



PROBIOL
PROGRAMA DE POSGRADO
EN BIOLOGÍA

TESIS DE DOCTORADO

**EL TEJIDO ADIPOSO COMO INTERMEDIARIO ENTRE LOS ESTADOS TIROIDEOS
Y EL CÁNCER DE MAMA**

DOCTORANDO

Leila Ester Zyla

Lic. en Cs. Básicas con orientación en Biología

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de Cuyo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Rubén Carón

Investigador Independiente, CONICET

CODIRECTORA DE TESIS

Dra. Constanza López-Fontana

Investigador Adjunta, CONICET

Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)

Centro Científico y Tecnológico Mendoza (CCT – Mendoza)

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Mendoza, Argentina 2022



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

I M B E C U

ÍNDICE TESIS:

“El tejido adiposo como intermediario entre los estados tiroideos y el cáncer de mama”

1. ABREVIATURAS.....	6
2. RESUMEN DE TESIS.....	11
3. INTRODUCCIÓN.....	12
3.1. Cáncer de mama (CaM).....	12
3.1.1. Epidemiología.....	14
3.1.2. Proceso tumorigénico.....	16
3.1.3. Regulación hormonal de la carcinogénesis mamaria.....	19
3.1.3.1. Clasificación molecular del CaM.....	19
3.1.3.2. Efecto de los estrógenos.....	20
3.1.3.3. Efecto de la progesterona.....	21
3.1.3.4. Hormonas tiroideas.....	23
3.2. Hipotiroidismo.....	25
3.2.1. Epidemiología.....	26
3.2.2. Efectos del hipotiroidismo sobre el balance energético y el acumulo de tejido adiposo (TA).....	26
3.3. Tejido adiposo.....	28
3.3.1. Tejido adiposo abdominal (TAA).....	29
3.3.2. Tejido adiposo mamario (TAM).....	29
3.3.3. Tejido adiposo blanco, beige y pardo.....	30
3.4. Efectos directos e indirectos, mediados por el TA, del hipotiroidismo sobre la carcinogénesis mamaria.....	32
3.4.1. Efectos directos mediados por el TA.....	32
3.4.2. Efectos indirectos mediados por el TA.....	34
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
4.1. Hipótesis.....	36
4.2. Objetivo general.....	36
4.3. Objetivos específicos.....	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1. <i>IN VIVO</i>	37
5.1.1. Animales de experimentación.....	37
5.1.2. Diseño experimental para la caracterización del TAM y TAA provenientes de ratas hipo- y eutiroides.....	37
5.1.2.1. Obtención de la muestra (TA y suero).....	38
5.1.2.2. Tinción con hematoxilina y eosina (H&E).....	38
5.1.2.2.1. Determinaciones en el TA.....	39
5.1.2.3. Inmunohistoquímica (IHQ).....	39

5.1.2.4.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, de sus siglas en inglés) y transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para su inmunoidentificación (immunobloting).....	41
5.1.3.	Diseño experimental para epidemiología tumoral.....	44
5.1.3.1.	Medición de parámetros tumorales.....	45
5.1.3.2.	Obtención de la muestra (TA, Tu y suero).....	45
5.1.3.3.	Tinción con H&E.....	46
5.1.3.4.	Inmunohistoquímica.....	46
5.1.3.5.	SDS-PAGE y transferencia a membranas de PVDF para su inmunobloting.....	47
5.2.	<i>IN VITRO</i>	48
5.2.1.	Diseño experimental <i>in vitro</i> con líneas celulares.....	48
5.2.1.1.	Líneas celulares.....	48
5.2.1.2.	Obtención de medios condicionados (MCs).....	49
5.2.1.3.	Ensayos con líneas celulares.....	50
5.2.1.3.1.	Viabilidad.....	50
5.2.1.3.2.	Proliferación.....	50
5.2.1.3.3.	Adhesión.....	51
5.2.1.3.4.	Migración.....	51
5.2.1.3.5.	Lisis celular para apoptosis.....	52
5.2.1.4.	Proteómica.....	53
5.2.1.4.1.	<i>Shotgun y/o bottom-up</i>	53
5.2.1.4.2.	Preparación de la muestra.....	55
5.2.1.4.3.	Cromatografía líquida.....	56
5.2.1.4.4.	MS/MS.....	57
5.2.1.4.5.	Análisis informático.....	58
5.2.1.4.6.	Curva de dosis-respuesta de los péptidos.....	58
5.2.1.4.7.	Ensayos con péptidos.....	60
5.3.	Análisis estadístico.....	60
6.	RESULTADOS.....	61
6.1.	OBJETIVO ESPECÍFICO Nº 1. Caracterización del TAA y del TAM en ratas hipo- y eutiroides.....	61
6.1.1.	Descripción del modelo de hipotiroidismo.....	61
6.1.1.1.	Establecimiento del hipotiroidismo: valores hormonales.....	61
6.1.1.2.	Condición corporal de los animales.....	61
6.1.1.3.	El TA en condiciones de hipotiroidismo.....	62
6.1.1.3.1.	Tejido adiposo abdominal.....	62
6.1.1.3.1.1.	Porcentaje de grasa y tamaño del adipocito.....	62
6.1.1.3.1.2.	Expresión de receptores hormonales.....	62
6.1.1.3.1.3.	Adipoquinas y sus receptores.....	63

6.1.1.3.1.4.	Marcadores de tejido adiposo blanco (TAB) y de tejido adiposo pardo (TAP).....	64
6.1.1.3.2.	Tejido adiposo mamario.....	65
6.1.1.3.2.1.	Porcentaje de grasa y tamaño de adipocito.....	65
6.1.1.3.2.2.	Expresión de receptores hormonales.....	66
6.1.1.3.2.3.	Adipoquinas y sus receptores.....	67
6.1.1.3.2.4.	Marcadores de TAB y TAP.....	67
6.1.1.3.3.	Esquema de síntesis: TAA y TAM en el hipotiroidismo.....	68
6.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO N° 2. Estudio de los efectos del TAA y del TAM sobre las líneas celulares mamarias.....	70
6.2.1.	Epidemiología tumoral.....	70
6.2.2.	Participación del TA en la carcinogénesis mamaria.....	74
6.2.2.1.	Línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-10A).....	75
6.2.2.1.1.	Ensayos de viabilidad, proliferación, adhesión, migración y marcadores de apoptosis.....	75
6.2.2.1.1.1.	Tejido adiposo abdominal.....	75
6.2.2.1.1.2.	Tejido adiposo mamario.....	77
6.2.2.2.	Línea celular tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-7).....	78
6.2.2.2.1.	Ensayos de viabilidad, proliferación, adhesión, migración y marcadores de apoptosis.....	78
6.2.2.2.1.1.	Tejido adiposo abdominal.....	78
6.2.2.2.1.2.	Tejido adiposo mamario.....	80
6.2.2.3.	Línea celular tumorigénica no sensible a estrógenos (MDA-MB-231).....	82
6.2.2.3.1.	Ensayos de viabilidad, proliferación, adhesión, migración y marcadores de apoptosis.....	82
6.2.2.3.1.1.	Tejido adiposo abdominal.....	82
6.2.2.3.1.2.	Tejido adiposo mamario.....	84
6.2.3.	Tablas de síntesis: Efecto de los MCs TAM y TAA hipotiroideos sobre las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231.....	85
6.3.	OBJETIVO ESPECÍFICO N°3. Identificación y cuantificación de los factores solubles asociados al TAA y al TAM.....	87
6.3.1.	Proteínas de los MCs.....	87
6.3.1.1.	Composición completa de los MCs.....	87
6.3.1.2.	Proteínas exclusivas de los MCs TAM de animales hipo- y eutiroides.....	89
6.3.1.3.	Proteínas expresadas diferencialmente en los MCs TAM de ratas hipo- y eutiroides.....	92
6.4.	OBJETIVO ESPECÍFICO N° 4. Identificación de la actividad biológica de los factores solubles secretados por el TAA y el TAM sobre las líneas celulares mamarias.....	95
6.4.1.	Efectos de los péptidos sobre las líneas celulares.....	95

6.4.1.1.	Línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-10A).....	95
6.4.1.1.1.	Ensayos de proliferación, adhesión y migración.....	95
6.4.1.2.	Línea celular tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-7).....	95
6.4.1.2.1.	Ensayos de proliferación, adhesión y migración.....	95
6.4.1.3.	Línea celular tumorigénica no sensible a estrógenos (MDA-MB-231).....	96
6.4.1.3.1.	Ensayos de proliferación, adhesión y migración.....	96
6.4.2.	Tablas de síntesis: Efecto de los péptidos sobre las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231.....	96
7.	DISCUSIÓN.....	98
7.1.	Objetivo específico N° 1. Caracterización del TAA y del TAM en ratas hipo- y eutiroides.....	98
7.1.1.	Efecto del hipotiroidismo sobre la condición corporal de los animales.....	98
7.1.2.	Efecto del hipotiroidismo sobre el TAA y el TAM.....	98
7.2.	Objetivo específico N°2. Estudio de los efectos del TAA y del TAM sobre las líneas celulares mamarias.....	101
7.2.1.	Efecto directo del hipotiroidismo sobre la carcinogénesis mamaria.....	101
7.2.2.	Efecto del hipotiroidismo mediado por el TA sobre la carcinogénesis mamaria.....	103
7.2.2.1.	Línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-10A).....	103
7.2.2.2.	Línea celular tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-7).....	105
7.2.2.3.	Línea celular tumorigénica no sensible a estrógenos (MDA).....	106
7.3.	Objetivo específico N°3. Identificación y cuantificación de los factores solubles asociados al TAA y al TAM.....	107
7.3.1.	Factores solubles secretados por el TAM y el TAA de ratas hipo- y eutiroides.....	107
7.4.	Objetivo específico N°4. Identificación de la actividad biológica de los factores solubles secretados por el TAA y el TAM sobre las líneas celulares mamarias.....	110
7.4.1.	Actividad biológica de Adipo y Clust sobre líneas celulares mamarias tumorales y no tumorales.....	110
8.	CONCLUSIONES.....	113
9.	REFERENCIAS.....	114
10.	AGRADECIMIENTOS.....	129

1. ABREVIATURAS

2D: dos dimensiones.

Adipo R1/R2: receptor de adiponectina uno/dos.

Adipo/AdipoQ/Ad: adiponectina.

ANOVA: análisis de la varianza.

APC: poliposis adenomatosa del colon.

ATP: adenosín-5-trifosfato.

BRIJ: polioxietilen (23) lauril éter (BRIJ 35).

BSA: albúmina sérica bobina.

c/Tu: con tumor.

CaM: cáncer de mama.

CaP: cáncer de próstata.

CCL5: quimiocina involucrada en la progresión del tumor.

CK1: caseína quinasa 1.

Clust/Cl: clusterina.

Ctrl: control.

D.O.R.: densidad óptica relativa.

Da: unidad de medida de peso molecular, daltons.

DAB: diaminobencidina.

DMBA: dimetilbenzantraceno.

DMEM: medio Dulbecco modificado.

DTT: ditioneitol, desnaturizante.

E2: estrógeno.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EGF: factor de crecimiento epidermal.

ESI: ionización por electrospray (electrospray ionization).

Eut: animales con niveles de tiroxina en sangre normales, estado eutiroideo.

Eut: animales eutiroideos.

Exp.: experimento.

Fiji: software de procesamiento de imágenes.

G: fuerza centrífuga relativa o fuerza g.

GH: hormona del crecimiento.

GM: glándula mamaria.

GSK3 β : glucógeno sintasa quinasa 3 β .

H&E: hematoxilina y eosina, técnica de tinción.

HAP: hidrocarburo aromático policíclico.

hASC: células madre derivadas de tejido adiposo humano.

HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2.

Hipo: animales depletados de tiroxina, estado hipotiroideo.

Hipo: animales hipotirideos.

HSA: albúmina sérica humana.

HSL: lipasa sensible a hormonas.

HT: hormonas tiroideas.

ICAM 1: molécula de adhesión intracelular 1.

IHQ: Inmunohistoquímica.

kDa: kilodalton.

M/A: índice mitótico apoptótico.

m/z: relación masa/carga.

M: molaridad.

M199: medio de crecimiento para tejido adiposo.

MALDI: técnica de ionización, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (ionización láser asistida por matriz).

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno.

MC Eut-nTu: medio condicionado de animales eutiroideos sin tumor.

MC Eut-Tu: medio condicionado de animales eutiroideos con tumor.

MC Hipo-nTu: medio condicionado de animales hipotiroideos sin tumor.

MC Hipo-Tu: medio condicionado de animales hipotiroideos con tumor.

MC/MCs: medio condicionado/medios condicionados.

MCT1/4: transportador de monocarboxilato uno/cuatro.

MEC: matriz extracelular.

mk: marcador de peso molecular, marker.

MOAT: tejido adiposo mesentérico y omental.

MS/MS: espectrometría de masas en tándem.

MS: espectrometría de masas.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ensayo colorimétrico.

MUC4: mucina 4.

nd: no detectable, indetectable.

ObR: receptor de leptina.

OE: objetivo específico.

p: significancia estadística.

P4: progesterona.

PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1.

PBS: buffer/tampón fosfato salino.

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación.

PGC1 α : coactivador gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas.

pH: concentración de iones hidrógeno.

p-HSL: lipasa sensible a hormonas forforilada.

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa.

PKL: formato de archivos, expresado en lista de picos/masas.

PPAR γ : receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma.

PRDM16: contenedor del dominio PR dieciséis.

PRL: prolactina.

PRLR: receptor de prolactina.

PTHrP: péptido relacionado con la hormona paratiroidea.

PTU: propiltiouracilo.

PVDF: fluoruro de polivinilideno.

Q: analizador de masas por cuadrupolo.

RE: receptor de estrógenos.

RE α : receptor de estrógeno alfa.

RIA: radioinmunoensayo de doble anticuerpo.

RIPA: buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RP4: receptor de progesterona.

RPg: receptor de progesterona.

s/Tu: sin tumor.

SB 6X: sample buffer/buffer de siembra 6 veces concentrado.

SC: conteo espectral, permite identificar proteínas junto a su abundancia relativa.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SFB: suero fetal bovino.

SFBc: suero fetal bovino charcolizado.

T3: triiodotironina. 3,3,5-triiodo-L-tironina.

T4: tiroxina. L- Tiroxina.

TA: tejido adiposo.

TAA: tejido adiposo abdominal.

TAB: tejido adiposo blanco.

TAG: triacilglicéridos.

TAM: tejido adiposo mamario.

TAP: tejido adiposo pardo.

TBS: tris buffer salino.

TBS-T: tris buffer salino con tween.

TBX1: factor de transcripción de la caja T.

TEBs: yemas o brotes terminales de los ductos mamarios

TGF- α : factor de crecimiento tumoral alfa.

TIFF: formato de archivo de imagen etiquetado.

TOF: detector de iones, Time Of Flight (tiempo de vuelo).

TR: receptor de hormonas tiroideas.

TR β 1: receptor de hormona tiroidea uno.

TSH: hormona estimulante de la tiroides/ tirotrófina.

Tu: tumor.

UCP1: proteína de desacoplamiento uno.

UPLC: cromatografía líquida de ultra rendimiento 2D-nanoAcquity.

VCAM 1: molécula de adhesión vascular 1.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

Wnt: de proteínas de señalización.

2. RESUMEN DE TESIS

TÍTULO DE LA TESIS: El Tejido Adiposo como intermediario entre los Estados Tiroideos y el Cáncer de Mama.

La tesis pretende evaluar el rol que juega el tejido adiposo abdominal y mamario de ratas hipo- y eutiroideas, sobre el desarrollo de tumores mamarios inducidos con dimetilbenzantraceno. El hipotiroidismo experimental modifica la incidencia, latencia y progresión del cáncer de mama (CaM) inducido en ratas. Se pueden distinguir tanto efectos directos de las hormonas tiroideas sobre el tumor, como acciones indirectas a través de otros órganos o sistemas que influyen sobre el mismo. Con el fin de investigar la participación del tejido adiposo como posible intermediario entre los estados tiroideos y el CaM, evaluamos cambios en la proliferación, adhesión, migración y apoptosis de células epiteliales tumorales y no tumorales mamarias incubadas con los medios condicionados (MCs) de tejido adiposo abdominal y mamario provenientes de ratas hipo- y eutiroideas con y sin tumores mamarios inducidos previamente. Así mismo, investigamos la activación de algunas vías de señalamiento celular relacionadas con dichos procesos. Para identificar los factores solubles producidos por el tejido graso se realizó un análisis proteómico de los MCs. El mismo nos permitió tener una visión completa del secretoma característico del tejido adiposo en las dos condiciones experimentales. Las proteínas extraídas a partir de los MCs fueron analizadas utilizando un protocolo específico para resolver mezclas complejas de proteínas (*shotgun proteomics*), mediante la combinación de espectrometría de masas con herramientas bioinformáticas. Los factores identificados por este procedimiento fueron biológicamente ensayados sobre las líneas celulares mamarias para corroborar su participación en la regulación del crecimiento tumoral. La dilucidación del papel desempeñado por el tejido adiposo en los distintos estadios tiroideos sobre la carcinogénesis mamaria puede tener implicancias importantes en el manejo del CaM en mujeres hipotiroideas. Igualmente, la identificación de los factores que participan como protectores o promotores del CaM puede aportar información para el diseño de herramientas terapéuticas novedosas.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Cáncer de mama (CaM)

El CaM es una enfermedad heterogénea, que comprende numerosas entidades distintas que no solo tienen diferentes características biológicas sino también distintos comportamientos clínicos. Hay varias líneas de evidencia que sugieren que el CaM es, de hecho, una colección de diferentes enfermedades con diferentes factores de riesgo, presentaciones clínicas, características patológicas, respuesta a terapia y resultados, que afectan al mismo órgano anatómico y se originan en la misma estructura anatómica (es decir, en la unidad lobulillar-ductal terminal del epitelio mamario).

La mama está formada por diferentes estructuras que pueden transformar sus células y originar un CaM (**Figura 3.1**). Las mamas constan de tres partes principales: lobulillos, conductos (o ductos) y tejido conectivo. Los lobulillos son las glándulas que producen leche. Los conductos son los tubos que transportan la leche de las glándulas al pezón. El tejido conectivo (formado por tejido fibroso y adiposo) rodea y sostiene todas las partes de la mama. La mayoría de los cánceres de mama comienzan en los conductos o en los lobulillos y terminan resultando en procesos descontrolados de la división celular, generando así diferentes tipos de tumores.

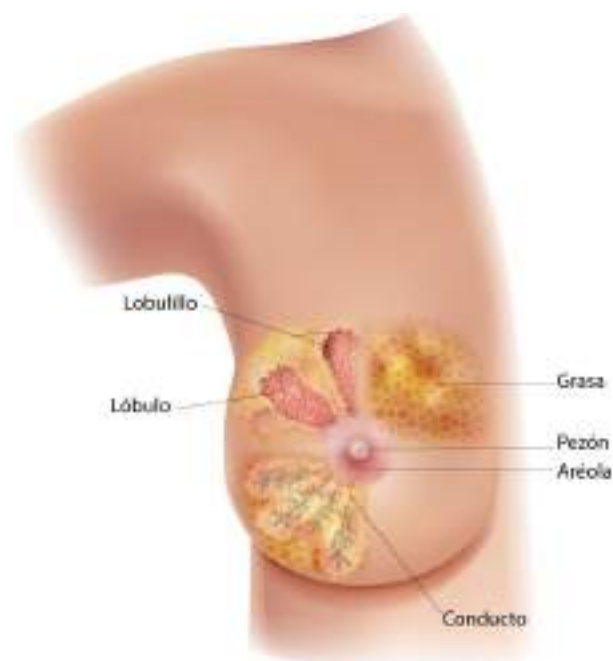


Figura 3.1. Partes de la mama. Diagrama representativo de las diferentes partes de la mama humana. Tomada de https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm. Centro para el control y prevención de enfermedades [1].

La arquitectura de la glándula mamaria (GM) se adapta precisamente a su función: producir y segregar leche para la alimentación del recién nacido. Está formada por parénquima y estroma. El parénquima forma un sistema de ramificación de conductos que eventualmente llevan al desarrollo de acinos secretores; y el estroma se compone principalmente de tejido adiposo (TA), que proporciona el entorno para el desarrollo del parénquima. Dos tipos de células epiteliales son las que principalmente comprenden el parénquima: células basales y las luminales. El epitelio basal se compone de células mioepiteliales, que generan la capa externa de la glándula, y una pequeña

población de células madre, que suministran los diferentes tipos celulares. El epitelio luminal forma conductos y alvéolos secretores, y contiene poblaciones de células definidas por su estado de receptores hormonales. Junto con el mioepitelio, el epitelio luminal genera una bi-capa, estructura tubular que permite que las células mioepiteliales se contraigan para expulsar la leche del interior de las células luminales alveolares durante la lactancia [2] (**Figura 3.2**).

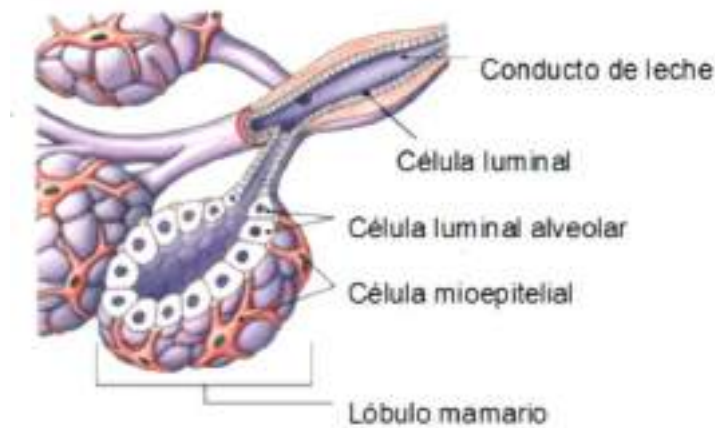


Figura 3.2. Histología de la GM. Adaptado de: <http://humanbiologylab.pbworks.com>

Existen distintos tipos de CaM, los dos más comunes de acuerdo a la estructura donde se origina la malignización son:

Carcinoma ductal. Las células cancerosas se originan en los conductos. Se vuelve **infiltrante** cuando las células transformadas salen de ellos y se multiplican en otros tejidos mamarios. Estas células cancerosas invasoras también pueden diseminarse, o formar metástasis en otras partes del cuerpo. Es el carcinoma más frecuente.

Carcinoma lobulillar. Las células cancerosas se originan en los lobulillos. Se vuelve **infiltrante** cuando las células transformadas se diseminan de los lobulillos a los tejidos mamarios cercanos.

Existen otros tipos de CaM menos comunes, tales como la **enfermedad de Paget** (que afecta el pezón y la areola mamaria), el **CaM medular** (subtipo del carcinoma ductal infiltrante, pero con mejor pronóstico), el **CaM mucinoso** (los tumores se forman de células anormales inmersas en lagunas de mucina, glucoproteína del moco epitelial), y el **CaM inflamatorio**, que es una enfermedad muy agresiva en la que las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos en la piel de la mama. Se le llama "inflamatorio" porque muchas veces el seno se ve hinchado y enrojecido, como si estuviera "inflamado" (extraído de breastcancer.org. **Figura 3.2**) [3].

El **carcinoma ductal *in situ*** es otro tipo de CaM que puede llevar a CaM infiltrante. Las células cancerosas se encuentran únicamente en la capa que cubre los conductos y no se han extendido a otros tejidos de la mama.



Figura 3.2. Tipos de CaM. Esquema de los distintos tipos de CaM más comunes, en rojo se señalan las partes de la mama que se ven afectadas en cada uno de ellos. Tomado de breastcancer.org. (<https://www.breastcancer.org/es/tipos/carcinoma-ductal-invasivo>) [3]

Las células cancerosas invasoras, originarias de un tumor (Tu) primario de mama pueden diseminarse fuera de la mama a través de los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. Cuando el CaM se disemina a otras partes del cuerpo, se dice que ha hecho metástasis. Con más frecuencia, el CaM se disemina a los huesos, el hígado, los pulmones y el cerebro [4].

3.1.1. Epidemiología

El CaM es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo [5]. El CaM femenino ha superado al cáncer de pulmón como la principal causa de incidencia mundial de cáncer en 2020, con un estimado de 2,3 millones de nuevos casos. Es la quinta causa principal de mortalidad por cáncer en todo el mundo, con 685.000 muertes. Entre mujeres, el CaM representa 1 de cada 4 casos de cáncer y 1 de cada 6 muertes por cáncer, ocupando el primer lugar en incidencia en la gran mayoría de países (159 de 185 países, **Figura 3.3 A**) y por mortalidad en 110 países (**Figura 3.3 B**, [6]. En la Argentina, cada año, mueren aproximadamente 5.400 mujeres a causa del CaM y se diagnostican alrededor de 17.000 casos nuevos [7].

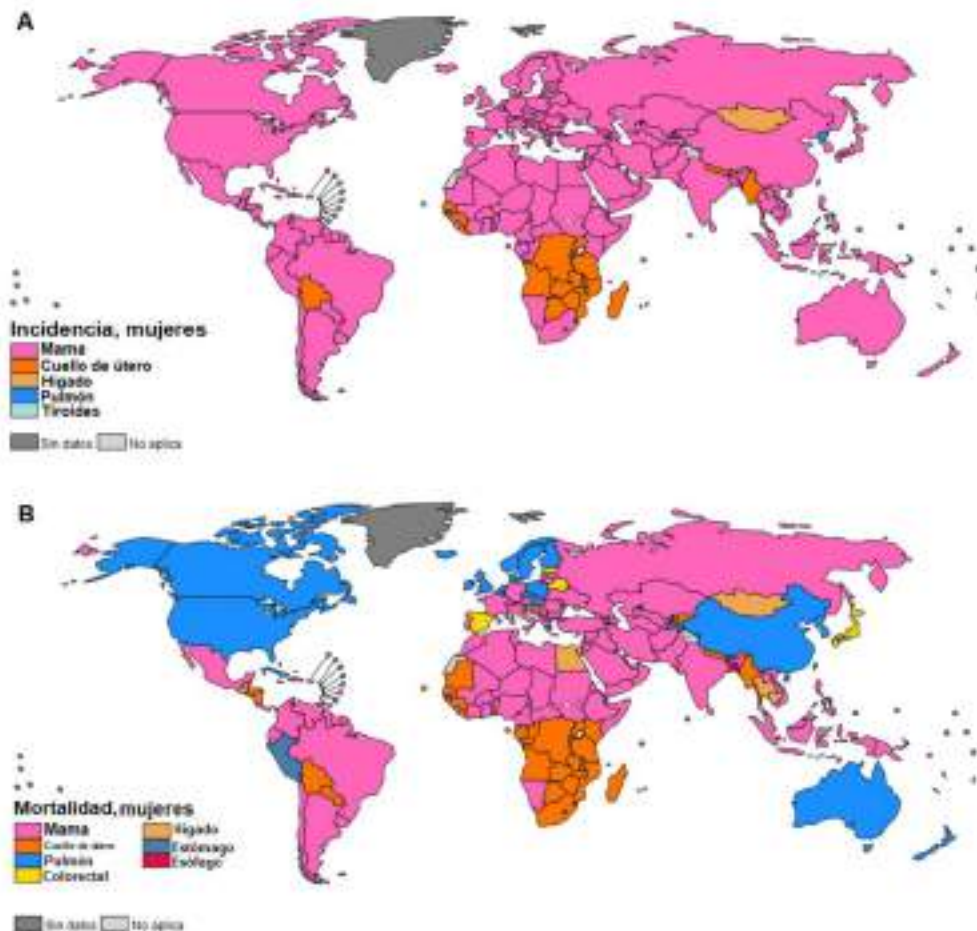


Figura 3.3. Incidencia y mortalidad mundial del CaM 2020. Imagen tomada y modificada de GLOBOCAN 2020. **A)** Incidencia mundial de CaM en mujeres. **B)** Mortalidad mundial de CaM en mujeres.

Datos más recientes evidencian una disminución en las tasas de mortalidad. A lo largo del período 2002–2019, la mortalidad por CaM registró un descenso sostenido y significativo, a un ritmo de -1,03 % anual, evidenciando en 2019 una tasa ajustada de 16,93 defunciones por cada 100.000 mujeres. En la **Figura 3.4** observamos la distribución de las TAE (Tasa Anual Equivalente) de mortalidad por CaM estandarizada por edad en Argentina según quintiles (en estadística, los quintiles dividen a la distribución en cinco partes, es decir, un quintil representa un 20% del total) de distribución. La provincia de Mendoza tiene una tasa intermedia de mortalidad (15,66 – 18,61) comparada con provincias como La Pampa que tiene la más alta (24,23) o Jujuy que tiene una de las más bajas (9,94; Estadísticas de mortalidad por cáncer de mama en mujeres. Disponible en: <https://www.argentina.gov.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad-cm>) [8].

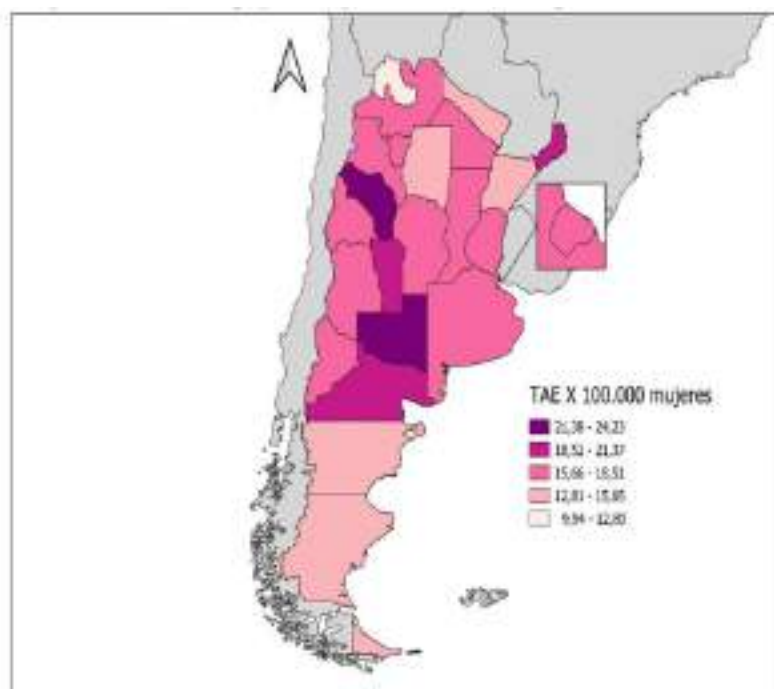


Figura 3.4. Mortalidad por CaM en mujeres según jurisdicciones. Tasas ajustadas por edad por 100.000 mujeres agrupadas en quintiles de mortalidad. Argentina, 2019. Imagen tomada del sitio web del Instituto Nacional del Cáncer (INC) [8].

3.1.2. Proceso tumorogénico

La carcinogénesis es un proceso complejo mediante el cual una célula normal se transforma en una célula neoplásica. La visión clásica de la carcinogénesis es la teoría de la mutación somática que explica el cáncer como consecuencia de una acumulación de mutaciones y otros cambios hereditarios en células susceptibles. La teoría de la mutación somática ha cambiado con el tiempo. Actualmente, diferentes investigadores han propuesto modificaciones en la teoría de la mutación somática que comparte la suposición de que los carcinógenos alteran la estructura o función del ADN en las células del tejido donde surge el cáncer. Estas variaciones, que incluyen teorías epigenéticas, cromosómicas y de células madre cancerosas, difieren en cómo se produce la alteración y en qué tipos de células están involucradas. Más recientemente, un paradigma alternativo, la teoría de campo de organización de tejidos, propone el cáncer como una enfermedad de origen tisular [9]. Bajo dicha teoría, el cáncer surge de la alteración de la microarquitectura tisular, impulsado por el colapso de los gradientes de morfogénesis que mantienen su integridad [9, 10]. Su idea central es que la causa original del cáncer no son mutaciones genéticas, sino la alteración de la cohesión de los tejidos. Como consecuencia, el control de la división celular se altera cuando los tejidos pierden su estructura, lo que progresivamente puede llevar a la formación de un Tu. Ambas teorías explican sólo en parte la tumorogénesis no siendo aceptadas en su totalidad por la comunidad científica para explicarla. Hacia 2015 algunos autores optaron por la conciliación de ambas teorías; o las tomaron como dos posibles caminos distintos, pero a la vez compatibles, de explicar la génesis del cáncer [11].

Otros autores propusieron diferentes hipótesis para detallar la carcinogénesis, como es el caso de Björn LDM Brücher y Ijaz S Jamall. Ellos originaron un paradigma que puede explicar el

origen de la mayoría de los tipos de cáncer existentes, este postula que el cáncer se origina siguiendo una secuencia de eventos que incluyen 1) un estímulo patógeno (biológico o químico), seguido de 2) inflamación crónica subclínica, que luego desarrolla 3) fibrosis con cambios asociados en el microambiente celular. A partir de estos cambios, 4) se desarrolla un nicho precanceroso (PCN), que desencadena la 5) implementación de una estrategia de escape del estrés crónico (CSES) celular con 6) una transición de célula normal a célula cancerosa (NCCCT) [12], **Figura 3.5**). También sugieren que la mayoría de los hallazgos reportados que evidencian mutaciones en el desarrollo del cáncer son eventos tardíos o epifenómenos y no la causa de origen de la enfermedad.

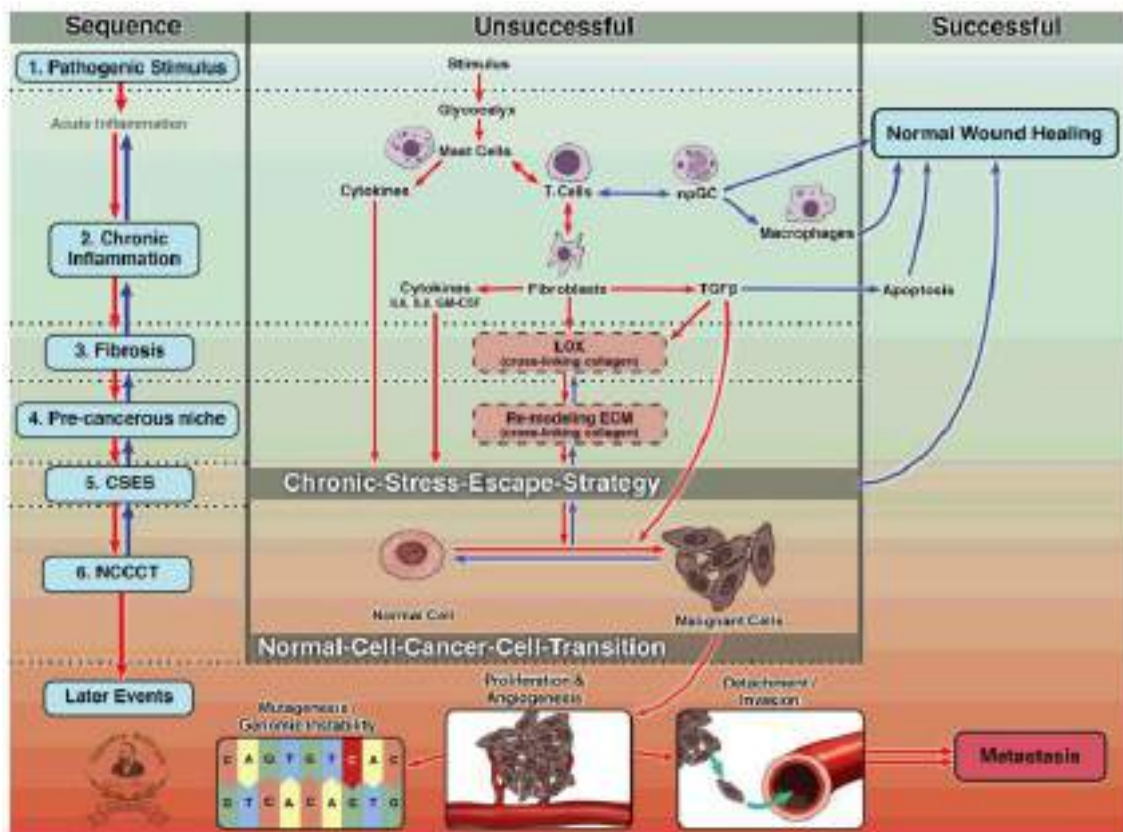


Figura 3.5. Esquema de “Epistemología del Origen del Cáncer”. Tomado de Björn LDM Brücher y Ijaz S Jamali 2014. Abreviaturas: CSES chronic stress escape strategy (estrategia de escape del estrés crónico); NCCCT normal-cell-cancer-cell transition (transición de células normales a células cancerígenas); npGC neutrophil granulocyte (granulocitos neutrófilos); TGFβ tumor growth factor beta (factor de crecimiento tumoral beta); LOX lysyl oxidase (lisil oxidasa); MEC extracellular matrix (matriz extracelular).

El proceso tumorigénico incluye diferentes etapas, entre ellas iniciación, promoción, progresión y metástasis. La fase de iniciación implica la alteración, cambio o mutación de genes que surgen espontáneamente o inducidos por la exposición a un agente cancerígeno. Las alteraciones genéticas pueden resultar en una desregulación en la proliferación, supervivencia y/o diferenciación celular. Se considera que la etapa de promoción es un proceso relativamente largo y reversible en el que se acumulan células iniciadas que proliferan activa y descontroladamente. Dentro de este período, el proceso puede ser alterado por los agentes promotores o quimiopreventivos. La progresión es la etapa final de la transformación neoplásica, donde se producen cambios genéticos,

fenotípicos y proliferación celular. Esto implica un rápido aumento en el tamaño del Tu, donde las células pueden sufrir nuevas mutaciones con potencial invasivo y metastásico [13], **Figura 3.6**).

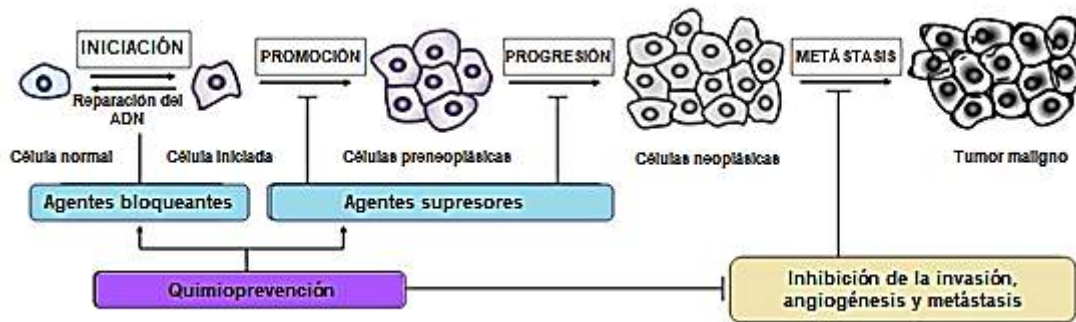


Figura 3.6. Etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción, progresión y metástasis. Adaptado de Siddiqui IA et al. 2015.

Actualmente se sabe que la progresión tumoral ocurre dentro de un microsistema donde el cáncer y las células del estroma intercambian proteínas, citocinas y otros compuestos solubles que promueven el crecimiento celular. Además de la liberación de estos componentes al medio ambiente, se ha propuesto una influencia recíproca entre los dos tipos de células mediante el contacto directo célula a célula [14] y mediante modificaciones en la matriz extracelular (MEC) [15]. La invasión de tejido sano por células tumorales es promovida por la proteólisis de la MEC local. Esto indica que la MEC, además de ser un sistema de apoyo, juega un papel clave en la regulación del tamaño, transporte y migración celular, y en la expresión de genes específicos [16]. Hasta la fecha, se conoce poco sobre los mecanismos específicos por los cuales las células tumorales activan el tejido estromal, o cómo el estroma regula la biología de la carcinogénesis [17].

El desarrollo de la GM, así como el proceso carcinogénico son similares entre la especie humana y los roedores [18]. El CaM de roedores imita a los tumores de mama humana, siendo ésta una de las principales razones para el uso de modelos de roedores en la investigación de la carcinogénesis mamaria [19, 20]. Los carcinomas mamarios producidos por dimetilbenzantraceno (DMBA) muestran características similares al adenocarcinoma de la mama humana, tales como la progresión histológica y la dependencia de hormonas ováricas [21]. Uno de los sistemas más ampliamente utilizados de tumorigénesis mamaria en ratas es la inducción de tumores mamarios mediante DMBA, administrado intragástricamente a ratas Sprague-Dawley. La incidencia de tumores inducidos por DMBA alcanza el 100% cuando el carcinógeno se administra a ratas de entre 30 y 55 días de edad [22].

El DMBA es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP). Los seres humanos están expuestos a los HAP como DMBA a través del humo del tabaco y el consumo de alimentos a la parrilla. La activación de DMBA implica su epoxidación catalizada por la enzima citocromo P450 oxidasa y epóxido hidrolasa con la formación de metabolitos como los fenoles, dioles, diolepóxidos y tetroles [23, 24]. Algunos de los diolepóxidos formados escapan a los mecanismos de desintoxicación, y pueden unirse a los residuos de adenina del ADN causando mutaciones en los oncogenes sensibles al crecimiento, resultando en la transformación de las células normales a un fenotipo maligno [25]. En adición, el metabolismo de DMBA también genera especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas (ROS) que pueden desempeñar un papel clave en la mutagénesis y carcinogénesis mediante la

inducción de daño de la membrana plasmática, oxidación de lípidos y proteínas, así como en el marco de lectura y reticulaciones entre el ADN y las proteínas [19, 26].

3.1.3. Regulación hormonal de la carcinogénesis mamaria

El CaM suele ser caracterizado por el control hormonal de su crecimiento, estando implicadas tres categorías de hormonas en este proceso: las reproductivas (estrógenos, progesterona -P4- y las hormonas lactogénicas), las metabólicas que son las responsables de coordinar la respuesta del organismo a cambios metabólicos y al estrés (la hormona de crecimiento -GH-, glucocorticoides, insulina y hormonas tiroideas -HT-), y las mamarias, ya que la misma GM es capaz de sintetizar y segregar GH, péptidos relacionados con la hormona paratiroides (PTHrP), leptina y prolactina [27].

Una función importante del sistema endocrino es sincronizar el desarrollo y la función mamaria con el estado reproductivo del animal y las demandas de las crías para el consumo de leche. Los niveles de solo un pequeño número de hormonas reproductivas, incluido el estrógeno (E2), P4, el lactógeno placentario (LP), la prolactina (PRL), y la oxitocina, cambian con el estado reproductivo. Todas estas hormonas tienen acciones directas sobre la GM. Otro grupo de hormonas, las hormonas metabólicas, son principalmente responsables de coordinar la respuesta del cuerpo a los cambios metabólicos y al estrés. Entre estos, se sabe que la GH juega un papel en el desarrollo ductal [28], los glucocorticoides y las HT son necesarios para la secreción de leche [29], y la insulina es necesaria para el desarrollo mamario en cultivo (*in vitro*) [28, 30]. En general, los cambios en los niveles sistémicos pueden alterar la respuesta mamaria a las hormonas reproductivas e indirectamente regulan la síntesis y secreción de leche al alterar el flujo de nutrientes a la GM lactante.

Recientemente se ha reconocido que la GM es en sí misma un órgano endocrino que sintetiza y secreta GH [31], PTHrP [31], leptina [31] y PRL [32]. Aunque todos pueden tener roles paracrinós o autocrinos locales en el desarrollo temprano, hay evidencia de roles sistémicos potenciales para GH, PTHrP y posiblemente leptina. La PRL mamaria es importante en la tumorigénesis, teniendo un efecto autocrino a través del receptor de prolactina (PRLR) en la célula que secreta la hormona [33]. Diferentes estudios han demostrado que el E2, la P4, la PRL, la GH, y las HT son esenciales para la elongación ductal, la ramificación y la gemación alveolar, y que la PRL, los glucocorticoides, la GH, las HT, la oxitocina y la insulina son necesarios para el desarrollo completo del lóbulo alveolar y la síntesis, secreción y producción de leche, además de la lactancia [28].

3.1.3.1 Clasificación molecular del CaM

El CaM es una enfermedad compleja que presenta un alto grado de heterogeneidad inter e intratumoral. Por esa razón, es necesario un enfoque personalizado para obtener la mejor respuesta en los pacientes al administrar las modalidades de tratamiento. La estratificación histológica del CaM está basada principalmente en la expresión del receptor de estrógeno (RE), receptor progesterona (RP4) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) además del nivel de expresión de Ki 67. De hecho, el CaM genera tumores en los que la subclasificación molecular inicial ha llevado a mejores resultados, al guiar la administración de terapias específicas como la terapia hormonal (por ejemplo, tamoxifeno) y la terapia dirigida a HER2 (por ejemplo,

trastuzumab). Si bien la estratificación histológica sigue siendo una práctica común, los avances tecnológicos han desentrañado más complejidades con la aparición de al menos cinco subtipos moleculares distintos de CaM basado en el agrupamiento de la expresión génica de los marcadores nombrados anteriormente [34]. Los cinco subtipos de CaM son los siguientes: **Luminal A** (RE y/o RP4 positivo/HER2 negativo/baja expresión de Ki 67), **Luminal B** (RE y/o RP4 positivo/HER2 negativo/alta expresión de Ki-67), **Luminal B positivo para HER2 o HER2 enriquecido** (RE y/o RP4 positivo/sobreexpresión de HER2/cualquier grado de expresión de Ki-67), **HER2 positivo no luminal o Basal-like** (RE y RP4 ausentes/sobreexpresión de HER2) y **triple negativo o Normal-like** (RE y RP4 ausentes/HER2 negativo) [35].

3.1.3.2 Efecto de los estrógenos

Los estrógenos endógenos juegan un papel importante en su desarrollo y los bloqueadores del RE son fármacos importantes en su tratamiento [36-38]. Se ha demostrado que exposiciones muy prolongadas a los estrógenos dan como resultado un mayor riesgo de contraer CaM [39].

Existen tres tipos de estrógenos principales: 17 β -estradiol, estrona y estriol (**Figura 3.7**). Dentro de ellos, el 17 β -estradiol es el más abundante y es sintetizado principalmente en el ovario mientras que en mujeres postmenopáusicas su producción se da en tejidos extragonadales. En cambio, la estrona tiene como fuente principal a los tejidos periféricos, en tanto que el estriol se produce mayormente en el hígado. Los estrógenos también se producen en cantidades menores en glándulas adrenales y TA [40].

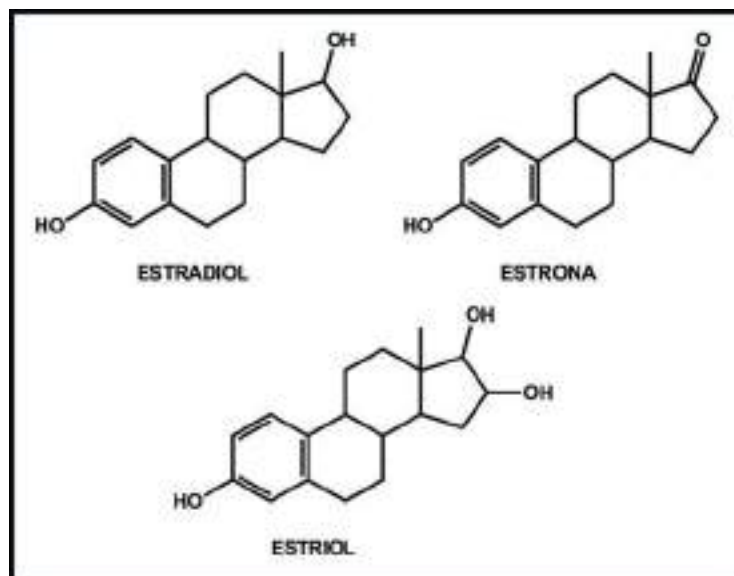


Figura 3.7. Estructuras de los principales estrógenos fisiológicos. Tomado de José Locía Espinoza 2013 [40].

Entre los efectos de los estrógenos se encuentran el control en los depósitos de grasa corporal, el desarrollo y crecimiento de la GM, la estimulación de la proliferación celular del útero, las trompas de Falopio, el epitelio vaginal y la maduración de los ovarios. También se encuentran implicados en el control de la conducta sexual femenina a nivel del sistema nervioso central. Por

otro lado, además de participar en la función reproductiva, los estrógenos son necesarios para el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y de la masa ósea, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, y participan en aspectos relacionados con la fisiología vascular siendo factores cardioprotectores, entre otras funciones. Los estrógenos también influyen procesos patológicos de enfermedades hormono-dependientes tales como CaM, endometrio, colon y ovario [41]. Concretamente, el E2 regula todos estos procesos primero a través de la difusión de la membrana plasmática de las células blanco y, luego, por la señalización de receptores específicos intracelulares.

Las acciones biológicas del E2 son mediadas por la unión a sus receptores, los cuales poseen dos isoformas: alfa (RE α) y beta (RE β) como se aprecia en la **Figura 3.8** [42].

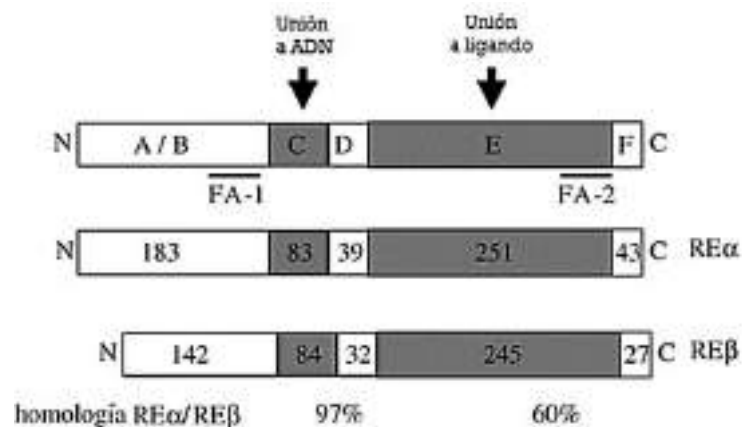


Figura 3.8. Comparación de las estructuras de los receptores de estrógenos α y β . En esta figura pueden apreciarse las similitudes que comparten ambas isoformas, con los dominios de unión a ADN y al ligando. Tomado de Curtis Hewitt y Korach 2002 [43].

