.-M., Zhang, F.-L., Liu, X.-L., & Zhang, J.-W. (2010). Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia. *FEBS Letters*, 584(20), 4366–4372. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.040>
- Smith, S. E., Mellor, P., Ward, A. K., Kendall, S., McDonald, M., Vizeacoumar, F. S., ... Anderson, D. H. (2017). Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. *Breast Cancer Research: BCR*, 19(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0855-0>
- Taghavi, Y., Hassanshahi, G., Kounis, N. G., Koniari, I., & Khorramdelazad, H. (2019). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in diabetic retinopathy: latest evidence and clinical considerations. *Journal of Cell Communication and Signaling*. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-00500-8>
- Takatsu, K. (2011). Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proceedings of the Japan Academy*

*Series B: Physical and Biological Sciences.* <https://doi.org/10.2183/pjab.87.463>

- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Ushach, I., & Zlotnik, A. (2016). Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(3), 481–489. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0316-144R>
- Vaday, G. G., Peehl, D. M., Kadam, P. A., & Lawrence, D. M. (2006). Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. *The Prostate*, 66(2), 124–134. <https://doi.org/10.1002/pros.20306>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019, January 22). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang, Y.-Y., Lehuédé, C., Laurent, V., Dirat, B., Dauvillier, S., Bochet, L., ... Muller, C. (2012). Adipose tissue and breast epithelial cells: A dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Letters*, 324(2), 142–151. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2012.05.019>
- Yan, H., He, D., Huang, X., Zhang, E., Chen, Q., Xu, R., ... Cai, Z. (2018, July 1). Role of interleukin-32 in cancer biology (review). *Oncology Letters*. Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8649>
- Yao, H., Wang, H., Li, C., Fang, J.-Y., & Xu, J. (2018). Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9, 1774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01774>
- Zhang, B. (2010). CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Research*, 70(16), 6407–6411. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1544>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zhang, Z., Zhang, Z., Lehrer, D., Jong, R. A., Pisano, E. D., Barr, R. G., ... Investigators, for the A. 6666. (2012). Detection of Breast Cancer With Addition of Annual Screening Ultrasound or a Single Screening MRI to Mammography in Women With Elevated Breast Cancer Risk. *JAMA*, 307(13), 1394. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.388>
- Zhao, H., Bo, C., Kang, Y., & Li, H. (2017). What Else Can CD39 Tell Us? *Frontiers in Immunology*, 8, 727. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00727>
- Zhou, P., Zhi, X., Zhou, T., Chen, S., Li, X., Wang, L., ... Ou, Z. (2007). Overexpression of Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biology & Therapy*, 6(3), 426–431. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.3.3762>
- Zundler, S., & Neurath, M. F. (2015, October 1). Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.003>

# XI. ANEXOS

## A. KIT DE DIFERENCIACIÓN DE 3T3-L1

En el siguiente enlace se encuentra el Kit de diferenciación de 3T3-L1 que se utiliza en la metodología.

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/dif001bul.pdf>

**SIGMA-ALDRICH®**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757  
email: [techservice@sial.com](mailto:techservice@sial.com) [sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

### Product Information

#### 3T3-L1 Differentiation Kit

Catalog Number **DIF001**  
Storage Temperature  $-20^{\circ}\text{C}$

### TECHNICAL BULLETIN

#### Product Description

3T3-L1 cells are derived from mouse 3T3 cells and provide a widely-used fundamental model in the study of adipose physiology and metabolic diseases. They exhibit a fibroblast-like morphology before differentiation but become rounded and accumulate lipid droplets several days after the initiation of differentiation. The accumulated lipid droplets can be visualized by light microscopy. The *in vitro* differentiated 3T3-L1 adipocytes have characteristics similar to tissue-derived adipocytes and have been commonly used to study adipogenesis, lipolysis, and metabolic dysfunctions.

The 3T3-L1 Differentiation Kit provides enough supplements to make:

100 ml of Differentiation Medium  
600 ml of Maintenance Medium

This is sufficient material for twelve 100 mm culture dishes.

#### Components

Insulin (1.5 mg/ml) (Catalog Number DIF001A, Green Cap)	0.6 ml
Differentiation Cocktail, 1000 $\times$ (lyophilized) (Catalog Number DIF001B, Yellow Cap)	1 $\mu\text{l}$
DMSO (anhydrous) (Catalog Number DIF001C, Blue Cap)	0.5 ml

#### Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- Cells grown in 96 well, 6 well, or 100 mm cell culture plate
- DMEM and DMEM/F12 (1:1) media
- Bovine calf serum and fetal bovine serum (FBS)
- Penicillin and streptomycin
- 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filters
- Light microscope

#### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

#### Preparation Instructions

Briefly centrifuge vials before opening. Use ultrapure water for the preparation of reagents. To maintain reagent integrity, avoid repeated freeze/thaw cycles. Read the entire protocol before preparing reagents.

Insulin – Supplied 1.5 mg/ml solution is ready to use. Warm to room temperature before use. Aliquot and store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Use within 6 months.

Differentiation Cocktail – Reconstitute in 110  $\mu\text{l}$  of DMSO (supplied), making sure the material is completely dissolved. Aliquot and store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Use within 6 months.

Preadipocyte Medium – DMEM medium with 10% bovine calf serum, 100 units/ml penicillin, and 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin.