Ambas isoformas del receptor pueden llevar a cabo sus acciones tanto por efectos genómicos como no-genómicos, y esto depende de la localización intracelular de los receptores. Para la activación de la vía genómica, la unión de E2 provoca la translocación de los receptores al núcleo. En cambio, en la activación de la vía no-genómica, el E2 produce una señalización rápida e involucra la activación de varias vías de transducción de señales tales como PLC/PKC; Src/ERK, PI3K/AKT, p38/MAPK; JAK/STAT, etc. La naturaleza de estas vías y el papel que desempeñan en la función celular difieren entre el RE α y el RE β . En particular, las señales rápidas generadas del complejo E2-RE α conducen a la célula al ciclo celular y representan la principal determinante de los efectos proliferativos y de supervivencia del E2. En contraste, los efectos rápidos generados por el complejo E2-RE β sacan a la célula del ciclo celular, representando la clave para entender los efectos antiproliferativos inducidos por el E2 [42, 44].

3.1.3.3 Efecto de la progesterona

Los progestágenos sintéticos también se han relacionado con un mayor riesgo de CaM; sin embargo, el papel de la P4 endógena en la fisiología mamaria y la carcinogénesis está poco definido. Estudios mecanísticos que utilizan cultivo celular, cultivo de tejidos y modelos preclínicos implican a

la P4 en la carcinogénesis de mama. Por el contrario, los datos epidemiológicos generalmente no muestran una asociación de los niveles de P4 circulante con el riesgo a contraer CaM. Esto puede deberse a lo difícil que es definir el papel de la P4 en la fisiología de la mama y en la neoplasia, ya que la P4 tiene interacciones complejas con los E2 y otras hormonas (por ejemplo, andrógenos, PRL, etc.). Separar los efectos individuales de los E2 y la P4 es aún más complicado por la dependencia parcial de la transcripción del RP en los eventos transcripcionales del RE α ; de hecho, interpretar la interacción integrada de las hormonas puede ser más esencial que aislar efectos independientes [45].

En humanos, la P4 (**Figura 3.9**) es producida por el ovario bajo la influencia de las hormonas hipotálamo-hipofisarias (hormona folículo-estimulante y hormona luteinizante), principalmente por el cuerpo lúteo o amarillo que se forma durante la segunda mitad del ciclo menstrual; y a partir del tercer mes del embarazo, por la placenta [46].

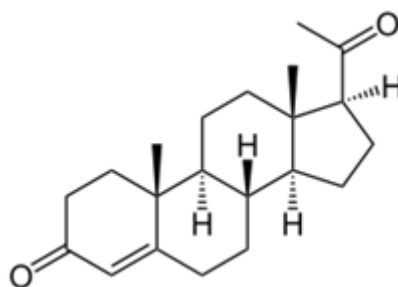


Figura 3.9. Estructura de la progesterona. Como todos los esteroides ováricos, es una hormona derivada del colesterol. Tomada de <https://es.wikipedia.org/wiki/Progesterona>.

Los efectos de P4 se producen luego de la unión de la hormona con su receptor intracelular (RP4). Este existe en dos isoformas, tal como se muestra en la **Figura 3.10**.

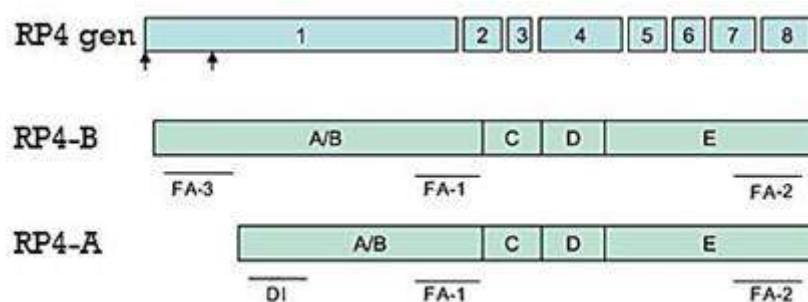


Figura 3.10. Estructura de los receptores de progesterona. Adaptado de Cork et al 2008 [47].

El RP4 es miembro de la superfamilia de receptores nucleares y es un efector importante producto de la activación de los RE; en la mayoría de los casos el E2 es requerido para la expresión de RP4. Estos receptores tienen dos mecanismos de acción: la vía genómica clásica, donde median la transcripción a través de la interacción con elementos de respuesta a P4 presentes en el ADN; y la vía no-genómica que es llevada a cabo por receptores presentes en la membrana plasmática. Dentro de los efectos no genómicos de P4 que se han descrito están los cambios en el flujo de iones y

calcio intracelular y la rápida y transitoria activación de la vía MAPK, entre otros segundos mensajeros. Sin embargo, las interacciones directas de los RP4 con componentes de la vía no-genómica y subsecuente activación de vías de señalización son integradas con las acciones genómicas [48].

3.1.3.4 Hormonas Tiroideas

Las HT, tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), son hormonas basadas en la tirosina producidas por la glándula tiroidea, la principal responsable de la regulación del metabolismo. Un componente importante en la síntesis de las hormonas tiroideas es el yodo [49]. La forma más abundante de HT en la sangre es la T4, que tiene una semivida más larga que la T3. La proporción T4 a T3 liberada en la sangre es aproximadamente 20 a 1 [50]. La T4 es convertida en la forma más activa T3 dentro de las células gracias a enzimas como las deiodinasas y la 5'-yodinasas. Sus efectos son el aumento del metabolismo basal, lo cual es indispensable para un correcto desarrollo fetal, y el funcionamiento adecuado de los sistemas cardiovasculares, musculoesquelético, hematopoyético, así como para respuestas corporales adecuadas en cuanto a producción de calor, consumo de oxígeno y regulación de otros sistemas hormonales [51].

La mayoría de la HT circulando por el torrente sanguíneo está unida a una proteína transportadora (ver **Tabla 3.1**). Sólo una pequeña cantidad de la hormona circulante está libre y biológicamente activa, por lo tanto la medición de las concentraciones de HT libre es de gran valor diagnóstico. Cuando la HT está unida, ésta no es activa, entonces es la cantidad de T3/T4 libre la que es importante [52].

Tabla 3.1. Porcentajes de HT libre y unida a proteínas transportadoras. Tomado de [52]

HT libre o unida a proteínas transportadoras	Porcentaje
Unida a globulina fijadora de tiroxina	70%
Unida a transtiretina o prealbúmina fijadora de tiroxina	10-15%
Paraalbumina	15-20%
T4 libre	0,03%
T3 libre	0,3%

La T3 y T4 atraviesan la membrana celular con facilidad ya que son moléculas lipofílicas, y funcionan vía una serie de receptores nucleares en el núcleo de la célula, los receptores de hormona tiroidea (TR). Sin embargo, se han identificado en humanos al menos diez diferentes transportadores de yodotironina activos energía-dependientes y genéticamente regulados. Ellos garantizan que los niveles intracelulares de HT sean mayores que en el plasma sanguíneo o líquido intersticial [52].

Las HT son esenciales para el desarrollo y diferenciación adecuada de todas las células del cuerpo humano. Estas hormonas también regulan el metabolismo de proteínas, grasas, y

carbohidratos, afectando cómo las células humanas usan los compuestos energéticos. También estimulan el metabolismo de las vitaminas. Numerosos estímulos fisiológicos y patológicos influyen en la síntesis de la hormona tiroidea. Las HT tienen diferentes efectos fisiológicos:

- Incrementan la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco.
- Potencian el desarrollo del cerebro.
- Incrementan el metabolismo de proteínas y carbohidratos.
- Incrementan la tasa de ventilación.
- Incrementan el metabolismo basal.
- Generan calor en todos los tejidos menos en el cerebro, útero, ganglios linfáticos, testículos y adenohipófisis.
- Aumentan el número de receptores de catecolaminas y amplifican la respuesta postreceptor en el sistema nervioso simpático.
- Aumentan la eritropoyetina.
- Regulan el metabolismo óseo.
- Permiten la relajación muscular.
- Engrosan el endometrio.
- Intervienen en los niveles de producción de hormonas gonadotropinas y GH.
- Permiten la respuesta correcta del centro respiratorio a la hipoxia e hipercapnia (aumento de la concentración de CO₂ en sangre), [53].

Tanto el exceso como la deficiencia de T4 pueden causar trastornos:

- **Hipertiroidismo** es causado por el exceso de T4 libre, T3 libre, o ambas circulantes en sangre.
- **Hipotiroidismo** es causado por una deficiencia de T4, T3, o ambas.

Las HT (T4 y T3) son producidas por las células epiteliales tiroideas de la glándula tiroides y son reguladas por la hormona estimulante de la tiroides o tirotrófina (TSH), la cual es secretada por las células tirotrópicas de la adenohipófisis. Ya que los efectos de la T4 son mediados vía la T3 (la T4 es convertida en T3 en el tejido blanco)[54].

La participación de las HT en el desarrollo y la diferenciación del tejido mamario normal ha sido bien establecida [55-57]. Sin embargo, existe controversia acerca de la relación entre los trastornos de la tiroides y la incidencia del CaM. Al unirse a los TR, la HT puede inducir o inhibir la transcripción de genes. Muchas vías influenciadas por la HT también juegan un papel en la tumorigénesis. Por ejemplo, la inducción de deiodinasa 3, una enzima que inactiva la HT, mantiene la proliferación en el carcinoma de colon, lo que sugiere un vínculo entre el hipotiroidismo local y el crecimiento tumoral. Además, se ha demostrado que la HT tiene un efecto directo sobre vías oncogénicas como las vías del fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y ERK1/2. La HT y los TR se han relacionado a una mayor proliferación en líneas celulares de CaM, ovario y próstata. Por el contrario, también se han formulado hipótesis sobre los efectos protectores de la HT. La HT suprime la proliferación celular no regulada al inhibir la proteína activadora 1. Varios tipos de tumores, como el cáncer de pulmón, mama e hígado están asociados con mutaciones inactivantes en los TR que bloquean el acceso de los TR nativo a los genes blanco, lo que produce una reducción de la acción de la HT. La restauración de la expresión del TR 1 nativo en líneas celulares de cáncer de hígado y mama retarda el crecimiento tumoral y suprime la invasión tumoral y la metástasis [58].

3.2. Hipotiroidismo

El hipotiroidismo es una enfermedad del sistema endocrino caracterizada por la acción inadecuada de las HT en el organismo [59] principalmente por una producción deficiente en la glándula tiroidea (hipotiroidismo primario). También puede producirse por una estimulación deficiente de la glándula tiroidea debido a un trastorno que altere la producción de la hormona tiroestimulante en la hipófisis (hipotiroidismo secundario, [60]). En las zonas donde la ingesta de yodo es suficiente, la tiroiditis crónica autoinmune (enfermedad de Hashimoto) es la causa más común del hipotiroidismo [61].

Las manifestaciones clínicas son poco específicas. El diagnóstico se basa en pruebas de laboratorio, principalmente la determinación de los niveles de TSH en la sangre como método de cribado. Se pueden realizar distintas clasificaciones del hipotiroidismo:

Según el lugar donde se produzca la disfunción.

- Hipotiroidismo primario (si se localiza en la glándula tiroidea).
- Hipotiroidismo secundario (si se sitúa en la región hipofisaria).
- Hipotiroidismo terciario (si se sitúa a nivel hipotalámico).
- Hipotiroidismo periférico (por resistencia periférica hormonal [62]).

Según el momento de inicio.

- Hipotiroidismo congénito (se presenta en el momento de nacer, o incluso antes).
- Hipotiroidismo adquirido [62].

Según su severidad. El hipotiroidismo es un trastorno graduado, que puede presentarse como una alteración leve sólo detectable en análisis bioquímicos hasta una condición potencialmente letal en el caso de un coma mixedematoso [60].

Hipotiroidismo subclínico: nivel de TSH elevado; T4 y T3 dentro de rangos normales [60, 62, 63]. El hipotiroidismo subclínico se produce cuando hay un nivel persistentemente alto de TSH, mientras que los niveles circulantes de HT libres (T4 y T3) están dentro de rangos de normalidad. El riesgo de progresión a hipotiroidismo clínico o manifiesto aumenta con la presencia de autoanticuerpos, los antecedentes familiares y la presencia de bocio [64].

Hipotiroidismo clínico leve: TSH elevada, T4 baja y T3 normal [60, 62].

Hipotiroidismo clínico manifiesto: TSH elevada; T4 y T3 bajas [60, 62].

El tratamiento consiste en administrar levotiroxina por vía oral, con dosis individualizadas según la magnitud del hipotiroidismo, la edad del paciente y los antecedentes de cardiopatía isquémica [61]. Es frecuente encontrar una parte de pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento y necesitan dosis inesperadamente elevadas de levotiroxina, o cuya respuesta al tratamiento es irregular, necesitando frecuentes ajustes de las dosis de medicación, con períodos de dosis más altas o más bajas. Este hecho es un indicio, habitualmente ignorado, de que el fármaco no se está absorbiendo correctamente en el intestino.

Así como es posible padecer hipotiroidismo por la deficiencia de las HT, un exceso de las mismas produce hipertiroidismo, el cual se caracteriza básicamente por el aumento del metabolismo celular. El propiltiouracilo (PTU) se usa para tratar el hipertiroidismo en adultos y en niños de 6 años

o más, y para provocar el estado de hipotiroidismo experimental en diferentes modelos animales, como por ejemplo en la rata [65].

Tiene un mecanismo de acción central y otro periférico: en el central el PTU inhibe la enzima yoduro peroxidasa, que actúa normalmente en la síntesis de las HT al oxidar el anión yoduro (I^-) a yodo (I^0), y facilita la adición de yodo a los residuos de tirosina de la tiroglobulina, precursora de las HT. Es una de las etapas esenciales en la formación de la T4 [62].

El PTU no inhibe la acción del transportador de yoduro dependiente de sodio que se ubica en las membranas basolaterales de las células foliculares. La inhibición de esta etapa requiere inhibidores competitivos, como el perclorato y el tiocianato. En el mecanismo periférico de acción, el PTU, inhibe la desiodación periférica de T4 y T3. Inhibe la enzima 5'-desiodinasa (tetraiodotironina 5' desiodinasa), que transforma la T4 a la forma activa T3 [63].

En nuestro laboratorio se pudo demostrar que el PTU por sí mismo no induce muerte celular ni inhibe directamente el crecimiento de las células tumorales mamarias (MCF-7 y MDA-MB-231) ya que no se observaron diferencias significativas en ensayos de proliferación por bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT (ensayo colorimétrico) y viabilidad por azul de tripán (datos no mostrados, ensayos realizados para responder los comentarios realizados por uno de los revisores de López-Fontana *et al.* 2017 [94]).

3.2.1 Epidemiología

Los desórdenes tiroideos son altamente frecuentes. Sus manifestaciones varían según el área geográfica y están determinadas principalmente por la disponibilidad de yodo en la dieta. Casi un tercio de la población mundial vive en áreas con deficiencia de yodo, localizadas principalmente en zonas montañosas del Sureste de Asia, Latinoamérica y África Central. Tradicionalmente, Mendoza ha sido considerada zona de bocio endémico. El hipotiroidismo es una patología 10 veces más frecuente en mujeres que en hombres y se incrementa con la edad [7, 66]. La incidencia de enfermedad sintomática es de aproximadamente del 3-4% en la población general y aumenta hasta un 13-14% entre individuos mayores de 64 años [67]. Una proporción significativa de sujetos padece tiroiditis autoinmune crónica asintomática y el 8% de las mujeres (10% de mujeres mayores de 55 años) y 3% de los hombres tienen hipotiroidismo subclínico [66, 68]. Según estadísticas locales, en Mendoza la incidencia de hipotiroidismo clínico es de 1-3% y de enfermedad subclínica de 3,5-5% creciendo hasta un 15-22% en personas mayores de 60 años. Por su parte, el hipertiroidismo también es una patología relativamente frecuente y su prevalencia es de 0,5-2% a nivel mundial y de 1,5% en Mendoza.

3.2.2. Efectos del hipotiroidismo sobre el balance energético y el acumulo de TA

Las HT tienen un importante efecto en el balance energético ya que afectan tanto la ingesta como el gasto de energía. El hipotiroidismo se relaciona con ganancia de peso y disminución de la termogénesis y del gasto metabólico. Las HT y la TSH juegan un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética. Pueden participar directamente en el balance energético ya que

influyen tanto en la ingesta como en el gasto energético, o indirectamente a través de su acción en cambios en los patrones de secreción de otras hormonas como E2, leptina y GH, entre otras [69].

El hipotiroidismo es un trastorno complejo que directa e indirectamente modifica el balance energético. Se ha asociado con alteraciones metabólicas y cambios en el peso corporal. Los pacientes hipotiroideos suelen mostrar disminución del apetito, con ligero aumento de peso debido principalmente a la retención de líquidos por depósitos de glicoproteínas hidrófilas en diferentes tejidos [70]. El hipotiroidismo severo en la rata provoca una fuerte caída en la ingesta de comida y el metabolismo [71]. En un reciente estudio realizado por el grupo de trabajo [72], se observó una disminución de la ingesta de comida y del balance energético en ratas hipotiroideas en comparación con los animales control (eutiroideos). De acuerdo con otros autores que han demostrado que el consumo de oxígeno, la producción de calor y la tasa metabólica basal disminuyen en pacientes hipotiroideos [73], nuestro grupo de trabajo confirmó que el hipotiroidismo redujo el gasto de energía total ya que disminuyó la tasa metabólica basal en un 40,7% con respecto al control.

Los pacientes con disfunción tiroidea frecuentemente muestran alteraciones metabólicas y alteraciones de la composición corporal que también pueden ir acompañadas de cambios en la masa grasa corporal y en el funcionamiento del TA [70]. Los adipocitos producen adipoquinas y, a su vez, expresan receptores para la mayoría de las sustancias que tienen efectos endocrinos, autocrinos y paracrinos. La disfunción de los adipocitos puede alterar la liberación de adipoquinas que dan lugar a alteraciones metabólicas y energéticas [74]. López-Fontana y Pennacchio 2019, mostraron que, aunque los animales hipotiroideos tuvieron menor peso corporal que los controles, el porcentaje de depósitos de tejido adiposo blanco (TAB) y las características morfológicas de los adipocitos fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, el tejido adiposo mesentérico y omental (MOAT) de ratas hipotiroideas pareció ser disfuncional, atendiendo a los niveles séricos más bajos y la expresión tisular de adipoquinas en estos animales. Aunque algunos autores han considerado que el estado tiroideo podría influir en los niveles de leptina circulante principalmente a través de la regulación de la masa grasa en la rata [75], los estudios en humanos han demostrado que las HT juegan un papel relevante en el control del metabolismo de la leptina independientemente del índice de masa corporal y la grasa corporal [76]. Los resultados de nuestro grupo de trabajo mostraron que los niveles de leptina sérica eran más bajos en ratas hipotiroideas y no se correlacionaron con la masa grasa total ni con la expresión de leptina y su receptor, ObR, en los adipocitos. Hay cierto desacuerdo en los informes publicados y hasta el momento no se ha establecido una relación constante entre las concentraciones séricas de leptina y el hipotiroidismo [77]. La leptina juega un papel central en el control a largo plazo del peso corporal, actuando principalmente en el sistema nervioso central (SNC), induciendo saciedad y aumentando el gasto energético [78]. López-Fontana y Pennacchio vieron algo similar en cuanto a adiponectina en el TA. La expresión de adiponectina fue significativamente menor en el MOAT de ratas hipotiroideas incluso cuando la expresión de su receptor, Adipo R1, no se modificó. Esto también podría ser considerado como una disfunción del TA en el hipotiroidismo [72]. Sin embargo, se ha considerado que la adiponectina tiene efectos sobre el metabolismo similares a los de las HT que inducen la biogénesis mitocondrial y aumentan el gasto energético [79] y se ha podido especular que los niveles más bajos de ambas hormonas (leptina y adiponectina) podrían contribuir al mecanismo compensatorio para mantener el balance energético en ratas hipotiroideas.

Las HT actúan sobre varios aspectos de la homeostasis metabólica y energética. Son esenciales para la regulación de procesos importantes involucrados en la ingesta de alimento, la termogénesis, el consumo de energía y muchas otras reacciones metabólicas. Sin embargo, los

mecanismos responsables de la regulación del balance energético regulado por las HT son complejos y aún no han sido dilucidados por completo.

3.3. Tejido adiposo

El TA es un órgano endocrino bioactivo [80], altamente metabólico [81], que no solamente secreta factores solubles sino que también contribuye de manera significativa a la composición de la MEC. Específicamente, el TA tiene la capacidad de secretar numerosos mediadores inflamatorios tales como interleuquinas, quemoquinas, y factores de crecimiento. El TA visceral es diferente del TA periférico dado que elabora un set único de factores de crecimiento y citoquinas [82]. Estudios recientes han demostrado que los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por el TA tienen un impacto significativo sobre la progresión de diferentes enfermedades, incluyendo el CaM [83-86]. Los adipocitos constituyen el tipo celular estromal predominante en el microentorno del tejido mamario [87]. En los últimos años varios grupos han demostrado la importancia del diálogo que se establece en el frente invasivo, entre las células tumorales y los adipocitos [87, 88]. Las células tumorales serían capaces de modificar el fenotipo de los adipocitos, los cuales a su vez, estimularían el comportamiento agresivo y la invasión local del Tu [89]. Se ha propuesto la participación de algunos factores en este diálogo tales como leptina, adiponectina, COLVI, IL-6, HGF y VEGF.

La leptina es una hormona que regula el tamaño de los adipocitos y el desarrollo de algunos tipos de tumores. Su participación en el desarrollo tumoral parece estar relacionado con sus efectos antiapoptóticos, mitogénicos y proangiogénicos. Se ha detectado una sobreexpresión de ObR en algunos tipos de cáncer [90]. Por lo tanto, la señalización de leptina podría tener un papel clave en las células epiteliales de mama durante la invasión de un carcinoma.

Además, la adiponectina regula la glucosa y el metabolismo de las grasas, modificando procesos fisiológicos como el comportamiento alimentario y la hematopoyesis. ObR está involucrado en las vías protumorigénicas, mientras que los receptores de adiponectina (Adipo R1 y Adipo R2), poseen efectos proangiogénicos y antiapoptóticos [90]. Ambas, la leptina y la adiponectina se producen dentro del TA y parecen tener efectos opuestos en la regulación del cáncer [91], sin embargo todavía algunos resultados son controversiales en cuanto a sus papeles en la carcinogénesis mamaria [67, 92-95].

Otro factor soluble que es secretado por los adipocitos y se ha relacionado con la carcinogénesis mamaria es la clusterina. La clusterina ha sido implicada en numerosos procesos incluida la apoptosis, la regulación inmunitaria, la adhesión y la transformación morfológica celular. Es una chaperona molecular que evita la agregación de proteínas (como las plasmáticas) y puede mantenerlas desplegadas para futuros plegamientos por otras chaperonas. Internaliza proteínas a la célula para su degradación, las formas intracelulares pueden ubiquitinar otras moléculas. Regula la transcripción del factor NF-kappa- β . Cuando es secretada de la célula actúa como un factor antiapoptótico, sin embargo, cuando se la encuentra en el núcleo tiene funciones proapoptóticas. Cuando se une a la membrana mitocondrial inhibe la apoptosis ya que interfiere en la liberación de Citocromo C dependiente de Bax, regulando así la proliferación [96, 97]. Existe bibliografía que la considera un actor anti quimioterapéutico en el CaM [98, 99], y que la encuentra sobre expresada en el CaM triple negativo [100]. En la línea celular MDA-MB-231, cuando esta proteína es silenciada disminuye en gran medida la proliferación, invasión y migración características de estas células [99, 101]. Hasta la fecha son escasos los trabajos que relacionan la expresión y localización de clusterina

con el hipotiroidismo, y aún menos los que involucran el CaM y los estados tiroideos junto a esta proteína [102]. Sería interesante poder establecer una relación entre estos tres factores.

El TA tiene características según su ubicación [82]. Por ejemplo, el TA visceral presenta anatomía celular y perfiles de expresión diferentes del TA subcutáneo [103].

3.3.1. Tejido adiposo abdominal (TAA)

El principal depósito adiposo es el subcutáneo, que se encuentra en una importante superficie del cuerpo, pero principalmente en la zona proximal de las extremidades inferiores y en el abdomen. Adicionalmente, existen diferentes depósitos adiposos dentro de la cavidad torácica, abdominal y pélvica. Los individuos eutróficos (en buen estado de nutrición) tienen un desarrollo muy limitado de estos tejidos adiposos que rodean las vísceras; en condiciones de exceso nutricional, el depósito de triglicéridos ocurre tanto a nivel subcutáneo como visceral. Los principales depósitos adiposos viscerales son los que se desarrollan en el mesenterio y el epiplón mayor, pero también hay desarrollo de TA a nivel perirrenal, pericardiaco y, según la magnitud de la obesidad, alrededor de otros órganos como páncreas, vesícula, vasos sanguíneos, próstata, entre otros. A pesar de que ambos tejidos adiposos están compuestos por los mismos tipos celulares, la evidencia sugiere que tienen una biología muy diferente entre sí, tanto en términos de lipólisis y lipogénesis como de otras características biológicas: anatomía, clínica, pronóstico, biología molecular, etc. [103]. Un exceso de grasa visceral es conocido como obesidad central, la cual sobresale del abdomen. También se le ha relacionado con diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, enfermedades inflamatorias, y otras enfermedades relacionadas con obesidad [104].

Anatómicamente, el TAA está presente principalmente en el mesenterio y epiplón, y drena directamente a través de la circulación portal al hígado, es más celular, vascular, innervado y contiene un mayor número de células inflamatorias e inmunes, menor capacidad diferenciadora de preadipocitos y mayor porcentaje de grandes adipocitos. Hay más receptores de glucocorticoides y andrógenos que en el TA subcutáneo. Los adipocitos del TAA son metabólicamente más activos, más sensibles a la lipólisis y más resistentes a la insulina que los adipocitos del TA subcutáneo. El TAA tiene mayor capacidad para generar ácidos grasos libres y absorber glucosa y es más sensible a la estimulación adrenérgica, además conlleva una mayor predicción de mortalidad, ya que se asocia con la obesidad y su riesgo incrementado de mortalidad por enfermedades cardiovasculares [103].

Existen variaciones regionales en la densidad de los receptores del TA, en su afinidad y en la transducción de señales. El TAA contiene una mayor concentración de receptores de glucocorticoides [104], los cuales participan en la regulación metabólica y distribución de la grasa corporal [105]; de receptores de andrógenos y estrógenos [106]; sus adipocitos son más sensibles a la lipólisis inducida por catecolaminas y menos sensibles a la inhibición de la lipólisis dependiente del receptor α 2-adrenérgico [107, 108], expresa menos leptina y más adiponectina, angiotensinógeno e inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) que el TA subcutáneo [106, 109, 110].

3.3.2. Tejido adiposo mamario (TAM)

Las glándulas mamarias comienzan a desarrollarse durante la vida prenatal, pero continúan su remodelación durante la vida posnatal, la pubertad, el embarazo y la lactancia; volviéndose más

susceptibles a la carcinogénesis y haciendo que la influencia de la nutrición sea más importante durante estas etapas [111, 112]. En los seres humanos, los dos primeros años de vida constituyen un período crítico para el desarrollo morfológico y la diferenciación celular del tejido mamario [113, 114]. Los lactantes presentan amplias variaciones en el grado de desarrollo glandular (ramificación del árbol ductal y formación de acinos) y en la diferenciación funcional dada por la capacidad secretora del epitelio de revestimiento de conductos y acinos [115]. Esas variaciones pueden deberse a diferencias en el medio nutricional temprano en la vida.

La GM del roedor tiene estructuras en los extremos de los conductos de crecimiento llamados yemas terminales (TEB, del inglés terminal end buds). Estas estructuras son máximas cuando el animal tiene 21 días de edad, que es cuando comienzan a diferenciarse en yemas más pequeñas o yemas alveolares. Los TEB son reconocidos como los sitios donde comienza la carcinogénesis mamaria cuando están expuestos a un carcinógeno y, por lo tanto, un mayor número de TEB se correlaciona con una mayor predisposición al desarrollo canceroso [22, 116]. En humanos, existen estructuras similares a las TEB llamadas unidades lobulares de conducto terminal (TDLU). Tanto los TEB como las TDLU presentan una alta tasa de proliferación celular, lo que las hace la fuente principal de la mayoría de los precursores del CaM [117, 118].

El tejido mamario cambia a lo largo de la vida de una mujer, principalmente durante los períodos de fertilidad y embarazo. En consecuencia, las células epiteliales mamarias experimentan un crecimiento, desarrollo y diferenciación constantes. El compartimento estromal juega un papel clave en la regulación de estos cambios a través de factores solubles que se liberan al ambiente, así como a través de factores insolubles que están presentes en el propio estroma.

El epitelio mamario está rodeado de múltiples tipos de células estromales, incluidos preadipocitos, adipocitos, fibroblastos, vasculatura, pericitos y macrófagos [119]. Los adipocitos son el tipo de células estromales predominantes en el microambiente del tejido mamario [120]. Las interacciones epitelio-estroma median el desarrollo de la mama y la progresión del CaM [121].

En el microambiente del tejido mamario, los adipocitos se encuentran entre los tipos de células estromales predominantes [120] y están presentes en forma de preadipocitos, adipocitos maduros y adipocitos en estados de diferenciación intermedia (adipocitos pobremente diferenciados [122]). Aunque numerosos estudios han intentado dilucidar las interacciones adipocitos-MEC, todavía tienen que aclarar el papel esencial del TA en el desarrollo y función de la GM [123].

3.3.3. Tejido adiposo blanco, beige y pardo

Los niveles anormales de TSH y HT se asocian con frecuencia con cambios en el peso corporal y modificaciones en la función del tejido adiposo pardo (TAP) y del TAB [124]. El TAB y TAP tienden a ser heterogéneos con los adipocitos beige (o BRITE de BRown y whITE) / pre-TAP adipocitos humanos con el potencial para transformarse en TAB o TAP [125, 126]. Los dos tipos de TA difieren en su morfología y función. Por un lado, el TAB tiene una sola vacuola de grasa grande. Comprende dos depósitos principales, el TAB subcutáneo y el TAB visceral alrededor de órganos internos en la cavidad abdominal [127, 128]. Los depósitos de TAB viscerales (inguinal, mesentérico, omental, gonadal y retroperitoneal) tienen diferencias fundamentales incluyendo su influencia en el metabolismo [129] su función endocrina [130], el tamaños de sus adipocitos [131], las características de los preadipocitos [132], la expresión de genes del desarrollo [127], la respuesta a alta alimentación con grasas [133], etc. El adipocito de TAB es funcionalmente una célula activa y

produce varias adipocinas y hormonas como adiponectina, leptina y E2. Actúan sobre el sistema nervioso central para informar sobre la cantidad de reservas de energía en el cuerpo [73]. Se ha demostrado que la adiponectina aumenta el metabolismo energético, para inducir la oxidación de ácidos grasos y promover la biogénesis de mitocondrias [134, 135]. La leptina se cree que es una "señal lipoestática" que produce una retroalimentación negativa en el núcleo arqueado hipotalámico [102]. Los niveles circulantes de leptina se correlacionan positivamente con la masa de grasa corporal, con el porcentaje de grasa corporal y el índice de masa corporal [136, 137].

Es importante destacar que los adipocitos blancos son principalmente glicolíticos incluso en presencia de oxígeno, y por lo tanto producen y liberan grandes cantidades de lactato, como se ha visto en adipocitos *in vitro*, así como en ratas y humanos *in vivo* [138, 139]. El lactato liberado es posteriormente oxidado en los tejidos metabólicos, o se utiliza en el hígado para la gluconeogénesis. La captación de glucosa por los adipocitos blancos *in vitro* excede su necesidad de uso en la producción de triacilglicéridos (TAG) [139] y se ha propuesto que está mediada por TAB. La conversión de glucosa en lactato podría desempeñar un papel protector para contrarrestar la hiperglucemia, un proceso potencialmente importante para preservar la sensibilidad a la insulina [140]. Además, los cambios en el TAB mediados por la homeostasis del lactato se han relacionado con alteraciones metabólicas como la obesidad y la diabetes. Por tanto, el transporte de lactato es fundamental para la función de los adipocitos, sin embargo, su regulación y roles en este contexto no están completamente estudiados. En la mayoría de las células, MCT1 (SLC16A1) y MCT4 (SLC16A3) son las vías predominantes de captación y salida de lactato. Los datos existentes sobre la expresión del transportador de lactato en los adipocitos son escasos y hasta cierto punto contradictorios [138, 141].

Por otro lado, el TAP tiene muchas vacuolas de grasa más pequeñas y más número de mitocondrias [124]. Disipa la energía como calor (termogénesis) en un proceso mediado por el desacoplamiento de la proteína 1 (UCP1), que desacopla la fosforilación oxidativa de la producción de ATP [142]. Los adipocitos marrones se encuentran en depósitos específicos o pueden emerger entre la grasa blanca a través de los llamados proceso de browning (pardización). Datos recientes sugieren que los adipocitos de color pardo en el TAB y el músculo esquelético juegan un papel crucial en la regulación del peso corporal. Las HT tienen efectos profundos sobre la biogénesis mitocondrial y promueven la expresión de ARNm de UCP1 en músculo esquelético y TAP. Informes anteriores demostraron que el tratamiento con T3 inducía expresión de UCP1 y biogénesis mitocondrial acompañada de la inducción de P4C-1 en células madre derivadas de adipocitos multipotentes humanos diferenciados (hMADS). Los efectos de T3 en la inducción de UCP1 dependían del TR β [143]. Los hallazgos sugieren que las HT posiblemente podrían actuar como moduladores fisiológicos que inducen la utilización de energía en los adipocitos blancos a través de la inducción de la expresión de UCP1. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente de las HT en la inducción de adipocitos de color pardo en TAB queda por aclarar. El hipotiroidismo puede afectar las funciones del TA y en conjunto pueden alterar el metabolismo y el balance energético. En cambio, poco se sabe con respecto a los posibles mecanismos subyacentes de la interrelación entre la función tiroidea y las citocinas secretadas por del TA.

3.4. Efectos directos e indirectos, mediados por el TA, del hipotiroidismo sobre la carcinogénesis mamaria

El CaM y los trastornos de la tiroides, como hipotiroidismo e hipertiroidismo, son muy frecuentes en la población general. La posible asociación entre estas patologías se ha debatido durante décadas y sigue siendo controversial [144, 145]. Según algunos estudios epidemiológicos y retrospectivos sabemos que el hipotiroidismo es un factor protector contra el cáncer [146]. El hipotiroidismo se asocia con una menor incidencia de CaM [147] y se ha observado que el hipotiroidismo prolongó la latencia de aparición del Tu, redujo la incidencia de tumores y retrasó el crecimiento de tumores en ratas [148]. En humanos, Cristofanilli *et al.* (2005) demostraron que el hipotiroidismo clínico espontáneo era un fuerte factor protector contra el CaM y disminuyó la incidencia y la agresividad del Tu. Los autores también encontraron que las mujeres con hipotiroidismo primario tuvieron una reducción del 61% en el riesgo de CaM invasivo y tenían más probabilidades de tener una enfermedad localizada y no afectación de los ganglios linfáticos en comparación con las mujeres eutiroideas. Es más, pacientes con hipotiroidismo que desarrollaron CaM progresaron con una enfermedad más indolente y tumores más pequeños [144]. Los resultados de estudios epidemiológicos con respecto al hipertiroidismo en relación al CaM son poco claros y parecen depender de la inclusión de pacientes pre o post menopáusicos. Saraiva y colaboradores observaron una mayor incidencia de enfermedad tiroidea en pacientes con CaM que en controles (58 vs. 18%; $p < 0,05$) siendo el hipertiroidismo subclínico la patología tiroidea más frecuentemente encontrada en pacientes post menopáusicas, no así en las pre menopáusicas [149]. El hipertiroidismo se asocia con un aumento de la incidencia y agresividad del CaM [147].

Las HT podrían participar directamente sobre la carcinogénesis mamaria, o indirectamente mediante su acción sobre cambios en el TA y secreción de adipocinas.

3.4.1. Efectos directos mediados por el TA

En un estudio publicado por el grupo de trabajo [94] el hipotiroidismo prolongó la latencia de aparición de tumores, produjo la reducción de la incidencia de tumores y retrasó el crecimiento tumoral en ratas. El mecanismo por el cual la glándula tiroides influye en la tumorigénesis mamaria no está claro. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que los diferentes estados tiroideos afectan la tumorigénesis mamaria alterando el crecimiento corporal, la morfología mamaria, la composición corporal y la liberación de adipocitoquinas, y patrones de secreción de otras hormonas como E2, P4, PRL y/o GH, entre otras [94].

El hipotiroidismo disminuye la secreción de GH en la rata. En nuestro estudio *in vivo*, observamos un retraso en el crecimiento corporal asociado con una disminución significativa en los niveles séricos de GH en ratas hipotiroideas, que también tuvieron una menor incidencia de CaM. El hipotiroidismo también retarda el crecimiento del sistema ductal e induce un aumento en el depósito de grasa de la GM. Por lo tanto, la disminución de la incidencia de tumores mamarios en los animales hipotiroideos puede deberse a la reducción del desarrollo de la GM y la disminución de la relación parénquima-estroma [94].

Además, la ingesta de alimentos y del peso corporal en ratas hipotiroideas disminuye al compararlas con los grupos control e hipertiroideo. La restricción calórica disminuye la proliferación y la angiogénesis y aumenta la apoptosis en tumores de mama. Ratas Sprague-Dawley tratadas con

PTU tiene un peso corporal más bajo que los controles, el porcentaje de grasa corporal es similar en los tres grupos estudiados (ratas eutiroideas, hipotiroideas e hipertiroideas). Sin embargo, el TA de las ratas hipotiroideas es disfuncional, atendiendo a la menor cantidad de leptina expresada por gramo de grasa y los niveles disminuidos de leptina en el suero de estos animales [94]. Este hecho puede ser uno de los posibles mecanismos relacionados con el aumento de la latencia en las ratas hipotiroideas ya que es sabido que la leptina inhibe la apoptosis y estimula el crecimiento [67] y también la angiogénesis en la carcinogénesis de mama [150]. Sin embargo, en nuestro estudio *in vivo*, no se observan cambios en la proliferación de células tumorales según lo evaluado por el índice mitótico y por inmunotinción del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). A su vez, en células cancerosas de nuestras ratas hipotiroideas se incrementa la apoptosis en una relación inversa a los niveles de leptina sérica [94]. Se sabe que la leptina inhibe la apoptosis y esta acción se correlaciona con una mayor expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 [151]. La grasa corporal disfuncional que secreta menos niveles de leptina puede ser otro factor responsable del retraso en el desarrollo de tumores mamarios en ratas hipotiroideas. En conclusión, estimamos que el menor desarrollo tumoral mamario observado en las ratas hipotiroideas puede deberse a un aumento en la apoptosis explicado por niveles séricos bajos de estradiol y de leptina. Interesantemente, el porcentaje de grasa tanto del pániculo adiposo mamario como del compartimento visceral de las ratas hipotiroideas es significativamente mayor a las eutiroideas, sugiriendo una disfunción del TA sometido a niveles bajos de hormonas tiroideas [94].

El hipotiroidismo experimental retarda la carcinogénesis mamaria promoviendo la apoptosis de las células tumorales [94]. La β catenina juega un papel fundamental en la adhesión celular y en las vías de señalización intracelular que condicionan el pronóstico del CaM [165]. Sin embargo, las conexiones mecanísticas asociadas con la expresión de β catenina en los diferentes estados tiroideos y el CaM aún no se conocen completamente.

Los mecanismos moleculares por los cuales las HT influyen la carcinogénesis mamaria tampoco se han descrito aún. La vía de señalización del Wnt/ β catenina, que está implicada en la carcinogénesis mediante la regulación de la proliferación, la migración, la polaridad tisular, la organogénesis y la apoptosis [152-156] es uno de los caminos posibles involucrado en esta explicación. La señalización del Wnt/ β catenina está desregulada en la mayoría de los cánceres humanos [157]. La β catenina juega diferentes roles en cuanto a su distribución subcelular, operando como un componente estructural integral de las uniones adherentes basadas en caderina y también como un efector nuclear clave de la señalización Wnt canónica en el núcleo [158]. Por un lado, la β catenina normalmente se expresa en la membrana plasmática y la β catenina libre suele ser de corta duración en el citoplasma. Es reconocida por el complejo de destrucción integrado por las moléculas de axina, poliposis adenomatosa del colon (APC), caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) que fosforilan la β catenina de forma secuencial para ser rápidamente objeto de degradación [159]. Por otro lado, el receptor de unión del Wnt inhibe la formación del complejo de destrucción, lo que conduce a la acumulación de β catenina en el citoplasma, y su translocación al núcleo [160]. La acumulación nuclear de β catenina resultante de la señalización aberrante del Wnt, la mutación de la β catenina o la delección de los genes APC pueden activar, junto con miembros de la familia Tcf/Lef, la transcripción de genes diana del Wnt/ β catenina implicados en el desarrollo y progresión de cáncer como survivina, COX-2, ciclina D1, Runx-2 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), [161-164]. Hay evidencia de que la β catenina nuclear promueve el CaM y se relaciona con un mal pronóstico del mismo [165, 166]. Sin embargo, hay un número limitado de estudios que investigan la asociación entre la β catenina y la vía de apoptosis. El

CaM es regulado hormonalmente y el estado de la tiroides puede ser un ejemplo prometedor de esta regulación. Estudios previos han abordado la compleja interacción entre las HT y la vía del Wnt/ β catenina en diferentes tejidos pero sin evidencia de esta interacción en la GM [167, 168].

Otro estudio más reciente de nuestro laboratorio muestra una localización nuclear aberrante de la β catenina en tumores mamarios provenientes de ratas hiper- o eutiroides asociado a una mayor progresión tumoral. En cambio, la localización normal de la β catenina en la membrana plasmática observada en las ratas hipotiroideas se encuentra relacionada con un menor crecimiento tumoral [94]. Los cambios en la localización celular y la expresión de la β catenina sugieren la participación de esta proteína en la regulación del crecimiento de los tumores de las ratas hiper- y eutiroides. Interesantemente, en concordancia con otros autores la leptina puede inducir acumulación nuclear de β catenina estimulando el desarrollo del Tu [84, 95], lo que podría constituir otro mecanismo para explicar la menor progresión tumoral en las ratas hipotiroideas (que tienen niveles séricos bajos de leptina).

3.4.2. Efectos indirectos mediados por el TA

Los estudios epidemiológicos señalan que la obesidad, considerada como un acumulo de energía en forma de TA, es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de tumores malignos aunque los mecanismos exactos de esta relación aún necesitan ser determinados [27, 166]. Los mecanismos potenciales mediante los cuales esta patología podría iniciar, promover o favorecer la progresión del CaM son la síntesis de estrógenos en el TA, la acumulación de tóxicos ambientales como los xenoestrógenos, agentes mutagénicos lipofílicos y metales pesados en la masa grasa, el síndrome metabólico coexistente, elevados niveles de leptina, bajos niveles de adiponectina y una excesiva acumulación de grasas saturadas [169]. Además, las adipoquinas (leptina y adiponectina), polipéptidos biológicamente activos producidos por el TA, estarían ligados a mecanismos carcinogénicos incluyendo angiogénesis, proliferación celular, metástasis e inhibición de la apoptosis [84, 95, 170].

Por su parte, el TA es el tejido estromal predominante en la GM. Es un órgano endócrino bioactivo [84, 126] que no solamente secreta factores solubles sino que también contribuye de manera significativa a la composición de la MEC. El comportamiento disfuncional del TA ha sido ampliamente apreciado como una de las principales causas subyacentes del cáncer [169]. Los factores secretados por el TA peritumoral, los componentes de la MEC y el contacto directo célula-célula pueden influir en el comportamiento fenotípico de las células malignas [171]. Por un lado, los factores derivados del Tu podrían influir sobre el perfil de la actividad metabólica del TA circundante; y, por otro, el aumento de la producción local de adipoquinas y el espesor de la grasa que rodea al órgano, podrían ser decisivos para la progresión y la agresividad del Tu [172, 173].

La GM no sólo se compone de TA, sino que también está formada por un epitelio capaz de generar las estructuras necesarias para permitir una lactancia futura. Las células epiteliales mamarias se encuentran en constante crecimiento, desarrollo y diferenciación. El estroma juega un rol clave en la regulación de estos cambios a través de factores solubles que son liberados al entorno, así como también a través de factores no solubles que están presentes en el propio estroma. Hemos demostrado que factores solubles y no solubles presentes en los diferentes estadios de diferenciación de la línea celular de preadipocitos murinos 3T3-L1, regulan de manera diferencial el crecimiento y la migración de células epiteliales mamarias murinas normales (NMuMG)

y tumorales (LM3) [83]. Así mismo, demostramos recientemente que los medios condicionados (MCs) de explantos de TA humano provenientes de mamas tumorales regulan la proliferación, adhesión y migración de líneas celulares epiteliales tumorales mamarias; a diferencia de los MCs de explantos de TA provenientes de mamas normales [85].

Sin embargo, todavía es necesario explorar el rol de componentes estromales específicos (fibroblastos, adipocitos, mastocitos, etc.) y la MEC en la carcinogénesis mamaria. Algunos estudios han evaluado las interacciones celulares entre los adipocitos y el epitelio mamario normal y tumoral [174, 175]. Sin embargo, la capacidad del TA para modificar el comportamiento biológico de las células epiteliales mamarias no es bien conocida. Pinilla y colaboradores [176] han investigado recientemente si células madre derivadas del tejido adiposo humano (hASC) aumentan la invasión tumoral siendo una fuente potencial de CCL5, una quimiocina involucrada en la progresión tumoral. Adicionalmente, Dirat y colaboradores [88, 177] han estudiado el papel de la IL-6 secretada por adipocitos mamarios y por la línea de células adiposas 3T3- F442A sobre el comportamiento de líneas celulares de tumores mamarios [88, 177].

La dilucidación del papel desempeñado por el TA sobre la carcinogénesis mamaria puede tener implicancias importantes en el manejo del CaM en mujeres hipotiroideas. Igualmente, la identificación de los factores que participan como protectores o promotores puede aportar información para el diseño de herramientas terapéuticas novedosas.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS:

El TA modifica la carcinogénesis mamaria dependiendo del estado tiroideo.

4.2. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el rol que juega el TAM y el TAA de ratas hipo- y eutiroideas, sobre el desarrollo de tumores mamarios inducidos con DMBA.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.** Caracterizar el TAM y TAA provenientes de ratas hipo- y eutiroideas.
- 2.** Estudiar los efectos del TAM y TAA provenientes de ratas hipo- y eutiroideas sobre la viabilidad, proliferación, adhesión y migración de células tumorales y no tumorales mamarias.
- 3.** Identificar y cuantificar factores solubles secretados por el TAM y TAA de ratas hipo- y eutiroideas con tumores mamarios inducidos.
- 4.** Evaluar la actividad biológica de factores secretados por el TAM y TAA, seleccionados de los resultados obtenidos en el **OE 3**, sobre las líneas celulares mamarias tumorales y no tumorales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. *IN VIVO*

5.1.1. Animales de experimentación

Ratas hembras Sprague Dawley de 55 días de edad (180-200 g) criadas en nuestro bioterio fueron aleatoriamente asignadas a uno de los siguientes grupos: ratas hipotiroideas (Hipo; por la administración crónica de 0,01% de propiltiouracilo – PTU, 6-N-propiltiouracilo-, Sigma P3755, en el agua de bebida), y ratas eutiroides (Eut) como controles. Los animales fueron mantenidos en condiciones de luz (luces encendidas entre las 6.00 y las 20.00 h) y temperatura (22-24 °C) controladas; alimentadas con alimento balanceado estándar en pellets (GEPISA Grupo Pilar S.A., Córdoba, Argentina) *ad libitum*.

El mantenimiento y la manipulación de los animales se realizaron de acuerdo con la guía del National Institute of Health (Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América, NIH) para el cuidado y uso de animales de laboratorio (publicación NIH n° 86-23, revisada en 1985 y 1991) y los requerimientos del Reino Unido para la ética de la experimentación con animales (Procedimientos científicos con animales, ley 1986).

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Preparación del PTU 0,01%:

El estado hipotiroideo se indujo mediante la administración de PTU en el agua de bebida. Para ello, se pesó 0,1 g de PTU que se disolvió en 1 l de agua corriente. La solución se almacenó a temperatura ambiente en envases color caramelo.

5.1.2. Diseño experimental para la caracterización del TAM y TAA provenientes de ratas hipo- y eutiroides

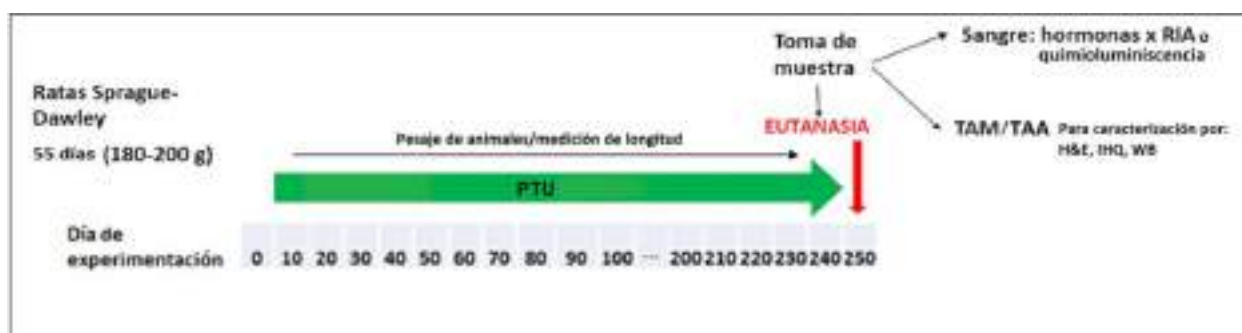


Figura 5.1. Diseño experimental para la caracterización del TAM y del TAAI (en ausencia de DMBA).

Una vez separadas las ratas hembras Sprague Dawley de 55 días de edad (180-200 g) en los dos grupos experimentales, se comenzó a administrar el PTU al grupo Hipo estableciéndose como

día 0 de experimentación. Los animales fueron pesados todas las semanas. A los 70 días de experimentación, se midió la longitud cabeza-cuerpo. Para ello, los animales fueron sedados con 40 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina, y medidos desde la punta de la nariz a la base de la cola.

A los 250 días de experimentación, considerado como día final del experimento, se procedió a la eutanasia por decapitación para iniciar la toma de muestras.

5.1.2.1. Obtención de muestra (TA y suero)

En el momento de la eutanasia, se recolectó sangre troncal para realizar los dosajes hormonales y se extrajeron el TAA y el TAM.

La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y el suero separado por centrifugación (1400 G por 5 min) fue mantenido a -20 °C hasta el momento de las mediciones hormonales. Se determinaron los niveles séricos de T4 libre y total, T3 libre y total, E2 y TSH para confirmar los estados de hipo- y eutiroidismo. Las concentraciones de TSH fueron medidas por radioinmunoensayos (RIA) de doble anticuerpo usando materiales provistos por A.F. Parlow y por el NHPP (National Hormone and Pituitary Program, Harbor- UCLA Medical Center, Torrance CA). Las hormonas fueron radioiodinadas usando el método de la Cloramina T y purificadas mediante el pasaje por Sephadex G75. La sensibilidad del ensayo en suero fue de 0,5 ng/ml con coeficientes de variación intra- e inter- ensayo menores al 10%. Todas las muestras fueron medidas en el mismo ensayo por duplicado. En el caso de las concentraciones de E2, T3 y de T4 se midieron por quimioluminiscencia mediante el kit Elecsys (Cobas, Roche).

El TAA extraído fue pesado y su peso expresado como porcentaje del peso total del animal. Luego, un fragmento de TAA y otro de TAM se fijaron en formol-acetato (225 ml de agua corriente, 25 ml de formaldehído, 5 g de acetato de calcio) y se procesaron para realizar los estudios histológicos con Hematoxilina-Eosina (H&E) e inmunohistoquímicos (IHQ).

Este modelo experimental ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio [72, 94]. Con las muestras obtenidas se procedió a trabajar como se detalla a continuación.

Fijación de tejidos e inclusión en parafina:

Los fragmentos de TAA y TAM se mantuvieron en formol-acetato hasta el día siguiente. Luego, se lavaron los tejidos con PBS 1X por 20 min, para después deshidratarlos en una serie de concentraciones ascendentes de etanol (70°, 96°, 100°) y xilol.

Posteriormente se realizó la inclusión de los tejidos en parafina en estufa de 56-60 °C. Los tacos de parafina fueron cortados a 4 micrómetros de espesor en micrótomos Arcaño para realizar tinción de H&E e IHQ.

5.1.2.2. Tinción con H&E

Los cortes histológicos se desparafinaron en una serie de xilol y etanol de concentración descendente (100°, 96°, 70°) y agua destilada como paso final. Se procedió a la tinción con Hematoxilina entre 30 seg y 2 min dependiendo del tiempo que llevaba preparado el colorante, y con Eosina por 3 seg.

Posteriormente, se deshidrataron los cortes en una serie de concentraciones ascendentes de etanol (70°, 96°, 100°) y xilol para montar los tejidos bajo campana con Bálsamo de Canadá

(Biopack). Se dejaron secar sobre una superficie plana hasta la observación en el microscopio donde se estimó el grado de desarrollo de los tejidos (cantidad y tamaño de los adipocitos, lóbulos de los adipocitos), hiperplasia, hipertrofia, infiltrado inflamatorio, fibrosis y estasis láctea (presencia de leche en alvéolos).

5.1.2.2.1. Determinaciones en el TA

Se determinaron los siguientes parámetros sobre el TA:

Porcentaje y tamaño de adipocito: las mediciones se realizaron utilizando el software gratuito de acceso abierto ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para ello, como primer paso, se calibró la imagen. Este proceso permitió que el programa reconozca el tamaño de la muestra en función del número de píxeles y la ampliación del microscopio (el cual fue establecido en milímetros). No se incluyeron aquellos adipocitos que estaban tocando el borde de la imagen. Posteriormente, se procedió a delimitar y medir las áreas, y realizar las mediciones correspondientes.

Porcentaje de grasa corporal (%): se calculó como el peso en gramos de TA sobre el peso corporal del animal en gramos multiplicado por 100.

Cantidad de lípidos en el TA (g): se calculó como los gramos de lípidos en un gramo de TAA a través de la técnica de Folch [178].

Porcentaje de tejido graso en el corte de GM: se calculó como el área total de la imagen menos el área de tejido conectivo y glandular del TAM.

5.1.2.3. Inmunohistoquímica (IHQ)

Se procesaron 3 cortes por animal ($n = 6$) y se desparafinaron en una serie de xilol, etanol de concentración descendente (100°, 96°, 70°) y agua destilada como paso final. La recuperación antigénica se realizó en buffer Citrato de Sodio 0,01 M pH 6 (Para 1 l de solución, 24,27 g de citrato de sodio di-hidratado; 3,36 g de ácido cítrico; agua destilada; pH 6) o en buffer EDTA 0,5 M pH 8 (100 μ l de EDTA 0,5 M en 50 ml de agua destilada) dependiendo del anticuerpo utilizado, en baño de agua hirviendo por 40 min. Luego, se descartó el buffer y se lavó dos veces con agua destilada para proceder al bloqueo de la peroxidasa endógena con azida 0,1% (0,1 g de azida sódica, 90 ml de autobuffer, 10 ml de H₂O₂) durante 30 min. Se pasaron por autobuffer (500 ml de PBS 1X, 1,25 ml de BRIJ) por 10 min y se bloqueó inespecíficamente con leche descremada y baja en calcio al 10% (10 g de leche, 90 ml de agua destilada, pizca de azida sódica) por 30 min.

Después de lavar los vidrios dos veces con agua destilada se goteó el primer anticuerpo (**Tabla 5.1**). Todos los primeros anticuerpos se diluyeron en buffer de dilución de anticuerpo (0,02 M NaH₂PO₄; 0,15 M NaCl; 0,04% azida sódica; 1% BSA; pH 7,6). Se gotearon entre 30 y 50 μ l de anticuerpo por muestra, previo secado de los vidrios. Se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4 °C.

Al día siguiente, se colocaron los vidrios en autobuffer por 10 min para luego gotear el segundo anticuerpo (1:400, VECTASTAIN ABC Kit, entre 30 y 50 μ l por muestra) en cámara húmeda y se incubó por 45 min a temperatura ambiente. Se volvieron a pasar los vidrios por autobuffer 10 min

para incubar la estreptavidina–biotina peroxidasa por 45 min en cámara húmeda a temperatura ambiente y en obscuridad.

Posteriormente, se colocaron los vidrios en autobuffer por 10 min por última vez y se goteó la diaminobencidina (DAB 1:50, ImmPACT Peroxidase Substrate Kit). Se incubaron por 15 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. La DAB se lavó por 5 min en agua corriente y en agua destilada por 2 min antes de la contratinción con H&E por 10 seg.

Luego, se deshidrataron los cortes en una serie de concentraciones ascendentes de etanol (70°, 96°, 100°) y xilol para montar los tejidos bajo campana con Bálsamo de Canadá (Biopack). Se secaron sobre una superficie plana hasta la observación en el microscopio donde se estimó la presencia de la inmunotinción (células positivas: nº de células marcadas por campo en 10 campos por corte, 3 cortes por animal) y su localización (en núcleo, citoplasma y/o membrana plasmática); o el puntaje (score, en inglés) y localización, dependiendo del anticuerpo utilizado (Puntaje = Proporción + Intensidad. Proporción: 0 = 0%, 1 = 1% al 10%, 2= 11% al 33%, 3 = 34% al 64%, 4 = mayor a 65%. Intensidad: 1 = leve, 2 = moderada, 3 = fuerte).

Tabla 5.1. Anticuerpos utilizados para IHQ

Antígeno	Anticuerpo	Concentración	Origen	Marca	Tejido
REα	Anti-Estrogen Receptor alpha antibody [E115] - CHIP Grade ab32063	1:200	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
RP4	PR (C-20) sc-539	1:100	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	TAM/TAA
TRβ1	TR β 1 (J52) sc-738	1:100	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	TAM/TAA
Aromatasa	Anti-Aromatase antibody ab18995	1:500	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
Leptina	Anti-Leptin antibody ab117751	1:200	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
ObR	Ob-R (H-300) sc-8325	1:50	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	TAM/TAA
Adiponectina	Anti-Adiponectin antibody [19F1] ab22554	1:100	Mouse	Abcam	TAM/TAA

Adipo R1	Anti-Adiponectin Receptor 1 antibody [EPR6626] (ab126611)	1:100	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
Perilipina	Anti-Perilipin-1 antibody ab3526	1:200	Rabbit	Abcam	TAM/TAA

5.1.2.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, de sus siglas en inglés) y transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para su inmunoidentificación (immunobloting)

Extracción de proteínas:

Para extraer las proteínas de las muestras de TA, se pesaron 200 mg de cada tejido y se colocaron en 1 ml de solución tamponada (buffer) de lisis para TA (605,5 mg de Tris pH 7,5; 876,6 mg de NaCl; 200 µl NaF; 40 µl de Ortovanadato; 0,5 g de Ácido desoxicólico; 0,1 g de SDS; Inhibidor de proteasas 1:100). Se homogeneizó en ULTRA-TURRAX (Janke y Kunkel, IKA-WERK) en frío. Una vez homogeneizadas las muestras, se centrifugaron a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el residuo graso y se almacenó a -20 °C hasta el momento de la medición de concentración de proteínas con el kit comercial Micro BCA (Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

Las muestras se desnaturalizaron por ebullición con SB 6X (7 ml de Tris-ClH 0,5 M pH 6,7; 1 g de SDS; 3 ml de glicerol; 1,2 mg de bromofenol blue; 680 µl de β-mercaptoetanol) durante un tiempo de 3 a 5 min. Los geles de poliacrilamida al 13-15% se hicieron según el protocolo de Maniatis [3] y se corrieron electroforéticamente en una cuba Bio-Rad llena con el buffer de corrida 1X (Stock 10X de 1 l: 30 g de Tris, 144 g de glicina, 100 ml de SDS al 10%). Se sembraron entre 30-40 µg de proteína de cada muestra por cada calle del gel.

Corrida electroforética:

Las muestras se corrieron electroforéticamente durante 30 min a 80/100 volts para apilar las proteínas. Cumplido ese plazo se corrió a 100/120 volts por 1,5 h aproximadamente, controlando que no se caiga el frente de corrida.

Los geles se corrieron por duplicado y uno de ellos se coloreó en la solución de Coomassie Blue R-250 (Coomassie Blue R-250, 500 ml: 0,5 g de Coomassie blue, 225 ml de metanol, 225 ml de H₂O ultrapura –miliQ-, 50 ml de ácido acético glacial. Solución de lavado, 500 ml: 50 ml de etanol, 50 ml de ácido acético glacial, 400 ml de H₂O ultrapura) durante 15 min, en agitación y a temperatura ambiente para determinar el control de carga y verificar la resolución de la corrida electroforética.

Transferencia del gel a membrana de PVDF:

Se cortaron membranas de PVDF de 8 x 5 cm, se activaron con metanol por 30 seg, y se hidrataron con H₂O ultrapura para finalmente colocarlas en remojo en buffer de transferencia o Towbin (1 l: 3 g de Tris 25 mM; 14,4 g de glicina 192 mM; 1 g de SDS 3,5 mM; 0-20% metanol; pH 8,3 o 250 ml de buffer de corrida 4X; 200 ml de metanol; 550 ml de H₂O ultrapura).

Una vez finalizada la corrida electroforética, se armó el cassette de transferencia. Se colocó adecuadamente el cassette en la cuba (respetando polaridad) y se ajustaron las condiciones de la corrida: 1,5 h a 90 volts o 250 mA aproximadamente en cámara fría.

Al terminar la transferencia, la membrana se reactivó 1 min con metanol (Biopack). Se coloreó con rojo Ponceau (Ponceau S 0,1% p/v en 5% v/v de ácido acético) para verificar si hubo una transferencia correcta. Se incubó la membrana con la solución de Ponceau durante 15 min en agitación a temperatura ambiente. Se lavó con H₂O ultrapura varias veces y se fotografiaron las bandas de proteínas. Se lavó la membrana con TBS-T (TBS-T 1X, 1 l: 2,42 g Tris-ClH 20 mM; 0,8 g NaCl 137 mM; pH 7,6 y 0,05% a 0,1% tween 20) tres veces durante 10 min cada lavado para eliminar el colorante.

Luego, se colocó la membrana en solución bloqueante (albúmina sérica humana -HSA- 5%, stock al 20% o leche parcialmente descremada libre de calcio al 10% en TBS-T) y se incubó durante 30 min en el caso de la HSA y durante 40 min a 1,5 h (dependiendo del anticuerpo a incubar) en el caso de la leche. Se incubó el anticuerpo primario (**Tabla 5.2**) en TBS-T con HSA 2% durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado (1:3000, mouse o rabbit) en TBS-T con HSA 2% por 1 h. Posteriormente, se incubó con estreptavidina (1:5000) durante 1 h, se realizaron 2 lavados de 10 min con TBS-T y uno de 10 min con TBS solo (TBS 1X, 1 l: 2,42 g Tris-ClH 20 mM; 0,8 g NaCl 137 mM; pH 7,6) para luego proceder al revelado.

Tabla 5.2. Anticuerpos utilizados para inmunobloting

Antígeno	Anticuerpo	Concentración	Origen	Marca	Tejido
HSL	Anti-Hormone sensitive lipase antibody ab45422	1:1000	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
pHSL	Phospho-HSL (Ser660) Antibody	1:1000	Rabbit	Cell Signaling Technology	TAM/TAA
PPar γ	PPAR γ (E-8) sc-7273	1:500	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	TAM/TAA
PRDM16	Anti-PRDM16 antibody ab106410	1:1000	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
PGC1 α	Anti-PGC1 alpha antibody ab54481	1:1000	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
TBX1	Anti-TBX1 antibody ab18530	1:500	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
UCP1	Anti-UCP1 antibody ab10983	1:500	Rabbit	Abcam	TAM/TAA

MCT1	Anti-Monocarboxylic acid transporter 1 antibody ab90582	1:1000	Mouse	Abcam	TAM/TAA
MCT4	MCT4 (H-90): sc-50329	1:500	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	TAM/TAA
Adiponectina	Anti-Adiponectin antibody [19F1] ab22554	1:500	Mouse	Abcam	TAM/TAA
Lámina β	Lamin B (C-12) sc-365214	1:3000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	TAM/TAA
β Actina	B-Actin (C4) sc-47778	1:1000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	TAM/TAA
β Tubulina	Anti-beta Tubulin antibody [EP1569Y] (ab52623)	1:5000	Rabbit	Abcam	TAM/TAA
2^{rio} Rabbit	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated Code No. E0432	1:3000	Goat	Dako	TAM/TAA
2^{rio} Mouse	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated Code No. E0433	1:3000	Goat	Dako	TAM/TAA

Revelado (ChemiDoc XRS+, BioRad, Image Lab Software):

Se utilizaron las soluciones de revelado A y B (Solución A, 5 ml: 4,6 ml de H₂O ultrapura, 333 μ l Tris-ClH 1,5 M pH 8,8, 50 μ l luminol, 22 μ l ácido cumárico. Solución B, 5 ml: 4,6 ml de H₂O ultrapura, 333 μ l Tris 1,5 M pH 8,8; 20 μ l de H₂O₂). Primero, se tomó una foto del marcador de peso molecular para tener la referencia de pesos moleculares. Luego, se colocó sobre la membrana una cantidad suficiente de revelador y se tomaron fotos de las bandas marcadas en el ChemiDoc XRS+.

Stripping:

Cuando fue necesario, se realizó stripping sobre las membranas de PVDF para poder incubar anticuerpos diferentes. El stripping pudo ser suave (0,75 g de glicina; 0,05 g de SDS; 0,5 ml de Tween 20; 50 ml de H₂O ultrapura; pH 2,2) o fuerte (10 ml de SDS 10%; 6,25 ml Tris ClH 0,5 M pH 6,8; 0,4 ml de β -mercaptoetanol; 37,75 ml de H₂O ultrapura) con agitación y calor dependiendo de la marcación que tuviera la membrana.

Las membranas fueron cortadas (previa tinción con rojo Ponceau S y utilizando un bisturí) para poder incubar diferentes anticuerpos a la vez en la misma membrana cuando fue requerido.

Análisis de imágenes:

Se realizó con el programa ImageJ FIJI. Previamente, se exportaron las imágenes a analizar desde el programa Image Lab en formato TIF y tildando la opción para análisis. Las cuantificaciones de los diferentes inmunoblottings fueron relativizadas al Ponceau S o la β Actina de la membrana correspondiente y a los valores de las muestras eutiroideas.

5.1.3. Diseño experimental para epidemiología tumoral

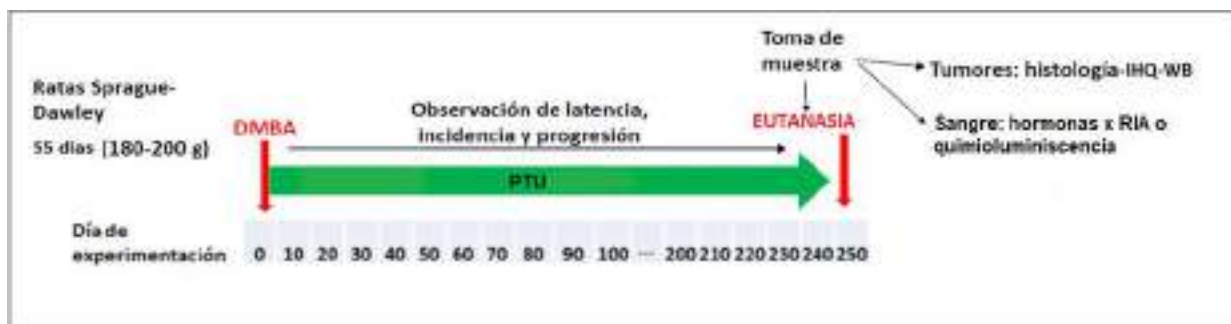


Figura 5.2. Diseño experimental para el modelo de tumorigénesis con DMBA.

Ratas hembras Sprague Dawley de 55 días de edad (180-200 g) fueron tratadas por vía oral (intragástrica) con una única dosis del cancerígeno DMBA (15 mg/rata, solución de 30 mg de DMBA/ml de aceite de girasol, a cada animal se le administró 0,5 ml de la solución). Tres días (72 h) después se separaron los animales en los dos grupos experimentales y se comenzó a administrar el PTU al grupo Hipo. Los animales fueron pesados semanalmente. A partir de los 30 días del tratamiento con DMBA, las ratas fueron observadas diariamente para detectar la aparición de tumores palpables de mama sobre los cuales se midieron diferentes parámetros tumorales (véase el apartado 5.1.3.1).

Los animales fueron sacrificados por decapitación cuando el volumen tumoral alcanzó los 1000 mm^3 o al final del experimento en el día 250 post DMBA. En ese momento, se colectó sangre troncal para realizar los dosajes hormonales y se extrajeron los tumores (**Figura 5.2**).

Preparación del dimetilbenzantraceno (DMBA, 30 mg/ml):

Se pesaron 15 mg de la droga por rata usando guantes y barbijo. Se agregó 1 ml de alcohol bencílico, se agitó enérgicamente y se llevó a volumen con aceite de girasol. Se mantuvo en agitación hasta disolución a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ resguardado de la luz. Finalmente, se almacenó a temperatura ambiente.

5.1.3.1. Medición de parámetros tumorales

Se determinaron los siguientes parámetros tumorales:

Incidencia tumoral: Calculada como el porcentaje de ratas (% de animales) que presentaron tumores dentro del período estudiado.

Latencia: Considerada como el tiempo (en días) transcurrido desde la administración del DMBA hasta la aparición del primer Tu mamario palpable.

Porcentaje de supervivencia libre de Tu: calculado como el porcentaje (%) de animales que sobreviven en un determinado periodo de tiempo expresado en días. En nuestro caso ese período de días es igual a 250 como máximo. Es graficado como el día de sacrificio de los animales y expresado como porcentaje de supervivencia.

Número de tumores por rata: Se procedió a contabilizar los tumores (nº de tumores) presentes en cada animal al momento del sacrificio.

Volumen tumoral (VT): Los tumores fueron medidos con calibre para determinar el diámetro mayor (DM) y menor (dm) y calcular el VT mediante la siguiente fórmula $VT = dm^2 \times DM / 2$. Expresado en cm^3 .

Velocidad de crecimiento tumoral: Fue calculada a partir de la relación entre el VT y la diferencia en días desde la detección del Tu y el sacrificio del animal. Es expresada en $mm^3/día$.

5.1.3.2. Obtención de muestra (TA, Tu y suero)

En el momento de la eutanasia, se recolectó sangre troncal para realizar los dosajes hormonales según se describe en el apartado 5.1.2.1 y se extrajeron el/los tumor/es.

Algunos fragmentos de Tu se fijaron en paraformaldehído 4%, para luego realizar los estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Otros fragmentos de Tu se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ser analizados por SDS-PAGE seguido de inmunoblotting.

Este modelo experimental ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio [1, 2]. Con las muestras obtenidas se procedió a trabajar como se detalla a continuación.

Fijación de tejidos e inclusión en parafina:

Una vez sacrificados los animales se extrajeron los Tu mamaros en condiciones de esterilidad. Se colocaron en paraformaldehído 4% y se dejaron a temperatura ambiente hasta el otro día. Luego, se lavaron los tejidos con PBS 1X por 20 min, para después deshidratarlos en una serie de concentraciones ascendentes de etanol (70° , 96° , 100°) y xilol.

Posteriormente, se realizó la inclusión de los tejidos en parafina en estufa a $56-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se procedió a armar los tacos, usando el molde adecuado para cada pieza de tejido, para luego cortarlo. Se realizaron cortes de $4\text{ }\mu\text{m}$ en micrótopo Arcano para realizar tinción de H&E e IHQ.

5.1.3.3. Tinción con H&E

La técnica se realizó de la misma forma que para los TA (ver apartado 5.1.2.2). Los cortes de Tu mamarios se desparafinaron en una serie de xilol y etanol de concentración descendente (100°, 96°, 70°) y agua destilada como paso final. Se procedió a la tinción con Hematoxilina entre 30 seg y 2 min dependiendo del tiempo que llevara preparado el colorante, y con Eosina por 3 seg.

Posteriormente, se deshidrataron los cortes en una serie de concentraciones ascendentes de etanol (70°, 96°, 100°) y xilol para montar los tejidos bajo campana con Bálsamo de Canadá (Biopack). Se dejaron secar sobre una superficie plana hasta la observación en el microscopio donde se estimó la histología de los Tu para seleccionar sólo aquellos que eran ductales (no se analizaron tumores lobulillares ni papilares). Además se estimaron los siguientes parámetros tumorales:

Índice mitótico: fue calculado por el conteo de figuras mitóticas presentes en diez campos en cortes de Tu teñidos con H&E analizados por microscopía óptica a 400x.

Índice apoptótico: fue calculado como la cantidad de cuerpos apoptóticos presentes en diez campos en cortes de Tu teñidos con H&E analizados por microscopía óptica a 400x.

Relación mitosis/apoptosis (M/A): Se calculó dividiendo el índice mitótico por el índice apoptótico de cada Tu.

5.1.3.4. Inmunohistoquímica

Tres cortes de cada Tu por animal correspondientes a 5 - 6 animales por grupo (3 cortes de Tu por animal, n = 6) se desparafinaron en una serie de xilol y etanol de concentración descendente (100°, 96°, 70°) y agua destilada como paso final. La técnica se realizó de la misma forma que para los TA (ver apartado 5.1.2.3). Se incubaron con los siguientes anticuerpos marcadores de receptores hormonales e indicadores de proliferación y apoptosis (**Tabla 5.3**):

Tabla 5.3. Anticuerpos utilizados para IHQ

Antígeno	Anticuerpo	Concentración	Origen	Marca	Tejido
RE α	Anti-Estrogen Receptor alpha antibody [E115] - CHIP Grade ab32063	1:200	Rabbit	Abcam	Tu
TR β 1	TR β 1 (J52) sc-738	1:100	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Tu
PCNA	Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen Clone [PC10]	1:750	Mouse	Dako	Tu

Caspasa 3	Anti-Caspasa 3 antibody ab4051	1:400	Rabbit	Abcam	Tu
β Catenina	Monoclonal Mouse Anti-human Beta-Catenin M3539	1:400	Mouse	Dako	Tu

5.1.3.5. SDS-PAGE y transferencia a membranas de PVDF para su inmunobloting

La técnica se realizó de la misma forma que para los TA (ver apartado 5.1.2.4). Se incubaron con los siguientes anticuerpos marcadores de proliferación y apoptosis (**Tabla 5.4**):

Tabla 5.4. Anticuerpos utilizados para inmunobloting

Antígeno	Anticuerpo	Concentración	Origen	Marca	Tejido
Caspasa 3	Anti-Caspasa 3 antibody ab4051	1:500	Rabbit	Abcam	Tu
Survivina	Anti-Survivin antibody ab24479	1:500	Rabbit	Abcam	Tu
β Catenina	Monoclonal Mouse Anti-human Beta-Catenin M3539	1:500	Mouse	Dako	Tu
Lámina β	Lamin B (C-12) sc-365214	1:3000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Tu
β Actina	B-Actin (C4) sc-47778	1:1000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Tu
β Tubulina	Anti-beta Tubulin antibody [EP1569Y] (ab52623)	1:5000	Rabbit	Abcam	Tu
2^o Rabbit	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated Code No. E0432	1:3000	Goat	Dako	Tu
2^o Mouse	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated Code No. E0433	1:3000	Goat	Dako	Tu

5.2. IN VITRO

5.2.1. Diseño experimental *in vitro* con líneas celulares

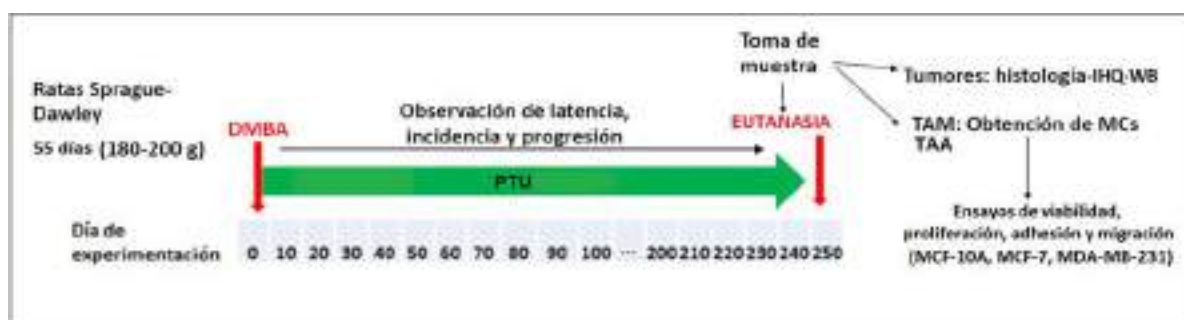


Figura 5.3. Diseño experimental para el modelo *in vitro* con líneas celulares.

Ratas hembras Sprague Dawley de 55 días de edad (180-200 g) fueron tratadas por vía oral (intragástrica) con una única dosis del cancerígeno DMBA (15 mg/rata, solución de 30 mg de DMBA/ml de aceite de girasol, a cada animal se le administró 0,5 ml de la solución). Tres días (72 h) después se separaron los animales en los dos grupos experimentales y se comenzó a administrar el PTU al grupo Hipo. Los animales fueron pesados todas las semanas. Posteriormente, cada grupo se subclasificó en aquellos animales que desarrollaron tumores (Eut con Tu e Hipo con Tu) y aquellos que no los desarrollaron (Eut sin Tu e Hipo sin Tu). Los grupos Eut e Hipo sin Tu se utilizaron para evaluar los efectos del hipotiroidismo sobre la capacidad de los adipocitos para modificar el comportamiento biológico de las células epiteliales mamarias tumorogénicas y no tumorogénicas, y luego compararlos con los producidos por los adipocitos asociados a tumores (Eut e Hipo con Tu).







En el momento de la eutanasia, se recolectó sangre troncal para realizar los dosajes hormonales y se extrajeron la grasa intra-abdominal (TAA) y el panículo adiposo de la glándula mamaria (TAM) para posteriormente generar medios condicionados (MCs), los cuales fueron utilizados para realizar los diferentes experimentos en líneas celulares mamarias.

5.2.1.1. Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares humanas epiteliales de mama donadas por el IBYME (Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET, CABA. A su vez, dicho instituto, obtuvo las células del American Type Culture Collection o ATCC, Rockville, MD, USA): MCF-10A (línea no tumorogénica; + RE α , + RE β , + RP4), MCF-7 (línea tumorogénica; + RE α , + RE β , + RP4) y MDA-MB-231 (línea tumorogénica; - RE α , - RE β , - RP4). La **Tabla 5.5** muestra la expresión de los receptores hormonales determinados por inmunoblotting en las diferentes líneas celulares mamarias. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.5. Expresión de receptores en las líneas celulares.

Receptor	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
RE α	✓	✗	✓
RE β	✗	✗	✓

RP4			
TRβ1			

Condiciones de cultivo de las líneas celulares:

Las tres líneas celulares fueron crecidas en medio DMEM F12 con rojo fenol con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios SRL) para las MCF-7 y MDA-MB-231, o marca GIBCO para las MCF-10A. Sólo esta última línea celular fue suplementada con Insulina 1:500 (Insulina, Humulin, insulina humana), cortisol 1:5000 (Cortisol, Invitrogen) y factor de crecimiento epidermal (EGF, Sigma-Aldrich) 1:5000.

Cuando se sembraron las células para los ensayos biológicos se incubaron en medio DMEM F12 con rojo fenol con los suplementos necesarios de cada línea celular hasta llegar a la confluencia deseada para colocarles los tratamientos correspondientes: MCs al 50% (50 µl de DMEM F12 sin rojo fenol con SFBc -suero fetal bovino charcolizado- al 2% + 50 µl de MCs) y control M199 al 50% (50 µl de DMEM F12 sin rojo fenol con SFBc al 2% + 50 µl de M199).

Estas mismas líneas celulares fueron siempre mantenidas en estufa Thermo o Panasonic a 37 °C con 5% de tensión de CO₂.

5.2.1.2. Obtención de Medios Condicionados (MCs)

Al momento del sacrificio de los animales, se obtuvieron fragmentos de TAA y de TAM. Este TAM podía provenir o no de una GM con presencia de Tu, en el caso de tenerlo se extraía el TAM que lo rodeaba, alejado no más de 1 cm del mismo, teniendo el cuidado de usar dos sets diferentes de instrumental quirúrgico (uno para realizar las incisiones de la piel y el músculo y otra para trabajar sobre los explantos) para mantener la esterilidad de los tejidos extraídos. En el caso del TAA se extrajo de diferentes depósitos de TAB, los cuales fueron el inguinal, mesentérico, omental, gonadal y retroperitoneal. Este material fue procesado para obtener MCs como se explica a continuación.

Inicialmente se lavó la muestra con PBS 1X frío para remover células rojas y luego con PBS 1X a 37 °C. Se pesó y se cortó en fragmentos no mayores a 0,6 g, los cuales se colocaron en placas de 6 pocillos con medio de cultivo M199 (Sigma) suplementado con gentamicina 50 µg/ml (1 g tejido/10 ml de M199). Después de la primera hora de cultivo se reemplazó el medio y se dejó incubando por 24 h. Se recolectó el MC en tubos eppendorf estériles, se centrifugó 3 min a 400 G, se alicuotó y se almacenó a -80 °C hasta su uso. De esta forma, obtuvimos MCs secretados por el TAM y TAA de ratas hipo- y eutiroides con y sin Tu.

La concentración de proteínas de los MCs se midió con el kit comercial Micro BCA (Protein Assay Kit, Thermo Scientific) y las hormonas como el E2 y la T4 se midieron con el kit Elecsys (Cobas, Roche).

5.2.1.3. Ensayos con líneas celulares

Los MCs se utilizaron para evaluar cambios en la viabilidad, proliferación, adhesión, migración y apoptosis de células epiteliales tumorogénicas y no tumorogénicas mamarias. Al alcanzar el grado de confluencia apropiada para cada ensayo biológico, el medio de crecimiento fue reemplazado por el correspondiente MC o tratamiento control, como se describe en los párrafos de las secciones siguientes. Cabe mencionar que el sistema es heterólogo, ya que se utilizan MCs provenientes del TA de ratas sobre líneas celulares epiteliales mamarias tumorogénicas y no tumorogénicas humanas. Lamentablemente en el momento que se pensó y escribió el proyecto que incluye esta metodología y dio origen a esta tesis no era posible conseguir líneas celulares epiteliales mamarias tumorogénicas y no tumorogénicas de rata, y sabemos que tampoco es ético ni posible inducir químicamente tumores mamarios en humanos para luego obtener los MCs de los tejidos adiposos correspondientes.

5.2.1.3.1. Viabilidad

Ensayo de viabilidad celular: se determinó la viabilidad de las células mamarias tras 24 h de incubación con los diferentes MCs obtenidos. Se utilizó el método de tinción con Azul Tripán (0,4% Tripán Blue, GIBCO). Se realizaron tres experimentos por triplicado.

Día 1: se plaquearon 50000 células MCF-7/MDA-MB-231/MCF-10A por pocillo en placas de 12 pocillos con DMEM F12 sin rojo fenol con SFB al 10%.

Día 2: 24 h después (o alcanzado el 90% de confluencia) se descartó el medio con SFB y se incubó 1 h con DMEM F12 sin rojo fenol y sin SFB. Se lavaron los pocillos con PBS 1X. Posteriormente, se cargaron 500 µl de los diferentes tratamientos (50% MCs y 50% DMEM F12 sin rojo fenol con 2% de SFBc) o medio control y se incubaron por 24 h.

Día 3: se recuperó el medio para levantar las células que pudieran haberse despegado y luego se lavó con PBS 1X para agregar 100 µl de tripsina 1X (0,5% Tripsina-EDTA, GIBCO) para levantar las células de cada pocillo. Una vez despegadas cortamos la reacción con 400 µl de PBS 1X y recolectamos todo el medio (incluido el medio con las células levantadas del inicio) en eppendorfs que llevamos a centrifugar por 10 min a 2400 rpm en centrífuga refrigerada. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µl de PBS 1X. Finalmente, se tomaron 20 µl de la solución con las células y se agregaron 20 µl de Azul Tripán para proceder a contar células vivas vs. muertas en cámara de Neubauer.

5.2.1.3.2. Proliferación

Ensayo de proliferación celular: se determinó la proliferación de las células mamarias luego de ser incubadas por 24 h con los diferentes MCs obtenidos. Se utilizó el ensayo de MTT para células vivientes (Cell titer 96, AQ One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, USA). Se realizaron tres experimentos por triplicado.

Día 1: se plaquearon 2000 células MCF-7/MDA-MB-231 ó 5000 células MCF-10A por pocillo en placas de 96 pocillos en DMEM F12 con rojo fenol con SFB al 10%.

Día 2: 24 h después (o alcanzado el 70% de confluencia) se volcó el medio haciendo un solo movimiento seco hacia abajo dando vuelta la placa sobre papel absorbente previamente rociado con alcohol 70°. Se lavaron los pocillos con PBS 1X y se volcó nuevamente sobre papel. Se cargaron 50 µl

de los diferentes tratamientos (50% MCs y 50% DMEM F12 sin rojo fenol con 2% de SFBC) o medio control. Se incubó por 24 h.

Día 3: Se preparó el MTT 1:10 diluyéndolo en PBS 1X protegiéndolo de la luz. Se volcó el medio como se explicó en el día 2. Se lavó con PBS 1X y el mismo se aspiró cuidadosamente inclinando la placa sin tocar el fondo de los pocillos. Se agregaron 100 µl de MTT por pocillo. Se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó 3 h en estufa a 37 °C. Se volcó el MTT sobre papel, se agregaron 100 µl de DMSO (Sigma- Aldrich) y se midió en espectrofotómetro (Multiscan EX, Thermo Scientific).

5.2.1.3.3. Adhesión

Ensayo de adhesión: este protocolo se llevó a cabo con modificaciones según el protocolo de Retta *et. al.* (1999) [179] . Se realizaron tres experimentos por triplicado.

Día 1: placas de 96 pocillos fueron cubiertas con 100 µl de los distintos tratamientos (50% MCs y 50% DMEM F12 sin rojo fenol con 2% de SFBC) o medio control por pocillo durante 24 h en estufa de cultivo.

Día 2: los pocillos fueron lavados con PBS 1X y bloqueados con seroalbumina bovina a 37 °C por 1 h. Después, se lavaron nuevamente los pocillos con PBS 1X y las células (5×10^4 células/pocillo) se resuspendieron en medio libre de suero y se sembraron para permitir adherirse a los pocillos. Luego de 1 h las células no adheridas se aspiraron cuidadosamente y los pocillos se lavaron con PBS 1X. Se incubaron 100 µl de cristal violeta 0,2% (Biopack) en etanol 10% por 20 min. Posteriormente, se lavó con agua ultrapura, se agregaron 50 µl de Na₂HPO₄ por 5 min y se midió en espectrofotómetro (Multiscan EX, Thermo Scientific).

5.2.1.3.4. Migración

Ensayo de cerrado de la herida: para analizar la motilidad celular de cultivos en monocapa confluentes de las distintas líneas, se sembraron 10000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se esperó hasta que cada línea celular llegó a una confluencia cercana al 100% (se cambió el medio cada 48 h). Cuando llegaron a confluencia, se lavó con PBS 1X y la monocapa fue cortada en el centro del pocillo, con ayuda de una porta objetos lavado con alcohol 70° utilizado como regla, con una punta para pipetas de 200 µl. Después de realizar lavados con PBS 1X para remover las células despegadas por el corte, se incubó con los tratamientos (50% MCs y 50% DMEM F12 sin rojo fenol con 2% de SFBC) o medio control. Los cultivos fueron observados y fotografiados inmediatamente después del corte (0 h) y a las 6, 12 y 24 h. Se realizaron tres experimentos por triplicado. Se utilizó el programa Image J FIJI para cuantificar el área de la herida mediante transectas. En esta tesis se mostrarán los resultados del análisis de los datos recolectados a las 6 h para evitar los cambios que pudiera provocar la proliferación de cada línea celular.

5.2.1.3.5. Lisis celular para apoptosis

Lisis de células para SDS-PAGE seguido de inmunobloting: para indagar en las modificaciones que pueden provocar los factores solubles secretados por el tejido adiposo sobre las diferentes líneas celulares, se sembraron 100000 células por pocillo en placas de 12 pocillos. Cuando llegaron a un 65-70% de confluencia se aspiró el medio, se lavó con PBS 1X, se agregaron los tratamientos (50% MCs y 50% DMEM F12 sin rojo fenol con 2% de SFBC) o medio control y se dejaron incubando por 24 h. Se aspiraron los medios, se lavó con PBS 1X y se agregaron 100 µl de buffer RIPA (50mM Tris ClH, 1:100 Protease Inhibitor Cocktail de Sigma, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 50 mM NaF) por pocillo. Se congelaron y descongelaron dos veces las placas para facilitar la ruptura de las células. Se rastrilló y se colectó en tubos eppendorf, los cuales se centrifugaron 3 min a 3000 rpm. Se recolectó el sobrenadante y se guardó a -20 °C hasta ser utilizado para detectar diferentes proteínas por inmunobloting (Ver **Tabla 5.6**).

Tabla 5.6. Anticuerpos utilizados para inmunobloting

Antígeno	Anticuerpo	Concentración	Origen	Marca	Muestra
Caspasa 3	Anti-Caspasa 3 antibody ab4051	1:500	Rabbit	Abcam	Lisis líneas celulares
PARP Clivado	Anti-Cleaved PARP1 antibody [E51]	1:500	Rabbit	Abcam	Lisis líneas celulares
PCNA	Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen Clone [PC10]	1:1000	Mouse	Dako	Lisis líneas celulares
REα	Anti-Estrogen Receptor alpha antibody [E115] - ChIP Grade ab32063	1:500	Rabbit	Abcam	Lisis líneas celulares
REβ	Anti-Estrogen Receptor beta antibody (ab3577)	1:500	Rabbit	Abcam	Lisis líneas celulares
RP4	PR (C-20) sc-539	1:500	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Lisis líneas celulares
TRβ1	TR β 1 (J52) sc-738	1:500	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Lisis líneas celulares
Lámina β	Lamin B (C-12) sc-365214	1:3000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Lisis líneas celulares
β Actina	B-Actin (C4) sc-47778	1:1000	Mouse	Santa Cruz	Lisis líneas celulares

				Biotechnology, Inc.	
β Tubulina	Anti-beta Tubulin antibody [EP1569Y] (ab52623)	1:5000	Rabbit	Abcam	Lisis líneas celulares
2^o Rabbit	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinilated Code No. E0432	1:3000	Goat	Dako	Lisis líneas celulares
2^o Mouse	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinilated Code No. E0433	1:3000	Goat	Dako	Lisis líneas celulares

5.2.1.4. Proteómica



Figura 5.4. Diseño experimental para el modelo in vitro incluyendo la proteómica.

Los MCs utilizados para el análisis proteómico fueron obtenidos mediante el mismo diseño experimental descrito en el apartado 5.2.1.2. (Figura 5.4). Un protocolo específico para resolver mezclas complejas de proteínas (*shotgun proteomics*), mediante la combinación de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con herramientas bioinformáticas [5] y SDS-PAGE fue empleado para el análisis proteómico.

5.2.1.4.1. Shotgun y/o bottom-up

El análisis denominado *shotgun* (técnica donde la muestra se usa en solución) y/o *bottom-up* (técnica que puede utilizarse antes o durante de la espectrometría de masas en tándem o MS/MS) se ha convertido en una herramienta útil para la identificación y cuantificación relativa de proteínas en mezclas complejas como homogeneizados de tejidos, fluidos biológicos, lisados celulares y proteínas extracelulares. Esta técnica utiliza la información arrojada por un espectrómetro MS/MS al que han sido inyectados los péptidos provenientes de la digestión de proteínas presentes en una muestra. La información arrojada se contrasta con una base de datos de proteínas previamente secuenciadas provenientes del mismo organismo. En la Figura 5.5 se muestra un esquema del flujo de trabajo para la identificación y análisis de las proteínas en los MCs. El análisis *shotgun* fue llevado a cabo según lo publicado por Callegari 2016 [180].

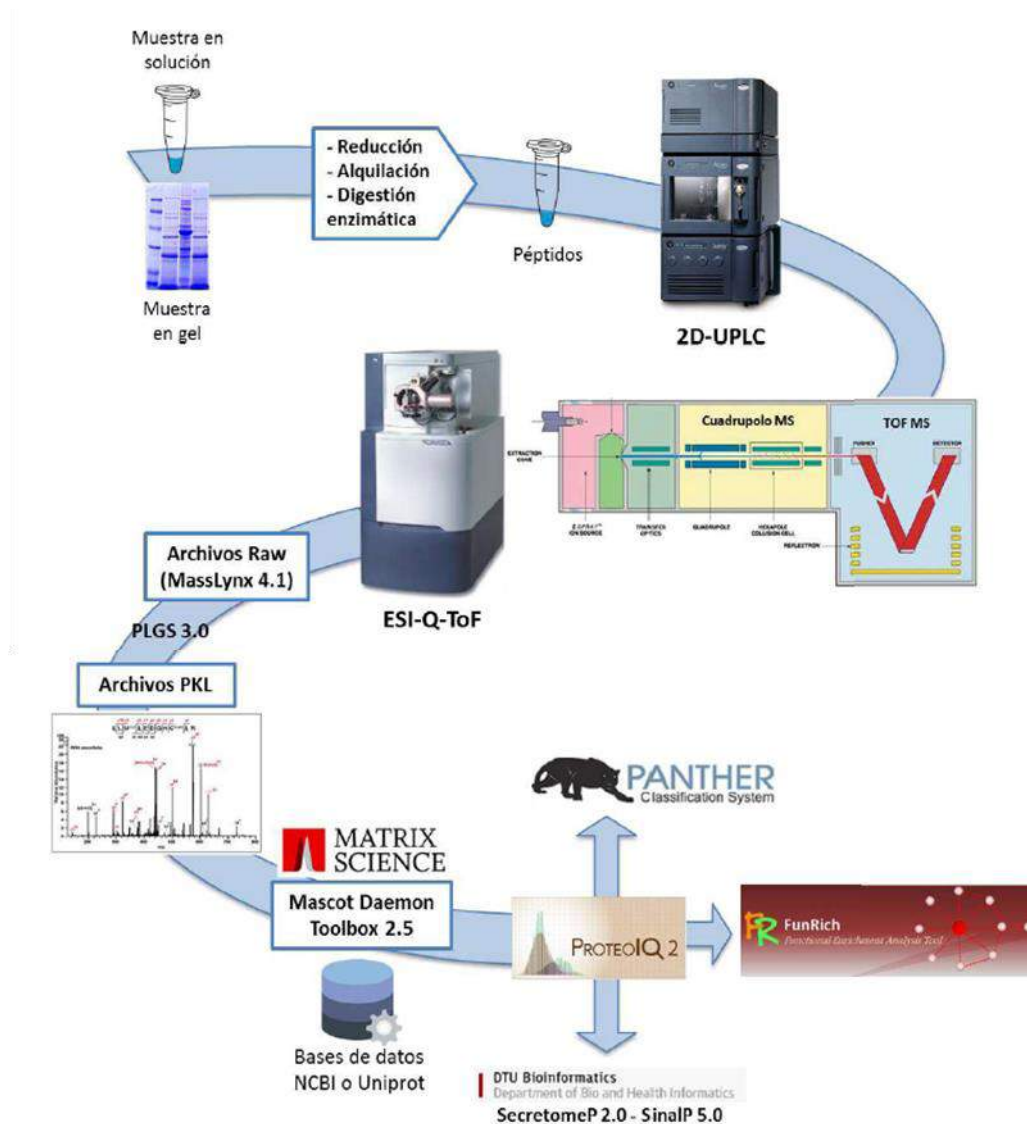


Figura 5.5. Diagrama de flujo de trabajo seguido para la identificación y análisis de las proteínas en los MCs (Imagen extraída de la tesis de postgrado de la Dra. Analía Redondo, 2020) [181]. Para el análisis shotgun, tanto las muestras en gel como las muestras en solución pasaron por tres reacciones: Reducción con ditiotreitól (DTT) de los puentes disulfuros entre los aminoácidos cisteína, alquilación de los mismos con iodoacetamida y digestión enzimática con tripsina. Los péptidos de allí obtenidos fueron separados por un 2D-nanoUPLC y en línea inyectados y analizados en un detector ESI-Q-Tof, para la obtención de los datos de MS/MS en archivos Raw (sin formato). La deconvolución de dichos archivos mediante el programa PLGS 3.0 permite acceder a los espectros de fragmentación de cada péptido leído (archivo PKL). El servidor Mascot es quién interpreta dichos archivos, buscando coincidencias entre las lecturas experimentales y las teóricas obtenidas de las bases de datos (NCBI o Uniprot). Finalmente, el programa ProteoIQ permite tener todas las proteínas identificadas en las distintas muestras en una misma tabla y poder realizar análisis comparativos y de abundancia relativa. Desde este programa podemos extraer la información para ser utilizada en otras herramientas de análisis cómo lo son Panther, FunRich, SecretomeP y SinalP.

5.2.1.4.2. Preparación de la muestra

Para la identificación y análisis de las proteínas, las muestras fueron enviadas al Laboratorio de SD-BRIN PROTEOMICS FACILITY, en la Universidad de Dakota del Sur, Vermillion, EE. UU., de dos maneras: MCs liofilizados y en bandas de geles de poliacrilamida.

a) Liofilización de los MCs:

El volumen correspondiente a 30 μg de proteínas de cada MC fue liofilizado por 48 h a 1 atmósfera y -50°C en tubos eppendorf con la tapa perforada. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

b) Preparación de los geles y muestras:

Se sembraron geles de poliacrilamida al 10% con igual volumen (85 μl) de los diferentes MCs para luego ser teñidos con el colorante Coomassie Blue G-250 (170 g de sulfato de amonio, 35 ml de ácido ortofosfórico, 340 ml de metanol y 2 g de Coomassie G-250 para 1 l de solución).

Posteriormente, se cortaron las bandas de los geles para ser enviadas a EEUU (**Figura 5.6**), junto con los MCs liofilizados.

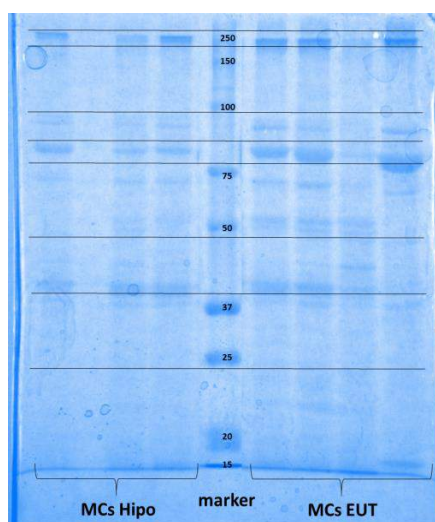


Figura 5.6. Fotografía representativa del gel de poliacrilamida al 10% teñido con Coomassie Blue G-250. Las líneas horizontales señalizan los lugares de corte. Marker: marcador de pesos moleculares en kDa.