Differentiation Medium – Add 1  $\mu\text{l}$  of Differentiation Cocktail to 1 ml of DMEM/F12 (1:1) medium with 10% FBS. Filter Sterilize with a 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter. Make enough differentiation medium as needed. The Differentiation Cocktail provides a final concentration of 1.5  $\mu\text{g/ml}$  insulin, 1  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 500  $\mu\text{M}$  IBMX, and 1  $\mu\text{M}$  rosiglitazone in the Differentiation Medium.

Maintenance Medium – Add 1  $\mu\text{l}$  of Insulin to 1 ml of DMEM/F12 (1:1) with 10% FBS. Filter sterilize with 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter. Enough Maintenance Medium can be prepared for several medium changes. Store the unused maintenance medium at  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

#### Storage/Stability

Store the kit at  $-20^{\circ}\text{C}$ , protected from light.

**Procedure****3T3-L1 Preadipocyte Differentiation Protocol**

*In vitro* differentiated 3T3-L1 adipocytes have characteristics similar to tissue-derived adipocytes and have been commonly used to study adipogenesis, lipolysis, and metabolic dysfunctions.

Either primary preadipocytes from animal tissues or cultured 3T3-L1 cells may be used in this procedure.

1. Culture 3T3-L1 cells in Preadipocyte Medium in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.  
*Notes:* It is important to never allow cultures to become confluent until initiation of differentiation. Change medium every 2–3 days.

It is important to subculture preadipocytes in a medium with 10% bovine calf serum.

2. To initiate differentiation, culture cells until confluent. Replace medium with fresh Preadipocyte Medium and incubate an additional 48 hours.

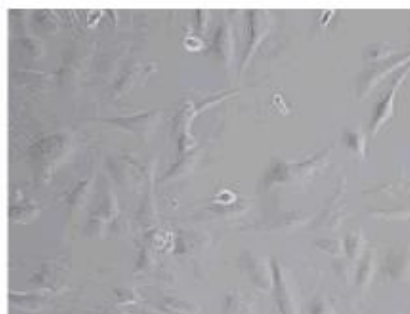
3. Replace Preadipocyte Medium with Differentiation Medium. Incubate for 3 days in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.  
*Notes:* It may be necessary to screen several lots of FBS, as some may be better at differentiation than others.

Primary preadipocytes may differentiate better at 10% CO<sub>2</sub>.

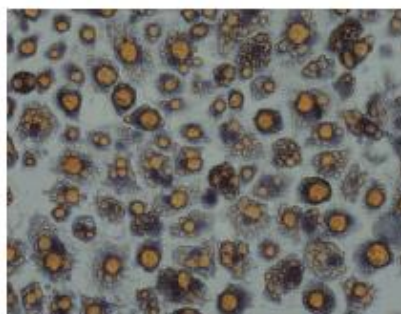
4. Remove Differentiation Medium and replace with Maintenance Medium. Replace Maintenance Medium every 2–3 days. Lipid droplet accumulation will be visible by light microscopy 7–10 days after the addition of Differentiation Medium.

**Results****Figure 1.**

3T3-L1 cells before differentiation

**Figure 2.**

3T3-L1 cells 7 days after the initiation of differentiation



Cells stained with neutral lipid dye, Oil Red O.

JS,MAM 11/14-1

## B. PROTEOME PROFILER ARRAY

En el siguiente enlace se encuentra el protocolo para el análisis de citoquinas en el medio acondicionado.

[https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-cytokine-array-kit\\_ary005b#product-datasheets](https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-human-cytokine-array-kit_ary005b#product-datasheets)

# Proteome Profiler™ Array

## Human Cytokine Array

Catalog Number ARY005B

For the parallel determination of the relative levels of selected human cytokines and chemokines.

**This package insert must be read in its entirety before using this product.  
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.**

## TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
INTRODUCTION .....	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY.....	1
TECHNICAL HINTS.....	1
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS .....	2
PRECAUTIONS.....	2
OTHER SUPPLIES REQUIRED .....	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED FOR CELL LYSATE SAMPLES .....	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED FOR TISSUE LYSATE SAMPLES .....	3
SAMPLE COLLECTION & STORAGE.....	4
REAGENT PREPARATION .....	5
ARRAY PROCEDURE .....	6
DATA ANALYSIS .....	8
PROFILING PROTEINS IN CELL CULTURE SUPERNATES.....	9
PROFILING PROTEINS IN CELL LYSATES .....	10
PROFILING PROTEINS IN TISSUE LYSATES .....	11
PROFILING PROTEINS IN PBMC SUPERNATES & BODY FLUIDS.....	12
APPENDIX.....	13

### MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

#### USA & Canada | R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA  
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400  
E-MAIL: info@RnDSystems.com

### DISTRIBUTED BY:

#### UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK  
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420  
E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

#### China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050  
TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001  
E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn



## INTRODUCTION

Cytokines and chemokines are extracellular signaling molecules that mediate cell-cell communication. They are released from cells and have critical roles in many biological processes such as cellular growth, differentiation, gene expression, migration, immunity and inflammation. In most biological processes, multiple cytokines operate in a large network, where the action of one cytokine is regulated by the presence or absence of other cytokines. The Human Cytokine Array Kit is a rapid, sensitive, and economic tool to simultaneously detect cytokine differences between samples. The relative expression levels of 36 human cytokines can be determined without performing numerous immunoassays.