Muestras en solución:

Los MCs liofilizados, una vez en el laboratorio de proteómica, fueron disueltos en 50 mM Tris-HCl (Promega, USA), para luego continuar con una reducción con 50 mM DTT a 65°C durante 5 min, y posterior alquilación con 100 mM de iodoacetamida a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez terminada la etapa de ruptura de puentes disulfuro se llevó a cabo la hidrólisis enzimática

con tripsina (Promega, USA) en una proporción 1 µg de tripsina/40 µg de proteína toda la noche a 37 °C para lograr una digestión completa. Pasado el tiempo de digestión, los tubos con las muestras fueron colocados en hielo seco y la reacción se detuvo utilizando ácido acético hasta alcanzar un pH menor a 3. Al terminar el proceso de digestión se realizó un concentrado de los péptidos utilizando una centrifuga de vacío AES 1010 SpeedVac System (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

Muestras en gel:

Para las muestras en gel los segmentos de gel fueron desteñidos con 50 mM de bicarbonato de amonio/50% de acetonitrilo por 30 min 2 veces, luego se procedió a la reducción con 10 mM de DTT por 30 min, seguido de la alquilación con 55 mM de iodoacetamida por 20 min. Luego de 2 lavados con 100 mM de bicarbonato de amonio se procedió a la deshidratación utilizando 100% de acetonitrilo por 5 min, la banda fue secada por completo en la centrifuga de vacío.

La siguiente etapa fue de digestión enzimática, para ello, se agregó a cada banda 25 µl de una solución de 0,006 µg/µl de tripsina, se dejó 30 min en hielo hasta que la banda se rehidrató por completo en dicha solución. Se procedió con el agregado de 100 µl de 50 mM de bicarbonato de amonio y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se procedió con la extracción de los péptidos, utilizando 2 soluciones de extracción: A) 2% ácido fórmico/2% acetonitrilo; B) 50% acetonitrilo. Las bandas fueron incubadas 2 veces con cada solución de manera intercalada utilizando 30 µl durante 1 h y recogiendo los extractos en un tubo. Por último se procedió a concentrar los péptidos utilizando la centrifuga de vacío.

5.2.1.4.3. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una técnica de fraccionamiento que puede utilizarse para separar proteínas o péptidos según las propiedades físicas y químicas. La cromatografía en dos dimensiones (2D) permite máximos niveles de resolución para muestras de gran complejidad, esta técnica acoplada a equipos de MS/MS superan a las técnicas basadas en geles de 2D, en rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad a diferentes muestras y condiciones [182].

Para separar los péptidos obtenidos de la digestión enzimática con tripsina de los MCs, se utilizó un cromatógrafo líquido de 2 dimensiones de nano-flujo, 2D-nanoAcquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (Waters Corp., Massachusetts, USA). Para la primera dimensión se utilizó una columna de fase reversa XBridge BEH130 C₁₈, 5 µm, 300 µm x 50 mm NanoEase (Waters). A los péptidos inyectados se les realizaron dos tratamientos en línea: la eliminación de sales y la concentración de los péptidos utilizando una columna de fase reversa (RP-Trap), Symmetry C₁₈ 180 µm x 20 mm, 5 µm nanoAcquity UPLC (Waters). Para realizar la separación de péptidos en la segunda dimensión se utilizó una columna de fase reversa BEH130 C₁₈, 1,7 µm, 100 µm x 100 mm nano Acquity (Waters), el gradiente utilizado desde el tiempo 0 hasta los 2 min fue de 3% de forma isocrática de fase B (Acetonitrilo/ácido fórmico, en relación 99, 9:0,1; v/v) mientras que la fase A cuenta con agua/ácido fórmico en relación 99, 9:0,1 (v/v); 3-80% de fase B desde el minuto 2, hasta los 40 min. El flujo de solvente utilizado fue de 400 nl /min.

5.2.1.4.4. MS/MS

La espectrometría de masas (MS) permite medir con precisión la relación masa/carga (m/z) de una molécula. Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector (**Figura 5.7**). En sus inicios la MS no era aplicable a proteínas, debido a la ausencia de técnicas suaves de ionización que permitieran realizar el paso de grandes moléculas a iones en fase gaseosa sin una excesiva fragmentación de las mismas [183]. A partir de fines de la década de 1980 el desarrollo de dos técnicas de ionización, MALDI y ESI, permitieron realizar el análisis de proteínas y péptidos [184, 185]. Se llama espectrometría de masas en tándem (MS/MS) al acoplamiento de dos espectrómetros de masas unidos por una cámara de colisión que generalmente fragmenta las moléculas. Estos equipos permiten realizar la medición de la relación masa/carga (m/z) de los péptidos intactos en el primer analizador de masas y, tras una fragmentación de los péptidos en la cámara de colisión, la medición de las m/z de los fragmentos en el segundo analizador de masas. Esto permite la identificación de la proteína con mayor exactitud, ya que el espectro de fragmentación de un péptido es característico para cada péptido.

Para el análisis de los péptidos separados y concentrados en la cromatografía líquida se utilizó un espectrómetro de masas en tándem con nano ionización por electrospray (electrospray ionization, ESI) con analizador de masas por cuadrupolo (Q) y posterior análisis por tiempo de vuelo (Time of flight, ToF), Q-ToF Synapt GI MS (Waters), los iones eluidos fueron analizados por un escaneo de masa completo del precursor (400-2000 m/z) seguido por cuatro escaneos MS/MS (50-2000 m/z) de los iones más abundantes detectados previamente en el precursor. Se utilizó 100 fmol de (Glu1)-fibrinopéptido B humano (Sigma-Aldrich) como calibrador. Los datos fueron analizados utilizando el software 4.1 MassLynx (Micromass, United Kindom), los archivos Raw se convirtieron en una lista de picos/masas (archivos PKL) mediante el programa ProteinLynx Global Server 3.0 (PLGS 3.0).

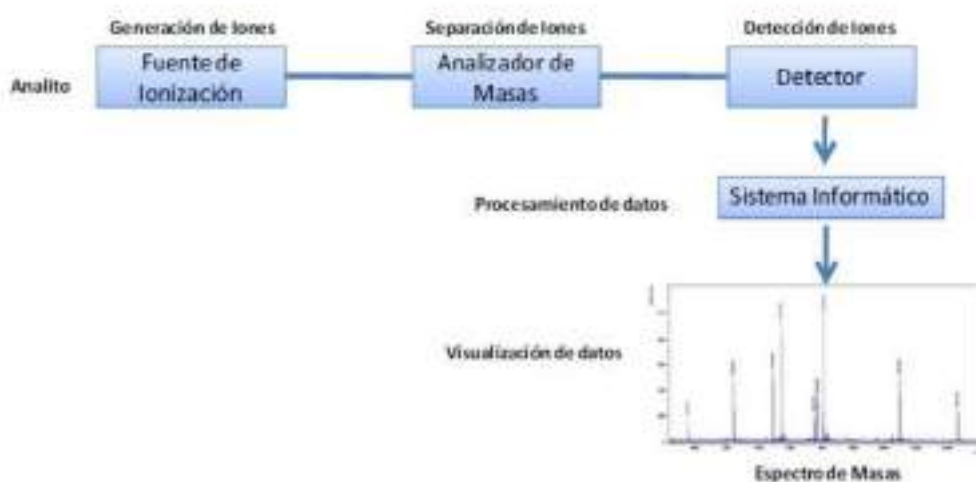


Figura 5.7. Esquema de las partes de un equipo de MS (Imagen extraída de la tesis de postgrado de la Dra. Analía Redondo, 2020) [181]. Fuente de Ionización (MALDI o ESI), el analizador de masas (TOF, Q o combinaciones) y el detector de iones. Las señales captadas en el detector son integradas en un sistema informático que genera gráficos conocidos como espectro de masas.

5.2.1.4.5. Análisis informático

Los archivos PKL fueron transferidos al servidor Mascot Daemon toolbox 2.5 (www.matrixscience.com, UK) para poder realizar una búsqueda en las base de datos Swiss Prot (The Universal Protein Resource, UniProt) utilizando el filtro taxonómico para *Rattus Norvegicus*. Se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda: (a) Modo de búsqueda de iones MS/MS, (b) enzima = tripsina, (c) clivajes = 2, (d) modificaciones fijas = carbamidometil en cisteína, (e) modificaciones variables = desamidación en asparagina y glutamina, y oxidación en metionina, (f) péptido y tolerancia MS/MS = 50 ppm y 0,3 Da, respectivamente, (g) masas monoisotópicas, (h) formato de datos = .PKL, (i) instrumento = ESI-Q-ToF y modo tolerante a errores.

Los resultados obtenidos fueron exportados como archivos Mascot.dat para realizar el análisis en ProteoIQ software (PREMIER Biosoft, USA) de las proteínas identificadas y su abundancia relativa mediante el conteo espectral (SC). Finalmente desde este programa se exportaron los datos para ser usados en otras herramientas de análisis como FunRich (Functional Enrichment analysis tool) [186, 187], String-db (www.string-db.org) para la predicción de posibles interacciones proteicas; the Global Proteome Machine (the GPM, www.thegpm.org) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, www.genome.jp/kegg/) para las vías metabólicas.

La colaboración se realizó en la Universidad de Dakota del Sur a cargo del Dr. Eduardo Callegari. El estudio proteómico permitió seleccionar los péptidos exclusivos de cada tipo de MC que podrían explicar los efectos biológicos producidos sobre las diferentes líneas celulares de mama utilizadas, éstos se encontraban además sobreexpresados. Dichos péptidos (Clusterina [rhClusterin, Nº de catálogo 2937-HS] para los MCs eutiroideos, Adiponectina [rhAcrp30, Nº 1065-AP] para los hipotiroideos. R&D System) se utilizaron sobre las líneas celulares como se detalla en los apartados que se encuentran a continuación.

5.2.1.4.6. Curvas de dosis respuesta de los péptidos

A partir del estudio proteómico se decidió estudiar el efecto *in vitro* de dos péptidos presentes en los MCs, la adiponectina y la clusterina. Ambos péptidos fueron adquiridos en R&D Systems (Adiponectina: Recombinant Human Adiponectin/Acrp30, número de catálogo: 1065-AP. Clusterina: Recombinant Human Clusterin, número de catálogo: 2937-HS). En este caso el sistema es homólogo, ya que los péptidos utilizados sobre las líneas celulares epiteliales mamarias tumorogénicas y no tumorogénicas, son humanos. Con el motivo de elegir la concentración más eficiente de los péptidos para realizar los ensayos sobre las líneas celulares se confeccionaron curvas de dosis respuesta por medio de ensayos de proliferación por MTT a 24 h (se aplicó el mismo protocolo utilizado para el ensayo de proliferación incubando los péptidos en lugar de los MCs. En este caso el control fue el medio DMEM F12 sin rojo fenol con SFBC al 1%. Ver apartado 5.2.1.3.2). Se decidió realizar ensayos de proliferación por MTT a 24 h y no, por ejemplo, un ensayo clonogénico que podría haber sido más representativo de la concentración del péptido que afecta a las líneas celulares utilizadas en esta tesis, ya que resultó en la economización de dichos péptidos. En un ensayo clonogénico se debería haber reemplazado el péptido incubado en las líneas celulares cada 48 h por más de 15 días vs. colocar una única dosis de los mismo en los ensayos de proliferación por MTT a 24 h.

Adiponectina: De un stock de 100 ng/ml realizamos una curva con ocho puntos (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 ng/ml).

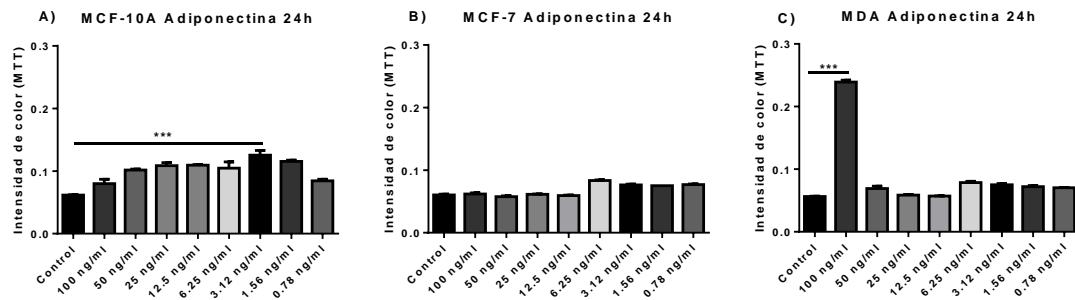


Figura 5.8. Curva de dosis respuesta por ensayo de proliferación por MTT. A) Línea celular MCF- 10A, no tumorigénica, *** $p < 0,001$. B) Línea celular MCF-7, tumorigénica sensible a estrógeno. C) Línea celular MDA-MB-231, tumorigénica no sensible a estrógeno, *** $p < 0,001$.

Clusterina: De un stock de 200 ng/ml realizamos una curva de siete puntos (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 ng/ml).

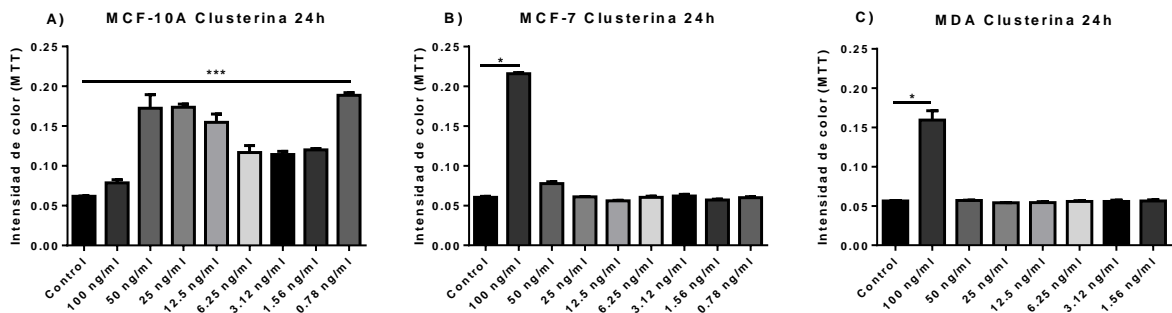


Figura 5.9. Curva de dosis respuesta por ensayo de proliferación por MTT. A) Línea celular MCF- 10A, no tumorigénica, *** $p < 0,001$. B) Línea celular MCF-7, tumorigénica sensible a estrógeno, * $p < 0,05$. C) Línea celular MDA-MB-231, tumorigénica no sensible a estrógeno, * $p < 0,05$.

En base a los resultados observados en las **Figuras 5.8** y **5.9** se eligieron las concentraciones de péptidos para realizar los ensayos biológicos descritos en el apartado 5.2.1.3 en las diferentes líneas celulares mamarias. Para adiponectina (seleccionado como candidato antitumoral y responsable de los efectos proapoptóticos y antiproliferativos de los MCs Hipo-TAM), al realizar la curva de dosis respuesta, inesperadamente no se vieron efectos antiproliferativos, sino que se observaron aumentos en la proliferación en dos de las tres líneas celulares (MCF-10A y MDA-MB-231). Adiponectina ejerce diferentes funciones dependiendo de factores microambientales, como el tipo de tejido/órgano y estado inflamatorio. Además, los modelos de células cultivadas disponibles probablemente no sean adecuados para reproducir el complejo microambiente tumoral existente 'in

vivo'. Otro nivel de complejidad que podría influir en los resultados experimentales deriva de la existencia de diferentes oligómeros de adiponectina que se unen a sus diferentes receptores ejerciendo así distintas funciones [72, 92, 95, 188, 189]. Dado el escenario, y respaldado por bibliografía [93, 172, 189] que tiene a la adiponectina como favorecedora de la proliferación y protumoral, se eligieron las concentraciones que mostraron este cambio para trabajar sobre las diferentes líneas celulares.

Para clusterina, las concentraciones elegidas fueron también las que mostraron mayor efecto proliferativo, debido a que dicho péptido fue seleccionado de los resultados de la proteómica como posible responsable del aumento de la proliferación y de sus funciones antiapoptóticas [96, 97, 99, 101, 190] de los MCs Eut-TAM. Los stocks de los péptidos se prepararon como se detalla a continuación.

Los stocks de los péptidos se prepararon en PBS 1X estéril. Los puntos de ambas curvas se diluyeron en DMEM F12 sin rojo fenol con SFBc al 2%.

5.2.1.4.7. Ensayos con péptidos

La **Tabla 5.7** muestra las concentraciones de péptidos utilizadas para llevar a cabo los ensayos de adhesión, proliferación y migración tal como se detallan en la sección 5.2.1.3. Se realizaron tres o cuatro experimentos por triplicado en las tres líneas celulares (MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231).

Tabla 5.7. Concentraciones en ng/ml de los péptidos utilizados para los diferentes ensayos sobre las líneas celulares.

Línea celular	Adiponectina (ng/ml)	Clusterina (ng/ml)
MCF-10A	3,12	0,78
MCF-7	6,25	100
MDA-MB-231	100	100

5.3. Análisis estadístico

Los valores se presentan como medias aritméticas \pm S.E.M. Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., CA, EEUU). Las diferencias en la distribución de las variables entre los dos grupos estudiados (Hipo y Eut) se evaluaron mediante la prueba T de Student o U de Mann Whitney en función de la normalidad de las variables evaluada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparaciones múltiples se utilizó ANOVA I, o el test de Kruskal-Wallis en caso de variables no paramétricas. Además, se utilizó el análisis de varianza bidireccional (ANOVA II) para el análisis de los efectos de los MCs TAM y TAA tumorales o no tumorales de ratas Hipo y Eut sobre la viabilidad, proliferación, adhesión y migración de líneas celulares humanas. La prueba de Bonferroni fue empleada como Post-hoc. La incidencia se muestra como porcentajes, pero los valores brutos se analizaron mediante la prueba de Chi-Cuadrado. Las curvas de supervivencia libre de tumores se compararon mediante la prueba de Mantel-Cox de rango logarítmico. Las diferencias se consideraron significativas si la probabilidad era del 5% o menos.

6. RESULTADOS

6.1. OBJETIVO ESPECÍFICO N°1. Caracterización del TAA y del TAM en ratas hipo- y eutiroideas

6.1.1. Descripción del modelo de hipotiroidismo

6.1.1.1. Establecimiento del hipotiroidismo: valores hormonales

El estado tiroideo de los animales se evaluó midiendo las concentraciones séricas de TSH, T4 y T3 (Tabla 6.1) al final del experimento. Las ratas tratadas con PTU presentaron bajas concentraciones circulantes de T4 y T3, mientras que los niveles de TSH fueron significativamente más elevados que los animales control. Todos ellos indicadores sensibles de hipotiroidismo.

Tabla 6.1. Niveles séricos de TSH, T4 y T3 en los grupos experimentales.

	Hipo	Eut	p
TSH(ng/ml)	4.98 ± 0.4	0.84 ± 0.1	<0,0001
T4 (ng/ml)	20.96 ± 1.1	33.29 ± 2.62	<0,0001
T3 (ng/ml)	0.42 ± 0.1	0.61 ± 0.01	0,02

6.1.1.2. Condición corporal de los animales

El tratamiento crónico con PTU retrasó significativamente el crecimiento de los animales reflejado en una disminución de peso y largo corporal (Figura 6.1 A y 6.1 B), y en bajos niveles circulantes de GH (6.38 ± 0.27 ng/ml) en comparación con los controles no tratados (17.01 ± 3.32 ng/ml, $p < 0,001$). Las ratas Hipo aumentaron el peso corporal de manera similar a las ratas Eut durante las primeras 4 semanas de tratamiento con PTU. Luego, dejaron de ganar peso hasta el final del estudio, mostrando una diferencia significativa con las no tratadas ($p < 0,001$; Figura 6.1 A). Así mismo pudimos observar que los animales Hipo mostraron una menor longitud cabeza-cuerpo comparado con los Eut (Figura 6.1 B).

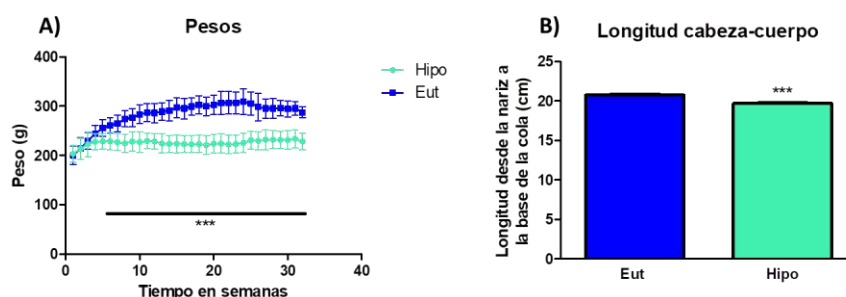


Figura 6.1. Condición corporal. A) Peso por semana de los grupos experimentales. *** $p < 0,001$. B) Longitud desde la nariz a la base de la cola de los animales en el día 75 de experimentación. *** $p < 0,001$.

6.1.1.3. El TA en condiciones de hipotiroidismo

6.1.1.3.1. Tejido adiposo abdominal

6.1.1.3.1.1. Porcentaje de grasa y tamaño de adipocito

Con el fin de caracterizar el TA, cuantificamos el porcentaje de grasa respecto al peso corporal de los animales y evaluamos el tamaño de los adipocitos mediante la técnica de tinción con H&E. Tanto el porcentaje de grasa como el tamaño de los adipocitos fueron mayores en los animales Hipo (**Figura 6.2**), lo que podría darnos cuenta de un TAA hipertrófico.

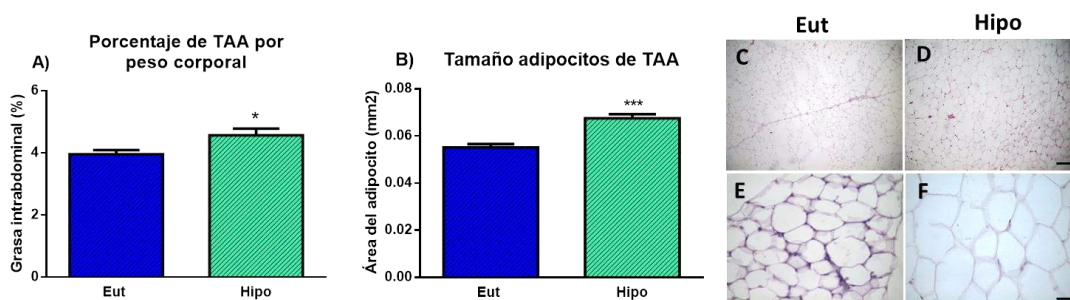


Figura 6.2. Porcentaje y tamaño de adipocitos en el TAA. **A)** Porcentaje de grasa intraabdominal por peso corporal. * $p < 0,05$. **B)** Tamaño promedio de los adipocitos en mm^3 . *** $p < 0,001$. **C)** y **D)** Imágenes representativas 100x del TAA en animales Eut e Hipo respectivamente. Regla de 100 μm . **E)** y **F)** Imágenes representativas 400x del TAA en animales Eut e Hipo. Regla de 50 μm .

Si bien estos dos parámetros se encontraron aumentados en el TAA, no observamos diferencias significativas en la cantidad de lípidos almacenados en el TAA determinado por la técnica de Folch (**Figura 6.3**).

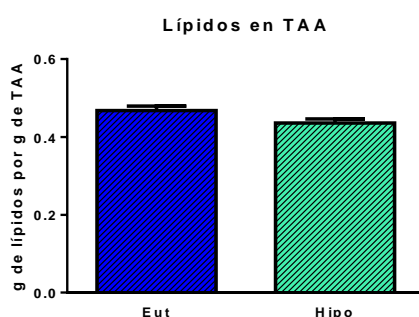


Figura 6.3. Lípidos en el TAA.

6.1.1.3.1.2. Expresión de receptores hormonales

Posteriormente, evaluamos la expresión de receptores hormonales en cortes de TAA mediante la técnica de IHQ y observamos que las ratas Hipo presentaron una disminución en la expresión de

los receptores TR β 1, RE α y del RP4 dando cuenta de un TAA con una posible menor sensibilidad a hormonas. No vimos cambios significativos en la expresión de la enzima aromatasa (**Figura 6.4**).

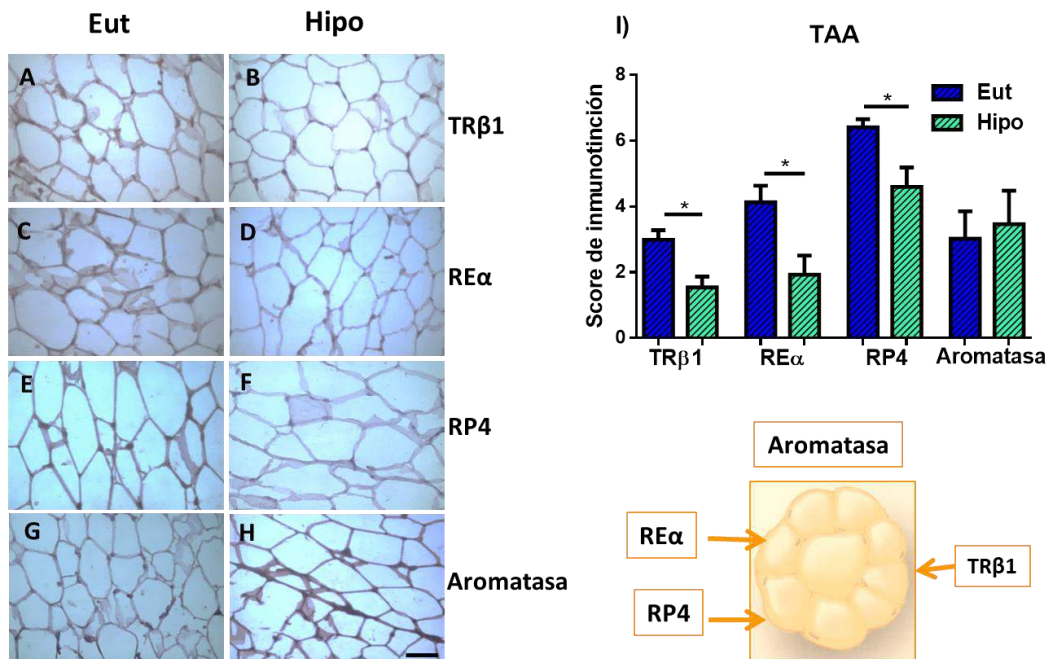


Figura 6.4. Expresión de receptores hormonales en el TAA. **A) – H)** Imágenes representativas 400x de la expresión de los diferentes receptores hormonales del TAA en animales Eut e Hipo. Regla de 50 μ m. **I)** Puntuación de inmunotinción para los receptores hormonales y aromatasa del TAA. * $p < 0,05$.

6.1.1.3.1.3. Adipoquinas y sus receptores

En cuanto a la expresión de adipoquinas y sus receptores en el TAA, hallamos una disminución de la expresión de leptina y adiponectina en animales Hipo comparado con los controles (**Figura 6.5**). No observamos diferencias significativas entre sus receptores, ni para perilipina sugiriendo que el TAA de ratas Hipo podría ser un TA disfuncional.

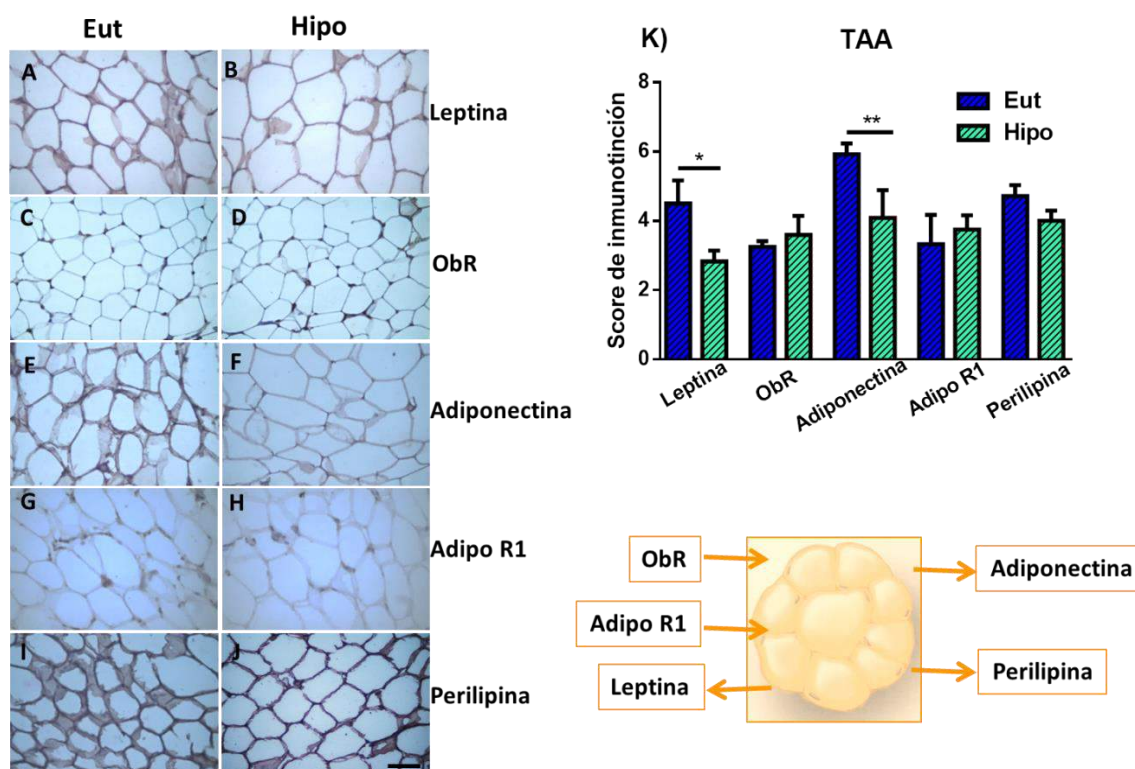


Figura 6.5. Expresión de adipoquinas y sus receptores. **A) – J)** Imágenes representativas 400x de la expresión de las diferentes adipoquinas y sus receptores en el TAA de animales Eut e Hipo. Regla de 50 μm. **K)** Puntuación de inmunotinción para las adipoquinas y sus receptores en el TAA. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

6.1.1.3.1.4. Marcadores de tejido adiposo blanco (TAB) y pardo (TAP)

Finalmente, se midió la expresión de ciertos marcadores del TAB y el TAP por la técnica de SDS-PAGE seguida de inmunobloting. Pudimos observar que en animales Hipo disminuyó la expresión de algunos marcadores de TAB como la lipasa sensible a hormonas (HSL) y su forma fosforilada (p-HSL), no así la relación (*ratio*) entre las mismas proteínas. También se detectó un aumento en la expresión del receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma (PPARY), importante marcador de la maduración del TA (**Figura 6.6 A**).

En cuanto a los marcadores de TAP, se observó una disminución de la expresión del contenedor del dominio PR dieciséis (PRDM16) y de la proteína de desacoplamiento uno (UCP1), indicadores de pardeamiento del TA, producida por el hipotiroidismo experimental (**Figura 6.6 B**).

Por otro lado, cuando se midió la actividad metabólica del TAA a través de la expresión de los transportador de monocarboxilato (MCT), se encontró un aumento de la expresión del MCT1, transportador encargado de introducir lactato al adipocito; no así en el MCT4, encargado de liberarlo al exterior celular (**Figura 6.6 C**).

Todos estos resultados en su conjunto indicarían que el estado de hipotiroidismo estaría favoreciendo la diferenciación del TAA hacia adipocitos blancos disminuyendo su pardeamiento, además de disminuir su catabolismo adiposo. Esto último nos estaría demostrando que el TAA se

comportaría principalmente como un reservorio de energía en forma de grasa en el hipotiroidismo experimental.

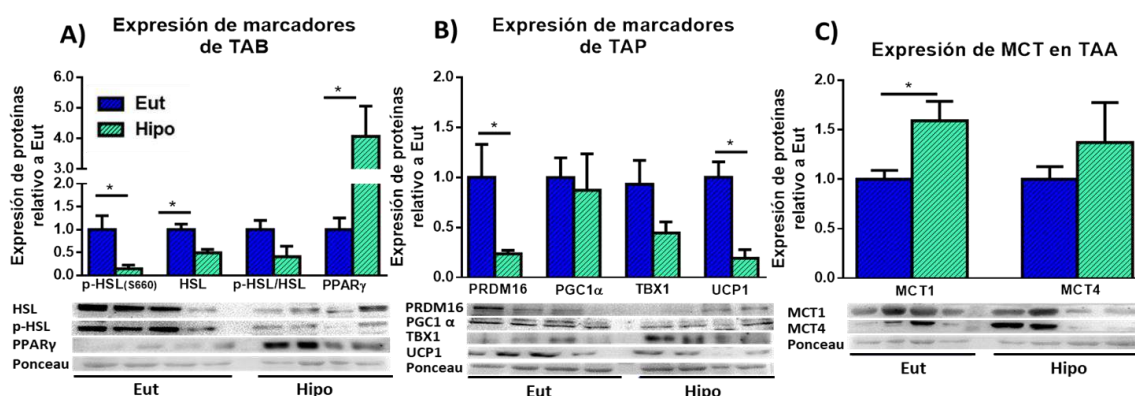


Figura 6.6. Marcadores de TAB y TAP. **A)** Marcadores de TAB, * $p < 0,05$. **B)** Marcadores de TAP, * $p < 0,05$. **C)** Indicadores de actividad metabólica en el TA, * $p < 0,05$.

6.1.1.3.2. Tejido adiposo mamario

6.1.1.3.2.1. Porcentaje de grasa y tamaño de adipocito

El efecto del hipotiroidismo en el TA de la GM se evaluó mediante observación histológica y medición de las áreas ocupadas por parénquima o estroma. La **Figura 6.7** muestra microfotografías representativas de tejido mamario teñido con H&E de ratas Hipo y Eut. Las glándulas mamarias de las ratas Eut presentaron una apariencia normal con pequeños conductos rodeados por una pequeña cantidad de tejido conectivo fibroso y abundante TA. Las glándulas mamarias de las ratas Hipo también fueron normales, pero en algunos casos se asociaron a patologías benignas mamarias como la estasis ductal. La **Figura 6.7 A** muestra los porcentajes relativos del área adiposa. En las ratas Eut, el 73.33 ± 4.57 % de la GM estaba compuesta de estroma, que consistía en grasa y tejido conectivo. El resto de la glándula estaba representado por el parénquima, incluidos los lóbulos tipo 1, los lóbulos tipo 2 y las estructuras ductales (**Figura 6.7 C**; $p < 0,05$). En ratas Hipo, se observó un discreto desarrollo lóbulo-alveolar de la GM (aproximadamente 10%) y un mayor porcentaje de grasa en el estroma (88.02 ± 2.03 %; $p < 0,0001$ en comparación con las ratas Eut; **Figura 6.7 A**), lo que sugiere que el hipotiroidismo induce cambios en la relación parénquima-estroma.

Continuando con la caracterización del TAM pudimos observar que, al igual que el TAA, tanto el porcentaje de grasa en la GM y el tamaño del adipocito fueron mayores en los cortes de TAM de animales Hipo (**Figura 6.7 A y B**), lo que también nos da cuenta de un TA hipertrófico.

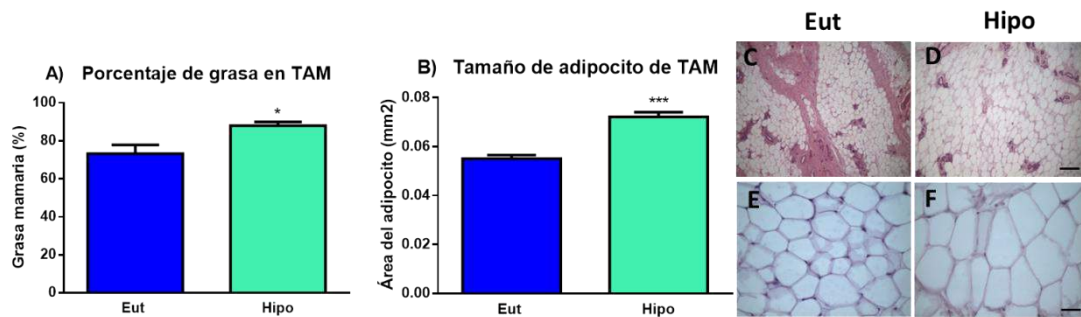


Figura 6.7. Porcentaje y tamaño de adipocitos en el TAM. **A)** Porcentaje de grasa de la GM. * $p < 0,05$. **B)** Tamaño de los adipocitos en mm^3 . *** $p < 0,001$. **C)** y **D)** Imágenes representativas 100x del TAM en animales Eut e Hipo. Regla de $100 \mu\text{m}$. **E)** y **F)** Imágenes representativas 400x del TAM en animales Eut e Hipo. Regla de $50 \mu\text{m}$.

6.1.1.3.1.2. Expresión de receptores hormonales

Con respecto a la expresión de receptores hormonales en TAM, no observamos diferencias significativas para TR β 1, RE α y RP4. Sólo se observó una tendencia a disminuir la expresión de TR β 1 en el grupo experimental Hipo (**Figura 6.8**). Estos resultados podrían indicar que el hipotiroidismo tiene mayores efectos a nivel sistémico que a nivel local ya que la expresión de dichos receptores solo se vio modificada en el TAA por el tratamiento con PTU. No observamos diferencias en la expresión de aromatasa.

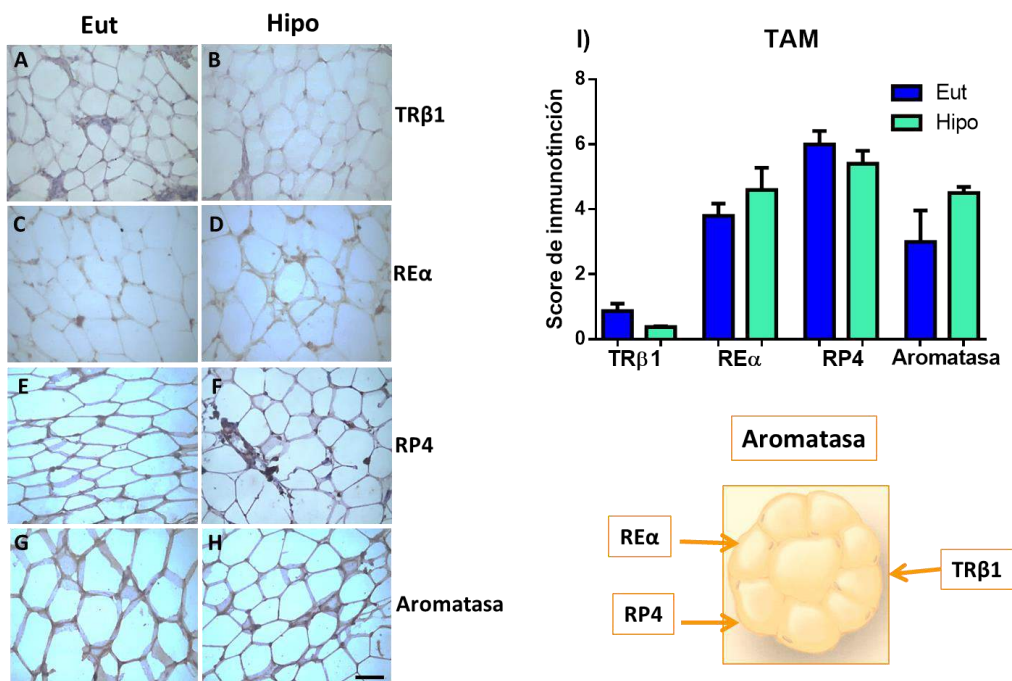


Figura 6.8. Expresión de receptores hormonales en el TAM. **A) – H)** Imágenes representativas 400x de la expresión de los diferentes receptores hormonales y aromatasa del TAM en animales Eut e

Hipo. Regla de 50 μm . I) Puntuación de inmunotinción para los receptores hormonales y aromatasas del TAM. $p < 0,052$ para TRB1.

6.1.1.3.1.3. Adipoquinas y sus receptores

En cuanto a la expresión de adipoquinas y sus receptores en el TAM advertimos una disminución de la expresión de adiponectina, su receptor Adipo R1 y perilipina en animales hipotiroideos (**Figura 6.9**), mientras que no vimos diferencias significativas para leptina ni su receptor ObR. Estos resultados sugieren que dicho tejido está menos diferenciado.

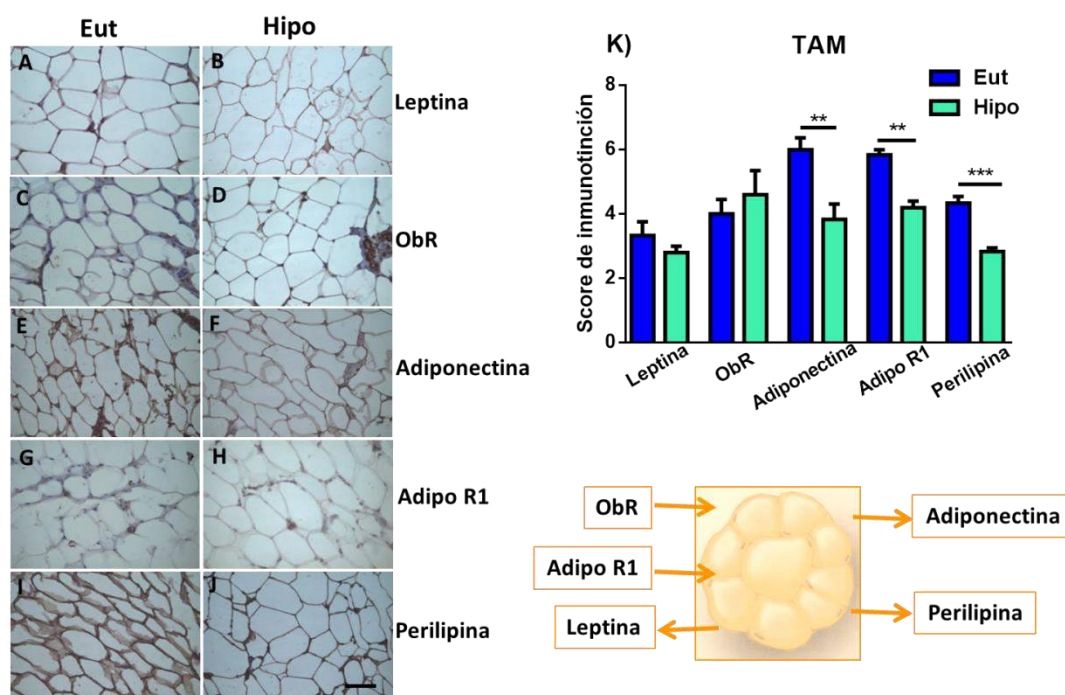


Figura 6.9. Expresión de adipoquinas y sus receptores en el TAM. A) – J) Imágenes representativas 400x de la expresión de las diferentes adipoquinas y sus receptores en el TAM de animales Eut e Hipo. Regla de 50 μm . K) Puntuación de inmunotinción para las adipoquinas y sus receptores en el TAM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

6.1.1.3.1.4. Marcadores de TAB y TAP

Por último, se midió la expresión de ciertos marcadores del TAB y el TAP por la técnica de SDS-PAGE seguida de inmunobloting. Pudimos observar que en animales Hipo disminuyó la expresión de algunos marcadores de TAB como HSL y su forma fosforilada, no así la proporción entre las mismas proteínas que tendió a aumentar. También se detectó una disminución en la expresión de PPARY, importante marcador de la diferenciación del TA (**Figura 6.10 A**).

En cuanto a los marcadores de TAP, se observó una disminución de la expresión de PRDM16 y un aumento de la expresión en el coactivador gamma 1-alfa activado por el proliferador de

peroxisomas (PGC1 α) y del factor de transcripción de la caja T (TBX1) en la GM de animales hipotiroideos (**Figura 6.10 B**).

Por otro lado, cuando se midió la actividad metabólica del TAM a través de la expresión de los MCT, se encontró un aumento de la expresión del MCT1, transportador encargado de introducir lactato al adipocito; no así en el MCT4, encargado de liberarlo al exterior celular (**Figura 6.10 C**).

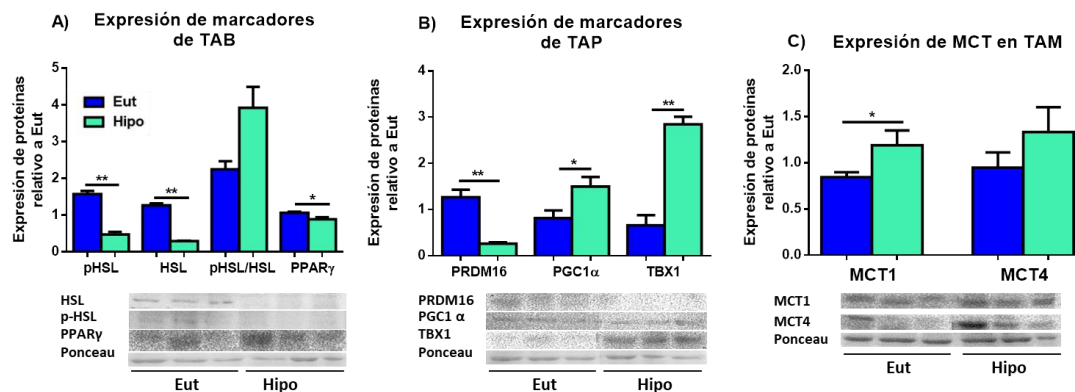


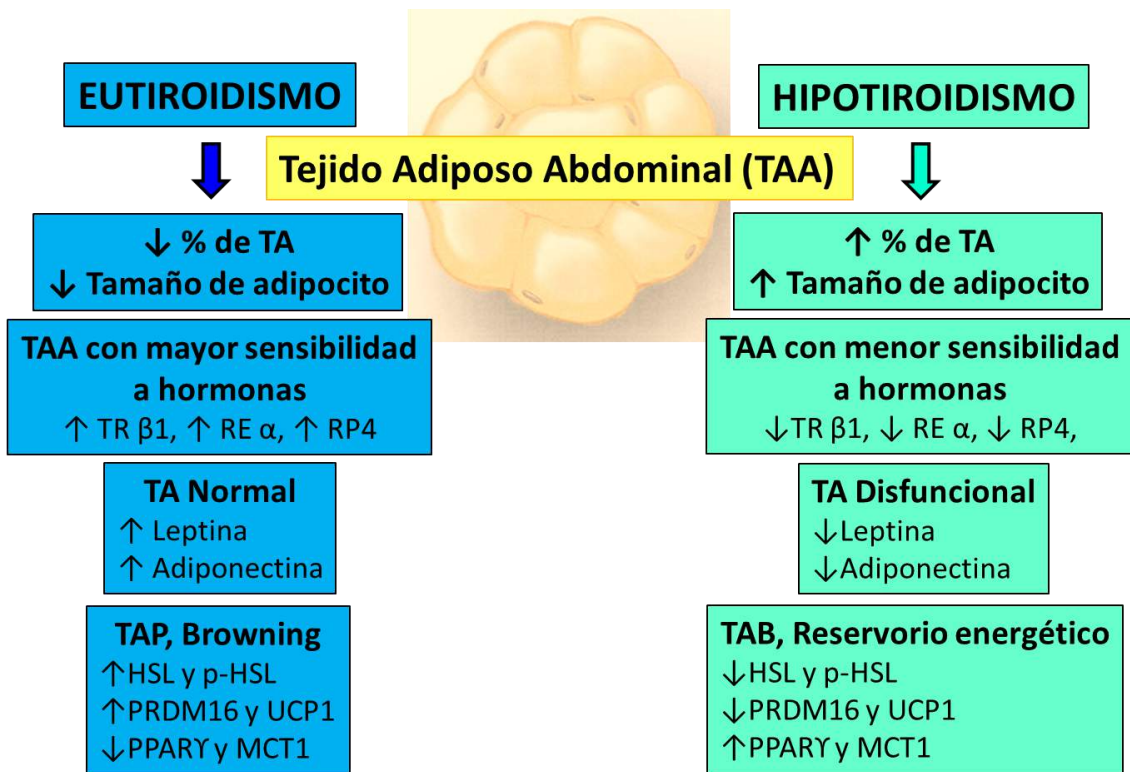
Figura 6.10. Marcadores de TAB y TAP. **A)** Marcadores de TAB, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. **B)** Marcadores de TAP, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. **C)** Indicadores de actividad metabólica en el TA, * $p < 0,05$.

Todos estos resultados en su conjunto sugieren una menor diferenciación de los adipocitos del TAM con una disminución de su catabolismo adiposo.

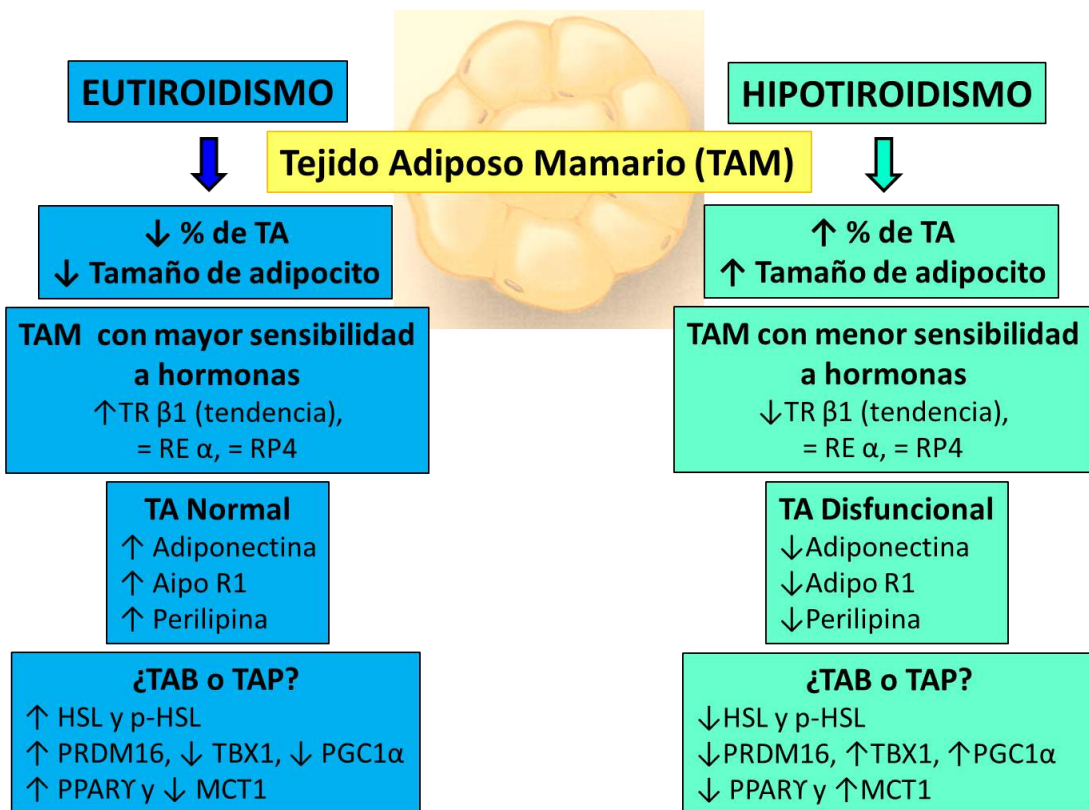
6.1.1.3.3. Esquema de síntesis: TAA y TAM en el hipotiroidismo

Como resultado de la caracterización del TA podemos concluir que el hipotiroidismo induce cambios significativos en el TA aumentando el porcentaje de grasa corporal y mamaria al igual que el tamaño de los adipocitos, sugiriendo la presencia de hiperplasia e hipertrofia. Así como también se vuelve menos sensible a la acción de diferentes hormonas, sobre todo para el caso del TAA.

Además, analizando los marcadores de TAB y TAP, consideramos que el TAA es un órgano de reserva energética, más que uno endócrino o secretor de adipocinas, con un catabolismo disminuido, lo que indicaría que estamos en presencia de un TAB principalmente (**Esquema 6.1**). En el caso del TAM los adipocitos están menos diferenciados y tienen un catabolismo adiposo disminuido (**Esquema 6.2**).



Esquema 6.1. Esquema de resultados: TAA durante el eutiroidismo y el hipotiroidismo.



Esquema 6.2. Esquema de resultados: TAM durante el eutiroidismo y el hipotiroidismo.

6.2. OBJETIVO ESPECÍFICO N°2. Estudio de los efectos del TAA y del TAM sobre las líneas celulares mamarias

6.2.1. Epidemiología tumoral

Para llevar a cabo el OE se utilizó el mismo protocolo de experimentación que en el OE N° 1, sólo que en este caso los animales, a los 55 días de edad, fueron tratados por única vez y por vía oral con el carcinógeno químico DMBA. A partir de los 30 días de tratamiento se comenzó a evaluar la latencia, incidencia y progresión de los tumores. Cuando estos alcanzaron 1000 mm³ de volumen aproximadamente, o al final del experimento (día 250) los animales fueron eutanasiados para extraer dichos tumores y para generar MCs a partir de los TA; los últimos se utilizaron en los ensayos *in vitro* con líneas celulares.

Observamos que los animales hipotiroideos disminuyeron la incidencia y aumentaron la latencia de tumores (**Figura 6.10 A y B**; $p < 0,001$), es decir, que generaron menos tumores y su aparición fue más tardía comparados con los animales eutiroideos. En consecuencia, los animales hipotiroideos vivieron más tiempo sin desarrollar tumores mamarios tal como se observa en la curva de sobrevida libre de enfermedad (**Figura 6.10 C**; $p < 0,001$).

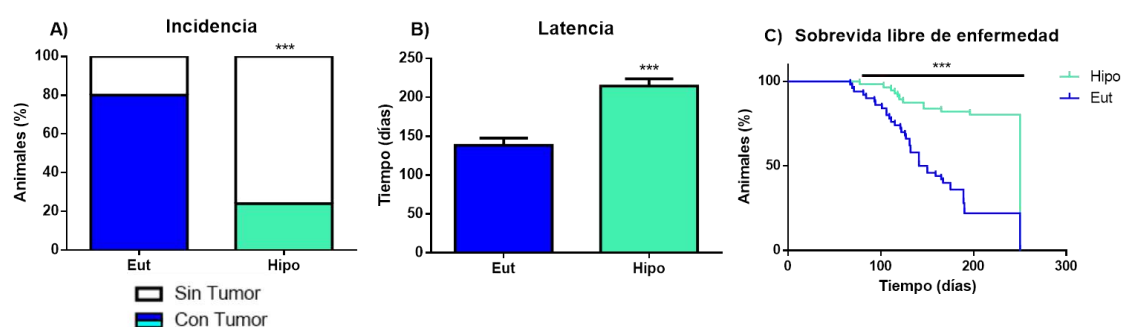


Figura 6.10. Epidemiología tumoral I. **A)** Incidencia de tumores. *** $p < 0,001$. **B)** Latencia de tumores. *** $p < 0,001$. **C)** Curva de sobrevida libre de enfermedad. *** $p < 0,001$.

Posteriormente, se analizó la histología de los tumores de ambos grupos experimentales. La **Tabla 6.1** muestra el tipo de Tu, el grado tumoral y otras características. Por un lado, los tumores de ratas Eut fueron de bajo grado considerando las características de los núcleos, la presencia de conductos y el número de figuras mitóticas. Presentaron un componente predominantemente *in situ* con poco componente invasivo. La necrosis era escasa y tenían moderada infiltración inflamatoria. El 23% de los animales Eut desarrollaron tumores secundarios. Por otro lado, los tumores malignos de ratas hipotiroideas fueron histológicamente más agresivos con un componente predominantemente invasivo con escaso componente *in situ*. La necrosis fue moderada y la respuesta inflamatoria fue menor que en los tumores de las ratas Eut.

Tabla 6.1. Anatomopatología general de los tumores

		HIPO	EUT
Tumores	Ratas con tumor	11%	70%
	Peso del tumor (g)	1.26 ± 0.57	1.22 ± 0.17

Tipo de tumor	Carcinoma ductal	11%	59%
	Carcinoma lobulillar infiltrante	0%	12%
Grado tumoral	I	4%	59%
	II	8%	0%
	III	0%	0%
Otras características	Componente predominante	Invasivo	<i>In situ</i>
	Respuesta inflamatoria	Escasa	Moderada
	Necrosis	Moderada	Escasa
Ratas con tumores secundarios	Carcinomas ductales (grado I)	4%	23%

La **Figura 6.11** muestra la velocidad de crecimiento tumoral y la relación entre figuras mitóticas y cuerpos apoptóticos existentes. No observamos diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los tumores (**Figura 6.11 A**) entre ambos grupos experimentales. Sin embargo, al calcular la relación mitosis/apoptosis se halló que en los tumores hipotiroideos predomina la apoptosis o muerte celular sobre la mitosis o proliferación celular (**Figura 6.11 B**; $p < 0,05$).

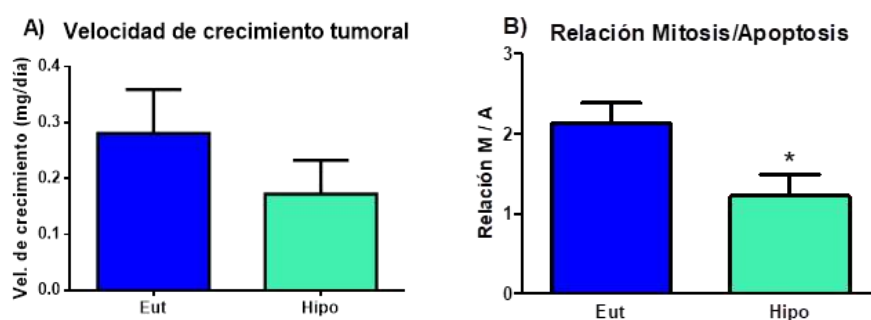


Figura 6.11. Epidemiología tumoral II. **A)** Velocidad de crecimiento tumoral. **B)** Relación Mitosis/Apoptosis. * $p < 0,05$.

Para corroborar los resultados obtenidos en la **Figura 6.11 B**, se midieron marcadores de proliferación y de apoptosis por IHQ y por SDS-PAGE seguido de inmunoblotting. En cuanto a la expresión de PCNA, indicador de proliferación celular, no se observaron diferencias significativas en los cortes de tumores evaluados por IHQ (**Figura 6.12 A**). No obstante la expresión de Caspasa 3, un importante marcador de apoptosis celular, fue significativamente mayor en los tumores de animales hipotiroideos medida tanto por IHQ ($p < 0,001$) como por SDS-PAGE seguido de inmunoblotting ($p < 0,05$) (**Figura 6.12 B y J**).

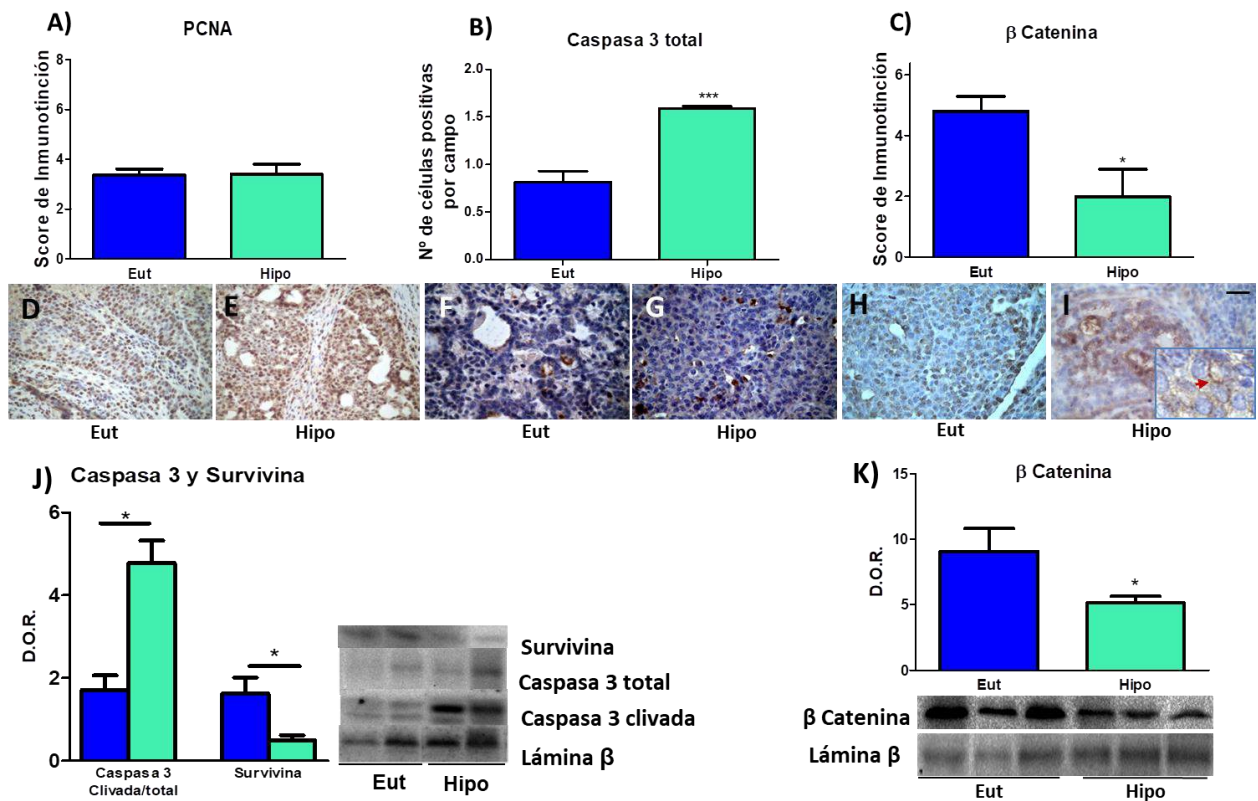


Figura 6.12. Epidemiología tumoral III. A) Puntuación de inmunotinción de PCNA. **B)** Nº de células positivas por campo de Caspasa 3 total. *** $p < 0,001$. **C)** Puntuación de inmunotinción de β catenina. * $p < 0,05$. **D-I)** Imágenes representativas 40x de los diferentes marcadores de apoptosis y proliferación de animales Hipo y Eut. Regla 100 μm . **J)** Densidad óptica relativa de Caspasa 3 total y Survivina. * $p < 0,05$. **K)** Densidad óptica relativa de β catenina. * $p < 0,05$.

Este último resultado fue acompañado de una disminución de la expresión de Survivina (**Figura 6.12 J**; $p < 0,05$), una proteína antiapoptótica. Dicho descenso podría estar relacionado con bajos niveles de expresión de β catenina (la cual actúa como factor de transcripción de la proteína Survivina, ver **Figura 6.13**) en tumores de animales hipotiroideos (**Figura 6.12 C y K**; $p < 0,05$), así como con su localización en la membrana plasmática de dichas células tumorales (**Figura 6.12 I recuadro**). Este último hecho ha sido asociado a un mejor pronóstico del cáncer de mama y a la activación de la apoptosis [72].

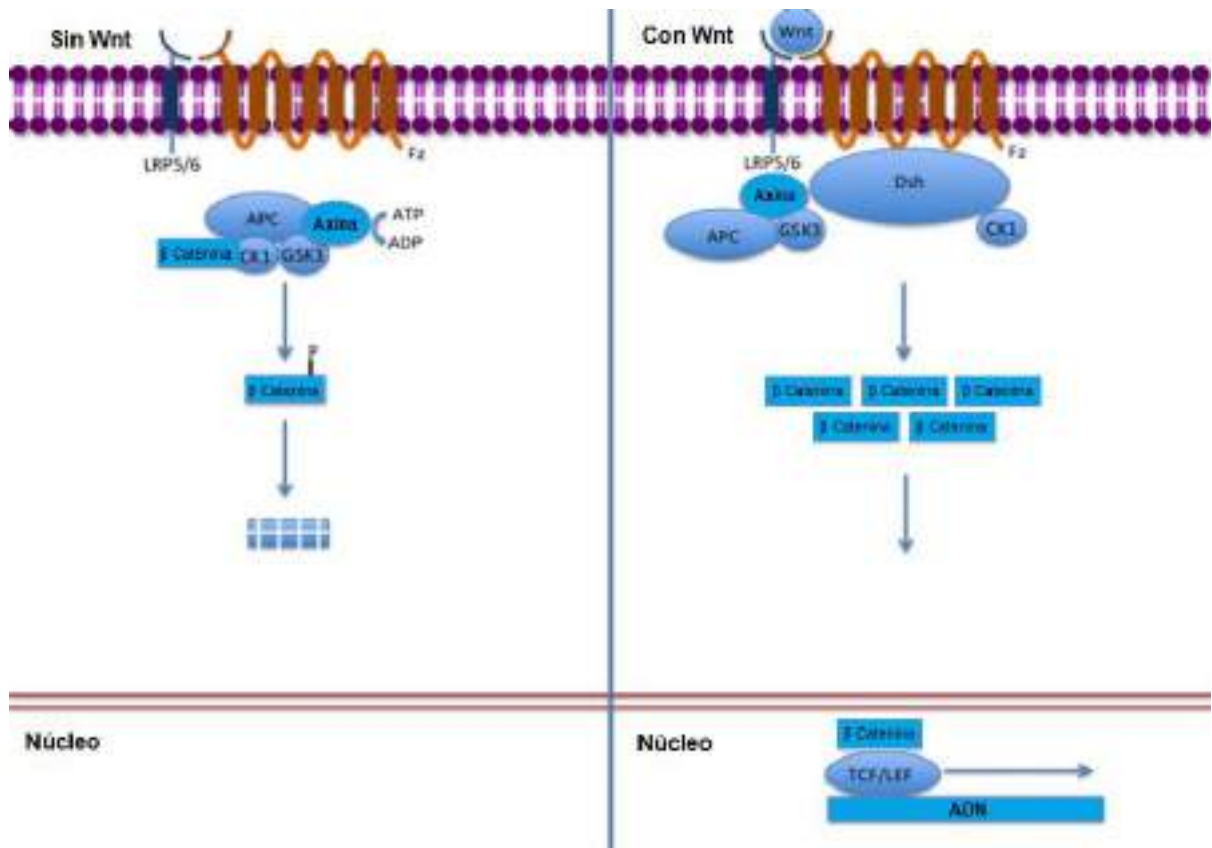


Figura 6.13. Vía canónica Wnt. Adaptada de https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Canonical_Wnt_pathway.jpg

En los tumores mamarios también se midieron receptores hormonales como TRβ1 y REα por la técnica de IHQ (**Figura 6.14**). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ambos receptores entre los grupos experimentales.

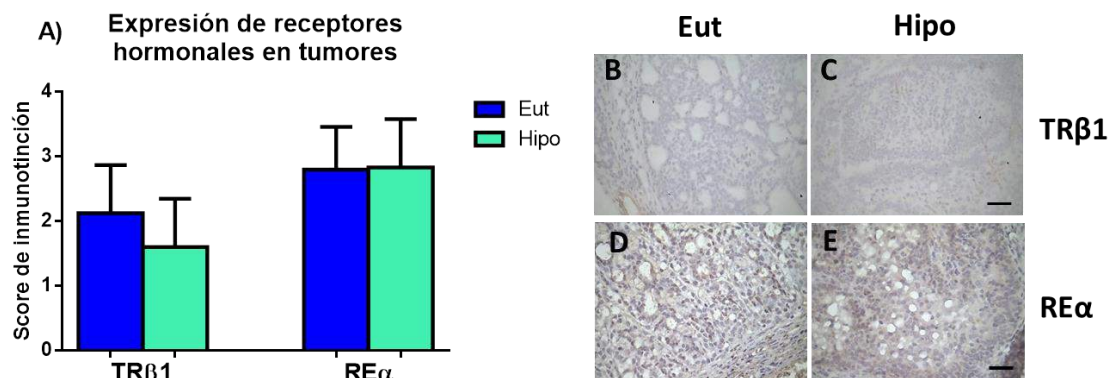
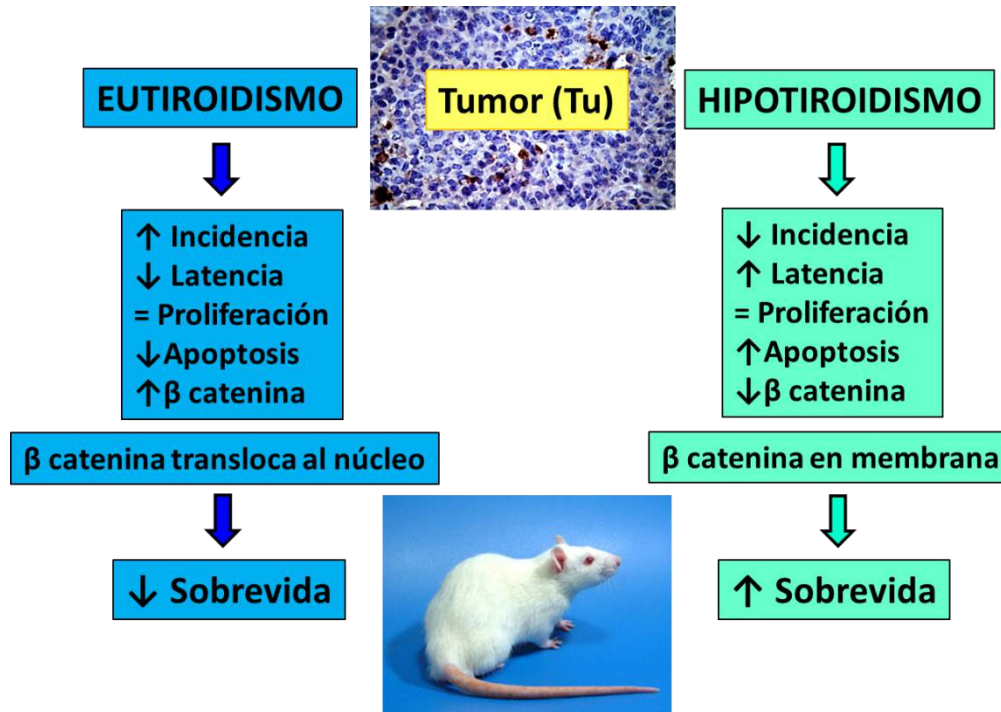


Figura 6.14. Receptores hormonales en tumores mamarios. **A)** Puntuación de inmunotinción de receptores hormonales. **B-E)** Imágenes representativas 40x de receptores hormonales en tumores de animales Eut e Hipo. Regla 100 μm.

Los resultados anteriores en su conjunto demuestran que el hipotiroidismo retrasó la carcinogénesis mamaria y, si bien los tumores mostraron características histológicas más agresivas, los marcadores de proliferación no se modificaron y el aumento de la apoptosis enlenteció el crecimiento tumoral y extendió la sobrevida de los animales Hipo. (**Esquema 6.3**).



Esquema 6.3. Sobrevida de animales Eutiroides vs. Hipotiroides.

6.2.2. Participación del TA en la carcinogénesis mamaria

Para estudiar la participación del TA en la carcinogénesis mamaria se obtuvieron MCs de TAA y TAM para incubar tres líneas celulares epiteliales mamarias diferentes (ver protocolo de obtención en la sección 5.2.1.2. Obtención de Medios Condicionados). Las líneas celulares utilizadas fueron las MCF-10A (línea celular epitelial mamaria humana, no tumorogénica y RE +), las MCF-7 (línea celular epitelial mamaria humana tumorogénica y RE +), y las MDA-MB-231 (línea celular epitelial mamaria humana tumorogénica, RE -, altamente agresiva, invasiva y poco diferenciada). Dichas líneas celulares y los MCs se emplearon para realizar los siguientes ensayos *in vitro* de:

Viabilidad por azul tripán. Las células fueron incubadas con los MCs por 24 h y, posteriormente, se contaron células por la técnica de azul tripán.

Proliferación por MTT. Las células se incubaron 24 h con los MCs y posteriormente se cuantificó por la técnica de MTT.

Adhesión por cristal violeta. Las células se incubaron con los MCs por 24 h previas al sembrado de las células en placas de 96 pocillos, y posteriormente se cuantificaron por la técnica de cristal violeta.

Migración por cierre de herida. Las células se incubaron con los MCs por 6 h previamente habiéndoles practicado una herida sobre la monocapa celular, luego se midieron dichas heridas mediante transectas.

Lisado celular. Se incubaron por 24 h los MCs sobre las células, posteriormente estas se levantaron con buffer RIPA y fueron analizadas por la técnica de SDS-PAGE seguida de inmunobloting como se detallará a continuación.

Estos ensayos biológicos se realizaron para evaluar la promoción de la carcinogénesis mamaria, ya que las líneas celulares utilizadas están iniciadas en la misma. Para más detalles de los ensayos biológicos anteriores ver Materiales y Métodos (Sección 5.2.1.3. Ensayos con líneas celulares).

En la descripción de los resultados, el efecto del hipotiroidismo fue medido a través de la comparación de los MCs de animales hipotiroideos sin Tu (MCs-Hipo-nTu) vs MCs de animales eutiroides sin Tu (MCs-Eut-nTu). El efecto de la presencia del Tu fue determinado al comparar los MCs de animales con y sin Tu en cada estado tiroideo (MCs-Hipo-Tu vs MCs-Eut-Tu).

6.2.2.1 Línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-10A)

6.2.2.1.1 Ensayos de viabilidad, proliferación, adhesión, migración y marcadores de apoptosis

6.2.2.1.1.1 Tejido adiposo abdominal

Para este TA, no observamos diferencias significativas en el ensayo de viabilidad en ninguno de los grupos experimentales, aún al diferenciar los MCs por la presencia o ausencia de Tu en los animales (**Figura 6.15 A**). Lo mismo sucedió cuando se midieron los efectos de los MCs TAA sobre la proliferación (**Figura 6.15 B**) y la migración (**Figura 6.15 D**) de la línea celular MCF-10A.

En el caso del ensayo de adhesión el hipotiroidismo por sí solo no causó efecto alguno, pero sí encontramos diferencias al comparar los MCs de animales con Tu. Al aparecer el Tu en el eutiroidismo disminuyó la adhesión celular (**Figura 6.15 C**; $p < 0,01$); y cuando surgió el Tu en el hipotiroidismo observamos mayor adhesión en las células comparado con los MCs-Eut-Tu (**Figura 6.15 C**; $p < 0,05$).

Al analizar los marcadores de apoptosis, la presencia de Tu causó modificaciones significativas. Los MCs-Eut-Tu aumentaron la expresión de Caspasa 3 Clivada, y los MCs-Hipo-Tu la

disminuyeron comparados con los MCs mencionados anteriormente (**Figura 6.15 E**; $p < 0,001$). El hipotiroidismo redujo la expresión de PARP Clivado (**Figura 6.15 F**; $p < 0,001$). Al aparecer el Tu la expresión de dicho marcador bajó en el eutiroidismo e incrementó en el hipotiroidismo (**Figura 6.15 F**; $p < 0,001$ en ambos casos.). Al comparar los MCs con Tu, los MCs-Hipo-Tu aumentaron marcadamente la expresión de PARP Clivado (**Figura 6.15 F**, $p < 0,001$).

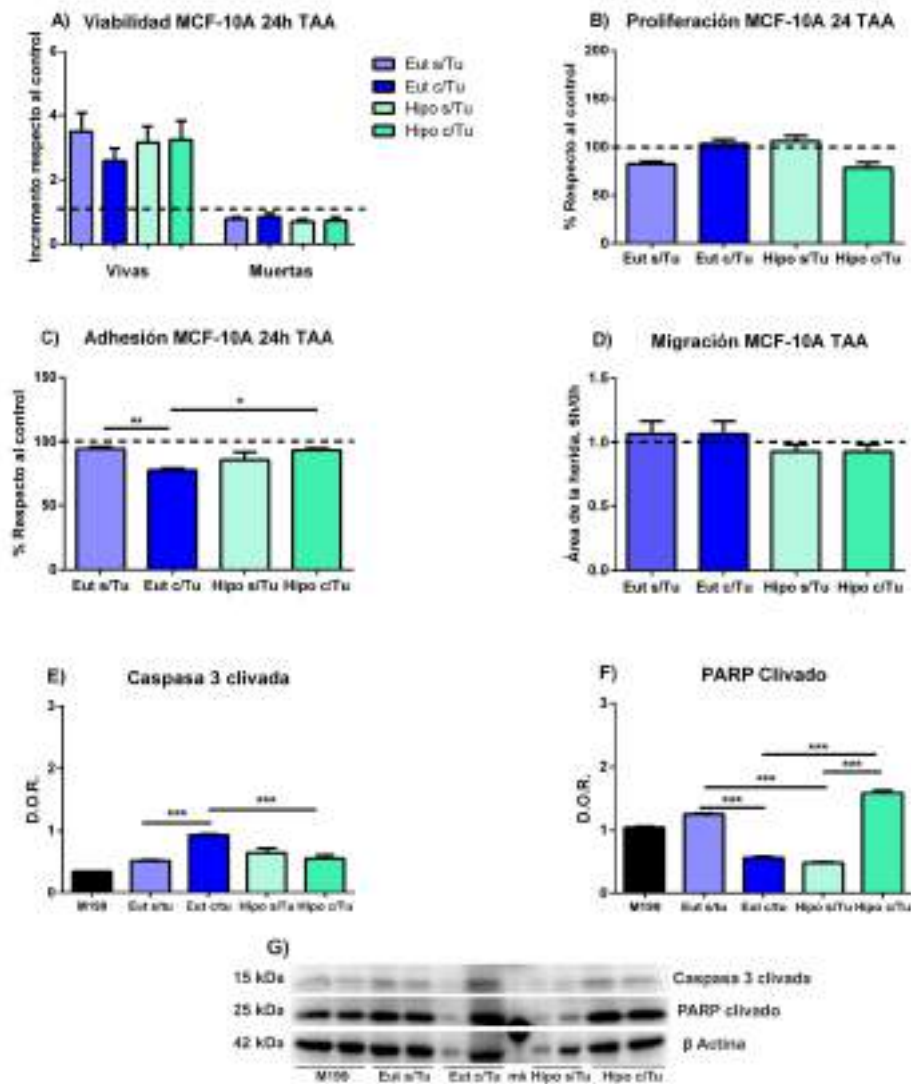


Figura 6.15. A) Viabilidad por Azul Tripán. **B)** Proliferación por MTT. **C)** Adhesión por Cristal violeta. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. **D)** Migración por Cierre de herida. **E)** Marcador apoptótico Caspasa 3 Clivada. *** $p < 0,001$. **F)** Marcador apoptótico PARP Clivado. *** $p < 0,001$. **G)** Panel de imágenes representativas de los inmunoblotting realizados para Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado junto a su control de carga (β Actina), mk: macador de peso molecular.

En resumen, para el TAA, vimos un efecto a nivel de la adhesión y la apoptosis celular, sin observar grandes cambios en los otros ensayos biológicos.

6.2.2.1.1.2 Tejido adiposo mamario

Al estudiar la acción de los MCs TAM sobre la línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos, MCF-10A, no se observaron cambios significativos en los ensayos de proliferación (**Figura 6.16 B**) y migración celular (**Figura 6.16 D**). Sin embargo, se advirtió que los MCs-Eut-Tu aumentaron la viabilidad celular (**Figura 6.16 A**; $p < 0,05$), y los MCs-Hipo-Tu disminuyeron en gran medida la mortalidad celular (**Figura 6.16**; $p < 0,01$). Esto se relacionó con los resultados del ensayo de adhesión (**Figura 6.16 C**) donde las células tratadas con MCs-Hipo-Tu ($p < 0,05$) se adhirieron más comparadas con los MCs-Hipo-nTu y, consecuentemente, murieron menos. Además, estos mismos MCs también incrementaron la adhesión celular comparado con los MCs-Eut-Tu ($p < 0,001$).

Se observó que los MCs-Hipo-Tu disminuyeron muy significativamente la expresión de Caspasa 3 Clivada (**Figura 6.16 E**; $p < 0,001$) y PARP Clivado (**Figura 6.16 F**; $p < 0,05$) comparados con los MCs-Hipo-nTu.

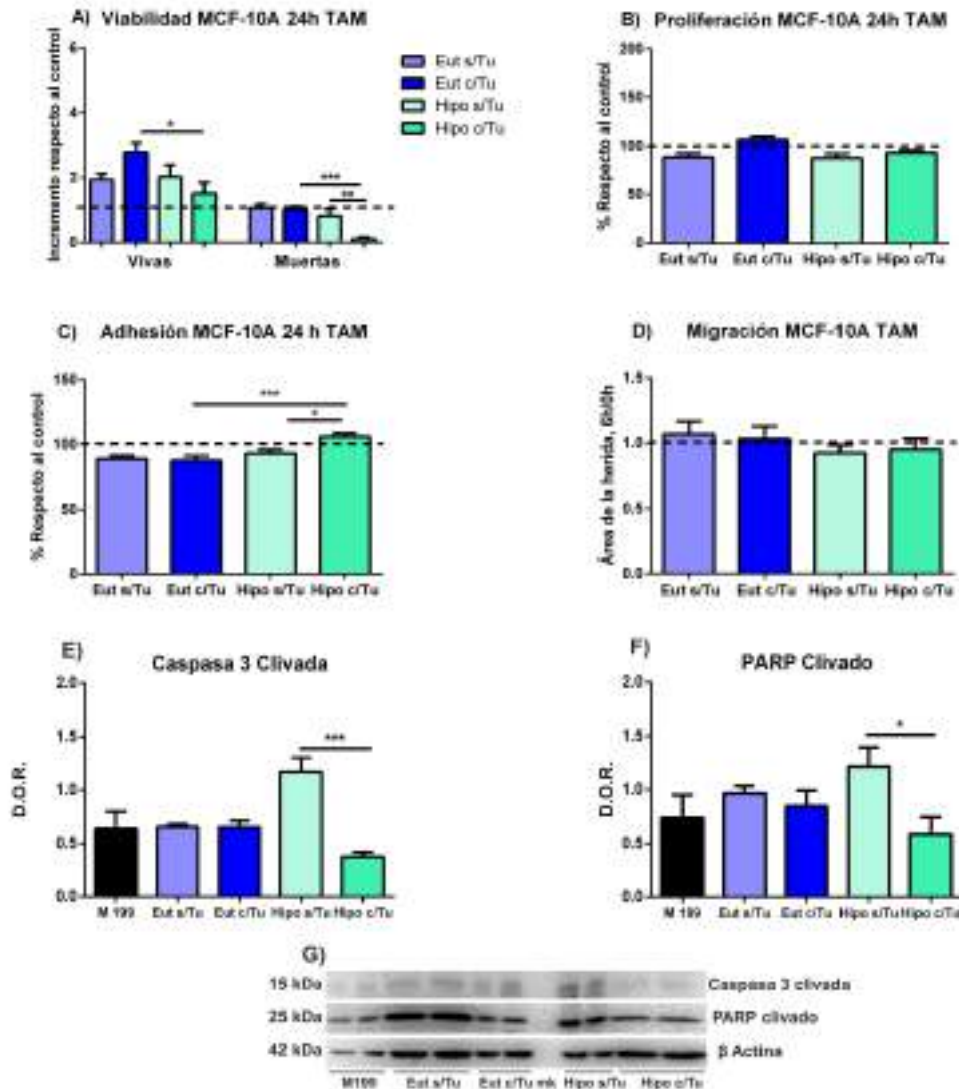


Figura 6.16. A) Viabilidad por Azul Tripán. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. **B)** Proliferación por MTT. **C)** Adhesión por Cristal violeta. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$. **D)** Migración por Cierre de herida. **E)** Marcador apoptótico Caspasa 3 Clivada. *** $p < 0,001$.

F) Marcador apoptótico PARP Clivado. * $p < 0,05$. **G)** Panel de imágenes representativas de los inmunobloting realizados para Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado junto a su control de carga (β Actina), **mk**: marcador de peso molecular.

Resumiendo, los MCs TAM tienen un efecto local sobre la viabilidad y adhesión celular de las MCF-10A. Los MCs TAM de ratas hipotiroideas con Tu aparentemente frenarían la apoptosis celular.

6.2.2.2. Línea celular tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-7)

6.2.2.2.1 Ensayos de viabilidad, proliferación, adhesión, migración y marcadores de apoptosis

6.2.2.2.1.1 Tejido adiposo abdominal

No observamos diferencias significativas en la viabilidad (**Figura 6.17 A**), la proliferación (**Figura 6.17 B**) y la migración (**Figura 6.17 D**) de la línea celular MCF-7 al tratarlos con los MCs de ninguno de los grupos experimentales. Tampoco hubo diferencias al compararlos por la presencia o ausencia de Tu en los animales.

Con respecto al ensayo de adhesión celular, si bien el hipotiroidismo no modificó la adhesión, la presencia del Tu sí lo hizo. Los MCs-Hipo-Tu aumentaron la adhesión de las células MCF-7 comparado con los MCs-Hipo-nTu (**Figura 6.17 C**; $p < 0,01$). Por su parte, cuando las células fueron incubadas con los MCs-Eut-Tu, la adhesión disminuyó significativamente comparado con los MCs-Eut-nTu ($p < 0,05$) y con los MCs-Hipo-Tu ($p < 0,001$).

Al analizar los lisados celulares por SDS-PAGE seguido de inmunobloting se encontró que las células MCF-7 tratadas con los MCs-Eut-Tu expresaron menos Caspasa 3 Clivada (**Figura 6.17 E**) que las tratadas con los MCs-Eut-nTu ($p < 0,001$); lo mismo sucedió con los MCs de animales hipotiroideos donde la expresión de Caspasa 3 Clivada también fue aminorada por los MCs-Hipo-Tu comparado con los MCs-Hipo-nTu ($p < 0,05$). En el caso de PARP Clivado (**Figura 6.17 F**) se observaron diversos efectos. Si bien con los MCs de animales eutiroideos se observó el mismo comportamiento que para Caspasa 3 Clivada, el estado de hipotiroidismo alteró la expresión de PARP Clivado. Por un lado, los MCs-Hipo-nTu disminuyeron drásticamente la expresión de PARP Clivado ($p < 0,001$) mientras que en presencia del Tu (MCs-Hipo-Tu), su expresión aumentó comparado con los MCs-Hipo-nTu ($p < 0,001$) y con los MCs-Eut-Tu ($p < 0,001$).

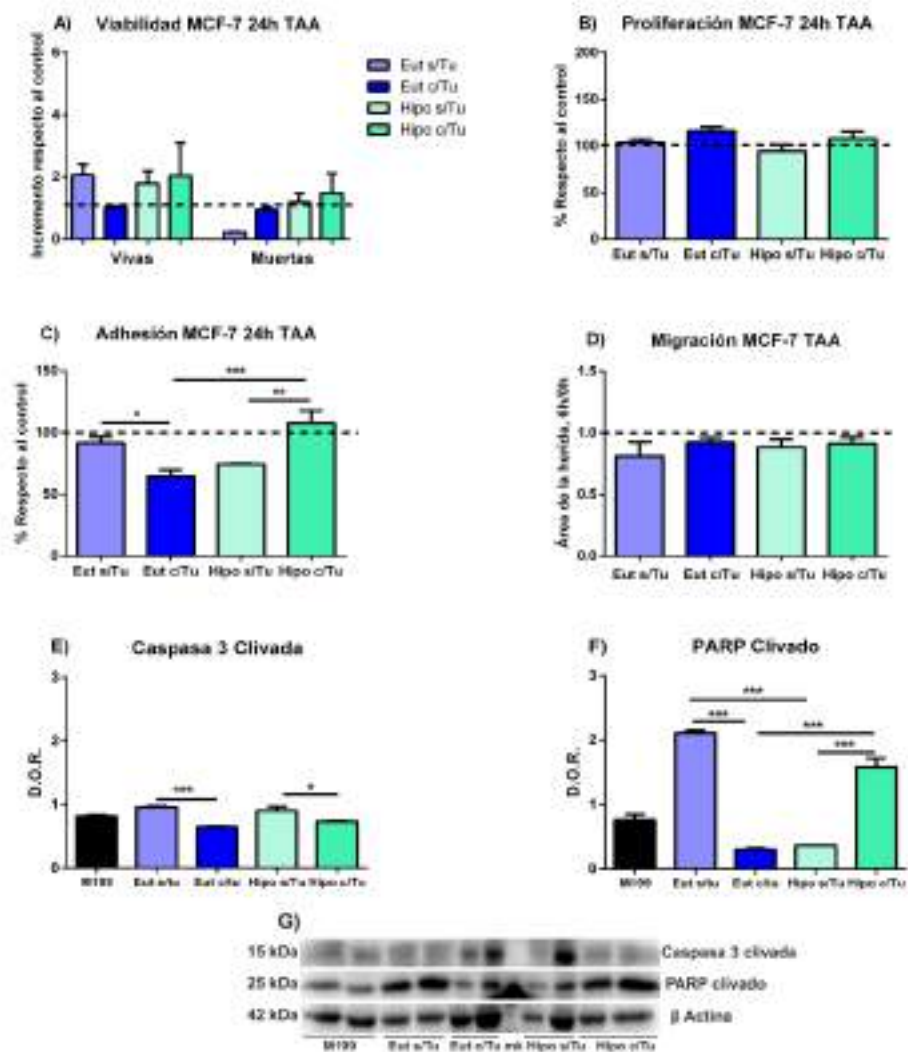


Figura 6.17. A) Viabilidad por Azul Tripán. **B)** Proliferación por MTT. **C)** Adhesión por Cristal violeta. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. **D)** Migración por Cierre de herida. **E)** Marcador apoptótico Caspasa 3 Clivada. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$. **F)** Marcador apoptótico PARP Clivado. *** $p < 0,001$. **G)** Panel de imágenes representativas de los inmunoblotting realizados para Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado junto a su control de carga (β Actina), **mk**: marcador de peso molecular.

En resumen, para el TAA, no observamos un efecto sistémico del hipotiroidismo. Sin embargo, la influencia de la presencia del Tu cambia según el estado tiroideo. En condiciones normales, los MCs-Eut-Tu disminuyeron la expresión de marcadores de apoptosis, el número de células vivas y la adhesión celular. En el hipotiroidismo, el MCs-Hipo-Tu favoreció la adhesión celular y, modificó erráticamente la expresión de Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado sin afectar la viabilidad celular.

6.2.2.2.1.2 Tejido adiposo mamario

Al estudiar la acción de los MCs TAM sobre la línea celular tumorigénica sensible a estrógenos MCF-7 se encontraron cambios significativos en los ensayos de viabilidad (**Figura 6.18 A**). Cuando las células fueron incubadas con los MCs-Eut-Tu aumentaron la mortalidad de las mismas comparado con los MCs-Eut-nTu ($p < 0,05$). Los MCs-Hipo-Tu incrementaron la proliferación celular (**Figura 6.18 B**) en relación a los MCs-Hipo-nTu ($p < 0,05$). En el caso del ensayo de adhesión (**Figura 6.18 C**), los MCs-Hipo-nTu disminuyeron la adhesión celular comparado con los MCs-Eut-nTu ($p < 0,001$), es decir, que el hipotiroidismo modificó esta propiedad. Sin embargo, en presencia del Tu, tanto los MCs-Eut-Tu ($p < 0,01$) como con los MCs-Hipo-Tu ($p < 0,001$) aumentaron la adhesión celular respecto a sus respectivos MCs no tumorales. Este último resultado podría estar relacionado con el efecto proliferativo observado con los MCs-Hipo-Tu (**Figura 6.18 B**). Finalmente, no se observaron cambios significativos en la migración celular (**Figura 6.18 D**).

La expresión de Caspasa 3 Clivada en la línea celular MCF-7 se mantuvo sin modificaciones después de 24 h de incubación con los MCs independientemente del estado tiroideo y de la presencia del Tu (**Figura 6.18 E**). Sin embargo, los MCs-Hipo-Tu acrecentaron la expresión de PARP Clivado comparado con los MCs-Hipo-nTu (**Figura 6.18 F**; $p < 0,05$). En base a los resultados del ensayo de proliferación y el análisis de los lisados celulares por SDS-PAGE seguido de inmunobloting para PARP Clivado se advirtió que la línea celular tumorigénica MCF-7 tratada con MCs-Hipo-Tu estuvo más activa metabólicamente ya que mostraría un incremento tanto en la proliferación como en la apoptosis.

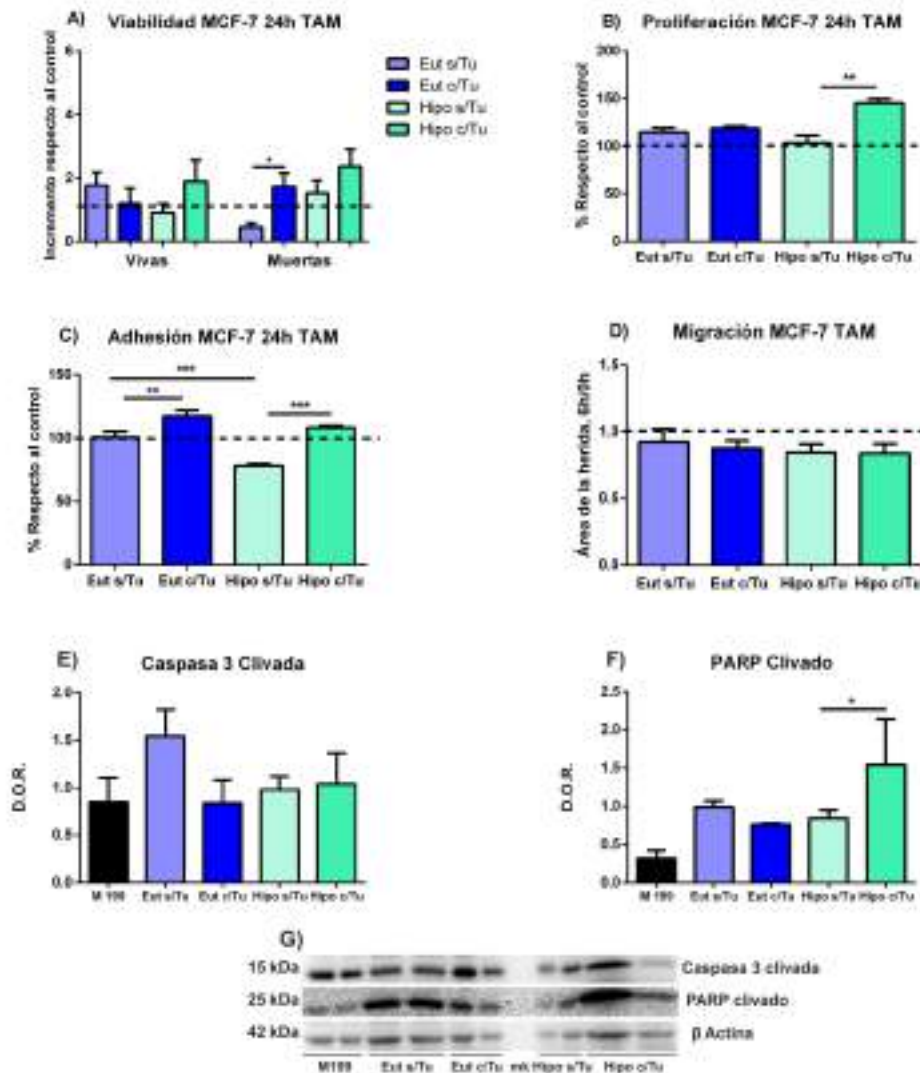


Figura 6.18. A) Viabilidad por Azul Tripán. * $p < 0,05$. B) Proliferación por MTT. ** $p < 0,01$ C) Adhesión por Cristal violeta. ** $p < 0,01$ y * $p < 0,001$. D) Migración por Cierre de herida. E) Marcador apoptótico Caspasa 3 Clivada. F) Marcador apoptótico PARP Clivado. * $p < 0,05$. G) Panel de imágenes representativas de los inmunobloting realizados para Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado junto a su control de carga (β Actina), mk: marcador de peso molecular.**

Resumiendo, los MCs TAM con Tu, independientemente del estado tiroideo, tienen un efecto local que favorece la adhesión celular. Particularmente, en el hipotiroidismo, los MCs-Hipo-Tu favorecerían tanto la proliferación celular como la apoptosis.

6.2.2.3. Línea celular tumorigénica no sensible a estrógenos (MDA-MB-231)

6.2.2.3.1 Ensayos de viabilidad, proliferación, adhesión, migración y marcadores de apoptosis

6.2.2.3.1.1. Tejido adiposo abdominal

Para este TA, no observamos diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales durante los ensayos de viabilidad (**Figura 6.19 A**). Lo mismo sucedió cuando se midieron los efectos de los MCs sobre la migración (**Figura 6.19 D**) de la misma línea celular.

Sí observamos cambios significativos en los ensayos de proliferación. Al incubar la línea celular MDA-MB-231 con los MCs-Hipo-nTu se incrementó su proliferación en comparación con los MCs-Eut-nTu (**Figura 6.19 B**; $p < 0,001$) sugiriendo un efecto estimulador del hipotiroidismo sobre la proliferación de las células MDA-MB-231. La presencia del Tu solo modificó la proliferación en el estado eutiroideo donde los MCs-Eut-Tu favorecieron la multiplicación celular con respecto a los MCs-Eut-nTu ($p < 0,001$). Por su parte, se detectaron otros efectos significativos sobre la adhesión celular donde los MCs-Hipo-nTu aumentaron la adhesión comparado con los MCs-Eut-nTu (**Figura 6.19 C**; $p < 0,001$) lo cual va en concordancia con los resultados de proliferación. Los MCs-Hipo-Tu también acrecentaron la adhesión de las MDA-MB-231 al ser comparado con los MCs-Eut-Tu ($p < 0,001$).

Al analizar los marcadores de apoptosis en los lisados celulares por SDS-PAGE seguido de inmunoblotting se encontró que la expresión de Caspasa 3 Clivada y de PARP Clivado disminuyeron en las células tratadas con los MCs-Hipo-nTu respecto a los MCs-Eut-nTu (**Figura 6.19 E y F**; $p < 0,001$). Una vez instaurados los tumores, este efecto sobre los marcadores apoptóticos se detectó con los MCs-Eut-Tu al compararlos con los MCs-Eut-nTu ($p < 0,001$) y los MCs-Hipo-Tu ($p < 0,001$). Estos efectos podrían en parte explicar los resultados correspondientes a los ensayos de adhesión con los MCs de animales sin Tu (**Figura 6.19 C**). Contrariamente, la presencia de Tu en el estado de hipotiroidismo, indujo mayor expresión de PARP Clivado en relación a los MCs-Hipo-nTu (**Figura 6.19 F**; $p < 0,001$).