## PRINCIPLE OF THE ASSAY

Carefully selected capture antibodies have been spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Cell culture supernates, cell lysates, serum, plasma, saliva, urine, and human milk samples are diluted and mixed with a cocktail of biotinylated detection antibodies. The sample/antibody mixture is then incubated with the Human Cytokine Array membrane. Any cytokine/detection antibody complex present is bound by its cognate immobilized capture antibody on the membrane. Following a wash to remove unbound material, Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents are added sequentially. Light is produced at each spot in proportion to the amount of cytokine bound. Refer to the Appendix for a list and coordinates of analytes and controls.

## TECHNICAL HINTS

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- This kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- **Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources. Substitution of some high intensity chemiluminescent reagents for Chemi Reagents 1 and 2 may cause either increased background or diminished signal, depending on the reagent.**
- Any variation in sample handling, buffers, operator, pipetting technique, washing technique, and incubation time or temperature can alter the performance of the kit.
- The Human Cytokine Array membranes are validated for single use only.
- Always use gloved hands and flat-tipped tweezers to handle the membranes.
- Pick up the membranes from the edge on the side with the identification number avoiding the area with the printed antibodies.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Individual arrays should be washed in separate containers to minimize background. Wash Buffer should be removed completely from the membrane before proceeding to the next step.
- Do not allow the membrane to dry out. This will cause high background.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers.
- Soluble receptors and other proteins present in biological samples do not necessarily interfere with the measurement of cytokines in samples. Until these proteins have been tested with the Human Cytokine Array, the possibility of interference cannot be excluded.
- For a procedure demonstration video, please visit:  
[www.RnDSystems.com/ProteomeProfilerVideo](http://www.RnDSystems.com/ProteomeProfilerVideo).

## MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human Cytokine Array	898260	4 nitrocellulose membranes each containing 36 different capture antibodies printed in duplicate.	Return unused membranes to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Array Buffer 4	895022	21 mL of a buffered protein base with preservatives. <i>May contain a precipitate. Mix well before and during use.</i>	May be stored for up to 3 months at 2-8 °C.*
Array Buffer 5	895876	21 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Wash Buffer Concentrate	895003	2 vials (21 mL/vial) of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Detection Antibody Cocktail, Human Cytokine Array	898261	1 vial of biotinylated antibody cocktail; lyophilized.	
Streptavidin-HRP	893019	200 µL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase.	
Chemi Reagent 1	894287	2.5 mL of stabilized hydrogen peroxide with preservative.	
Chemi Reagent 2	894288	2.5 mL of stabilized luminol with preservative.	
4-Well Multi-dish	607544	Clear 4-well rectangular multi-dish.	Store at room temperature.
Transparency Overlay Template	607940	1 transparency overlay template for coordinate reference.	

\* Provided this is within the expiration date of the kit.

## PRECAUTIONS

Chemi Reagents 1 and 2 contain Boric Acid which is suspected of damaging fertility or the unborn child. Do not handle until all safety precautions in the MSDS have been read and understood.

Some components in this kit contain ProClin® which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Please refer to the MSDS on our website prior to use.

## **OTHER SUPPLIES REQUIRED**

- Aprotinin (Sigma, Catalog # A6279)
- Leupeptin (Tocris, Catalog # 1167)
- Pepstatin (Tocris, Catalog # 1190)
- Igepal® CA-630 (Sigma, Catalog # I3021)
- Pipettes and pipette tips
- Gloves
- Deionized or distilled water
- Rocking platform shaker
- Microcentrifuge
- A plastic container with the capacity to hold 50 mL (for washing the arrays)
- Plastic transparent sheet protector (trimmed to 10 cm x 12 cm and open on three sides)
- Plastic wrap
- Absorbent lab wipes (KimWipes® or equivalent)
- Paper towels
- Autoradiography cassette
- Film developer
- X-ray film (Kodak® BioMax™ Light-1, Catalog # 1788207) or equivalent
- Flat-tipped tweezers
- Flatbed scanner with transparency adapter capable of transmission mode
- Computer capable of running image analysis software and Microsoft® Excel

## **OTHER SUPPLIES REQUIRED FOR CELL LYSATE SAMPLES**

- Phosphate-Buffered Saline (PBS)
- Lysis Buffer 17 (R&D Systems, Catalog # 895943)
- Aprotinin (Sigma, Catalog # A6279)
- Leupeptin (Tocris, Catalog # 1167)
- Pepstatin (Tocris, Catalog # 1190)

## **OTHER SUPPLIES REQUIRED FOR TISSUE LYSATE SAMPLES**

- Lysis Buffer 16 (R&D Systems, Catalog # 895935)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, Catalog # P8340)

## SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Since the Human Cytokine Array Kit detects relative expression levels of individual analytes, it is important to include appropriate control samples.

**Note:** Sample amount may be empirically adjusted to attain optimal sensitivity with minimal background. Suggested starting ranges are 200-700  $\mu$ L for cell culture supernates, 100-300  $\mu$ g for cell and tissue lysates, and 50-200  $\mu$ L for serum, plasma, saliva, urine, and human milk samples.

**Cell Culture Supernates** - Remove particulates by centrifugation. Assay immediately or aliquot and store samples at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Cell Lysates** - Rinse cells with PBS, making sure to remove any remaining PBS before adding lysis buffer. Solubilize cells at  $1 \times 10^7$  cells/mL in lysis buffer. Pipette up and down to resuspend and rock the lysates gently at 2-8 °C for 30 minutes. Microcentrifuge at 14,000 x g for 5 minutes, and transfer the supernate into a clean test tube. Quantitation of sample protein concentrations using a total protein assay is recommended. Assay immediately or aliquot and store at  $\leq -70$  °C. Thawed lysates should be kept on ice prior to use. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Tissue Lysates** - Excise tissue and place in Tissue Lysis buffer (0.5% Igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 150 mM NaCl) with Protease Inhibitor Cocktail. Homogenize tissue and centrifuge at 1000 x g for 10 minutes at 2-8 °C to remove cellular debris. Transfer supernate to a new tube. Quantitation of sample protein concentration using a total protein assay is recommended. Assay immediately or aliquot and store samples at  $\leq -70$  °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Serum** - Allow blood samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifuging for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Plasma** - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at approximately 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Saliva** - Collect saliva in a tube and centrifuge for 5 minutes at 10,000 x g. Collect the aqueous layer, and assay immediately or aliquot and store samples at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Urine** - Collect urine and centrifuge to remove particulate matter. Assay immediately or aliquot and store at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

**Human Milk** - Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g at 2-8 °C. Collect the aqueous fraction and repeat this process a total of 3 times. Assay immediately or aliquot and store samples at  $\leq -20$  °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

## REAGENT PREPARATION

**Bring all reagents to room temperature before use.**

**Human Cytokine Array** - Four nitrocellulose membranes each containing 36 different anti-cytokine antibodies printed in duplicate. **Handle arrays only with gloved hands and flat-tipped tweezers.**

**Detection Antibody Cocktail** - One vial of lyophilized biotinylated antibodies. Before use, reconstitute Detection Antibody Cocktail in 100  $\mu$ L of deionized or distilled water.

**1X Wash Buffer** - If crystals have formed in the concentrate, warm the bottles to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 40 mL of 25X Wash Buffer Concentrate to 960 mL of deionized or distilled water to prepare 1000 mL of 1X Wash Buffer.

**Chemi Reagent Mix** - Chemi Reagent 1 and 2 should be mixed in equal volumes within 15 minutes of use. **Protect from light. 1 mL of the resultant mixture is required per membrane.** Discard any remaining after use.



## ARRAY PROCEDURE

**Bring all reagents to room temperature before use. Keep samples on ice. To avoid contamination, wear gloves while performing the procedures.**

1. Prepare all reagents and samples as directed in the previous sections.
2. Pipette 2.0 mL of Array Buffer 4 into each well of the 4-Well Multi-dish to be used. Array Buffer 4 serves as a block buffer.
3. Using flat-tip tweezers, remove each membrane to be used from between the protective sheets and place in a well of the 4-Well Multi-dish. The array number should be facing upward.

**Note:** Upon contact with Array Buffer 4, the blue dye from the spots will disappear, but the capture antibodies are retained in their specific locations.

4. Incubate for one hour on a rocking platform shaker. Orient the tray so that each array rocks end to end in its well.
5. While the membranes are blocking, prepare samples by adding up to 1 mL of each sample to 0.5 mL of Array Buffer 4 in separate tubes. Adjust to a final volume of 1.5 mL with Array Buffer 5 as necessary.
6. Add 15  $\mu$ L of reconstituted Human Cytokine Array Detection Antibody Cocktail to each prepared sample. Mix and incubate at room temperature for one hour.
7. Aspirate Array Buffer 4 from the wells of the 4-Well Multi-dish and add sample/antibody mixtures prepared in steps 5 and 6. Place the lid on the 4-Well Multi-dish.
8. Incubate overnight at 2-8 °C on a rocking platform.

**Note:** A shorter incubation time may be used if optimal sensitivity is not required.

9. Carefully remove each membrane and place into individual plastic containers with 20 mL of 1X Wash Buffer. Rinse the 4-Well Multi-dish with deionized or distilled water and dry thoroughly.
10. Wash each membrane with 1X Wash Buffer for 10 minutes on a rocking platform shaker. Repeat two times for a total of three washes.
11. Dilute the Streptavidin-HRP in Array Buffer 5 using the dilution factor on the vial label. Pipette 2.0 mL of diluted Streptavidin-HRP into each well of the 4-Well Multi-dish.
12. Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess buffer to drain from the membrane. Return the membrane to the 4-Well Multi-dish containing the diluted Streptavidin-HRP. Cover the wells with the lid.
13. Incubate for 30 minutes at room temperature on a rocking platform shaker.

## ARRAY PROCEDURE *CONTINUED*

14. Wash each array as described in steps 9 and 10.

**Note:** *Complete the remaining steps without interruption.*

15. Carefully remove each membrane from its wash container. Allow excess Wash Buffer to drain from the membrane by blotting the lower edge onto paper towels. Place each membrane on the bottom sheet of the plastic sheet protector with the identification number facing up.