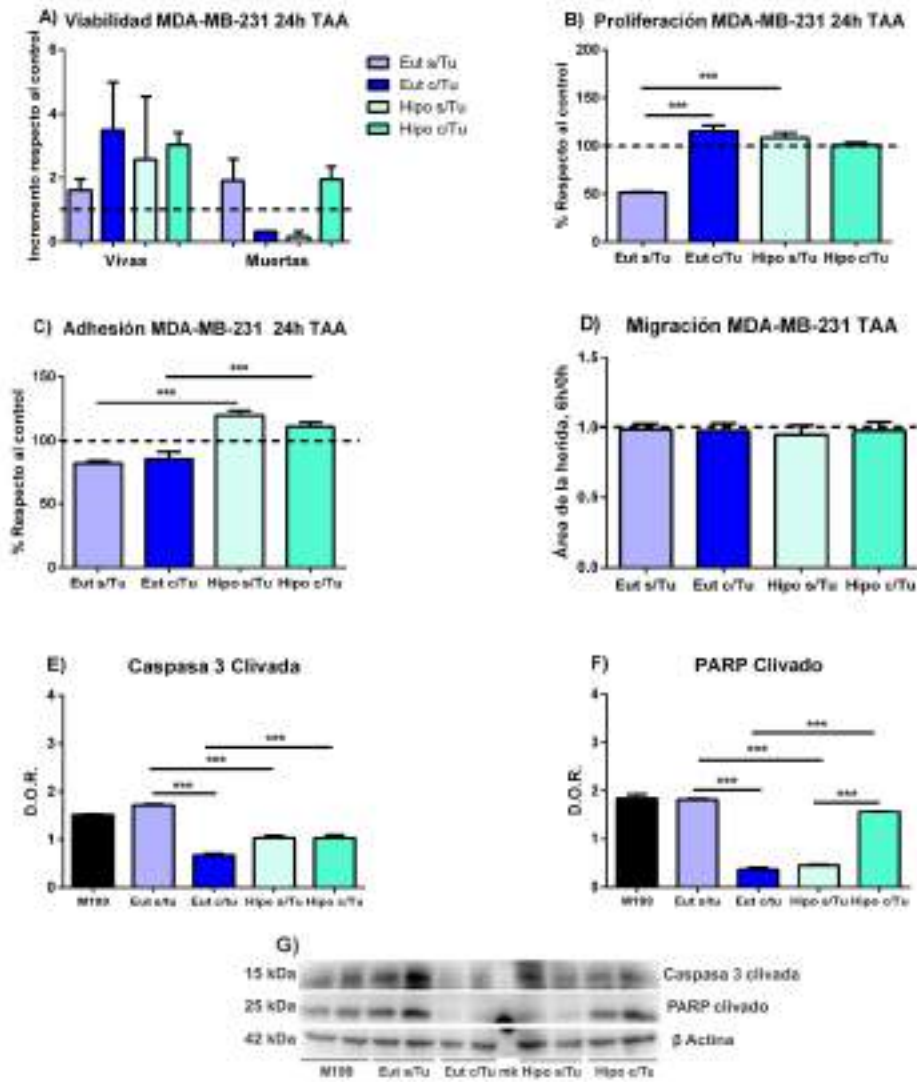


Figura 6.19. A) Viabilidad por Azul Tripán. **B)** Proliferación por MTT. $***p<0,001$. **C)** Adhesión por Cristal violeta. $*** p<0,001$. **D)** Migración por Cierre de herida. **E)** Marcador apoptótico Caspasa 3 Clivada. $*** p<0,001$. **F)** Marcador apoptótico PARP Clivado. $*** p<0,001$. **G)** Panel de imágenes representativas de los inmunoblotting realizados para Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado junto a su control de carga (β Actina), **mk**: marcador de peso molecular.

En resumen, para el TAA, el hipotiroidismo tendría un efecto estimulador sobre la proliferación y la adhesión celular y frenaría la apoptosis de las células MDA-MB-231. La adhesión celular aumentó con los MCs hipotiroideos independientemente de la presencia de Tu. Finalmente, los MCs-Eut-Tu favorecerían la proliferación celular y reducirían la apoptosis facilitando el desarrollo tumoral.

6.2.2.3.1.2. Tejido adiposo mamario

Al estudiar la acción de los MCs TAM sobre la línea celular tumorigénica no sensible a estrógenos MDA-MB-231 no se vieron cambios significativos para los ensayos de viabilidad (**Figura 6.20 A**) ni migración celular (**Figura 6.20 D**). No obstante, los MCs-Hipo-nTu aumentaron la proliferación celular con respecto a los MCs-Eut-nTu (**Figura 6.20 B**, $p < 0,01$) y la presencia del Tu intensificó dicho efecto aún más ($p < 0,001$). Por su lado, los MCs-Eut-Tu también incrementaron la proliferación celular al compararlo con los MCs-Eut-nTu ($p < 0,001$). Cuando se compararon los MCs con Tu, los MCs-Hipo-Tu promovieron una mayor proliferación celular que los MCs-Eut-Tu ($p < 0,05$).

Con respecto a los resultados de adhesión celular (**Figura 6.20 C**) observamos que los MCs-Hipo-nTu disminuyeron esta propiedad en las células MDA-MB-231 ($p < 0,001$). Contrariamente, en presencia del Tu los MCs-Hipo-Tu aumentaron la adhesión ($p < 0,01$). En este último caso los resultados se condicen con los de proliferación (**Figura 6.20 B**).

Analizando marcadores apoptóticos influidos por los MCs TAM no encontramos cambios significativos para Caspasa 3 Clivada (**Figura 6.20 E**) ni para PARP Clivado (**Figura 6.20 F**).

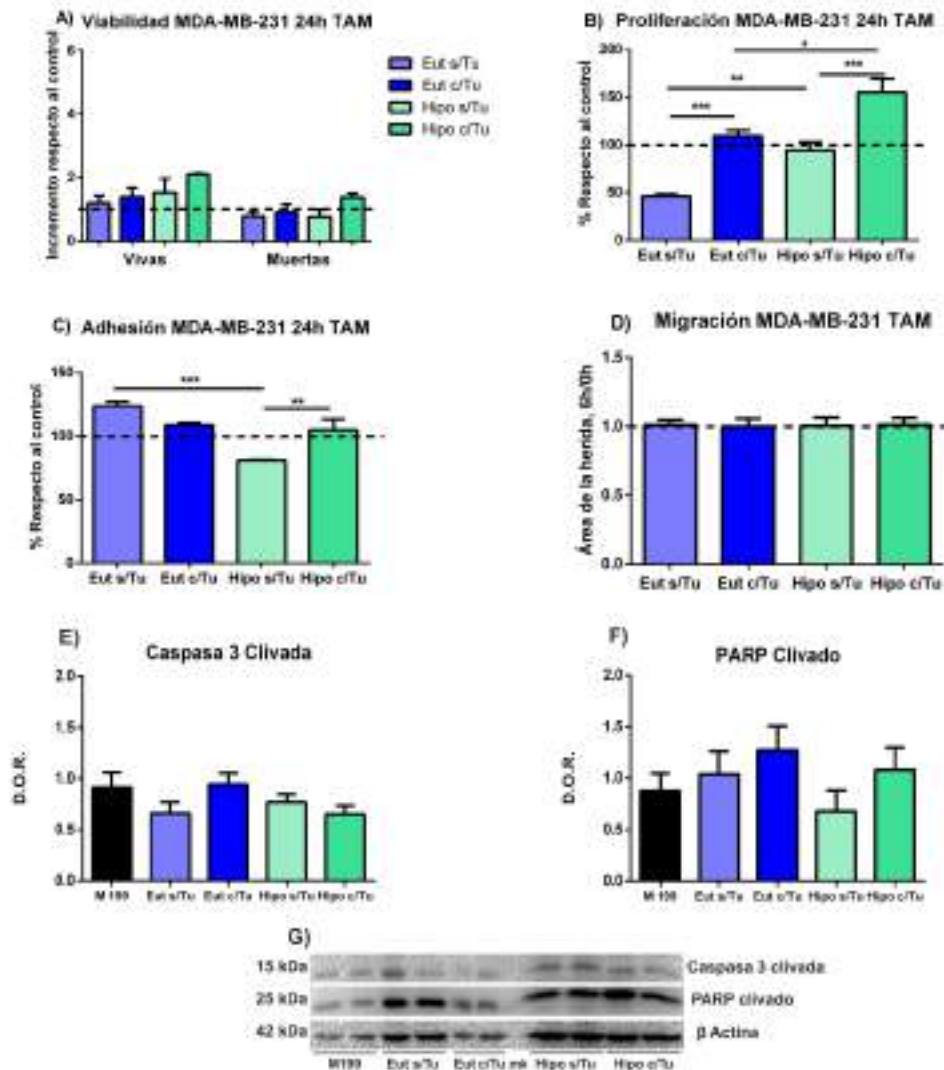


Figura 6.20. **A)** Viabilidad por Azul Tripán. **B)** Proliferación por MTT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. **C)** Adhesión por Cristal violeta. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. **D)** Migración por Cierre de herida. **E)** Marcador apoptótico Caspasa 3 Clivada. **F)** Marcador apoptótico PARP Clivado. **G)** Panel de imágenes representativas de los inmunobloting realizados para Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado junto a su control de carga (β Actina), **mk**: marcador de peso molecular.

Resumiendo, los MCs TAM en presencia de Tu, independientemente del estado tiroideo, tendrían un efecto estimulador sobre la proliferación celular sin cambios significativos en la viabilidad, apoptosis, ni migración celular.

6.2.3. Tablas de síntesis: Efecto de los MCs TAM y TAA hipotiroideos sobre las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231

A modo de resumen se presentan las siguientes tablas que describen los efectos de los MCs provenientes del TAM y TAA de animales hipotiroideos con presencia y ausencia de Tu mamario sobre las tres líneas celulares trabajadas. En los casilleros sin Tu se detallan los resultados de las comparaciones entre los MCs-Eut-nTu vs los MCs-Hipo-nTu y hacen referencia a los efectos del hipotiroidismo *per se*. En los casilleros con Tu se comparan los MCs-Hipo-nTu vs los MCs-Hipo-Tu en alusión a los efectos de la aparición del Tu durante el hipotiroidismo.

Tabla 6.2. Efectos de los MCs TAM provenientes de animales hipotiroideos con y sin Tu sobre líneas celulares.

Efecto biológico		MCF-10A (no tumorigénica)		MCF-7 (tumorigénica)		MDA-MB-231 (tumorigénica)	
		sin Tu	con Tu	sin Tu	con Tu	sin Tu	con Tu
VIABILIDAD	Vivas	=	=	=	=	=	=
	Muertas	=	↓	=	=	=	=
PROLIFERACIÓN		=	=	=	↑	↑	↑
APOPTOSIS	Caspasa 3 Clivada	=	↓	=	=	=	=
	PARP Clivado	=	↓	=	↑	=	=
ADHESIÓN		=	↑	↓	↑	↓	↑
MIGRACIÓN		=	=	=	=	=	=

La **Tabla 6.2** muestra que los MCs-Hipo-Tu provenientes del TAM favorecieron la adhesión y frenaron la apoptosis de la línea celular MCF-10A no tumorigénica y sensible a estrógenos *in vitro*. Esto no se podría correlacionar con el aumento de la apoptosis *in vivo* en los tumores de ratas hipotiroideas (**Figura 6.12 B y J**). También, los MCs-Hipo-Tu favorecieron la adhesión y proliferación *in vitro* de las líneas celulares tumorigénicas (**Figura 6.12 C y K**), lo que no se podría relacionar con la disminución de la expresión de β catenina *in vivo* en los tumores de animales hipotiroideos. Dichos MCs no generaron cambios significativos en la viabilidad y la adhesión celular.

Los MCs provenientes del TAM Hipo-nTu no ejercieron grandes cambios en las líneas celulares. No obstante, incrementaron la proliferación en las MDA-MB-231 y redujeron la adhesión en las líneas tumorogénicas. Los MCs TAM hipotiroideos produjeron efectos *in vitro* inversos dependientes de la sensibilidad hormonal de la línea celular y, en la mayoría de los casos, la presencia de Tu modificó el efecto de los MCs sobre las líneas celulares, es decir, el efecto producido por la aparición del Tu fue más notable que el provocado por el hipotiroidismo *per se*.

Tabla 6.3. Efectos de los MCs TAA provenientes de animales hipotiroideos con y sin Tu sobre líneas celulares.

Efecto biológico		MCF-10A (no tumorogénica)		MCF-7 (tumorogénica)		MDA-MB-231 (tumorogénica)	
		sin Tu	con Tu	sin Tu	con Tu	sin Tu	con Tu
VIABILIDAD	Vivas	=	=	=	=	=	=
	Muertas	=	=	=	=	=	=
PROLIFERACIÓN		=	=	=	=	↑	=
APOPTOSIS	Caspasa 3 Clivada	=	=	=	↓	↓	=
	PARP Clivado	↓	↑	↓	↑	↓	↑
ADHESIÓN		=	=	=	↑	↑	=
MIGRACIÓN		=	=	=	=	=	=

La **Tabla 6.3** muestra que los MCs TAA principalmente ejercieron cambios en las respuestas biológicas de las líneas celulares tumorogénicas MCF-7 y MDA-MB-231. Por su parte, la presencia del Tu, modificó el efecto producido por el hipotiroidismo por sí solo sobre la apoptosis en las tres líneas celulares. Los MCs-Hipo-nTu frenarían la apoptosis mientras que MCs-Hipo-Tu la favorecerían.

Los MCs TAA no modificaron la viabilidad y la migración celular.

6.3. OBJETIVO ESPECÍFICO N°3. Identificación y cuantificación de los factores solubles asociados al TAA y al TAM

6.3.1. Proteínas de los MCs

La identificación de los factores solubles secretados por el TA mamario mediante su estudio proteómico a través de espectrometría de masas se desarrolló en el OE N° 3. Se intentó dilucidar si los MCs contenían promotores y/o supresores de la carcinogénesis mamaria.

6.3.1.1. Composición de los MCs

La concentración de proteínas (**Figura 6.21 A**) y hormonas (**Figura 6.21 B y C**) de los diferentes MCs fueron determinadas como se detalla en el apartado 5.2.1.2. Los MCs generados a partir del TAM de animales eutiroideos tuvieron mayor concentración proteica que los del TAM de animales hipotiroideos (**Figura 6.21 A**; $p < 0,0001$). Por su parte, los MCs-TAM, independientemente del estado tiroideo, tuvieron una mayor concentración de estradiol que los MCs-TAA (**Figura 6.21 B**; $p < 0,05$). Al clasificar los MCs según la presencia del Tu, observamos que la concentración de T4 fue menor en los MCs-Eut/Hipo-TAM de animales con Tu comparado con los MCs-Eut/Hipo-TAM sin Tu (**Figura 6.21 C**; $p < 0,05$).

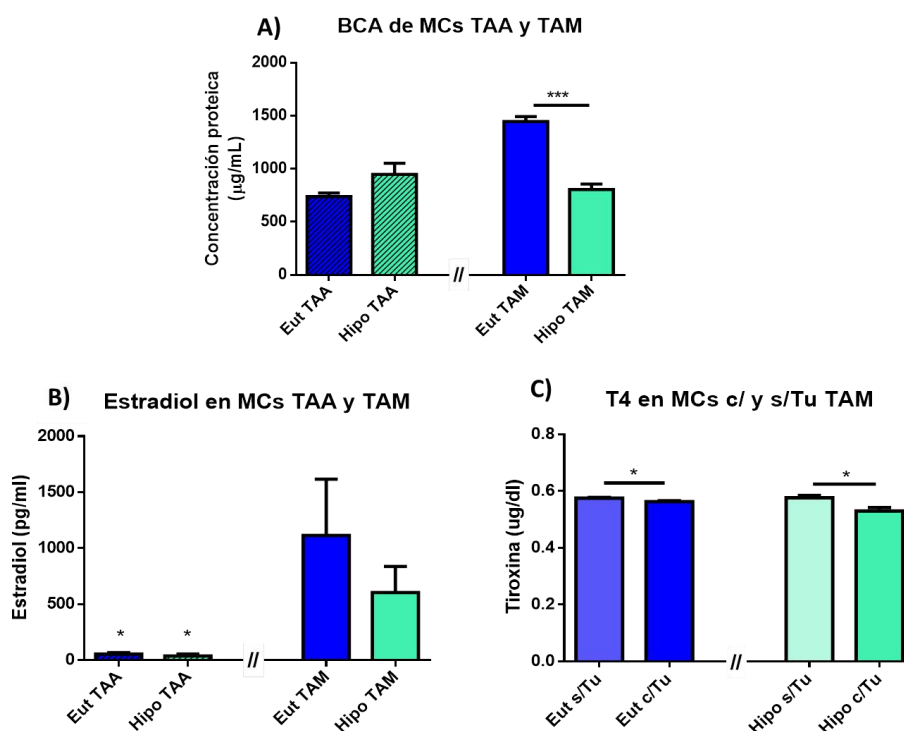


Figura 6.21. Concentración de proteínas y hormonas de los MCs. **A)** Concentración de proteínas totales de los MCs-Eut/Hipo-TAA/TAM. *** $p < 0,001$. **B)** Concentración de Estradiol en MCs-Eut/Hipo-TAA/TAM. * $p < 0,05$. **C)** Concentración de Tiroxina (T4) en MCs-Eut/Hipo-TAM con y sin Tu. * $p < 0,05$.

El análisis proteómico se realizó mediante espectrometría de masa en la Unidad de Proteómica del SD-BRIN, Escuela de Medicina de Sanford, de la Universidad de Dakota del Sur, Vermillion, Dakota del Sur, EEUU. Para ello, se realizó la separación electroforética de dos geles de poliacrilamida al 10% con igual volumen de los MCs-Eut/Hipo-TAA/TAM, posteriormente se tiñeron y cortaron las bandas. A su vez, un volumen correspondiente a 30 μg de proteínas de cada MC fue liofilizado por 48 h a -1 atmósfera y -50°C . Tanto las bandas como los MCs liofilizados fueron enviados a EEUU para el análisis proteómico. Los resultados obtenidos fueron analizados con herramientas bioinformáticas que nos permitieron conocer la distribución de las proteínas que conforman nuestros MCs (**Figura 6.22**) y su localización celular (**Figura 6.23**), entre otras cosas.

Los MCs-Hipo-TAA/TAM presentaron una distribución más amplia de los pesos moleculares que los MCs-Eut-TAA/TAM, pero a su vez una menor variedad de proteínas (**Figura 6.22**).

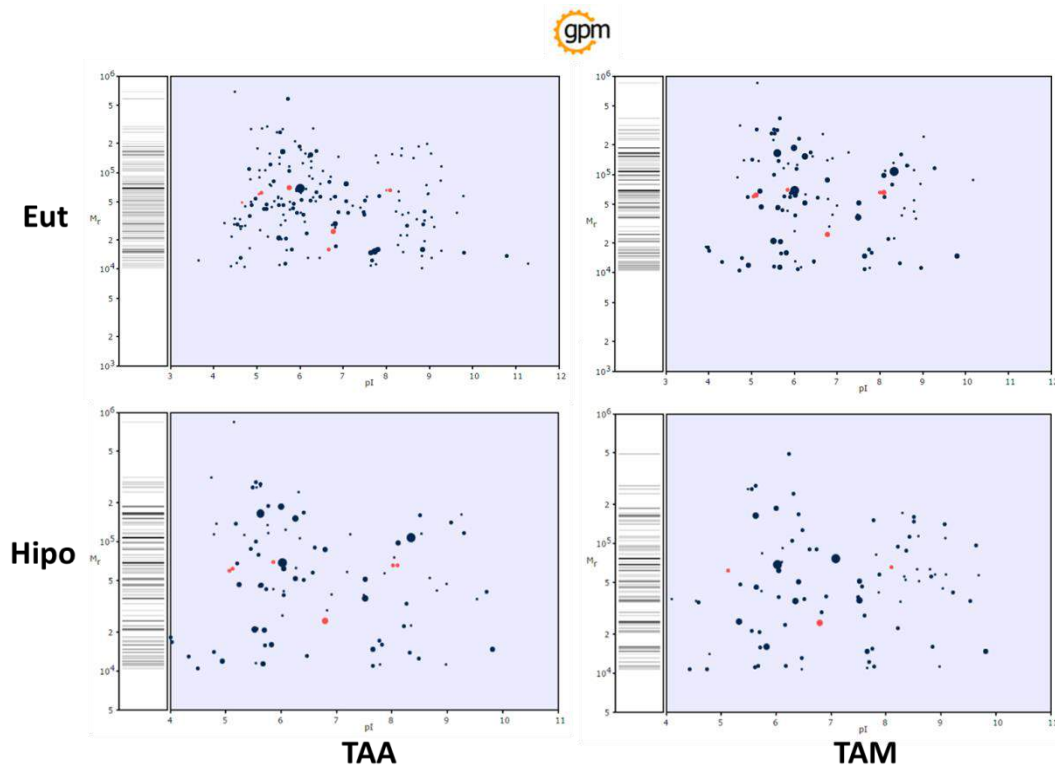


Figura 6.22. Simulación informática de la distribución de las proteínas de los MCs en 2D. En el eje 'y' se grafica el peso molecular de la proteína y en el 'x' su punto isoeléctrico de acuerdo al pH. El diámetro de cada círculo simboliza la cantidad relativa de cada proteína. Los círculos rojos son posibles proteínas contaminantes de las muestra. Se utilizó la herramienta Global Proteome Machine (The GPM) para confeccionar la imagen.

En cuanto a la localización celular de las proteínas de los MCs-Eut/Hipo-TAM observamos que tanto para los MCs provenientes de animales eutiroideos como hipotiroideos, las proteínas eran mayormente citoplasmáticas o extracelulares (**Figura 6.23**).

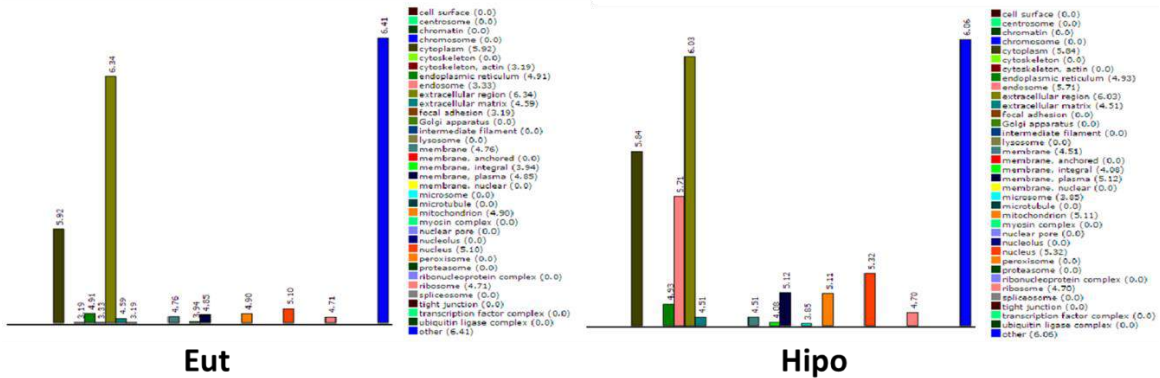


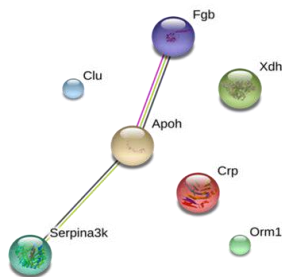
Figura 6.23. Localización celular de las proteínas de los MCs-Eut/Hipo-TAM. La figura se confeccionó utilizando una herramienta que es una combinación del Global Proteome Machine y KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

6.3.1.2. Proteínas exclusivas de los MCs TAM de animales hipo- y eutiroides

La **Figura 6.24** muestra las proteínas presentes exclusivamente en los MCs-Eut-TAM y en los MCs-Hipo-TAM. Además, en color rojo se resaltan las proteínas que podrían explicar los efectos biológicos que observamos sobre las líneas celulares de CaM, siendo la clusterina en los MCs-Eut-TAM y la adiponectina en los MCs-Hipo-TAM.

Proteínas presentes sólo en los MCs-Eut-TAM:

- Inhibidor de serinproteasa A3K (Proteína reguladora de la hormona tiroidea)
- Proteína reactiva C
- Glicoproteína ácida α 1
- **Clusterina**
- Glicoproteína-1 β 2
- Xantina deshidrogenasa/oxidasa
- Cadena β del fibrinógeno



Proteínas presentes sólo en los MCs-Hipo-TAM:

- Complemento C4
- Plasminógeno
- **Proteína AdipoQ (Adiponectina)**
- Inhibidor de la serinproteasa A3M
- Cadena α del fibrinógeno
- Lectina de unión a manano serinproteasa 2
- Miembro 10 de la superfamilia de las Inmunoglobulinas

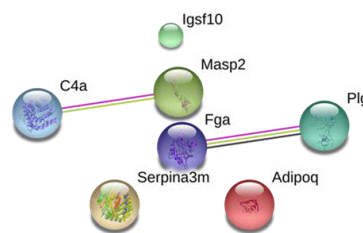


Figura 6.24. Listado de proteínas exclusivas de los MCs-Eut/Hipo-TAM. Debajo de cada listado se grafican los esquemas correspondientes a cada grupo proteico. Las líneas que unen a las proteínas indican que existe cierta relación entre ellas basada en bibliografía revisada. En rojo se resaltan las proteínas que podrían explicar la respuesta biológica vista en las líneas celulares.

Referencias: Clu (Clusterina), Fgb (Cadena β del fibrinógeno), Xdh (Xantina deshidrogenasa/oxidasa), Apoh ($\beta 2$ Glicoproteína 1), Crp (Proteína reactiva C), Serpina3K (Inhibidor de serinproteasa A3K), Orm1 (Glicoproteína ácida $\alpha 1$), Igsf10 (Miembro 10 de la superfamilia de las inmunoglobulinas), C4a (Complemento C4), Masp2 (Lectina de unión a manano serinproteasa 2), Fga (Cadena α del fibrinógeno), Plg (Plasminógeno), Serpina3m (Inhibidor de serinproteasa A3M), Adipoq (Adiponectina, Proteína AdipoQ). Se utilizó la herramienta String-db (www.string-db.org) para el análisis.

La siguiente tabla muestra las proteínas presentes únicamente en los MCs-Eut-TAM (Tabla 6.4), en general, ejercen funciones en la coagulación sanguínea, la defensa inmune y la apoptosis celular.

Tabla 6.4. Proteínas exclusivas de los MCs-Eut-TAM.

Nombre de la proteína	Funciones principales	Localización/secreción	Bibliografía
Inhibidor de serinproteasa A3K (Proteína reguladora de la hormona tiroidea)	Se une e inhibe a las calicreínas (proteasas serinas). Inhibe a la tripsina pero no a la quimotripsina o elastasa. Posible supresor tumoral en CaM	Secretada al espacio extracelular	[191, 192]
Proteína reactiva C	Funciones de defensa contra patógenos. Inmunidad innata. Puede interactuar con el ADN y las histonas. Marcador de hipotiroidismo subclínico	Secretada al espacio extracelular	[193, 194]
Glicoproteína ácida $\alpha 1$ (Orosomucoide)	Proteína de transporte en sangre. Modula la fase aguda de la respuesta inmune. Bajas concentraciones estimulan el receptor de TSH y la acumulación de AMPc intracelular. Altas concentraciones de esta proteína inhiben la señalización de TSH. Posible marcador en CaM	Secretada al espacio extracelular	[195, 196]
Clusterina (Apolipoproteína J)	Chaperona que evita la agregación de proteínas (como las plasmáticas) y puede mantenerlas desplegadas para futuros plegamientos por otras chaperonas. Internaliza proteínas a la célula para su degradación. Regula la transcripción del NF-kappa- β . Las formas intracelulares pueden ubiquitinar. Cuando es secretada actúa como antiapoptótica, cuando está en el núcleo es proapoptótica. Cuando se une a la membrana mitocondrial es antiapoptótica ya que interfiere en la liberación de Citocromo C dependiente de Bax, regulando así la proliferación. Antiquimioterapéutico en el CaM	Secretada al espacio extracelular. Núcleo	[96-98, 100, 102, 190, 197]

Glicoproteína-1 β 2 (Apolipoproteína H)	Se une a sustancias cargadas negativamente como la heparina, fosfolípidos y el dextrán sulfato. Inhibiría la activación de la cascada de coagulación uniéndose a los fosfolípidos de la membrana plasmática de células dañadas. Biomarcador en CaM	Secretada al espacio extracelular	[198, 199]
Xantina dehidrogenasa/oxidasa	Degrada purinas. Cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina, y de la xantina a ácido úrico. Forma ROS. Procancerígena	Es secretada al espacio extracelular pero puede encontrarse en citoplasma y peroxisomas	[200, 201]
Cadena β del fibrinógeno	Junto al fibrinógeno α y γ forman una red de fibrina insoluble que permite la coagulación y la formación del nuevo epitelio. Se cree que participa en la respuesta inmune ante bacterias y mediada por células T. Biomarcador en el cáncer de vejiga. Puede tomarse como anti- y protumorigénico en el CaM	Secretada al espacio extracelular	[202, 203]

Las proteínas de los MCs-Hipo-TAM, en general, también realizan funciones en la coagulación sanguínea y la defensa inmune, al igual que las de los MCs-Eut-TAM; además de intervenir en el metabolismo de la glucosa y la carcinogénesis (**Tabla 6.5**).

Tabla 6.5. Proteínas exclusivas de los MCs-Hipo-TAM.

Nombre de la proteína	Funciones principales	Localización/secreción	Bibliografía
Complemento C4	Esencial para la vía del complemento (respuesta inmune ante patógenos). Se une covalentemente a las inmunoglobulinas y complementos inmunes. Suele tener efectos patogénicos en carcinomas mamarios	Secretada al espacio extracelular. Puede encontrarse en axones, dendritas y sinapsis neuronales	[204, 205]
Plasminógeno	Disuelve la red de fibrina de los coágulos. Factor proteolítico durante el desarrollo embrionario, remodelación tisular, invasión tumoral e inflamación. Debilita las paredes del folículo de Graaf. Activa diferentes factores de la vía del complemento. Escinde fibronectina y laminina	Secretada al espacio extracelular	[206, 207]
Proteína AdipoQ (Adiponectina)	Participa en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. Dependiendo de la bibliografía puede catalogarse como una proteína antitumoral/protumoral	Secretada al espacio extracelular	[92, 208-210]
Inhibidor de la serinproteasa A3M	Actividad inhibitoria de las endopeptidasas de tipo serina. Posible biomarcador en el cáncer de hígado	Secretada al espacio extracelular	[211, 212]

Cadena α del fibrinógeno	Junto al fibrinógeno β y γ forman una red de fibrina insoluble que permite la coagulación y la formación del nuevo epitelio. Participaría en la respuesta inmune ante bacterias y mediada por células T. Posible biomarcador en el CaM	Secretada al espacio extracelular	[202, 203]
Lectina de unión a manano serinproteasa 2	Proteasa plasmática que participa en la activación de la vía del complemento dependiente de manosa-lectina. Se activa por autoclivaje y puede clivar otros factores del complemento. Protumorigénica en cáncer de colon y cáncer del sistema reproductor	Secretada al espacio extracelular.	[213, 214]
Miembro 10 de la superfamilia de las Inmunoglobulinas	Proteína soluble y de la superficie celular que participa en los procesos de reconocimiento, unión o adhesión de células. Puede estar involucrada en la mantención del pool de células osteocondroprogenitoras. Posibles biomarcadores pronóstico en el CaM	Secretada al espacio extracelular	[215, 216]

Adicionalmente, se midió la expresión de adiponectina por la técnica de SDS-PAGE seguida de inmunobloting (**Figura 6.25**) en los MCs-Eut/Hipo-TAA/TAM. Se observó un aumento significativo en la expresión de adiponectina en los MCs-Hipo-TAA/TAM comparados con los MCs-Eut-TAA/TAM, confirmando el resultado de la proteómica.

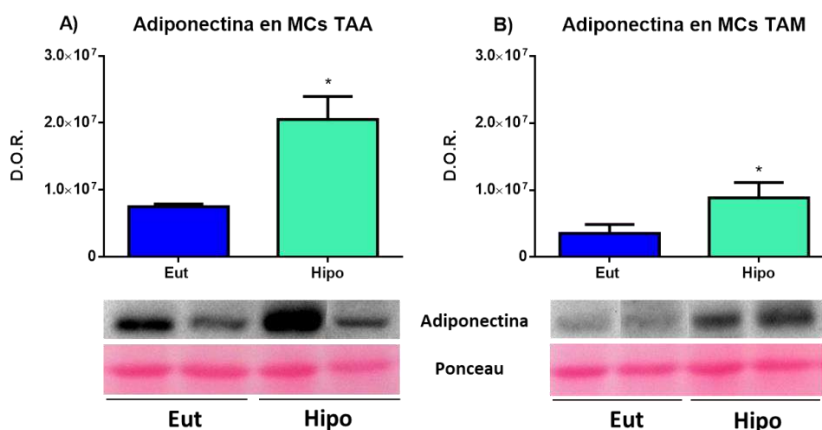


Figura 6.25. Adiponectina en los MCs-Eut/Hipo-TAA/TAM. **A)** Expresión de adiponectina en MCs-Eut/Hipo-TAA. * $p < 0,05$. **B)** Expresión de adiponectina en MCs-Eut/Hipo-TAM. * $p < 0,05$.

6.3.1.3. Proteínas expresadas diferencialmente en los MCs TAM de ratas hipo- y eutiroides

La **Tabla 6.6** muestra las proteínas expresadas diferencialmente en los MCs-Hipo-TAM respecto a los MCs-Eut-TAM. Los signos negativos de la expresión relativa significan que la proteína se halló expresada en menor medida, mientras que los números positivos significan que la proteína se encontró sobre expresada en estos MCs.

Tabla 6.6. Expresión relativa de las proteínas expresadas diferencialmente en los MCs-Hipo-TAM respecto a los Mcs-EUT-TAM.

Proteína	Expresión Relativa (log2)	Desviación estándar (log2)	p
Mucina-4	1,208	0	0,0024
Tripsina Aniónica 1	-1,624	0,56	0,0017
Complemento C3	-2,568	0,46	0
Antiproteinasa α 1	-1,779	0,41	0,0002
Inhibidor de la α 1	-2,318	0,38	0
Murinoglobulina 1	-2,346	0,62	0,0003
Murinoglobulina 2	-2,032	0,39	0,0001
Peroxiredoxina 4	-1,096	0	0,0002

Las proteínas de los MCs-Hipo-TAM expresadas diferencialmente, en general, también realizan funciones en la coagulación sanguínea y la defensa inmune, además de intervenir en la inhibición de proteasas y en la regulación de la proliferación y adhesión celular (**Tabla 6.7**).

Tabla 6.7. Proteínas expresadas diferencialmente en los MCs-Hipo-TAM respecto a los MCs-Eut-TAM.

Nombre de la proteína	Funciones principales	Localización/secreción	Bibliografía
Mucina-4	Protege y lubrica el epitelio, lo que facilita el transporte y atrapa las partículas extrañas. Juega un papel en la progresión tumoral, proliferativa, antiapoptótica, tiene propiedades antiadhesivas entre uniones célula-célula y célula-matriz extracelular. La cadena β se encuentra en la membrana plasmática como proteína multipaso y la cadena α es secretada al espacio extracelular	Cadena α secretada al espacio extracelular	[217, 218]
Tripsina Aniónica 1	Función catalítica, cliva en argininas y lisinas. Funciona con un cofactor: Ca^{+2}	Secretada al espacio extracelular	[219, 220]
Complemento C3	Importante factor del sistema del complemento. Puede unirse covalentemente a los carbohidratos de la superficie celular o a agregados inmunes. Mediador de la respuesta inmune. Estimularía la síntesis de triglicéridos por el adipocito. Posible biomarcador en CaM	Secretada al espacio extracelular	[198, 221]

Antiproteínasa α 1 (antitripsina)	Inhibidora de las proteínasas serinas. El blanco primario es la elastasa, tiene afinidad también por la plasmina y la trombina. Protumorigénica en CaM, pulmón y colon	Secretada al espacio extracelular	[222, 223]
Inhibidor de la Antiproteínasa α 1 o antitripsina (inhibidor 3 de la α 1)	Inhibidor de proteasas de amplio espectro. Posible biomarcador en el cáncer de hígado	Secretada al espacio extracelular	[211, 224]
Murinoglobulina-1 y -2	Inhibidoras de proteasas. Importantes en la regeneración hepática. Están presentes en el estrés oxidativo.	Secretadas al espacio extracelular.	[225, 226]
Peroxiredoxina-4	Probablemente involucrada en la regulación de las reacciones redox de la célula. Regula la activación del NF- κ - β en el citosol mediante la modulación de la fosforilación del I- κ - β . Protumorigénico en el CaM	Se puede encontrar en el citoplasma o ser secretada al medio extracelular.	[227, 228]

Finalmente, con el fin de explicar los posibles efectos biológicos de los MCs en las diferentes líneas celulares (véase resultados OE 2) seleccionamos algunas proteínas presentes exclusivamente de los MCs TAM. En los MCs-Eut-TAM seleccionamos a la proteína clusterina ya que podría explicar los efectos apoptóticos generados en las líneas celulares de mama; mientras que elegimos a la adiponectina en los MCs-Hipo-TAM por su papel protector ante la carcinogénesis mamaria, a pesar de que existen resultados controversiales en cuanto a esta postura.

6.4. OBJETIVO ESPECÍFICO N° 4. Identificación de la actividad biológica de los factores solubles secretados por el TAA y el TAM sobre las líneas celulares mamarias

6.4.1. Efectos de los péptidos sobre las líneas celulares.

Una vez identificados los factores solubles de los MCs-Eut/Hipo-TAM, adiponectina (Adipo) y clusterina (Clust) fueron seleccionados como los péptidos que posiblemente podrían explicar los comportamientos biológicos observados en las líneas celulares utilizadas en esta tesis cuando fueron incubadas con los MCs correspondientes.

6.4.1.1. Línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-10A).

6.4.1.1.1. Ensayos de proliferación, adhesión y migración.

Las células MCF-10A fueron incubadas con los péptidos seleccionados para realizar los ensayos biológicos de proliferación y observamos que Adipo aumentó la proliferación celular a las 24 h (**Figura 6.26 A**; $p < 0,05$) y retrasó la migración (**Figura 6.26 C**; $p < 0,001$). Además, Clust disminuyó la adhesión celular (**Figura 6.26 B**; $p < 0,001$).

En resumen, Adipo frenó la migración de la línea celular, mientras que favoreció la proliferación de la misma; mientras que Clust disminuyó la adhesión de las MCF-10A.

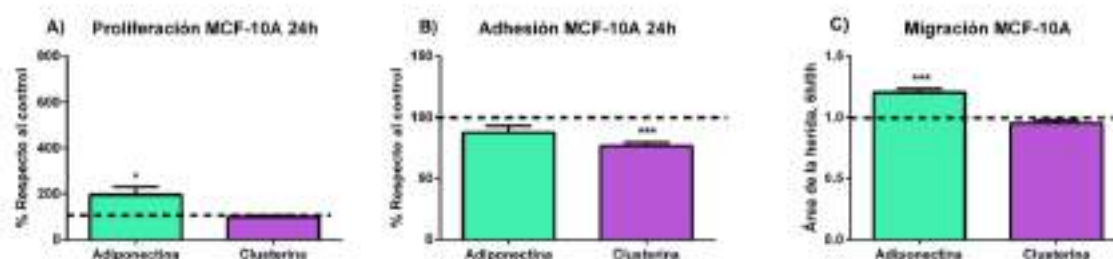


Figura 6.26. A) Proliferación por MTT. * $p < 0,05$. B) Adhesión por Cristal violeta. *** $p < 0,001$. C) Migración por Cierre de herida. *** $p < 0,001$.

6.4.1.2. Línea celular tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-7).

6.4.1.2.1. Ensayos de proliferación, adhesión y migración.

Las células MCF-7 fueron incubadas con Adipo y con Clust, y observamos que Adipo promovió la proliferación ($p < 0,001$) mientras que Clust no produjo cambios (**Figura 6.27 A**; $p < 0,001$).

Clust disminuyó muy significativamente la adhesión celular (**Figura 6.27 B**; $p < 0,001$), mientras que Adipo no provocó cambios significativos. Además, ambos péptidos disminuyeron el tamaño de las heridas producidas en las monocapas celulares, es decir, incrementaron la migración de las células (**Figura 6.27 C**; $p < 0,01$).

En resumen Adipo estimuló la proliferación y la migración celular, en tanto que Clust propició la migración de las células MCF-7.

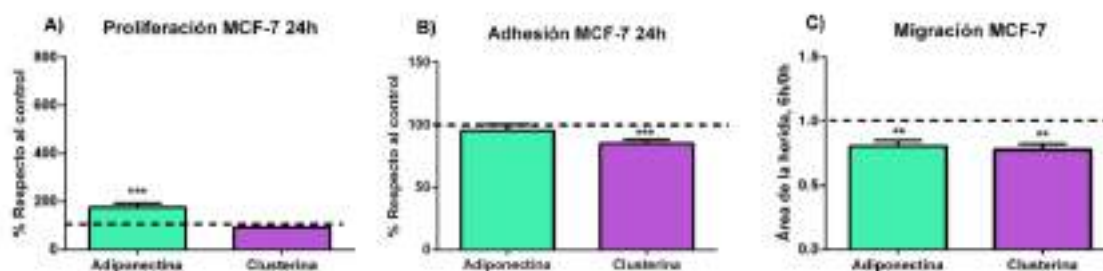


Figura 6.27. A) Proliferación por MTT. *** $p < 0,001$. B) Adhesión por Cristal violeta. *** $p < 0,001$. C) Migración por Cierre de herida. ** $p < 0,01$.

6.4.1.3. Línea celular tumorigénica no sensible a estrógenos (MDA-MB-231).

6.4.1.3.1. Ensayos de proliferación, adhesión y migración.

Tanto Adipo como Clust provocaron un marcado aumento de la proliferación (Figura 6.28 A; $p < 0,001$) y una disminución de la adhesión celular (Figura 6.28 B; $p < 0,05$) en las células MDA-MB-231. En el caso de la migración, sucedió algo similar, Adipo ($p < 0,05$) y Clust ($p < 0,01$) aumentaron la migración celular (Figura 6.28 C), lo que podría relacionarse con los resultados observados en la adhesión (Figura 6.28 B).

En resumen, ambos péptidos indujeron un aumento en la proliferación y migración de las MDA-MB-231 y aminoran la adhesión celular de las mismas.

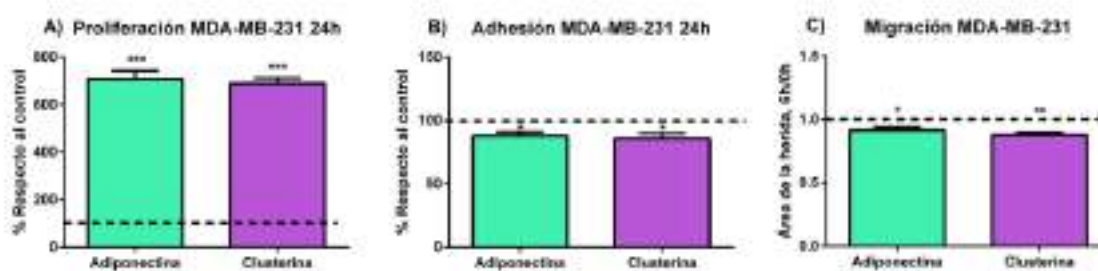


Figura 6.28. A) Proliferación por MTT. *** $p < 0,001$. B) Adhesión por Cristal violeta. * $p < 0,05$. C) Migración por Cierre de herida. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

6.4.2. Tablas de síntesis: Efecto de los péptidos sobre las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231.

A modo de resumen se presenta la **Tabla 6.8** que describe los efectos de los péptidos Adipo y Clust sobre las tres líneas celulares trabajadas. En los casilleros siempre se detallan los resultados de las comparaciones entre los péptidos y el control utilizado (SFBC 1%).

Tabla 6.8. Efectos de los péptidos Adipo y Clust sobre las líneas celulares

Efecto biológico	MCF-10A (no tumorigénica)		MCF-7 (tumorigénica)		MDA-MB-231 (tumorigénica)	
	Adipo	Clust	Adipo	Clust	Adipo	Clust
PROLIFERACIÓN	↑	=	↑	=	↑	↑
ADHESIÓN	=	↓	=	↓	↓	↓
MIGRACIÓN	↓	=	↑	↑	↑	↑

Adipo fue capaz de aumentar la proliferación de las tres líneas celulares utilizadas. En cuanto a los ensayos de adhesión y migración los efectos producidos por Adipo fueron variados. Para los de adhesión no se evidenciaron modificaciones respecto al control en las MCF-10A y MCF-7, pero sí provocó un descenso de la adhesión en las MDA-MB-231. En esta última línea celular Adipo aumentó la migración celular, así como también en las MCF-7, y la disminuyó en las MCF-10A.

Por su parte, Clust disminuyó la adhesión en las tres líneas celulares. En cuanto a la proliferación y la migración, sólo produjo efectos sobre las líneas celulares tumorigénicas. Clust no modificó la proliferación, pero sí aumentó la migración de las MCF-7; y en el caso de las MDA-MB-231, promovió tanto la proliferación como la migración celular.

7. DISCUSIÓN

7.1. Objetivo Específico N° 1. Caracterización del TAA y del TAM en ratas hipo- y eutiroideas

7.1.1. Efecto del hipotiroidismo sobre la condición corporal de los animales

El hipotiroidismo es una enfermedad del sistema endocrino caracterizada principalmente por una producción deficiente de HT en la glándula tiroidea (hipotiroidismo primario [229]). También puede producirse por una estimulación deficiente de la glándula tiroidea debido a un trastorno que altere la producción de la TSH en la hipófisis (hipotiroidismo secundario) [60]. Durante los ensayos de establecimiento del hipotiroidismo se observó que las ratas tratadas con PTU (Hipo) presentaron bajas concentraciones circulantes de T4 y T3 libres, mientras que los niveles de TSH fueron significativamente más elevados que los de los animales control (Eut). Todos ellos indicadores sensibles de hipotiroidismo.

El mecanismo por el cual la glándula tiroidea influye en la tumorigénesis mamaria no está claro. La posible asociación entre las enfermedades tiroideas y el carcinoma de mama se ha debatido durante décadas y sigue siendo controversial [144, 230]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el hipotiroidismo afecta la tumorigénesis mamaria alterando el crecimiento corporal, la composición corporal, la morfología mamaria, el TA y la liberación de adipocitoquinas. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento crónico con PTU retrasó significativamente el crecimiento de los animales reflejado en una disminución de peso y largo corporal, y en bajos niveles circulantes de GH en comparación con los controles no tratados, lo cual concuerda con trabajos que afirman que el hipotiroidismo es un trastorno complejo que directa e indirectamente modifica el balance energético. Se ha asociado con alteraciones metabólicas y cambios en el peso corporal. Los pacientes hipotiroideos suelen mostrar disminución del apetito, con ligero aumento de peso debido principalmente a la retención de líquidos por depósitos de glicoproteínas hidrófilas en diferentes tejidos [70]. Sin embargo, el hipotiroidismo severo en la rata provoca una fuerte caída en la ingesta de comida y el metabolismo [71, 72].

7.1.2. Efecto del hipotiroidismo sobre el TAA y el TAM

El desarrollo de la GM ocurre a través de un proceso de elongación ductal, ramificación y brotación de ductos o alvéolos, proceso que requiere proliferación celular y penetración del epitelio ductal en el estroma [231]. El estroma de la GM es una estructura compleja compuesta por una matriz extracelular y una variedad de tipos de células que incluyen células endoteliales, células inflamatorias, fibroblastos, células similares a fibroblastos y adipocitos. Este compartimento también puede denominarse almohadilla de grasa mamaria o panículo adiposo [172] ya que contiene principalmente TA [232]. La respuesta del epitelio ductal a varias hormonas y los factores de crecimiento están modulados por interacciones epiteliales-estromales, que parecen ser bidireccionales [213]. Se espera que las marcadas variaciones en la relación epitelio-estroma influyan la conexión bidireccional que conduce a modificaciones específicas en la expresión génica que pueden explicar la diferente susceptibilidad o riesgo de desarrollar CaM [231]. Los presentes resultados mostraron que en las ratas Hipo, se observó un desarrollo discreto lóbulo-alveolar de la

GM (aproximadamente 10%) y un mayor porcentaje de grasa en el estroma en comparación con las ratas Eut, lo que sugiere que el hipotiroidismo induce cambios en la relación parénquima-estroma. Esta puede ser una de las causas por las cuales el hipotiroidismo experimental disminuye la carcinogénesis mamaria, ya que al incrementarse la almohadilla adiposa de la mama hay menos yemas o brotes terminales de los ductos mamarios o TEBs, por lo tanto hay menos probabilidad de que actúe el DMBA para provocar la carcinogénesis mamaria. Coincidiendo con nuestros resultados, Vonderhaar y Greco describieron que mientras las glándulas de animales vírgenes hipertiroideos y eutiroideos conservaron un pequeño grado de ramificación ductal con alvéolos primitivos, las glándulas de animales hipotiroideos mostraban menos ramificación ductal y carecían de alvéolos [233].

También se observó que tanto el porcentaje de grasa como el tamaño de los adipocitos del TAA y TAM fueron mayores en los animales Hipo, lo que podría darnos cuenta de un TA hipertrófico. Estos resultados acompañan a los de Iglesias y Díez, ellos vieron que los pacientes con disfunción tiroidea frecuentemente muestran alteraciones metabólicas y alteraciones de la composición corporal que también pueden ir acompañadas de cambios en la masa grasa corporal y en el funcionamiento del TA [70]. Además en López-Fontana y Pennacchio *et al.* 2019, mostramos que, aunque los animales hipotiroideos tuvieron menor peso corporal que los controles, el porcentaje de depósitos de TAB y las características morfológicas de los adipocitos fueron similares en ambos grupos [72].

Los adipocitos producen adipoquinas y, a su vez, expresan receptores para la mayoría de las sustancias que tienen efectos endocrinos, autocrinos y paracrinos. La disfunción de los adipocitos puede alterar la liberación de adipoquinas que dan lugar a alteraciones metabólicas y energéticas [74]. En relación al funcionamiento del TA regulado por hormonas, en este trabajo se midieron diferentes receptores hormonales por IHQ y resultó que las ratas Hipo presentaron una disminución en la expresión de los receptores TR β 1, RE α y del RP4 dando cuenta de un TAA menos sensible a estas hormonas. No observamos diferencias significativas en la expresión de los receptores TR β 1, RE α y RP4 en el TAM. Sólo se observó una tendencia a disminuir la expresión de TR β 1 en el grupo experimental Hipo. Tampoco vimos cambios significativos en la expresión de la enzima aromatasa en ambos tejidos adiposos. Estos resultados podrían indicar que el hipotiroidismo tiene mayores efectos a nivel sistémico que a nivel local ya que la expresión de dichos receptores solo se vio modificada en el TAA por el tratamiento con PTU.