16. Pipette 1 mL of the prepared Chemi Reagent Mix evenly onto each membrane.

**Note:** *Using less than 1 mL of Chemi Reagent Mix per membrane may result in incomplete membrane coverage.*

17. Carefully cover with the top sheet of the plastic sheet protector. Gently smooth out any air bubbles and ensure Chemi Reagent Mix is spread evenly to all corners of each membrane. Incubate for 1 minute.

18. Position paper towels on top and sides of plastic sheet protector containing the membranes and carefully squeeze out excess Chemi Reagent Mix.

19. Remove the top plastic sheet protector and carefully lay an absorbent lab wipe on top of the membranes to blot off any remaining Chemi Reagent Mix.

20. Leaving the membranes on the bottom plastic sheet protector, cover the membranes with plastic wrap taking care to gently smooth out any air bubbles. Wrap the excess plastic wrap around the back of the sheet protector so that the membranes and sheet protector are completely wrapped.

21. Place the membranes with the identification numbers facing up in an autoradiography film cassette.

**Note:** *Use an autoradiography cassette that is not used with radioactive isotope detection.*

22. Expose membranes to X-ray film for 1-10 minutes. Multiple exposure times are recommended.

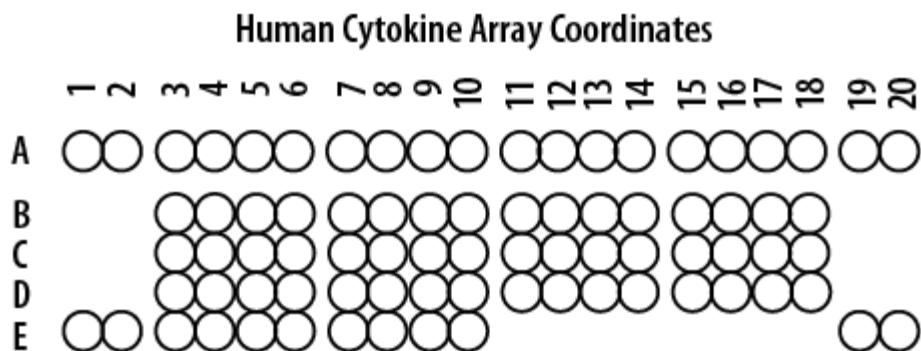
## DATA ANALYSIS

The positive signals seen on developed film can be quickly identified by placing the transparency overlay template on the array image and aligning it with the pairs of reference spots in three corners of each array. The stamped identification number on the array should be placed on the left hand side. The location of controls and cytokine capture antibodies is listed in the Appendix.

**Note:** Reference spots are included to align the transparency overlay template and to demonstrate that the array has been incubated with Streptavidin-HRP during the assay procedure.

Pixel densities on developed X-ray film can be collected and analyzed using a transmission-mode scanner and image analysis software.

1. Create a template to analyze pixel density in each spot of the array.
2. Export signal values to a spreadsheet file for manipulation in a program such as Microsoft Excel.
3. Determine the average signal (pixel density) of the pair of duplicate spots representing each cytokine.
4. Subtract an averaged background signal from each spot. Use a signal from a clear area of the array or negative control spots as a background value.
5. Compare corresponding signals on different arrays to determine the relative change in cytokine levels between samples.

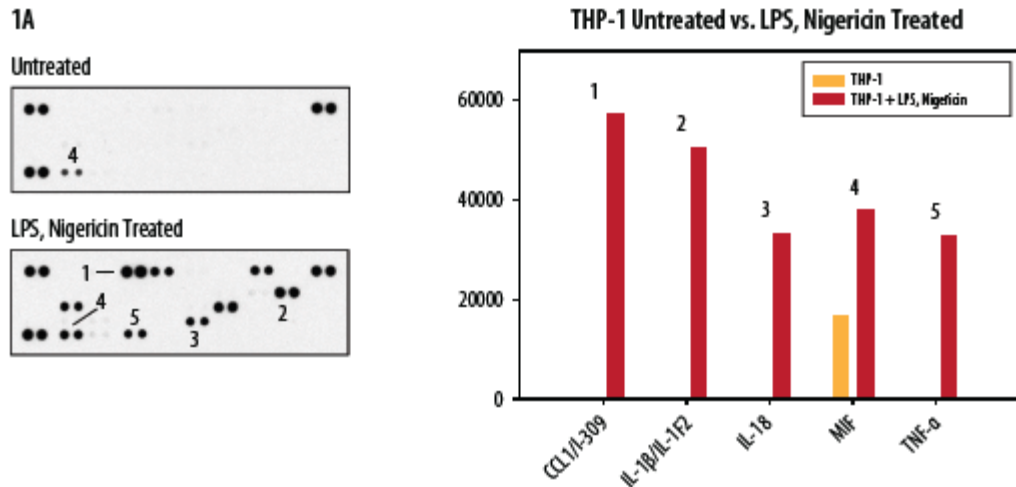


This image is not to scale. It is for coordinate reference only.  
Please use the transparency overlay for analyte identification.

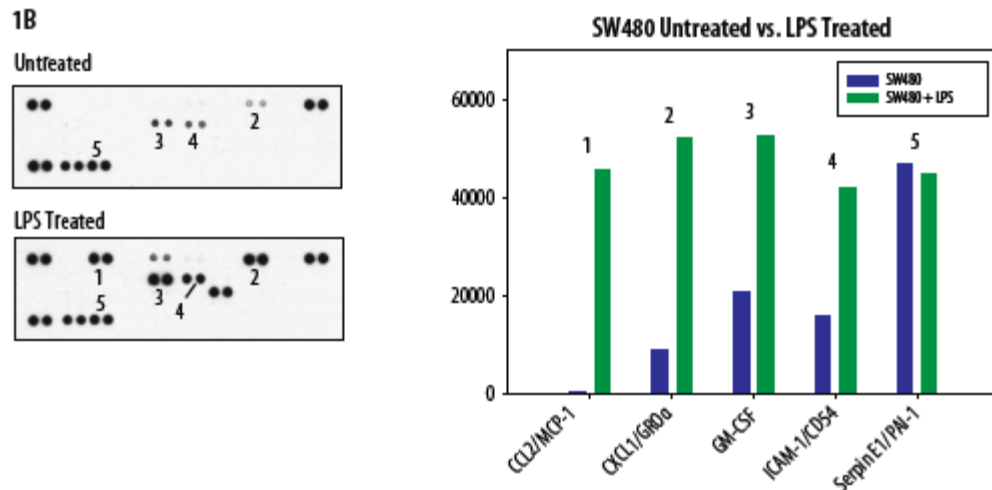


## PROFILING PROTEINS IN CELL CULTURE SUPERNATES

The Human Cytokine Array detects multiple cytokines, chemokines, growth factors and other soluble proteins in cell culture supernates. The amount of cell culture supernate used on each array and the duration of exposure to X-ray film is indicated below. Profiles of mean spot pixel density were created using a transmission-mode scanner and image analysis software.



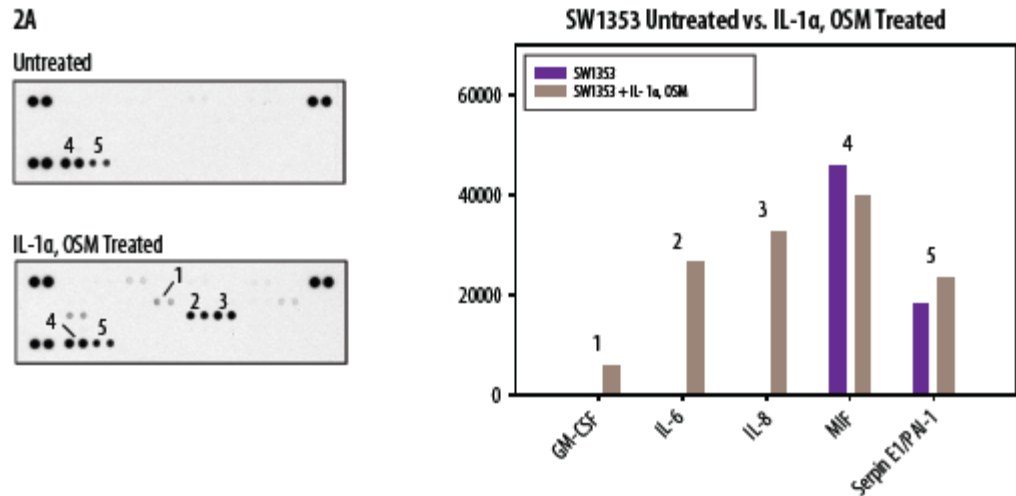
**Figure 1A:** THP-1 human acute monocytic leukemia cells were untreated or treated with 1 µg/mL LPS for 4 hours, then 5mM Nigericin (Tocris, Catalog # 4312) for 1 hour (500 µL of cell culture supernate, 10 minute exposure).



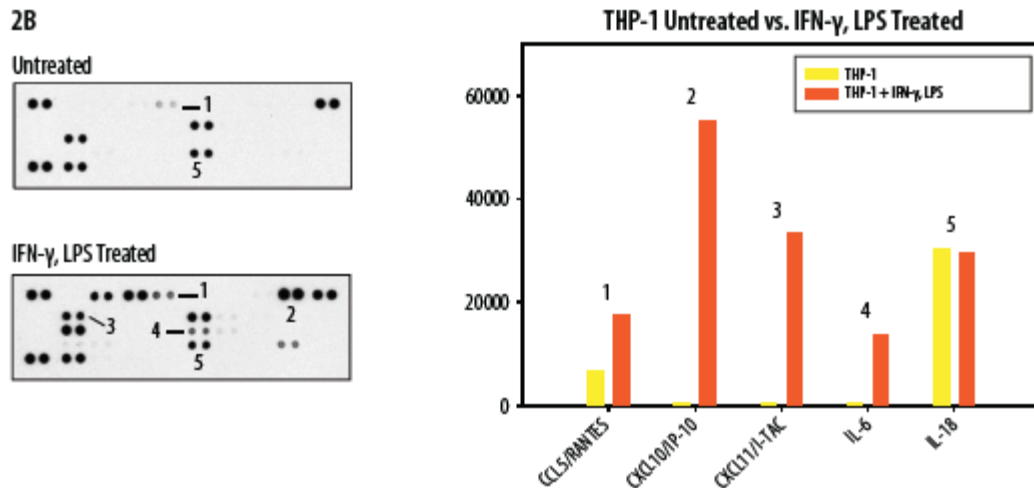
**Figure 1B:** SW480 human colorectal adenocarcinoma cells were untreated or treated with 100 ng/mL LPS for 24 hours (500 µL of cell culture supernate, 10 minute exposure).