A pesar de que en López-Fontana y Pennacchio demostramos que los animales hipotiroideos tuvieron menor peso corporal que los controles, y que el porcentaje de depósitos de TAB y las características morfológicas de los adipocitos fueron similares en ambos grupos observamos que el tejido adiposo mesentérico y omental (MOAT) de ratas hipotiroideas fue disfuncional, atendiendo a los niveles séricos más bajos y la expresión tisular de adipoquinas en estos animales [72]. Durante este trabajo, en cuanto a la expresión de adipoquinas y sus receptores en el TAA, hallamos una disminución de la expresión de leptina y adiponectina en animales Hipo comparado con los controles. No observamos diferencias significativas entre sus receptores, ni para perilipina sugiriendo que el TAA de ratas Hipo podría ser un TA disfuncional. En el TAM advertimos una disminución de la expresión de adiponectina, su receptor Adipo R1 y perilipina en animales hipotiroideos, mientras que no vimos diferencias significativas para leptina ni su receptor ObR. La leptina es el producto del gen Ob secretado exclusivamente por adipocitos. La evidencia acumulada muestra que la leptina es un importante agente proangiogénico, proinflamatorio y factor mitógeno, cuyas acciones se ven reforzadas a través del diálogo cruzado con citocinas/factores de crecimiento

[234]. El aumento de los niveles de leptina activan los ejes tiroideo, de la GH y gonadal [235]. Por lo tanto, es concebible que la leptina pueda tener un papel en diferentes estados de la enfermedad tiroidea. Esta relación ha sido objeto de varios estudios, pero aún no ha surgido un panorama uniforme de los resultados. Valcavi *et al.* [236] informaron una reducción significativa de las concentraciones séricas de leptina antes y durante el tratamiento de reemplazo hormonal en pacientes con hipotiroidismo. Otros autores no observaron alteraciones en la leptina sérica en diferentes tipos de hipotiroidismo. Sreenana y Leonhardt *et al.* describieron un aumento de las concentraciones de leptina en pacientes con hipotiroidismo primario o carcinoma de tiroides en comparación con controles eutiroideos [237]. Recientemente López-Fontana *et al.* observaron cambios en el contenido de adiponectina en el TA en relación con las reducidas HT circulantes. Adiponectina fue significativamente menor en el MOAT de ratas Hipo incluso cuando la expresión de su receptor, Adipo R1, no se modificó. Esto también podría ser considerado como una disfunción del TA en el hipotiroidismo [72]. Finalmente, estos mismos autores vieron la expresión de perilipina, una proteína relacionada con el revestimiento de vacuolas grasas en adipocitos maduros [238].

Los resultados descritos más arriba, donde se encontró un TAA con una disminución de leptina y adiponectina, y un TAM con menor expresión de perilipina, adiponectina y su receptor Adipo R1 sugieren que el tejido graso está menos diferenciado o es más inmaduro. Debido a estas razones es que en esta tesis se midieron diferentes marcadores de diferenciación y pardeamiento del TA (marcadores de TAB y TAP). Pudimos observar que en animales Hipo en el TAA, disminuyó la expresión de algunos marcadores de TAB como HSL y su forma fosforilada (pHSL), no así la relación entre las mismas proteínas. También se detectó un aumento en la expresión de PPAR γ , importante marcador de la maduración del TA; en cuanto a los marcadores de TAP del TAA, se observó una disminución de la expresión de PRDM16 y UCP1, indicadores de pardeamiento del TA. En López-Fontana y Pennacchio *et al.* mostramos que las expresiones de HSL y pHSL estaban disminuidas en el TA en el hipotiroidismo, al igual que los resultados de esta tesis. Aunque, menos p-HSL (forma activa) estaba presente en el MOAT de ratas Hipo, atribuible a la disminución en la expresión de HSL, la proporción de p-HSL/HSL fue similar en ambos grupos [72].

La adipogénesis es el proceso de diferenciación celular por el cual los preadipocitos se convierten en adipocitos maduros y está altamente regulado [239]. El factor de transcripción PPAR γ es un regulador dominante de adipogénesis y necesario, así como C/EBP α para la expresión de genes de diferenciación en etapa tardía [240]. La delección de PPAR γ en adipocitos maduros compromete su viabilidad y almacenamiento de grasa debido a la pérdida de expresión de las principales enzimas metabólicas de los adipocitos [241, 242]. La sobreexpresión de PPAR γ en fibroblastos da como resultado la estimulación de la adipogénesis y acumulación de lípidos [240]. En los resultados de esta tesis y de forma contraria a nuestros resultados mostrados en López-Fontana y Pennacchio *et al.*, vimos un aumento de la expresión de PPAR γ por la técnica de SDS-PAGE, pero no corroboramos este aumento de expresión en cuanto a este importante marcador de TAB sobre cortes de TA por IHQ, posiblemente por las diferencias de sensibilidad y especificidad de ambas técnicas. En línea con esto, también observamos que los niveles de expresión de UCP1 y PRDM16, pero no de la proteína PGC1 α , marcadores de adipocitos pardos, fueron significativamente menores en el MOAT de ratas Hipo [72]. Observaciones previas demostraron que el tratamiento con T3 indujo la expresión de UCP1 y la biogénesis mitocondrial, acompañada de la inducción de PGC1 α en TA usando hMADS (células madre multipotentes mesenquimales humanas, derivadas de TA) [143]. Estos hallazgos indican que T3 es un activo modulador, que induce la utilización de energía en los adipocitos blancos a través de la regulación de la expresión de UCP1 y la biogénesis mitocondrial. Nuestros resultados

sugieren que la expresión de PGC1 α , la cual no sufrió cambios significativos entre los grupos experimentales, en el TAA es poco sensible a las HT en ratas.

En el TAM sucede algo similar que en el TAA, HSL y p-HSL disminuyeron en animales Hipo, pero el ratio entre estas proteínas tendió a aumentar. También se detectó una disminución en la expresión de PPAR γ , por lo que podríamos decir que este tejido seguramente sufre de una disminución de la hidrólisis de los TAG y de la adipogénesis [239, 240]. En cuanto a los marcadores de TAP en el TAM, se observó una disminución de la expresión de PRDM16, al igual que en el TAA; y un aumento de la expresión en PGC1 α y TBX1 en la GM de animales hipotiroideos. Nuevos avances en la identificación de la especificación del linaje celular han destacado varios factores reguladores clave en la especificación del destino de las células de grasa parda, que incluyen a PRDM16, un co-regulador maestro crítico para el compromiso con el linaje de adipocitos pardos [243, 244]. La pérdida de PRDM16 de las células precursoras de grasa parda provoca una reducción masiva de la concentración de marcadores moleculares y de las características morfológicas de los adipocitos pardos [244]. PGC1 α está altamente expresado en el TAP pero lo hace en bajos niveles en el TAB. La sobreexpresión de PGC1 α en TAB induce el pardeamiento celular, aumentando la expresión de genes mitocondriales y termogénicos [245, 246]. Es por estas premisas bien conocidas que en base a los resultados obtenidos de la expresión de PRDM16 y PGC1 α no podemos concluir si el TAM está más cercano a un TAB o un TAP.

Por otro lado, cuando se midió la actividad metabólica del TAA y del TAM a través de la expresión de los MCTs (transportadores de monocarboxilato), se encontró un aumento de la expresión del MCT1, transportador encargado de introducir lactato al adipocito; no así en el MCT4, encargado de liberarlo al exterior celular. Varias líneas de evidencia sugieren que la expresión de los MCTs es modificada cuando las demandas metabólicas en el tejido están siendo alteradas [247]. Además, se sabe que la regulación al alza de MCT1 y la capacidad de flujo de lactato mediada por MCT4 es importante para el estado fisiológico y función de los adipocitos maduros [248]. En el presente estudio, expresiones similares de MCT1 y MCT4 en el TAA y TAM de ratas Eut e Hipo están de acuerdo con un metabolismo menor de sus adipocitos.

En su conjunto, la expresión de los marcadores del TAA sugieren un TA que actúa como un reservorio de energía, más que uno endócrino o secretor de adipoquinas, y permiten afirmar que el estado de hipotiroidismo estaría favoreciendo la diferenciación del TAA hacia adipocitos blancos disminuyendo su pardeamiento, además de disminuir su catabolismo adiposo. En el caso del TAM los resultados no fueron concluyentes, sólo podemos decir que los adipocitos están menos diferenciados y tienen un catabolismo adiposo disminuido al igual que el TAA.

7.2. Objetivo específico N° 2. Estudio de los efectos del TAA y del TAM sobre las líneas celulares mamarias

7.2.1. Efecto directo del hipotiroidismo sobre la carcinogénesis mamaria

La posible asociación entre las enfermedades tiroideas y el CaM se ha debatido durante décadas y sigue arrojando resultados contradictorios [144, 230]. Estudios epidemiológicos y prospectivos no han sido capaces de demostrar una correlación entre condiciones benignas de la tiroides y el riesgo de CaM [116]. Sin embargo, otros estudios han apoyado una asociación significativa entre el hipotiroidismo primario y el CaM [249]. En la presente tesis observamos que el

hipotiroidismo prolongó la latencia de aparición de tumores, provocó la reducción de la incidencia de tumores y retrasó el crecimiento tumoral en ratas. Los animales Hipo tuvieron menor incidencia y mayor latencia de tumores, es decir, que generaron menos tumores y su aparición fue más tardía comparado con los animales Eut. En consecuencia, los animales Hipo vivieron más tiempo sin desarrollar tumores mamarios tal como se observa en la curva de supervivencia libre de enfermedad. Martínez-Iglesias *et al.*, inyectaron células MDA-MB-468 en ratones hipotiroideos y evaluaron el crecimiento de los tumores, evitando así el efecto de las HT en la iniciación del cáncer. Ellos encontraron que el hipotiroidismo tenía un doble efecto en la tumorigénesis de mama, ya que el crecimiento del Tu fue más lento en ratones con hipotiroidismo, pero los tumores eran más agresivos e invasivos, y la formación de metástasis estuvo fuertemente favorecida [250]. Por el contrario, en humanos, Cristofanilli *et al.*, demostraron que el hipotiroidismo clínico espontáneo fue un fuerte factor protector contra el CaM y disminuyó la incidencia y agresividad tumoral. Estos autores también descubrieron que las mujeres con hipotiroidismo tuvieron una reducción del 61% en el riesgo de cáncer invasivo de mama y eran más propensas a pasar la enfermedad sin la afectación de los ganglios linfáticos en comparación con mujeres eutiroideas. Además, los pacientes hipotiroideos que desarrollaron CaM progresaron con una enfermedad más indolente y tumores más pequeños [250]. Existen metanálisis que no mostraron una asociación significativa, a excepción de que la tiroiditis autoinmune aumenta el riesgo de CaM; sin embargo, la heterogeneidad de los estudios analizados impide conclusiones firmes [251, 252].

En este trabajo también se analizó la histología de los tumores de ambos grupos experimentales. Por un lado, los tumores de ratas Eut fueron de bajo grado considerando las características de los núcleos, la presencia de conductos y el número de figuras mitóticas. Presentaron un componente predominantemente *in situ* con poco componente invasivo. La necrosis era escasa y tenían moderada infiltración inflamatoria. El 23% de los animales Eut desarrollaron tumores secundarios. Por otro lado, los tumores malignos de ratas hipotiroideas fueron histológicamente más agresivos con un componente predominantemente invasivo con escaso componente *in situ*. La necrosis fue moderada y la respuesta inflamatoria fue menor que en los tumores de las ratas Eut. Las características de los Tu Hipo acompañan lo observado en Martínez-Iglesias más arriba [250]. Estos últimos autores también confirmaron un crecimiento más lento de los tumores Hipo, sin embargo nosotros no observamos diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los tumores entre ambos grupos experimentales. Interesantemente, al calcular la relación mitosis/apoptosis se halló que en los tumores hipotiroideos predomina la apoptosis o muerte celular sobre la mitosis o proliferación celular. En los resultados del **OE 1** reportamos que el TA de las ratas Hipo parece ser disfuncional, atendiendo a la menor cantidad de expresión de leptina medida por IHQ. Este hecho puede ser uno de los posibles mecanismos relacionados con el aumento de la latencia en ratas Hipo ya que se ha demostrado que la leptina inhibe la apoptosis y estimula el crecimiento y también la angiogénesis en la carcinogénesis mamaria [150].

Para corroborar los resultados referidos a la relación mitosis/apoptosis, se midieron marcadores de proliferación y de apoptosis por IHQ y por SDS-PAGE seguido de inmunobloting. En cuanto a la expresión de PCNA, indicador de proliferación celular, no se observaron diferencias significativas en los cortes de tumores evaluados por IHQ. No obstante la expresión de Caspasa 3, un importante marcador de apoptosis celular, fue significativamente mayor en los tumores de animales hipotiroideos medida tanto por IHQ como por SDS-PAGE seguido de inmunobloting. A su vez, en células de Tu de ratas Hipo se incrementó la apoptosis en una relación inversa a los niveles de leptina sérica. En apoyo de nuestros resultados, se ha descrito que la leptina inhibe la apoptosis y

esta acción se correlaciona con una mayor expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 [151]. La grasa corporal disfuncional que secreta menos niveles de leptina puede ser otro factor responsable del retraso en el desarrollo de tumores mamarios en ratas Hipo. Es por esto que nosotros no podemos descartar el posible papel del estroma en la producción de adipocinas como factores de crecimiento tumoral.

Los últimos resultados referidos a la Caspasa 3 fueron acompañados de una disminución de la expresión de Survivina, una proteína antiapoptótica. Dicho descenso podría estar relacionado con bajos niveles de expresión de β catenina (la cual actúa como factor de transcripción de la proteína Survivina) en tumores de animales hipotiroideos, así como con su localización en la membrana plasmática de dichas células tumorales. Este último hecho ha sido asociado a un mejor pronóstico del CaM y a la activación de la apoptosis [94]. Un mecanismo adicional por el cual las HT pueden promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis estaría afectando directamente a β catenina o activando indirectamente la vía de señalización PI3K/AKT [148]. Los hallazgos del grupo que estudió este mecanismo mostraron que la adición de T4 aumentó la expresión de β catenina y su translocación al núcleo, acompañando nuestros resultados descritos más arriba. Cuando T4 se convierte en T3 y se une a TR α 1, aumenta la abundancia de β catenina y la proteína se traslada al núcleo. Esto da como resultado la expresión de genes aguas abajo, incluidos c-MYC y ciclina D1, que regulan la proliferación celular y la apoptosis [253, 254]. Muchos estudios han observado que la β catenina nuclear promueve el CaM y se relaciona con un mal pronóstico [165, 166].

En los tumores mamarios también se midieron receptores hormonales como TR β 1 y RE α por la técnica de IHQ. Al contrario de lo esperado no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ambos receptores entre los grupos experimentales.

Los resultados anteriores en su conjunto demuestran que el hipotiroidismo retrasó la carcinogénesis mamaria y, si bien los tumores mostraron características histológicas más agresivas, los marcadores de proliferación no se modificaron y el aumento de la apoptosis retardó el crecimiento tumoral y extendió la supervivencia de los animales Hipo.

7.2.2. Efecto del hipotiroidismo mediado por el TA sobre la carcinogénesis mamaria

Hemos demostrado que el hipotiroidismo induce un aumento del tamaño de los adipocitos y favorece un aumento del depósito de grasa del TAA y el TAM alterando la relación parénquima-estroma. Hasta ahora no se ha estudiado el posible papel del estroma, concretamente del TA, en la producción de factores solubles que pueden promover o retardar el crecimiento del Tu en condiciones de hipotiroidismo. Este es el primer estudio que demuestra que los MCs-TAA/TAM de las ratas Hipo modificaron varios aspectos del comportamiento de las diferentes células tumorales de mama.

Cabe destacar que no vimos diferencias significativas en los ensayos de migración de ninguna de las líneas celulares utilizadas en este trabajo, lo cual podría haber sido un resultado esperado para los MCs-TAM y según lo reportado por nuestro grupo de trabajo respecto al menor grado de diferenciación de los adipocitos del TAM, además de lo publicado por Carter *et al.* Dicho grupo de investigación observó que sólo los adipocitos maduros son capaces de promover la motilidad de líneas celulares como las MCF-10A [255].

2.2.1. Línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos (MCF-10A)

Para el TAA, no observamos diferencias significativas en el ensayo de viabilidad en ninguno de los grupos experimentales, aún al diferenciar los MCs por la presencia o ausencia de Tu en los animales. Lo mismo sucedió cuando se midieron los efectos de los MCs TAA sobre la proliferación y la migración de la línea celular MCF-10A. En el caso de los ensayos de proliferación los resultados fueron esperados para las células tratadas con MCs tumorales, al no haber visto diferencias significativas entre los grupos experimentales en la parte *'in vivo'* de este trabajo referida a la velocidad de crecimiento tumoral en la expresión de PCNA, y a la disminución de la relación mitosis/apoptosis sobre los Tu de los animales. Recordemos que en los resultados del **OE 1** reportamos que el TAA de las ratas Hipo parecía ser disfuncional, atendiendo a la menor cantidad de expresión de leptina medida por IHQ y, que se ha demostrado que la leptina inhibe la apoptosis y estimula el crecimiento [189]. En base a lo discutido relacionado a la leptina podríamos haber encontrado una disminución de la proliferación de la línea celular. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la proliferación celular promovida por los MCs TAA.

En el caso del ensayo de adhesión el hipotiroidismo por sí solo no causó efecto alguno, pero sí encontramos diferencias al comparar los MCs de animales con Tu. Al aparecer el Tu en el eutiroidismo disminuyó la adhesión celular, en concordancia, y de acuerdo a lo que reportan en el trabajo de Pistone-Creydt *et al* 2013., donde observan un marcado descenso de la adhesión en células MCF-10A y MCF-7 cuando son incubadas con MCs de TA provenientes de pacientes con tumores mamarios [85]. Contrariamente, la presencia del Tu en el estado de hipotiroidismo favoreció la adhesión celular comparado con los MCs-Eut-Tu. En este último caso el Tu en las ratas Hipo provocó, a través del TAA, que las células entraran en apoptosis evocando el papel protector del hipotiroidismo [144]. Al analizar los marcadores de apoptosis, la presencia de Tu causó modificaciones significativas. Los MCs-Eut-Tu aumentaron la expresión de Caspasa 3 Clivada pero disminuyeron la expresión de PARP Clivado, impidiendo que se traduzca en un aumento en el número de células muertas. Por su parte, el hipotiroidismo redujo la expresión de PARP Clivado comparado con los MCs-Eut-nTu. Pero en presencia del Tu, la expresión de dicho marcador se incrementó notablemente. Es importante detallar que es posible que en una célula haya poca o nula expresión de Caspasa 3 Clivada y gran expresión de PARP Clivado, ya que existe un tipo de apoptosis independiente de Caspasa 3, denominada "partánatos". Este tipo de muerte celular no requiere de Caspasa 3 activa para activar a PARP-1, y se ha visto que este último marcador puede ser clivado por otras enzimas como las catepsinas, calpaínas o granzimas [256, 257].

En resumen, para el TAA, no vimos un efecto sistémico protector otorgado por el hipotiroidismo, pero sí la presencia del Tu en las ratas hipotiroideas favoreció la apoptosis celular.

Al estudiar la acción de los MCs TAM sobre la línea celular no tumorigénica sensible a estrógenos, MCF-10A, no se observaron cambios significativos en los ensayos de proliferación y migración celular. Sin embargo, se advirtió que los MCs-Eut-Tu aumentaron la viabilidad y levemente la proliferación celular. Si bien el hipotiroidismo favoreció la apoptosis de las células MCF-10A, la presencia del tumor disminuyó en gran medida la mortalidad celular. Estos resultados fueron soportados por la menor expresión de Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado en las células tumorales tratadas con MCs-Hipo-Tu sugiriendo que estos MCs TAM, en presencia del Tu, estarían frenando la apoptosis en el estado de hipotiroidismo.

Resumiendo, los MCs TAM tienen un efecto local sobre la viabilidad y adhesión celular de las MCF-10A favoreciendo su supervivencia en condiciones normales. El TAM en estado hipotiroideo

favorecería la apoptosis mientras que la presencia del Tu frenaría rotundamente este tipo de muerte celular.

2.2.2. Línea celular tumorogénica sensible a estrógenos (MCF-7)

No observamos diferencias significativas en la viabilidad, la proliferación y la migración de la línea celular MCF-7 al tratarlos con los MCs de ninguno de los grupos experimentales. Tampoco hubo diferencias al compararlos por la presencia o ausencia de Tu en los animales. Con respecto al ensayo de adhesión celular, si bien el hipotiroidismo no modificó la adhesión, la presencia del Tu sí lo hizo. Los MCs-Hipo-Tu aumentaron la adhesión de las células MCF-7 comparado con los MCs-Hipo-nTu. Por su parte, cuando las células fueron incubadas con los MCs-Eut-Tu, la adhesión disminuyó significativamente comparado con los MCs-Eut-nTu y con los MCs-Hipo-Tu. Al comparar estos resultados, la aparición del Tu ejerce cambios en sentidos opuestos dependiendo del estado tiroideo, actualmente no hemos encontrado un grupo de trabajo que haya publicado referido a los estados tiroideos, el CaM y la potencialidad del TA para generar cambios sobre líneas celulares.

Al analizar los lisados celulares por SDS-PAGE seguido de inmunoblotting se encontró que las células MCF-7 tratadas con los MCs-Eut-Tu expresaron menos Caspasa 3 Clivada y PARP Clivado que las tratadas con los MCs-Eut-nTu. Estos resultados podrían en parte explicar la menor adhesión celular y menor número de células vivas cuando son incubadas con estos MCs. Por otro lado, los MCs-Hipo-Tu alteraron los marcadores de apoptosis, lo que podría traducirse en cambios en la viabilidad celular.

En resumen, para el TAA, no vemos un efecto sistémico del hipotiroidismo propiamente dicho. No obstante, la presencia del Tu ejerce efectos opuestos según el estado tiroideo. Los MCs-Eut-Tu frenaron la apoptosis de las células mamarias tumorales hormonosensibles mientras que los MCs-Hipo-Tu modificaron inversamente los marcadores de apoptosis sin cambios biológicos significativos en la muerte celular.

Al estudiar la acción de los MCs TAM sobre la línea celular tumorogénica sensible a estrógenos MCF-7 se encontraron cambios significativos principalmente a nivel de la adhesión celular. Los MCs-Hipo-nTu disminuyeron la adhesión celular comparado con los MCs-Eut-nTu, es decir, que el hipotiroidismo modificó esta propiedad. Sin embargo, en presencia del Tu, tanto los MCs-Eut-Tu como con los MCs-Hipo-Tu aumentaron la adhesión celular respecto a sus respectivos MCs no tumorales. Este último resultado podría estar relacionado con el efecto proliferativo observado con los MCs-Hipo-Tu. Finalmente, no se observaron cambios significativos en la migración celular.

La expresión de Caspasa 3 Clivada en la línea celular MCF-7 se mantuvo sin modificaciones después de 24 h de incubación con los MCs independientemente del estado tiroideo y de la presencia del Tu. Sin embargo, los MCs-Hipo-Tu acrecentaron la expresión de PARP Clivado comparado con los MCs-Hipo-nTu [256, 257]. En base a los resultados del ensayo de proliferación y el análisis de los lisados celulares por SDS-PAGE seguido de inmunoblotting para PARP Clivado se advirtió que la línea celular tumorogénica MCF-7 tratada con MCs-Hipo-Tu estuvo más activa metabólicamente ya que mostró un incremento tanto en la proliferación como en la muerte celular.

Resumiendo, los MCs TAM tienen un efecto local principalmente sobre la adhesión celular, donde la presencia del Tu, independientemente del estado tiroideo, la favoreció. Además, en

condiciones de hipotiroidismo, los MCs-Hipo-Tu propiciaron tanto la proliferación como la apoptosis de las células MCF-7.

2.2.3. Línea celular tumorogénica no sensible a estrógenos (MDA-MB-231)

Para el TAA, no observamos diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales durante los ensayos de viabilidad. Lo mismo sucedió cuando se midieron los efectos de los MCs sobre la migración de la misma línea celular.

Sí observamos cambios significativos en los ensayos de proliferación. Al incubar la línea celular MDA-MB-231 con los MCs-Hipo-nTu se incrementó su proliferación en comparación con los MCs-Eut-nTu sugiriendo un efecto estimulador del hipotiroidismo sobre la proliferación de las células MDA-MB-231. La presencia del Tu solo modificó la proliferación en el estado eutiroides donde los MCs-Eut-Tu favorecieron la multiplicación celular con respecto a los MCs-Eut-nTu, remarcando el potencial proliferativo que podría otorgar el estado de eutiroides. Por su parte, se detectaron otros efectos significativos sobre la adhesión celular donde los MCs-Hipo-nTu aumentaron la adhesión comparado con los MCs-Eut-nTu lo cual va en concordancia con los resultados de proliferación. Los MCs-Hipo-Tu también acrecentaron la adhesión de las MDA-MB-231 al ser comparado con los MCs-Eut-Tu.

Al analizar los marcadores de apoptosis en los lisados celulares por SDS-PAGE seguido de inmunoblotting se encontró que la expresión de Caspasa 3 Clivada y de PARP Clivado disminuyeron en las células tratadas con los MCs-Hipo-nTu respecto a los MCs-Eut-nTu. Una vez instaurados los tumores, este efecto sobre los marcadores apoptóticos se detectó con los MCs-Eut-Tu al compararlos con los MCs-Eut-nTu y los MCs-Hipo-Tu. Estos efectos podrían en parte explicar los resultados correspondientes a los ensayos de adhesión con los MCs de animales sin Tu. Contrariamente, la presencia de Tu en el estado de hipotiroidismo, indujo mayor expresión de PARP Clivado en relación a los MCs-Hipo-nTu [256, 257].

En resumen, para el TAA, el hipotiroidismo tendría un efecto estimulador sobre la proliferación y la adhesión celular y frenaría la apoptosis de las células MDA-MB-231. El aumento de la adhesión celular en ambas condiciones tiroideas fue independiente de la presencia de Tu. Finalmente, los MCs-Eut-Tu promueven la proliferación celular y reducen la apoptosis, facilitando el crecimiento tumoral.

Al estudiar la acción de los MCs TAM sobre la línea celular tumorogénica no sensible a estrógenos MDA-MB-231 no se vieron cambios significativos para los ensayos de viabilidad ni migración celular. No obstante, los MCs-Hipo-nTu aumentaron la proliferación celular con respecto a los MCs-Eut-nTu y la presencia del Tu intensificó dicho efecto aún más, otra vez otorgándole al hipotiroidismo un potencial proliferativo en vez de protector, aparentemente propio de las células tumorales independientes de control hormonal. Por su lado, los MCs-Eut-Tu también incrementaron la proliferación celular al compararlo con los MCs-Eut-nTu. Cuando se compararon los MCs con Tu, los MCs-Hipo-Tu promovieron una mayor proliferación celular que los MCs-Eut-Tu. La aparición del Tu en el estado de hipotiroidismo acentúa aún más el efecto proliferativo celular.

Con respecto a los resultados de adhesión celular observamos que los MCs-Hipo-nTu disminuyeron esta propiedad en las células MDA-MB-231. Contrariamente, en presencia del Tu los MCs-Hipo-Tu aumentaron la adhesión. En este último caso los resultados se condicen con los de

proliferación, permitiéndole a la célula proliferar más al estar más adherida. Nuevamente observamos que la presencia del Tu acrecienta los cambios producidos por el hipotiroidismo.

Analizando marcadores apoptóticos influidos por los MCs TAM no encontramos cambios significativos para Caspasa 3 Clivada ni para PARP Clivado, era de esperar que si las células se encuentran en fase proliferativa y conservando su capacidad de adhesión, no modifiquen la expresión de los marcadores de muerte celular.

En resumen, los MCs TAM en presencia de tumores, independientemente del estado de la tiroides, tienen un efecto estimulador local sobre la proliferación celular.

7.3. Objetivo específico Nº 3. Identificación y cuantificación de los factores solubles asociados al TAA y al TAM

7.3.1. Factores solubles secretados por el TAM y el TAA de ratas hipo- y eutiroides.

Pruebas recientes sugieren que el hipotiroidismo afecta las funciones del TA [72] y que juntos pueden alterar el desarrollo de los tumores. Como discutimos en el apartado anterior (7.2.2.) en esta tesis, el hipotiroidismo induce un aumento del tamaño de los adipocitos y favorece un aumento del depósito de grasa del TAA y el TAM alterando la relación parénquima-estroma. Hasta ahora no se ha estudiado el posible papel del estroma, concretamente del TA, en la producción de factores solubles que pueden promover o retardar el crecimiento del Tu en condiciones de hipotiroidismo. Por esta razón es que se analizaron por proteómica los MCs-Eut/Hipo-TAA/TAM.

La concentración de proteínas y hormonas de los diferentes MCs fueron determinadas como se detalla en el apartado 5.2.1.2. Los MCs generados a partir del TAM de animales eutiroides tuvieron mayor concentración proteica que los del TAM de animales hipotiroideos. Este resultado pudo correlacionarse en la imagen del gel de poliacrilamida con el bandeo proteico más abundante y diverso mostrado por los carriles donde corrieron muestras de MCs-Eut vs. la imagen de los carriles con menor abundancia y diversidad de proteínas donde corrieron muestras de MCs-Hipo.

Por su parte, los MCs-TAM, independientemente del estado tiroideo, tuvieron una mayor concentración de estradiol que los MCs-TAA. Al clasificar los MCs según la presencia del Tu, observamos que la concentración de T4 fue menor en los MCs-Eut/Hipo-TAM de animales con Tu comparado con los MCs-Eut/Hipo-TAM sin Tu. El principal efecto de la T3 y la T4 es el aumento del metabolismo basal, lo cual es indispensable para un correcto desarrollo fetal, y el funcionamiento adecuado de los sistemas cardiovasculares, musculoesquelético, hematopoyético, así como para respuestas corporales adecuadas en cuanto a producción de calor, consumo de oxígeno y regulación de otros sistemas hormonales como puede ser la regulación del balance energético [51, 71]. Por otro lado, el E2 tiene un papel esencial en el desarrollo de la GM y la carcinogénesis. Se sabe que el E2 y la P4 promueven la proliferación y la diferenciación en la mama normal. La mayoría de los cánceres de mama son inicialmente hormonodependientes y es bien aceptado que el E2 participa en su desarrollo y progresión [258]. Se han informado interacciones *in vitro* entre T3 y el RE en líneas celulares de CaM [259]. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han reportado niveles de E2 circulante significativamente reducidos en ratas hipertiroideas, incluso cuando la carcinogénesis mamaria fue similar a las ratas Eut. Este resultado apoya el papel de las HT como un factor similar al

E2 en el crecimiento de tumores mamarios [260]. Toda esta información en conjunto afirma el importante papel que pueden cumplir estas hormonas presentes en los MCs utilizados en esta tesis sobre las diferentes líneas celulares, al menos sobre las células hormonosensibles, MCF-10A y MCF-7. Si bien, y en primer lugar, la expresión de TR β 1 en las líneas celulares no pudo detectarse por SDS-PAGE seguido de inmunobloting, las hormonas tiroideas ejercen sus efectos genómicos y no genómicos mediante su unión no solo a TR β 1, sino también a otros receptores como el receptor de integrinas $\alpha\beta$ 3, HER2, β Catenina y, cadena abajo, las vías de señalización PI3K/AKT y ERK. En segundo lugar, los niveles de estradiol en los MCs-TAA son extremadamente bajos y los de los MCs-TAM no mostraron diferencias significativas entre los diferentes estados tiroideos, lo que, en primera instancia no permitiría sacar conclusiones muy fuertes.

Los resultados obtenidos del análisis proteómico fueron analizados con herramientas bioinformáticas que nos permitieron conocer la distribución de las proteínas que conforman nuestros MCs y su localización celular, entre otras cosas. Los MCs-Hipo-TAA/TAM presentaron una distribución más amplia de los pesos moleculares que los MCs-Eut-TAA/TAM, pero a su vez una menor variedad de proteínas. Ello va acompañado por el hecho de que los MCs-Hipo-TAM tienen una menor concentración de proteínas. Estos resultados apoyan el concepto mencionado anteriormente de un TA disfuncional en los animales con hipotiroidismo.

En cuanto a la localización celular de las proteínas de los MCs-Eut/Hipo-TAM observamos que tanto para los MCs provenientes de animales eutiroideos como hipotiroideos, las proteínas eran mayormente citoplasmáticas o extracelulares. Justamente esto era lo esperado al haber analizado un MCs, los cuales se caracterizan por estar formados por factores solubles o secretados por las células o los tejidos que lo originaron [261, 262].

Durante las últimas décadas, el TA ha atraído un gran interés debido a su complicada composición y funciones versátiles. El TA ya no se considera solo una almohadilla de grasa que almacena energía, sino que también es un actor clave en las redes de interacción entre varios órganos y tejidos. Una amplia gama de factores liberados por el TA son responsables de la regulación del TA mismo y otros tejidos y células diana distantes, como los riñones, el músculo esquelético, el sistema cardiovascular y el sistema inmunitario, de forma auto/paracrina. El MC del TA está constituido por una mezcla de moléculas bioactivas. El papel beneficioso que desempeñan estas moléculas bioactivas en la angiogénesis, la cicatrización de heridas, la regeneración de tejidos y la inmunomodulación ha sido demostrado por varios estudios [261]. El TA, un tejido complejo y heterogéneo, está formado no sólo por adipocitos maduros y preadipocitos de fibroblastos o células madre, sino que también de pericitos, células endoteliales y macrófagos [263]. El TA también es un almacén de factores secretores, incluidas las citoquinas, los factores de crecimiento, las hormonas y las proteasas procesadoras de la matriz extracelular [262]. Puede comunicarse con órganos centrales y periféricos a través de varios factores secretores, que se conocen como factores o adipoquinas secretados de células derivadas de TA [264]. El descubrimiento de los factores secretores de TA ha hecho que el MC gane un gran interés en la comunidad científica y médica. Muchas investigaciones recientes han demostrado el efecto benéfico del MC de TA sobre la angiogénesis y la adipogénesis *in vitro* e *in vivo* [265]. Además, el MC de TA se ha utilizado en gran medida por estar involucrado en gran cantidad de procesos fisiopatológicos como la cicatrización de heridas [266], inmunorregulación [267] y regeneración celular [268]. La gran cantidad de procesos en los que el MC de TA está involucrado y la versatilidad de la manera en que pueden influir en los receptores diana que componen esta mezcla bioactiva, hacen al mismo una fuente interesante tanto para aplicaciones terapéuticas como diagnósticas.

Luego de analizar los resultados de proteómica con herramientas bioinformáticas pudimos elaborar un listado de proteínas presentes exclusivamente en los MCs-Eut-TAM y en los MCs-Hipo-TAM. De este listado seleccionamos las proteínas que podrían explicar los efectos biológicos que observamos sobre las líneas celulares de CaM, siendo la Clust en los MCs-Eut-TAM y la Adipo en los MCs-Hipo-TAM. En primer lugar, la razón por la cual se eligió a la proteína Clust en los MCs-Eut-TAM fue debido a que es secretada por los adipocitos y se ha relacionado con la carcinogénesis mamaria. La Clust ha sido implicada en numerosos procesos incluida la apoptosis, la regulación inmunitaria, la adhesión y la transformación morfológica celular. Es una chaperona molecular que evita la agregación de proteínas (como las plasmáticas) y puede mantenerlas desplegadas para futuros plegamientos por otras chaperonas. Internaliza proteínas a la célula para su degradación, las formas intracelulares pueden ubiquitinar otras moléculas. Regula la transcripción del factor NF-kappa- β . Cuando es secretada de la célula actúa como un factor antiapoptótico, sin embargo, cuando se la encuentra en el núcleo tiene funciones proapoptóticas. Cuando se une a la membrana mitocondrial inhibe la apoptosis ya que interfiere en la liberación de Citocromo C dependiente de Bax, regulando así la proliferación [96, 97, 190]. Existe bibliografía que la considera un actor antiqumioterapéutico en el CaM [98, 197], y que la encuentra sobre expresada en el CaM triple negativo [100]. En la línea celular MDA-MB-231, cuando esta proteína es silenciada disminuye en gran medida la proliferación, invasión y migración características de estas células [101, 197]. Hasta la fecha son escasos los trabajos que relacionan la expresión y localización de Clust con el hipotiroidismo, y aún menos los que involucran el CaM y los estados tiroideos junto a esta proteína [102]. Los papeles que cumple en la apoptosis, proliferación, invasión y migración podrían llegar a explicar los efectos biológicos observados en las líneas celulares de CaM tratadas con Clust. En segundo lugar, la razón por la cual se eligió a la proteína Adipo en los MCs-Hipo-TAM fue debido a que también es secretada por los adipocitos y se ha relacionado con distintos cánceres, incluyendo al CaM. Adipo regula el metabolismo de la glucosa y el de las grasas, modificando procesos fisiológicos como el comportamiento alimentario y la hematopoyesis. Receptores como ObR están involucrados en las vías protumorigénicas, mientras que los receptores de Adipo (Adipo R1 y Adipo R2), poseen efectos proangiogénicos y antiapoptóticos [84]. Adipo se produce dentro del TA y parece tener efectos varios en la regulación del cáncer [91], aunque todavía algunos resultados son controversiales en cuanto a su papel en la carcinogénesis mamaria. Dieudonne *et al.* mostraron que las células MCF-7 expresan receptores de Adipo y responden a la Adipo recombinante humana al reducir su crecimiento [92]. Otros investigadores hipotetizan que la Adipo puede ser un factor paracrino que controla negativamente el desarrollo de tumores mamarios. Ellos demostraron la inhibición del crecimiento de la línea celular MCF-7 de CaM sensible a los E2 por Adipo [188]. Housa *et al.* propusieron a la Adipo como marcador de progresión en el CaP ya que la encontraron aumentada en los grados tumorales más altos de esta patología [67] y Jia *et al.* observaron que Adipo favoreció el crecimiento y la migración de células epiteliales mamarias [93]. A la vista está que aún no se ha definido el comportamiento de Adipo en la carcinogénesis mamaria [208].

A fin de dar a conocer los factores solubles de los MCs analizados y ordenarlos de acuerdo a su origen se confeccionaron cuatro tablas diferentes en los resultados del **OE 3**. La **Tabla 6.4** contiene las proteínas presentes únicamente en los MCs-Eut-TAM, en general, estas ejercen funciones en la coagulación sanguínea, la defensa inmune [261, 267] y la apoptosis celular. Estas proteínas o factores solubles son exclusivas de los MCs-Eut-TAM. El estudio proteómico logró identificar siete proteínas, una de las cuales es Clust, la cual fue incubada en las líneas celulares de CaM utilizadas en esta tesis para analizar ensayos de proliferación, adhesión y migración celular. Las

proteínas de los MCs-Hipo-TAM, en general, también realizan funciones en la coagulación sanguínea y la defensa inmune [261, 267], al igual que las de los MCs-Eut-TAM; además de intervenir en el metabolismo de la glucosa y la carcinogénesis. En este caso también se encontraron por proteómica siete proteínas, una de las cuales fue Adipo, también incubada en las líneas celulares mamarias para ver efectos de proliferación, adhesión y migración celular. La expresión de Adipo fue medida por la técnica de SDS-PAGE seguida de inmunobloting en los MCs-Eut/Hipo-TAA/TAM. Se observó un aumento significativo en la expresión de Adipo en los MCs-Hipo-TAA/TAM comparados con los MCs-Eut-TAA/TAM, confirmando el resultado de la proteómica.

La **Tabla 6.6** contiene las proteínas expresadas diferencialmente en los MCs-Hipo-TAM respecto a los MCs-Eut-TAM. Los signos negativos de la expresión relativa significan que la proteína se halló expresada en menor medida, mientras que los números positivos significan que la proteína se encontró sobre expresada en estos MCs. Aquí se encontraron por proteómica ocho proteínas, entre las cuales, como perspectiva futura, se podría probar el efecto de MUC4 ya que se sabe que está involucrada en patologías como el cáncer y es capaz de regular procesos como la apoptosis y la proliferación, además la encontramos sobre expresada en los MCs-Hipo-TAM respecto a los MCs-Eut-TAM ("[MUC4 Gene](#)". *GeneCards*. Weizmann Institute of Science) [269]. Las proteínas de los MCs-Hipo-TAM expresadas diferencialmente, en general, también realizan funciones en la coagulación sanguínea y la defensa inmune [261, 267], además de intervenir en la inhibición de proteasas y en la regulación de la proliferación y adhesión celular.

7.4. Objetivo específico N°4. Identificación de la actividad biológica de los factores solubles secretados por el TAA y el TAM sobre las líneas celulares mamarias

7.4.1. Actividad biológica de Adipo y Clust sobre líneas celulares mamarias tumorales y no tumorales

La Adipo y la Clust son factores solubles secretados por los adipocitos y se han relacionado con la carcinogénesis mamaria. Adipo regula el metabolismo de la glucosa y el de las grasas, modificando procesos fisiológicos como el comportamiento alimentario y la hematopoyesis, además de tener efectos varios en la regulación del cáncer [91-93]. La Clust ha sido implicada en numerosos procesos incluida la apoptosis, la regulación inmunitaria, la adhesión y la transformación morfológica celular [96, 97, 190].

Teniendo en cuenta los resultados del **OE 3**, decidimos probar ambos péptidos sobre las tres líneas celulares de mama utilizadas en esta tesis para realizar ensayos de proliferación, adhesión y migración. Las células MCF-10A mostraron que Adipo aumentó la proliferación a las 24 h y disminuyó la migración celular, corroborando su efecto dual en la carcinogénesis. Existen muchos trabajos donde se reporta la función antitumoral de Adipo al causar efectos antiproliferativos en células de CaM [92], pero otros autores han descrito efectos que favorecerían la proliferación celular, por ejemplo aumentando la expresión de diferentes mitógenos como el VEGF y el TEG β [93].

Por otro lado, Clust disminuyó la adhesión celular de las MCF-10A. Kang *et al.* demostraron que Clust es importante para la adhesión celular y es capaz de regularla. Ellos observaron que al sembrar células de Sertoli la expresión de Clust aumentaba marcadamente durante la primera hora, favoreciendo la adhesión celular en placas de Petri. Posteriormente comprobaron que al inhibir la

expresión de Clust las células de Sertoli no conseguían adherirse a las placas y terminaban muriendo por apoptosis [270]. En este caso no se encontraron trabajos que relacionaran la Clust con la adhesión de células MCF-10A.

Las células MCF-7 también fueron incubadas con Adipo y con Clust, y observamos que Adipo promovió la proliferación mientras que Clust no produjo cambios en dicho parámetro [93].

Clust disminuyó muy significativamente la adhesión celular [270], mientras que Adipo no provocó cambios significativos en la adhesión. Además, ambos péptidos disminuyeron el tamaño de las heridas producidas en las monocapas celulares, es decir, incrementaron la migración de las células. En el caso de Adipo, nuestro resultado va en contra de lo reportado por Taliaferro-Smith *et al.* [271]. A su vez, se ha visto que Clust es una proteína moduladora de la actividad de Hsp90 α , ya que es capaz de potenciar las vías de señalamiento de AKT, ERK y NF- κ B favoreciendo la transición epitelio-mesenchimal y la migración de células de CaM [272] por ende, nuestro resultado del ensayo de adhesión con Clust soporta esta información. De acuerdo a los resultados observados ambos péptidos estarían, mediante diferentes mecanismos, promoviendo el desarrollo y progresión tumoral.

Tanto Adipo como Clust provocaron un marcado aumento de la proliferación y migración, y una disminución de la adhesión celular en las células MDA-MB-231. Como vimos en los resultados del **OE 4**, Adipo siempre potenció la proliferación celular [93, 273], en cambio Clust sólo lo hizo en las MDA-MB-231, donde Niu y col. observaron que el silenciamiento de la Clust secretada inhibe la proliferación, la invasión y la migración de esta línea celular [99, 197, 274]. Respecto a los resultados de adhesión ya vimos que Clust es capaz de regular esta capacidad, y que nuestros resultados van en el mismo sentido que Kang *et al.* [270]. Para Adipo se ha visto que su forma globular puede regular la expresión de diferentes moléculas importantes de la adhesión celular, como la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) o la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), en células endoteliales [275].

En el caso de la migración, Adipo y Clust la potenciaron, lo que podría relacionarse con la disminución de la adhesión de esta línea celular [197, 273].

En resumen Adipo ha sido capaz de aumentar la proliferación independientemente de la línea celular, ya que potenció el crecimiento de las MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 [93, 273], es por esto que no pudimos atribuirle un papel protector o antitumoral. Adipo potenció la proliferación celular de las células MCF-7 cuando fueron incubadas con los MCs-Hipo-Tu provenientes del TAM, y de las MDA-MB-231 cuando fueron incubadas con MCs-Hipo con o sin Tu provenientes del TAA y del TAM. Es importante aclarar que los MCs-Hipo-TAM son los que contienen a Adipo en su composición, no así los MCs-Eut-TAM. Clust sólo consiguió aumentar la proliferación en las MDA-MB-231 [197, 274]; justamente en esta línea celular es que vimos que los MCs-Eut-Tu provenientes del TAM fueron capaces de incrementar la proliferación. Dichos MCs son los que contienen a Clust en su composición, y no así los MCs-Hipo-TAM.

Clust disminuyó la adhesión de las MCF-10A y MDA-MB-231 [270]. Para la línea epitelial mamaria normal observamos que la adhesión mermaba cuando las células eran incubadas con los MCs-Eut-Tu provenientes del TAA. Curiosamente, las MCF-7 también redujeron su adhesión cuando fueron incubadas con los MCs anteriores, pero cuando se trataron sólo con Clust no modificaron su adhesión. Adipo fue capaz de provocar un descenso de la adhesión solo en las MDA-MB-231 [275]. Se vio este mismo efecto cuando estas células se incubaron con MCs-Hipo-nTu provenientes del TAM, y observamos el efecto contrario con los MCs-Hipo con y sin Tu del TAA, y con Tu del TAM.

Por último, Adipo logró disminuir la migración de las MCF-10A y promoverla en las MCF-7 y MDA-MB-231 [271]. Clust aumentó la movilidad y migración celular en las MCF-7 y MDA-MB-231 [197]. Lamentablemente, no detectamos cambios significativos en los ensayos de migración en ninguna de las líneas celulares con ninguno de los MCs. Posiblemente podría deberse, a que los péptidos Adipo y Clust podrían modificar o variar su actividad en presencia de otros factores solubles con los que podrían interactuar.

Si nos enfocamos en los ensayos del **OE 4**, podríamos decir que Adipo se comportó como una proteína protumoral al actuar como un factor soluble promotor de la proliferación en las tres líneas celulares, potenciador de la migración en las MCF-7 y MDA-MB-231, e inhibidor de la adhesión de las MDA-MB-231. La elevada proliferación, la reducción de la adhesión y la capacidad migratoria aumentada son características que benefician al desarrollo tumoral. Clust sólo aumentó la proliferación en las MDA-MB-231, disminuyó la adhesión en las tres líneas celulares y aumentó la migración de todas las líneas tumorales. En consecuencia podríamos afirmar que Clust también se comportaría como un factor protumoral. Si bien ambos péptidos estarían comportándose como factores protumorales, la Adipo de los MCs-Hipo-Tu sería la que tendría esta función, debido a que el hipotiroidismo en ausencia de Tu ejerce un efecto protector. En base a esto podríamos decir que cuando el Tu se instaura en deficiencia de T4, el hipotiroidismo facilita el desarrollo tumoral. Respecto a la Clust podríamos afirmar que es la responsable del efecto protumoral de los MCs-Eut.

8. CONCLUSIONES

El hipotiroidismo experimental en ratas produce:

- Cambios en la composición corporal y el crecimiento de los animales.
- Cambios en la morfología mamaria y del TA.
- Un TA disfuncional en cuanto la secreción de adipoquinas.
- Un TA con un catabolismo disminuido.
- Un TAA diferenciado a TAB y un TAM menos diferenciado.
- Una baja incidencia y una mayor latencia de tumores mamarios.
- Una mayor sobrevida libre de enfermedad de los animales.
- Un aumento de la apoptosis en los tumores mamarios *in vivo*.
- Un TAM que aumenta la apoptosis de líneas celulares mamarias hormonosensibles tumorales y no tumorales.
- Un TAM que, en presencia de Tu, tiene un efecto local potenciador de la carcinogénesis.
- Un TAA que, en presencia de Tu, favorece la apoptosis de la línea celular mamaria no tumoral y la muerte celular independiente de Caspasa 3 Clivada en las líneas celulares tumorales.
- Una mayor secreción de Adipo, y menor de Clust en los MCs-Hipo TAM.
- Una menor concentración de proteínas y menor diversidad de las mismas en los MCs-Hipo TAM.

Los ensayos con los péptidos demostraron que:

- Adiponectina y clusterina actuaron como factores protumorales, independientemente de la línea celular.

Nosotros podemos afirmar que el hipotiroidismo experimental produce efectos directos e indirectos sobre la carcinogénesis mamaria. El hipotiroidismo modifica la tumorogénesis mamaria alterando el crecimiento y composición corporal de los animales, así como también su morfología mamaria y adiposa, generando un TA disfuncional. Este TA disfuncional, a su vez, es capaz de modificar la carcinogénesis mamaria.

Como perspectiva futura nos proponemos estudiar el diálogo opuesto, es decir, cómo el Tu de mama es capaz de modificar el TA en los diferentes estados tiroideos.