## PROFILING PROTEINS IN CELL LYSATES

The Human Cytokine Array detects multiple cytokines, chemokines, growth factors and other soluble proteins in cell lysates. The amount of cell lysate used on each array and the duration of exposure to X-ray film is indicated below. Profiles of mean spot pixel density were created using a transmission-mode scanner and image analysis software.



**Figure 2A:** SW1353 human chondrosarcoma cells were untreated or treated with 5 ng/mL recombinant human IL-1 $\alpha$  (R&D Systems, Catalog # 200-LA) and 10 ng/mL recombinant human OSM (R&D Systems, Catalog # 295-OM) for 24 hours (200  $\mu$ g of cell lysate, 5 minute exposure).



**Figure 2B:** THP-1 human acute monocytic leukemia cells were untreated or treated with 1  $\mu$ g/mL recombinant human IFN- $\gamma$  (R&D Systems, Catalog # 285-IF) for 8 hours, then 1  $\mu$ g/mL LPS for 16 hours (200  $\mu$ g of cell lysate, 5 minute exposure).

## PROFILING PROTEINS IN TISSUE LYSATES

The Human Cytokine Array detects multiple cytokines, chemokines, growth factors and other soluble proteins in tissue lysate samples. 200 µg of tissue lysate was run on each array. Data shown are from a 5 minute exposure to X-ray film.

Lung



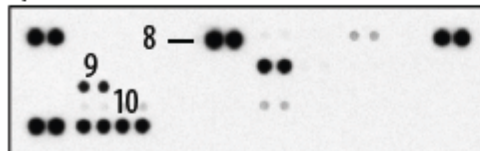
Lung Cancer



Thymus



Spleen

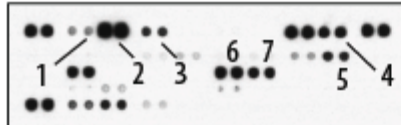


1	ICAM-1/CD54
2	MIF
3	Complment Component C5/C5a
4	CXCL1/GROα
5	IL-8
6	IL-16
7	IL-18
8	CCL5/RANTES
9	IL-1ra/IL-1F3
10	Serpin E1/PAI-1

## PROFILING PROTEINS IN PBMC SUPERNATES & BODY FLUIDS

The Human Cytokine Array detects multiple cytokines, chemokines, growth factors and other soluble proteins in human PBMC supernate, serum, plasma, saliva, urine, and human milk samples. The sample type and quantity used are listed below. Data shown are from a 10 minute exposure to X-ray film

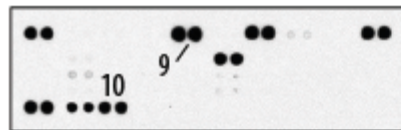
PBMC supernate, 500  $\mu$ L per array



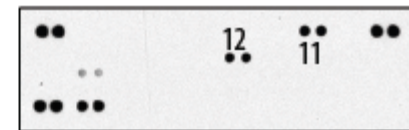
Serum, 200  $\mu$ L per array



EDTA plasma, 200  $\mu$ L per array



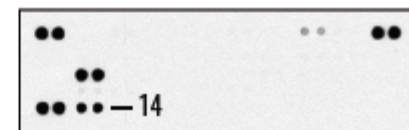
Human milk, 200  $\mu$ L per array



Urine, 200  $\mu$ L per array



Saliva, 100  $\mu$ L per array



		MEAN PIXEL DENSITY					
		PBMCs	Serum	Plasma	Human Milk	Urine	Saliva
1	CCL1/1-309	13,316	0	0	13	0	191
2	CCL2/MCP-1	58,425	0	0	107	0	832
3	CCL3/CCL4/MIP-1 $\alpha/\beta$	24,767	0	0	0	0	317
4	CXCL10/IP-10	42,204	229	0	93	0	489
5	IL-1 $\beta$ /IL-1F2	29,081	102	0	367	333	222
6	IL-6	47,816	872	1305	444	27	386
7	IL-8	37,224	294	0	533	178	286
8	Complement Component C5/CSa	0	58,073	54,767	0	40	265
9	CCL5/RANTES	17	58,604	57,415	213	0	354
10	Serpin E1/PAI-1	27,361	51,368	48,497	330	35	457
11	CXCL1/GRO $\alpha$	52,804	3263	2308	34,934	47	6966
12	ICAM-1/CD54	1045	52,814	49,756	29,052	0	196
13	IL-1ra/IL-1F3	43,086	3725	3417	7313	21078	51,209
14	MIF	17,290	25,345	32,613	40,228	96	34,465

## APPENDIX

Refer to the table below for the Human Cytokine Array coordinates.

Coordinate	Target/Control	Entrez Gene ID	Alternate Nomenclature
A1, A2	Reference Spots	N/A	————
A3, A4	CCL1/I-309	6346	P500, SCYA1, SCYA2, TCA-3
A5, A6	CCL2/MCP-1	6347	MCAF
A7, A8	MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$	6348/6351	CCL3/CCL4
A9, A10	CCL5/RANTES	6352	————
A11, A12	CD40 Ligand/TNFSF5	959	CD154, CD40LG, gp39, TRAP
A13, A14	Complement Component C5/C5a	727	C5/C5a
A15, A16	CXCL1/GRO $\alpha$	2919	CINC-1, KC
A17, A18	CXCL10/IP-10	3627	CRG-2
A19, A20	Reference Spots	N/A	————
B3, B4	CXCL11/I-TAC	6373	$\beta$ -R1, H174
B5, B6	CXCL12/SDF-1	6387	PBSF
B7, B8	G-CSF	1440	CSF $\beta$ , CSF-3
B9, B10	GM-CSF	1437	CSFa, CSF-2
B11, B12	ICAM-1/CD54	3383	————
B13, B14	IFN- $\gamma$	3458	Type II IFN
B15, B16	IL-1 $\alpha$ /IL-1F1	3552	————
B17, B18	IL-1 $\beta$ /IL-1F2	3553	————
C3, C4	IL-1ra/IL-1F3	3557	————
C5, C6	IL-2	3558	TCGF
C7, C8	IL-4	3565	BCDF, BSF1
C9, C10	IL-5	3567	————
C11, C12	IL-6	3569	BSF-2
C13, C14	IL-8	3576	CXCL8, GCP1, NAP1
C15, C16	IL-10	3586	CSIF
C17, C18	IL-12 p70	3592/3593	CLMF p35

continued on next page...

**APPENDIX CONTINUED**

Coordinate	Target/Control	Entrez Gene ID	Alternate Nomenclature
D3, D4	IL-13	3596	————
D5, D6	IL-16	3603	LCF
D7, D8	IL-17A	3605	CTLA-8
D9, D10	IL-17E	64806	IL-25
D11, D12	IL-18/IL-1F4	3606	IGIF
D13, D14	IL-21	59067	————
D15, D16	IL-27	246778	IL-27 A
D17, D18	IL-32a	9235	
E1, E2	Reference Spots	N/A	————
E3, E4	MIF	4282	GIF, DER6
E5, E6	Serpin E1/PAI-1	5054	Nexin, PLANH1
E7, E8	TNF- $\alpha$	7124	TNFSF1A
E9, E10	TREM-1	54210	CD354
E19, E20	Negative Control	N/A	————

*All trademarks and registered trademarks are property of their respective owners.*

©2015 R&D Systems, Inc.

07.15

753087.0

7/15

14

**For research use only. Not for use in diagnostic procedures.**

## C.CITOQUINAS LIBERADAS POR FIBROBLASTOS Y ADIPOCITOS EN MEDIO ALTO Y BAJO EN GLUCOSA

Cuadro 7. Razón de cambio de las citoquinas liberadas por fibroblastos y adipocitos en medio alto y bajo en glucosa

Citoquinas	Razón de cambio (alta glucosa/baja glucosa)	
	Fibroblastos	Adipocitos
CCL1/I-309	0.627154184	6.180248148**
CCL2/MCP-1	0.988391519	2.946623258**
MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$	1.48497537**	0.821287218
CCL5/RANTES	0.923646795	0.496405503*
CD40 Ligand/TNFSF5	0.926233283	0.667443343
Complement Component C5/C5a	0.743759819	0.298437215*
CXCL1/GRO $\alpha$	0.844647929	0.656326829
CXCL10/IP-10	0.847394786	3.008263005**
CXCL11/I-TAC	0.897279126	0.242646184*
CXCL12/SDF-1	0.999427937	0.993482483
G-CSF	0.992313139	0.52733878*
GM-CSF	1.103949452	0.287010688*
ICAM-1/CD54	0.885248802	0.779679584
IFN- $\gamma$	1.011453893	0.818110201
IL-1 $\alpha$ /IL-1F1	0.948356635	0.628796956
IL-1 $\beta$ /IL-1F2	0.737101573	0.504173189*
IL-1ra/IL-1F3	0.621594333	0.751551308
IL-2	1.879844932**	0.771451968
IL-4	0.88715483	0.856089223
IL-5	0.672491652	0.413462757*
IL-6	0.833080882	0.427969076*
IL-8	0.754390869	0.302681177*
IL-10	0.964213717	0.542138326*
IL-12 p70	0.828872671	0.248803067*
IL-13	0.745301586	0.779262593
IL-16	0.601614928	0.640501216
IL-17 <sup>a</sup>	0.781781503	0.59517002
IL-17E	0.659300464	0.605647825
IL-18/IL-1F4	0.947220141	0.388560887*
IL-21	0.989876805	0.304167024*
IL-27	0.894973234	0.356152567*
IL-32 $\alpha$	0.79597951	0.247670606*
MIF	1.22693114	2.275071172**
Serpin E1/PAI-1	1.046688938	0.985340684
TNF- $\alpha$	1.027991596	0.801622164
TREM-1	0.946571853	0.489606099*

\*Razón de cambio menor o igual a 0.5, citoquinas menormente secretadas en alta glucosa.

\*\*Razón de cambio mayor o igual a 1.5, citoquinas mayormente secretadas en alta glucosa