9. REFERENCIAS

1. [https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm.]
2. Weigelt B, Reis-Filho JS: **Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?** (1759-4782 (Electronic)).
3. [<https://www.breastcancer.org/es/tipos/carcinoma-ductal-invasivo>]
4. Harris JR, Lippman ME, Osborne CK, Morrow M: **Diseases of the Breast**: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
5. Koch A, Richter-Marot A, Wissler MP, Baratte A, Mathelin C: **Métastases mammaires de cancers d'origine extra-mammaire : état des lieux et difficultés diagnostiques**. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2013, **41**(11):653-659.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: **Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. *CA: a cancer journal for clinicians* 2021, **71**(3):209-249.
7. Cleary MP, Grande JP, Juneja SC, Maihle NJ: **Diet-induced obesity and mammary tumor development in MMTV-neu female mice**. *Nutrition and cancer* 2004, **50**(2):174-180.
8. [<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad-cm>]
9. Baker SG, Cappuccio A, Potter JD: **Research on early-stage carcinogenesis: are we approaching paradigm instability?** *Journal of Clinical Oncology* 2010, **28**(20):3215.
10. Potter JD: **Morphostats: a missing concept in cancer biology**. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2001, **10**(3):161-170.
11. Bedessem B, Ruphy S: **SMT or TOFT? How the two main theories of carcinogenesis are made (artificially) incompatible**. *Acta biotheoretica* 2015, **63**(3):257-267.
12. Brücher BLD, Jamall IS: **Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm**. *BMC cancer* 2014, **14**(1):1-15.
13. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H: **Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2015, **1348**(1):20-31.
14. Zidar N, Gale N, Kambič V, Fischinger J: **Proliferation of myofibroblasts in the stroma of epithelial hyperplastic lesions and squamous carcinoma of the larynx**. *Oncology* 2002, **62**(4):381-385.
15. Nelson CM, Bissell MJ: **Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer**. *Annual review of cell and developmental biology* 2006, **22**:287.
16. Bissell MJ, Radisky D: **Putting tumours in context**. *Nature Reviews Cancer* 2001, **1**(1):46-54.
17. Mukaratirwa S, Koninkx JF, Gruys E, Nederbragt H: **Mutual paracrine effects of colorectal tumour cells and stromal cells: modulation of tumour and stromal cell differentiation and extracellular matrix component production in culture**. *International journal of experimental pathology* 2005, **86**(4):219-229.
18. Líška J, Brtko J, Dubovický M, Macejova D, Kissova V, Polák Š, Ujhazy E: **Relationship between histology, development and tumorigenesis of mammary gland in female rat**. *Experimental Animals* 2015:15-0055.
19. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM: **A developmental atlas of rat mammary gland histology**. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2000, **5**(2):165-185.
20. Thayer KA, Foster PM: **Workgroup report: national toxicology program workshop on hormonally induced reproductive tumors—relevance of rodent bioassays**. *Environmental Health Perspectives* 2007, **115**(9):1351-1356.

21. Sharma D, Smits BMG, Eichelberg MR, Meilahn AL, Muelbl MJ, Haag JD, Gould MN: **Quantification of epithelial cell differentiation in mammary glands and carcinomas from DMBA-and MNU-exposed rats.** *PLoS one* 2011, **6**(10):e26145.
22. Russo J, Russo IH: **Experimentally induced mammary tumors in rats.** *Breast cancer research and treatment* 1996, **39**(1):7-20.
23. Safe S: **Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis.** *Toxicology letters* 2001, **120**(1-3):1-7.
24. Shimada T: **Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2006, **21**(4):257-276.
25. Dipple A, Pigott M, Moschel RC, Costantino N: **Evidence that binding of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene to DNA in mouse embryo cell cultures results in extensive substitution of both adenine and guanine residues.** *Cancer Research* 1983, **43**(9):4132-4135.
26. Morrison VM, Burnett AK, Forrester LM, Wolf CR, Craft JA: **The contribution of specific cytochromes P-450 in the metabolism of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene in rat and human liver microsomal membranes.** *Chemico-biological interactions* 1991, **79**(2):179-196.
27. Wu CC, Howell KE, Neville MC, Yates Iii JR, McManaman JL: **Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells.** *ELECTROPHORESIS: An International Journal* 2000, **21**(16):3470-3482.
28. Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK: **Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2002, **7**(1):17-38.
29. Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC: **Hormonal control of lactation**, vol. 15: Springer Science & Business Media; 2012.
30. Topper YJ, Freeman CS: **Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland.** *Physiological reviews* 1980, **60**(4):1049-1106.
31. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I: **Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2002, **7**(1):49-66.
32. Clevenger CV, Plank TL: **Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast tissue.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1997, **2**(1):59-68.
33. Ramamoorthy P, Sticca R, Wagner TE, Chen WY: **In vitro studies of a prolactin antagonist, hPRL-G129R in human breast cancer cells.** *International journal of oncology* 2001, **18**(1):25-57.
34. Yeo SK, Guan JL: **Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor?** *Trends in Cancer*, **3**, 753-760. In.; 2017.
35. Li J, Chen Z, Su K, Zeng J: **Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2015, **8**(7):8500.
36. Fisher B, Jeong J-H, Dignam J, Anderson S, Mamounas E, Wickerham DL, Wolmark N: **Findings from recent National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies in stage I breast cancer.** *JNCI Monographs* 2001, **2001**(30):62-66.
37. McGuire WL: **Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy.** In: 1978. 428-433.
38. Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG: **'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer.** *Nature* 1983, **303**(5920):767-770.
39. Henderson IC: **Risk factors for breast cancer development.** *Cancer* 1993, **71**(S6):2127-2140.
40. Espinoza JL, Aguilar MEH, Abreu GEA, Durán FR, Denes JM, Ávila GAC, Aguilar CEY, Cid AHS: **El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática.** *eNeurobiología* 2013, **4**(8):1.
41. Vrtačník P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J: **The many faces of estrogen signaling.** *Biochemia medica* 2014, **24**(3):329-342.

42. Acconcia F, Marino M: **The effects of 17 β -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane.** *Frontiers in PHYSIOLOGY* 2011, **2**:30.
43. Hewitt SC, Korach KS: **Estrogen receptors: structure, mechanisms and function.** *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2002, **3**(3):193-200.
44. Bardin A, Bouille N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P: **Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression.** *Endocrine-related cancer* 2004, **11**(3):537-551.
45. Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ: **Progesterone and breast cancer.** *Endocrine reviews* 2020, **41**(2):320-344.
46. Orizaba-Chávez B, Alba-Jasso GA, Ocharán-Hernández ME: **Farmacocinética de la progesterona.** *Revista del Hospital Juárez de México* 2013, **80**(1):59-66.
47. Cork DM, Lennard, T. W., & Tyson-Capper, A. J.: **Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer.** *Breast Cancer Research*, (2008), **10**((3)):1-8.
48. Rekawiecki R, Kowalik Mk Fau - Kotwica J, Kotwica J: **Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract.** (1505-1773 (Print)).
49. Arce VMC, Pablo F.; Mallo, Federico **Endocrinología.** ; (2006).
50. Colbert D: **Cómo revertir la inflamación: Prevenga la enfermedad, retrase el envejecimiento, acelere la pérdida de peso.** ; (2015).
51. Ross MHP, Wojciech **Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.** , 5ta edición. edn; (2007).
52. Dietrich JW, K. Brisseau und B. O. Boehmx: **Resorption, Transport und Bioverfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen [Absorption, transport and bio-availability of iodothyronines].** ; (2008).
53. Bilezikian Jp Fau - Loeb JN, Loeb JN: **The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness.** (0163-769X (Print)).
54. Walter F. PB: **Chapter 48, "SYNTHESIS OF THYROID HORMONES"** In: *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach* Edited by Elsevier/Saunders., vol. p. 1300. ; (2003).
55. Furuya F, Hanover Ja Fau - Cheng S-y, Cheng SY: **Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor.** (0027-8424 (Print)).
56. Marimuthu A, Feng W Fau - Tagami T, Tagami T Fau - Nguyen H, Nguyen H Fau - Jameson JL, Jameson JI Fau - Fletterick RJ, Fletterick Rj Fau - Baxter JD, Baxter Jd Fau - West BL, West BL: **TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor.** (0888-8809 (Print)).
57. Tang HY, Lin Hy Fau - Zhang S, Zhang S Fau - Davis FB, Davis Fb Fau - Davis PJ, Davis PJ: **Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor.** (0013-7227 (Print)).
58. Khan SR, Chaker L, Ruiters R, Aerts JG, Hofman A, Dehghan A, Franco OH, Stricker BH, Peeters RP: **Thyroid Function and Cancer Risk: The Rotterdam Study.** (1945-7197 (Electronic)).
59. **The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers**
60. Wiersinga WM: **Adult Hypothyroidism.** *BTI - Endotext.*
61. Torres Barea I, Cayón Blanco M, Coserria Sánchez C, Aguilar-Diosdado M: **Hipotiroidismo.** *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2012, **11**(14):819-826.
62. Godoy Junchaya J: **«Síndrome de hipotiroidismo».** . In: *En Rocca Nacion, Jesús, ed Manual de Diagnóstico y Tratamiento del Hipotiroidismo.* (Lima, Perú: Merck Serono Perú). ; (2014).
63. Surks MI, Ortiz E Fau - Daniels GH, Daniels Gh Fau - Sawin CT, Sawin Ct Fau - Col NF, Col Nf Fau - Cobin RH, Cobin Rh Fau - Franklyn JA, Franklyn Ja Fau - Hershman JM, Hershman Jm Fau - Burman KD, Burman Kd Fau - Denke MA, Denke Ma Fau - Gorman C *et al*: **Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management.** (1538-3598 (Electronic)).
64. Raza SA, Mahmood N: **Subclinical hypothyroidism: Controversies to consensus.** (2230-8210 (Print)).

65. Cooper DS, Kieffer D, Halpern R, Saxe V, Mover H, Maloof F, Ridgway EC: **Propylthiouracil (PTU) Pharmacology in the Rat,II. Effects of PTU on Thyroid Function***. *Endocrinology* 1983, **113**(3):921-928.
66. Vanderpump MP, Tunbridge WM: **Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism**. (1050-7256 (Print)).
67. Housa D, Vernerová Z Fau - Heráček J, Heráček J Fau - Procházka B, Procházka B Fau - Čechák P, Čechák P Fau - Kuncová J, Kuncová J Fau - Haluzík M, Haluzík M: **Adiponectin as a potential marker of prostate cancer progression: studies in organ-confined and locally advanced prostate cancer**. (0862-8408 (Print)).
68. Vanderpump MP: **The epidemiology of thyroid disease**. (1471-8391 (Electronic)).
69. Valassi E, Scacchi M Fau - Cavagnini F, Cavagnini F: **Neuroendocrine control of food intake**. (1590-3729 (Electronic)).
70. Iglesias P, Díez JJ: **Influence of thyroid dysfunction on serum concentrations of adipocytokines**. (1096-0023 (Electronic)).
71. Lombardi A, Senese R, De Matteis R, Busiello RA, Cioffi F, Goglia F, Lanni A: **3,5-Diiodo-L-thyronine activates brown adipose tissue thermogenesis in hypothyroid rats**. (1932-6203 (Electronic)).
72. López-Fontana CM, Pennacchio G, Zyla LE, Toneatto J, Bruna FA, Ortiz N, Sassi PL, Santiano FE, García S, Sasso CV *et al*: **Effects of hypothyroidism on the mesenteric and omental adipose tissue in rats**. (1872-8057 (Electronic)).
73. Santini F, Marzullo P, Rotondi M, Ceccarini G, Pagano L, Ippolito S, Chiovato L, Biondi B: **Mechanisms in endocrinology: the crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease**. (1479-683X (Electronic)).
74. Matsuzawa Y: **The metabolic syndrome and adipocytokines**. (0014-5793 (Print)).
75. Syed MA, Thompson Mp Fau - Pachucki J, Pachucki J Fau - Burmeister LA, Burmeister LA: **The effect of thyroid hormone on size of fat depots accounts for most of the changes in leptin mRNA and serum levels in the rat**. (1050-7256 (Print)).
76. Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T: **Regulation of Expression of Leptin mRNA and Secretion of Leptin by Thyroid Hormone in 3T3-L1 Adipocytes**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, **232**(3):822-826.
77. Zimmermann-Belsing T, Brabant G Fau - Holst JJ, Holst Jj Fau - Feldt-Rasmussen U, Feldt-Rasmussen U: **Circulating leptin and thyroid dysfunction**. (0804-4643 (Print)).
78. Zhang Y, Proenca R Fau - Maffei M, Maffei M Fau - Barone M, Barone M Fau - Leopold L, Leopold L Fau - Friedman JM, Friedman JM: **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue**. (0028-0836 (Print)).
79. Cinar N, Gurlek A: **Association between novel adipocytokines adiponectin, vaspin, visfatin, and thyroid: An experimental and clinical update**. (2049-3614 (Print)).
80. Wu Y, Kim Jy Fau - Zhou S, Zhou S Fau - Smas CM, Smas CM: **Differential screening identifies transcripts with depot-dependent expression in white adipose tissues**. (1471-2164 (Electronic)).
81. Kershaw EE, Flier JS: **Adipose tissue as an endocrine organ**. (0021-972X (Print)).
82. Finley DS, Calvert Vs Fau - Inokuchi J, Inokuchi J Fau - Lau A, Lau A Fau - Narula N, Narula N Fau - Petricoin EF, Petricoin Ef Fau - Zaldivar F, Zaldivar F Fau - Santos R, Santos R Fau - Tyson DR, Tyson Dr Fau - Ornstein DK, Ornstein DK: **Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness**. (1527-3792 (Electronic)).
83. Fletcher SJ, Sacca PA, Pistone-Creydt M, Coló FA, Serra MF, Santino FE, Sasso CV, Lopez-Fontana CM, Carón RW, Calvo JC *et al*: **Human breast adipose tissue: characterization of factors that change during tumor progression in human breast cancer**. (1756-9966 (Electronic)).
84. Park J, Euhus Dm Fau - Scherer PE, Scherer PE: **Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression**. (1945-7189 (Electronic)).

85. Pistone Creydt V, Fletcher Sj Fau - Giudice J, Giudice J Fau - Bruzzone A, Bruzzone A Fau - Chasseing NA, Chasseing Na Fau - Gonzalez EG, Gonzalez Eg Fau - Sacca PA, Sacca Pa Fau - Calvo JC, Calvo JC: **Human adipose tissue from normal and tumoral breast regulates the behavior of mammary epithelial cells.** (1699-3055 (Electronic)).
86. Schäffler A, Schölmerich J Fau - Buechler C, Buechler C: **Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer.** (1745-8366 (Print)).
87. Iyengar P, Espina V Fau - Williams TW, Williams Tw Fau - Lin Y, Lin Y Fau - Berry D, Berry D Fau - Jelicks LA, Jelicks La Fau - Lee H, Lee H Fau - Temple K, Temple K Fau - Graves R, Graves R Fau - Pollard J, Pollard J Fau - Chopra N *et al*: **Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression *in vivo*, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment.** (0021-9738 (Print)).
88. Dirat B, Bochet L Fau - Dabek M, Dabek M Fau - Daviaud D, Daviaud D Fau - Dauvillier S, Dauvillier S Fau - Majed B, Majed B Fau - Wang YY, Wang Yy Fau - Meulle A, Meulle A Fau - Salles B, Salles B Fau - Le Gonidec S, Le Gonidec S Fau - Garrido I *et al*: **Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion.** (1538-7445 (Electronic)).
89. Wang YY, Lehuédé C Fau - Laurent V, Laurent V Fau - Dirat B, Dirat B Fau - Dauvillier S, Dauvillier S Fau - Bochet L, Bochet L Fau - Le Gonidec S, Le Gonidec S Fau - Escourrou G, Escourrou G Fau - Valet P, Valet P Fau - Muller C, Muller C: **Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer.** (1872-7980 (Electronic)).
90. Mauro L, Catalano S Fau - Bossi G, Bossi G Fau - Pellegrino M, Pellegrino M Fau - Barone I, Barone I Fau - Morales S, Morales S Fau - Giordano C, Giordano C Fau - Bartella V, Bartella V Fau - Casaburi I, Casaburi I Fau - Andò S, Andò S: **Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression.** (0008-5472 (Print)).
91. Vona-Davis L, Rose DP: **Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression.** (1351-0088 (Print)).
92. Dieudonne M-N, Bussiere M, Dos Santos E, Leneveu M-C, Giudicelli Y, Pecquery R: **Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, **345**(1):271-279.
93. Jia Z, Liu Y Fau - Cui S, Cui S: **Adiponectin induces breast cancer cell migration and growth factor expression.** (1559-0283 (Electronic)).
94. López Fontana CM, Zyla LE, Santiano FE, Sasso CV, Cuello-Carrión FD, Pistone Creydt V, Fanelli MA, Carón RW: **Hypothyroidism reduces mammary tumor progression via B-catenin-activated intrinsic apoptotic pathway in rats.** (1432-119X (Electronic)).
95. Perera CN, Chin Hg Fau - Duru N, Duru N Fau - Camarillo IG, Camarillo IG: **Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression.** (1479-6805 (Electronic)).
96. Arumugam P, Samson A, Ki J, Song JM: **Knockdown of clusterin alters mitochondrial dynamics, facilitates necrosis in camptothecin-induced cancer stem cells.** (1573-6822 (Electronic)).
97. Jones SE, Jomary C: **Clusterin.** (1357-2725 (Print)).
98. Koltai T: **Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition.** (1178-6930 (Print)).
99. Niu ZH, Wang Y Fau - Chun B, Chun B Fau - Li CX, Li Cx Fau - Wu L, Wu L: **Secretory clusterin (sCLU) overexpression is associated with resistance to preoperative neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer.** (1128-3602 (Print)).
100. Zhang D, Sun B Fau - Zhao X, Zhao X Fau - Cui Y, Cui Y Fau - Xu S, Xu S Fau - Dong X, Dong X Fau - Zhao J, Zhao J Fau - Meng J, Meng J Fau - Jia X, Jia X Fau - Chi J, Chi J: **Secreted CLU is associated with the initiation of triple-negative breast cancer.** (1555-8576 (Electronic)).

101. Li J, Jia L Fau - Zhao P, Zhao P Fau - Jiang Y, Jiang Y Fau - Zhong S, Zhong S Fau - Chen D, Chen D: **Stable knockdown of clusterin by vectorbased RNA interference in a human breast cancer cell line inhibits tumour cell invasion and metastasis.** (1473-2300 (Electronic)).
102. Silva D, Lizama C, Tapia V, Moreno RD: **Propylthiouracil-induced hypothyroidism delays apoptosis during the first wave of spermatogenesis.** *Biological Research* 2011, **44**:181-188.
103. Ibrahim MM: **Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences.** (1467-789X (Electronic)).
104. Mokdad AH, Ford Es Fau - Bowman BA, Bowman Ba Fau - Dietz WH, Dietz Wh Fau - Vinicor F, Vinicor F Fau - Bales VS, Bales Vs Fau - Marks JS, Marks JS: **Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001.** (0098-7484 (Print)).
105. Joyner JM, Hutley Lj Fau - Cameron DP, Cameron DP: **Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: regional and gender differences.** (0022-0795 (Print)).
106. Freedland ES: **Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review.** (1743-7075 (Print)).
107. Arner P, Hellström L Fau - Wahrenberg H, Wahrenberg H Fau - Brönnegård M, Brönnegård M: **Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions.** (0021-9738 (Print)).
108. Hellmér J, Marcus C Fau - Sonnenfeld T, Sonnenfeld T Fau - Arner P, Arner P: **Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells.** (0021-972X (Print)).
109. Alessi MC, Peiretti F Fau - Morange P, Morange P Fau - Henry M, Henry M Fau - Nalbone G, Nalbone G Fau - Juhan-Vague I, Juhan-Vague I: **Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease.** (0012-1797 (Print)).
110. Wajchenberg BL: **Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.** (0163-769X (Print)).
111. Hilakivi-Clarke L: **Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention.** (1873-5576 (Electronic)).
112. Spina E, Cowin P: **Embryonic mammary gland development.** *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2021, **114**:83-92.
113. Javed A, Lteif A: **Development of the human breast.** (1535-2188 (Print)).
114. Naccarato AG, Viacava P Fau - Vignati S, Vignati S Fau - Fanelli G, Fanelli G Fau - Bonadio AG, Bonadio Ag Fau - Montrucoli G, Montrucoli G Fau - Bevilacqua G, Bevilacqua G: **Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty.** (0945-6317 (Print)).
115. Howard BA, Gusterson BA: **Human breast development.** (1083-3021 (Print)).
116. Russo J Fau - Russo IH, Russo IH: **Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis.** (0023-6837 (Print)).
117. Figueroa JD, Pfeiffer RM, Patel DA, Linville L, Brinton LA, Gierach GL, Yang XR, Papathomas D, Visscher D, Mies C *et al*: **Terminal duct lobular unit involution of the normal breast: implications for breast cancer etiology.** LID - dju286 [pii] LID - 10.1093/jnci/dju286 [doi]. (1460-2105 (Electronic)).
118. Russo J Fau - Tait L, Tait L Fau - Russo IH, Russo IH: **Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma.** (0002-9440 (Print)).
119. Hennighausen L, Robinson GW: **Information networks in the mammary gland.** (1471-0072 (Print)).
120. Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, Lee H, Temple K, Graves R, Pollard J *et al*: **Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression *in vivo*, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment.** *The Journal of Clinical Investigation* 2005, **115**(5):1163-1176.

121. Krause S, Maffini Mv Fau - Soto AM, Soto Am Fau - Sonnenschein C, Sonnenschein C: **The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures.** (1471-2407 (Electronic)).
122. Krause S, Maffini MV, Soto AM, Sonnenschein C: **The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures.** *BMC Cancer* 2010, **10**:263.
123. Couldrey C, Moitra J Fau - Vinson C, Vinson C Fau - Anver M, Anver M Fau - Nagashima K, Nagashima K Fau - Green J, Green J: **Adipose tissue: a vital *in vivo* role in mammary gland development but not differentiation.** (1058-8388 (Print)).
124. Draman MS, Stechman M, Scott-Coombes D, Dayan CM, Rees DA, Ludgate M, Zhang L: **The Role of Thyrotropin Receptor Activation in Adipogenesis and Modulation of Fat Phenotype.** (1664-2392 (Print)).
125. Jespersen NZ, Larsen Tj Fau - Peijs L, Peijs L Fau - Daugaard S, Daugaard S Fau - Homøe P, Homøe P Fau - Loft A, Loft A Fau - de Jong J, de Jong J Fau - Mathur N, Mathur N Fau - Cannon B, Cannon B Fau - Nedergaard J, Nedergaard J Fau - Pedersen BK *et al*: **A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans.** (1932-7420 (Electronic)).
126. Wu J, Boström P Fau - Sparks LM, Sparks Lm Fau - Ye L, Ye L Fau - Choi JH, Choi Jh Fau - Giang A-H, Giang Ah Fau - Khandekar M, Khandekar M Fau - Virtanen KA, Virtanen Ka Fau - Nuutila P, Nuutila P Fau - Schaart G, Schaart G Fau - Huang K *et al*: **Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human.** (1097-4172 (Electronic)).
127. Gesta S, Tseng Yh Fau - Kahn CR, Kahn CR: **Developmental origin of fat: tracking obesity to its source.** (0092-8674 (Print)).
128. Item F, Konrad D: **Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited.** (1467-789X (Electronic)).
129. Tran TT, Yamamoto Y Fau - Gesta S, Gesta S Fau - Kahn CR, Kahn CR: **Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism.** (1932-7420 (Electronic)).
130. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D Fau - da Silva ME, da Silva Me Fau - Santos RF, Santos RF: **Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome.** (0018-5043 (Print)).
131. Sackmann-Sala L, Berryman De Fau - Munn RD, Munn Rd Fau - Lubbers ER, Lubbers Er Fau - Kopchick JJ, Kopchick JJ: **Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice.** (1930-739X (Electronic)).
132. Cartwright MJ, Tchkonja T Fau - Kirkland JL, Kirkland JL: **Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms.** (0531-5565 (Print)).
133. Strissel KJ, Stancheva Z Fau - Miyoshi H, Miyoshi H Fau - Perfield JW, 2nd, Perfield Jw 2nd Fau - DeFuria J, DeFuria J Fau - Jick Z, Jick Z Fau - Greenberg AS, Greenberg As Fau - Obin MS, Obin MS: **Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications.** (1939-327X (Electronic)).
134. Civitarese AE, Ukropcova B Fau - Carling S, Carling S Fau - Hulver M, Hulver M Fau - DeFronzo RA, DeFronzo Ra Fau - Mandarino L, Mandarino L Fau - Ravussin E, Ravussin E Fau - Smith SR, Smith SR: **Role of adiponectin in human skeletal muscle bioenergetics.** (1550-4131 (Print)).
135. Lafontan M, Viguerie N: **Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin.** (1471-4892 (Print)).
136. Considine RV, Sinha Mk Fau - Heiman ML, Heiman Ml Fau - Kriauciunas A, Kriauciunas A Fau - Stephens TW, Stephens Tw Fau - Nyce MR, Nyce Mr Fau - Ohannesian JP, Ohannesian Jp Fau - Marco CC, Marco Cc Fau - McKee LJ, McKee Lj Fau - Bauer TL, Bauer TL *et al*: **Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.** (0028-4793 (Print)).
137. Maffei M, Halaas J Fau - Ravussin E, Ravussin E Fau - Pratley RE, Pratley Re Fau - Lee GH, Lee Gh Fau - Zhang Y, Zhang Y Fau - Fei H, Fei H Fau - Kim S, Kim S Fau - Lallone R, Lallone R Fau -

- Ranganathan S, Ranganathan S *et al*: **Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.** (1078-8956 (Print)).
138. Jansson PA, Larsson A, Smith U, Lönnroth P: **Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men.** *J Clin Invest* 1994, **93**(1):240-246.
139. Sabater D, Arriarán S, Romero MdM, Agnelli S, Remesar X, Fernández-López JA, Alemany M: **Cultured 3T3L1 adipocytes dispose of excess medium glucose as lactate under abundant oxygen availability.** *Scientific Reports* 2014, **4**(1):3663.
140. Brooks GA: **Cell-cell and intracellular lactate shuttles.** (1469-7793 (Electronic)).
141. Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, André M, Chenouard V, Arnaud E, Barreau C, Walther R, Galinier A, Wdziekonski B *et al*: **Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure.** (1939-327X (Electronic)).
142. Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerbäck S, Lidell ME, Saraf MK, Labbe SM, Hurren NM *et al*: **Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans.** (1939-327X (Electronic)).
143. Lee JY, Takahashi N Fau - Yasubuchi M, Yasubuchi M Fau - Kim Y-I, Kim Yi Fau - Hashizaki H, Hashizaki H Fau - Kim M-J, Kim Mj Fau - Sakamoto T, Sakamoto T Fau - Goto T, Goto T Fau - Kawada T, Kawada T: **Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes.** (1522-1563 (Electronic)).
144. Cristofanilli M, Yamamura Y Fau - Kau S-W, Kau Sw Fau - Bevers T, Bevers T Fau - Strom S, Strom S Fau - Patangan M, Patangan M Fau - Hsu L, Hsu L Fau - Krishnamurthy S, Krishnamurthy S Fau - Theriault RL, Theriault RI Fau - Hortobagyi GN, Hortobagyi GN: **Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma.** (0008-543X (Print)).
145. Ito K Fau - Maruchi N, Maruchi N: **Breast cancer in patients with Hashimoto's thyroiditis.** (0140-6736 (Print)).
146. Lin HY, Chin YT, Yang YC, Lai HY, Wang-Peng J, Liu LF, Tang HY, Davis PJ: **Thyroid Hormone, Cancer, and Apoptosis.** (2040-4603 (Electronic)).
147. Glushakov RI, Proshin SN, Tapił'skaya NI: **The Incidence of Breast Tumor during Experimental Hyperthyroidism.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2013, **156**(2):245-247.
148. Lin HY, Chin YT, Yang YC, Lai HY, Wang-Peng J, Liu LF, Tang HY, Davis PJ: **Thyroid Hormone, Cancer, and Apoptosis.** *Compr Physiol* 2016, **6**(3):1221-1237.
149. Saraiva PP, Figueiredo Nb Fau - Padovani CR, Padovani Cr Fau - Brentani MM, Brentani Mm Fau - Nogueira CR, Nogueira CR: **Profile of thyroid hormones in breast cancer patients.** (0100-879X (Print)).
150. Rose DP, Gilhooly Em Fau - Nixon DW, Nixon DW: **Adverse effects of obesity on breast cancer prognosis, and the biological actions of leptin (review).** (1019-6439 (Print)).
151. Artwohl M, Roden M Fau - Hölzenbein T, Hölzenbein T Fau - Freudenthaler A, Freudenthaler A Fau - Waldhäusl W, Waldhäusl W Fau - Baumgartner-Parzer SM, Baumgartner-Parzer SM: **Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells.**
152. Arend RC, Londoño-Joshi Ai Fau - Straughn JM, Jr., Straughn Jm Jr Fau - Buchsbaum DJ, Buchsbaum DJ: **The Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer: a review.** (1095-6859 (Electronic)).
153. Huang GL, Luo Q Fau - Rui G, Rui G Fau - Zhang W, Zhang W Fau - Zhang Q-Y, Zhang Qy Fau - Chen Q-X, Chen Qx Fau - Shen D-Y, Shen DY: **Oncogenic activity of retinoic acid receptor γ is exhibited through activation of the Akt/NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cholangiocarcinoma.** (1098-5549 (Electronic)).
154. Jiang G, Xiao X Fau - Zeng Y, Zeng Y Fau - Nagabhushanam K, Nagabhushanam K Fau - Majeed M, Majeed M Fau - Xiao D, Xiao D: **Targeting beta-catenin signaling to induce apoptosis in human breast cancer cells by z-guggulsterone and Gugulipid extract of Ayurvedic medicine plant Commiphora mukul.** (1472-6882 (Electronic)).

155. Li P, Guo Y, Bledsoe G, Yang Z, Chao L, Chao J: **Kallistatin induces breast cancer cell apoptosis and autophagy by modulating Wnt signaling and microRNA synthesis.** (1090-2422 (Electronic)).
156. Shao H, Ma J, Guo T, Hu R: **Triptolide induces apoptosis of breast cancer cells via a mechanism associated with the Wnt/ β -catenin signaling pathway.** *Exp Ther Med* 2014, **8**(2):505-508.
157. Clevers H, Nusse R: **Wnt/ β -catenin signaling and disease.** (1097-4172 (Electronic)).
158. Valenta T, Hausmann G Fau - Basler K, Basler K: **The many faces and functions of β -catenin.** (1460-2075 (Electronic)).
159. Kimelman D, Xu W: **beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective.** (0950-9232 (Print)).
160. Wang X, Hu G Fau - Zhou J, Zhou J: **Repression of versican expression by microRNA-143.** (1083-351X (Electronic)).
161. Dong YF, Soung do Y Fau - Schwarz EM, Schwarz Em Fau - O'Keefe RJ, O'Keefe Rj Fau - Drissi H, Drissi H: **Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor.** (0021-9541 (Print)).
162. Howe LR, Subbaramaiah K Fau - Chung WJ, Chung Wj Fau - Dannenberg AJ, Dannenberg Aj Fau - Brown AM, Brown AM: **Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells.** (0008-5472 (Print)).
163. Tetsu O, McCormick F: **Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.** (0028-0836 (Print)).
164. Zhang X, Gaspard Jp Fau - Chung DC, Chung DC: **Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia.** (0008-5472 (Print)).
165. Fanelli MA, Montt-Guevara M Fau - Diblasi AM, Diblasi Am Fau - Gago FE, Gago Fe Fau - Tello O, Tello O Fau - Cuello-Carrión FD, Cuello-Carrión Fd Fau - Callegari E, Callegari E Fau - Bausero MA, Bausero Ma Fau - Ciocca DR, Ciocca DR: **P-cadherin and beta-catenin are useful prognostic markers in breast cancer patients; beta-catenin interacts with heat shock protein Hsp27.** (1466-1268 (Electronic)).
166. Wang Z, Zhang H, Hou J, Niu J, Ma Z, Zhao H, Liu C: **Clinical implications of β -catenin protein expression in breast cancer.** (1936-2625 (Electronic)).
167. Guigon CJ, Kim Dw Fau - Zhu X, Zhu X Fau - Zhao L, Zhao L Fau - Cheng S-y, Cheng SY: **Tumor suppressor action of liganded thyroid hormone receptor beta by direct repression of beta-catenin gene expression.** (1945-7170 (Electronic)).
168. Plateroti M, Kress E Fau - Mori JI, Mori Ji Fau - Samarut J, Samarut J: **Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells.** (0270-7306 (Print)).
169. van Kruijsdijk RC, van der Wall E Fau - Visseren FLJ, Visseren FL: **Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue.** (1538-7755 (Electronic)).
170. Saraiva PP, Figueiredo NB, Padovani CR, Brentani MM, Nogueira CR: **Profile of thyroid hormones in breast cancer patients.** *Braz J Med Biol Res* 2005, **38**(5):761-765.
171. Valastyan S, Weinberg RA: **Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules.** (1477-9137 (Electronic)).
172. Tan H Fau - Wang X, Wang X Fau - Yang X, Yang X Fau - Li H, Li H Fau - Liu B, Liu B Fau - Pan P, Pan P: **Oncogenic role of epithelial cell transforming sequence 2 in lung adenocarcinoma cells.** (1792-0981 (Print)).
173. van Roermund JG, Hinnen Ka Fau - Tolman CJ, Tolman Cj Fau - Bol GH, Bol Gh Fau - Witjes JA, Witjes Ja Fau - Bosch JLHR, Bosch JI Fau - Kiemeney LA, Kiemeney La Fau - van Vulpen M, van Vulpen M: **Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients.** (1464-410X (Electronic)).

174. Rahimi N, Saulnier R Fau - Nakamura T, Nakamura T Fau - Park M, Park M Fau - Elliott B, Elliott B: **Role of hepatocyte growth factor in breast cancer: a novel mitogenic factor secreted by adipocytes.** (1044-5498 (Print)).
175. Zangani D, Darcy Km Fau - Shoemaker S, Shoemaker S Fau - Ip MM, Ip MM: **Adipocyte-epithelial interactions regulate the *in vitro* development of normal mammary epithelial cells.** (0014-4827 (Print)).
176. Pinilla S, Alt E Fau - Abdul Khalek FJ, Abdul Khalek Fj Fau - Jotzu C, Jotzu C Fau - Muehlberg F, Muehlberg F Fau - Beckmann C, Beckmann C Fau - Song Y-H, Song YH: **Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion.** (1872-7980 (Electronic)).
177. Dirat Ba Fau - Bochet L, Bochet L Fau - Escourrou G, Escourrou G Fau - Valet P, Valet P Fau - Muller C, Muller C: **Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes?** (1421-7082 (Print)).
178. Folch J Fau - Lees M, Lees M Fau - Sloane Stanley GH, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** (0021-9258 (Print)).
179. Retta SF, Ternullo M Fau - Tarone G, Tarone G: **Adhesion to matrix proteins.** (1064-3745 (Print)).
180. Callegari EA: **Shotgun Proteomics Analysis of Estrogen Effects in the Uterus Using Two-Dimensional Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry.** (1940-6029 (Electronic)).
181. Redondo. A: **“Papel de la Adventicia y del Tejido Adiposo Perivascular en la regulación del estrés oxidativo asociado a la fisiopatología de la Hipertensión Arterial”.** . Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza Argentina; Agosto 2020. .
182. Ferguson PL, Smith RD: **Proteome analysis by mass spectrometry.** (1056-8700 (Print)).
183. Domon B, Aebersold R: **Mass spectrometry and protein analysis.** (1095-9203 (Electronic)).
184. Fenn JB, Mann M Fau - Meng CK, Meng Ck Fau - Wong SF, Wong Sf Fau - Whitehouse CM, Whitehouse CM: **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.** (0036-8075 (Print)).
185. Karas M Fau - Hillenkamp F, Hillenkamp F: **Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.** (0003-2700 (Print)).
186. Oriowo MA: **Perivascular adipose tissue, vascular reactivity and hypertension.** (1423-0151 (Electronic)).
187. Pathan M, Keerthikumar S, Ang C-S, Gangoda L, Quek CYJ, Williamson NA, Mouradov D, Sieber OM, Simpson RJ, Salim A *et al*: **FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool.** *PROTEOMICS* 2015, **15**(15):2597-2601.
188. Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne M-N, Leneveu M-C, Serazin V, Giudicelli Y, Pecquery R: **Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells.** *Oncol Rep* 2008, **20**(4):971-977.
189. Housa D, Housová J Fau - Vernerová Z, Vernerová Z Fau - Haluzík M, Haluzík M: **Adipocytokines and cancer.** (0862-8408 (Print)).
190. Wang Y, Wang X Fau - Zhao H, Zhao H Fau - Liang B, Liang B Fau - Du Q, Du Q: **Clusterin confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in breast cancer cells through NF-kappaB activation and Bcl-2 overexpression.** (1973-9478 (Electronic)).
191. Gettins PG: **Serpin structure, mechanism, and function.** (0009-2665 (Print)).
192. Kaiserman D, Whisstock Jc Fau - Bird PI, Bird PI: **Mechanisms of serpin dysfunction in disease.** (1462-3994 (Electronic)).
193. Marchiori RC, Pereira LA, Naujorks AA, Rovaris DL, Meinerz DF, Duarte MM, Rocha JB: **Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment.** (1472-6823 (Electronic)).
194. Pepys MB, Hirschfield GM: **C-reactive protein: a critical update.** (0021-9738 (Print)).

195. Dietrich JW, Landgrafe G Fau - Fotiadou EH, Fotiadou EH: **TSH and Thyrotropic Agonists: Key Actors in Thyroid Homeostasis**. (2042-0072 (Electronic)).
196. Duché JC, Urien S Fau - Simon N, Simon N Fau - Malaurie E, Malaurie E Fau - Monnet I, Monnet I Fau - Barré J, Barré J: **Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer**. (0009-9120 (Print)).
197. Niu Z, Li X Fau - Hu B, Hu B Fau - Li R, Li R Fau - Wang L, Wang L Fau - Wu L, Wu L Fau - Wang X, Wang X: **Small interfering RNA targeted to secretory clusterin blocks tumor growth, motility, and invasion in breast cancer**. (1745-7270 (Electronic)).
198. Chung L Fau - Moore K, Moore K Fau - Phillips L, Phillips L Fau - Boyle FM, Boyle Fm Fau - Marsh DJ, Marsh Dj Fau - Baxter RC, Baxter RC: **Novel serum protein biomarker panel revealed by mass spectrometry and its prognostic value in breast cancer**. (1465-542X (Electronic)).
199. Keeling DM, Wilson Aj Fau - Mackie IJ, Mackie Ij Fau - Isenberg DA, Isenberg Da Fau - Machin SJ, Machin SJ: **Role of beta 2-glycoprotein I and anti-phospholipid antibodies in activation of protein C *in vitro***. (0021-9746 (Print)).
200. Enroth C, Eger Bt Fau - Okamoto K, Okamoto K Fau - Nishino T, Nishino T Fau - Nishino T, Nishino T Fau - Pai EF, Pai EF: **Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion**. (0027-8424 (Print)).
201. Fini MA, Monks J Fau - Farabaugh SM, Farabaugh Sm Fau - Wright RM, Wright RM: **Contribution of xanthine oxidoreductase to mammary epithelial and breast cancer cell differentiation in part modulates inhibitor of differentiation-1**. (1557-3125 (Electronic)).
202. Akakura N, Hoogland C Fau - Takada YK, Takada Yk Fau - Saegusa J, Saegusa J Fau - Ye X, Ye X Fau - Liu F-T, Liu Ft Fau - Cheung AT-W, Cheung At Fau - Takada Y, Takada Y: **The COOH-terminal globular domain of fibrinogen gamma chain suppresses angiogenesis and tumor growth**. (1538-7445 (Electronic)).
203. Weisel JW, Litvinov RI: **Fibrin Formation, Structure and Properties**. (0306-0225 (Print)).
204. Niculescu F, Rus Hg Fau - Retegan M, Retegan M Fau - Vlaicu R, Vlaicu R: **Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer**. (0002-9440 (Print)).
205. Yang Y, Chung Ek Fau - Zhou B, Zhou B Fau - Blanchong CA, Blanchong Ca Fau - Yu CY, Yu Cy Fau - Füst G, Füst G Fau - Kovács M, Kovács M Fau - Vatay A, Vatay A Fau - Szalai C, Szalai C Fau - Karádi I, Karádi I Fau - Varga L *et al*: **Diversity in intrinsic strengths of the human complement system: serum C4 protein concentrations correlate with C4 gene size and polygenic variations, hemolytic activities, and body mass index**. (0022-1767 (Print)).
206. Csiszar A Fau - Kutay B, Kutay B Fau - Wirth S, Wirth S Fau - Schmidt U, Schmidt U Fau - Macho-Maschler S, Macho-Maschler S Fau - Schreiber M, Schreiber M Fau - Alacaptan M, Alacaptan M Fau - Vogel GF, Vogel Gf Fau - Aumayr K, Aumayr K Fau - Huber LA, Huber La Fau - Beug H *et al*: **Interleukin-like epithelial-to-mesenchymal transition inducer activity is controlled by proteolytic processing and plasminogen-urokinase plasminogen activator receptor system-regulated secretion during breast cancer progression**. (1465-542X (Electronic)).
207. McMahan BJ, Kwaan HC: **Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer**. (0065-2598 (Print)).
208. Katira A, Tan PH: **Evolving role of adiponectin in cancer-controversies and update**. (2095-3941 (Print)).
209. Nagaraju GP, Rajitha B, Aliya S, Kotipatrani RP, Madanraj AS, Hammond A, Park D, Chigurupati S, Alam A, Pattnaik S: **The role of adiponectin in obesity-associated female-specific carcinogenesis**. (1879-0305 (Electronic)).
210. Yu H, Yang Y Fau - Zhang M, Zhang M Fau - Lu H, Lu H Fau - Zhang J, Zhang J Fau - Wang H, Wang H Fau - Cianflone K, Cianflone K: **Thyroid status influence on adiponectin, acylation stimulating protein (ASP) and complement C3 in hyperthyroid and hypothyroid subjects**. (1743-7075 (Electronic)).

211. Park SY, Phark S Fau - Lee M, Lee M Fau - Zheng Z, Zheng Z Fau - Choi S, Choi S Fau - Won NH, Won Nh Fau - Jung W-W, Jung Ww Fau - Sul D, Sul D: **Evaluation of plasma carcinogenic markers in rat hepatic tumors models induced by rat hepatoma N1-S1 cells and benzo[a]pyrene.** (0253-6269 (Print)).
212. Sugiyama K, Izumi S Fau - Tomino S, Tomino S Fau - Nagase S, Nagase S: **Tumor-associated expression of a serum protein, termed α X protein (alpha 1-inhibitor III), and its mRNA in rat liver.** (0910-5050 (Print)).
213. Petersen OW, Rønnov-Jessen L Fau - Weaver VM, Weaver Vm Fau - Bissell MJ, Bissell MJ: **Differentiation and cancer in the mammary gland: shedding light on an old dichotomy.** (0065-230X (Print)).
214. Swierczko AS, Szala A Fau - Sawicki S, Sawicki S Fau - Szemraj J, Szemraj J Fau - Sniadecki M, Sniadecki M Fau - Sokolowska A, Sokolowska A Fau - Kaluzynski A, Kaluzynski A Fau - Wydra D, Wydra D Fau - Cedzynski M, Cedzynski M: **Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours.** (1432-0851 (Electronic)).
215. Lee G, Zhu M Fau - Ge B, Ge B Fau - Potzold S, Potzold S: **Widespread expressions of immunoglobulin superfamily proteins in cancer cells.** (1432-0851 (Electronic)).
216. Li Y, Guo M, Fu Z, Wang P, Zhang Y, Gao Y, Yue M, Ning S, Li D: **Immunoglobulin superfamily genes are novel prognostic biomarkers for breast cancer.** (1949-2553 (Electronic)).
217. Albrecht H, Carraway KL, 3rd: **MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small.** (1557-8852 (Electronic)).
218. Carraway KL, Theodoropoulos G Fau - Kozloski GA, Kozloski Ga Fau - Carothers Carraway CA, Carothers Carraway CA: **Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer.** (1744-8301 (Electronic)).
219. Chen JM, Ferec C: **Molecular basis of hereditary pancreatitis.** (1018-4813 (Print)).
220. Chen JM, Ferec C: **Gene conversion-like missense mutations in the human cationic trypsinogen gene and insights into the molecular evolution of the human trypsinogen family.** (1096-7192 (Print)).
221. Opstal-van Winden AW, Vermeulen Rc Fau - Peeters PHM, Peeters Ph Fau - Beijnen JH, Beijnen Jh Fau - van Gils CH, van Gils CH: **Early diagnostic protein biomarkers for breast cancer: how far have we come?** (1573-7217 (Electronic)).
222. Semaan SM, Wang X Fau - Marshall AG, Marshall Ag Fau - Sang Q-XA, Sang QX: **Identification of Potential Glycoprotein Biomarkers in Estrogen Receptor Positive (ER+) and Negative (ER-) Human Breast Cancer Tissues by LC-LTQ/FT-ICR Mass Spectrometry.** (1837-9664 (Electronic)).
223. Tan AA, Phang WM, Gopinath SC, Hashim OH, Kiew LV, Chen Y: **Revealing Glycoproteins in the Secretome of MCF-7 Human Breast Cancer Cells.** (2314-6141 (Electronic)).
224. Abraham LJ, Bradshaw Ad Fau - Northemann W, Northemann W Fau - Fey GH, Fey GH: **Identification of a glucocorticoid response element contributing to the constitutive expression of the rat liver alpha 1-inhibitor III gene.** (0021-9258 (Print)).
225. Madian AG, Myracle Ad Fau - Diaz-Maldonado N, Diaz-Maldonado N Fau - Rochelle NS, Rochelle Ns Fau - Janle EM, Janle Em Fau - Regnier FE, Regnier FE: **Differential carbonylation of proteins as a function of *in vivo* oxidative stress.** (1535-3907 (Electronic)).
226. Sorg UR, Behnke K, Degrandi D, Reich M, Keitel V, Herebian D, Deenen R, Beyer M, Schultze JL, Köhrer K *et al*: **Cooperative role of lymphotoxin β receptor and tumor necrosis factor receptor p55 in murine liver regeneration.** (1600-0641 (Electronic)).
227. McDonald C, Muhlbauer J, Perlmutter G, Taparra K, Phelan SA: **Peroxiredoxin proteins protect MCF-7 breast cancer cells from doxorubicin-induced toxicity.** (1791-2423 (Electronic)).

228. Tehan L, Taparra K Fau - Phelan S, Phelan S: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression in MCF-7 breast cancer cells and regulation by cell proliferation and oxidative stress.** (1532-4192 (Electronic)).
229. [<https://medlineplus.gov/spanish/hypothyroidism.html>]
230. Bach L, Kostev KA-O, Schiffmann L, Kalder M: **Association between thyroid gland diseases and breast cancer: a case-control study.** (1573-7217 (Electronic)).
231. Russo J, Lynch H Fau - Russo IH, Russo IH: **Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer.** (1075-122X (Print)).
232. Neville Mc Fau - Medina D, Medina D Fau - Monks J, Monks J Fau - Hovey RC, Hovey RC: **The mammary fat pad.** (1083-3021 (Print)).
233. Vonderhaar BK, Greco AE: **Effect of Thyroid Status on Development of Spontaneous Mammary Tumors in Primiparous C3H Mice.** *Cancer Research* 1982, **42**(11):4553-4561.
234. Zhou W, Guo S Fau - Gonzalez-Perez RR, Gonzalez-Perez RR: **Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling.** (1532-1827 (Electronic)).
235. Mantzoros CS: **The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence.** (0003-4819 (Print)).
236. Valcavi R, Zini M Fau - Peino R, Peino R Fau - Casanueva FF, Casanueva Ff Fau - Dieguez C, Dieguez C: **Influence of thyroid status on serum immunoreactive leptin levels.** (0021-972X (Print)).
237. Sreenan S, Caro Jf Fau - Refetoff S, Refetoff S: **Thyroid dysfunction is not associated with alterations in serum leptin levels.** (1050-7256 (Print)).
238. Shan T, Liu W Fau - Kuang S, Kuang S: **Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues.** (1530-6860 (Electronic)).
239. Clifford GM, Londos C Fau - Kraemer FB, Kraemer Fb Fau - Vernon RG, Vernon Rg Fau - Yeaman SJ, Yeaman SJ: **Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes.** (0021-9258 (Print)).
240. Fernyhough ME, Okine E Fau - Hausman G, Hausman G Fau - Vierck JL, Vierck JI Fau - Dodson MV, Dodson MV: **PPARgamma and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte.** (0739-7240 (Print)).
241. Imai T, Takakuwa R Fau - Marchand S, Marchand S Fau - Dentz E, Dentz E Fau - Bornert J-M, Bornert Jm Fau - Messaddeq N, Messaddeq N Fau - Wendling O, Wendling O Fau - Mark M, Mark M Fau - Desvergne B, Desvergne B Fau - Wahli W, Wahli W Fau - Chambon P *et al*: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse.** (0027-8424 (Print)).
242. Rosen ED, MacDougald OA: **Adipocyte differentiation from the inside out.** (1471-0072 (Print)).
243. Kajimura S, Seale P Fau - Tomaru T, Tomaru T Fau - Erdjument-Bromage H, Erdjument-Bromage H Fau - Cooper MP, Cooper Mp Fau - Ruas JL, Ruas JI Fau - Chin S, Chin S Fau - Tempst P, Tempst P Fau - Lazar MA, Lazar Ma Fau - Spiegelman BM, Spiegelman BM: **Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex.** (0890-9369 (Print)).
244. Seale P, Kajimura S Fau - Yang W, Yang W Fau - Chin S, Chin S Fau - Rohas LM, Rohas Lm Fau - Uldry M, Uldry M Fau - Tavernier G, Tavernier G Fau - Langin D, Langin D Fau - Spiegelman BM, Spiegelman BM: **Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16.** (1550-4131 (Print)).
245. Puigserver P, Wu Z Fau - Park CW, Park Cw Fau - Graves R, Graves R Fau - Wright M, Wright M Fau - Spiegelman BM, Spiegelman BM: **A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.** (0092-8674 (Print)).

246. Tiraby C, Tavernier G Fau - Lefort C, Lefort C Fau - Larrouy D, Larrouy D Fau - Bouillaud F, Bouillaud F Fau - Ricquier D, Ricquier D Fau - Langin D, Langin D: **Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes.** (0021-9258 (Print)).
247. Wang Y, Tonouchi M Fau - Miskovic D, Miskovic D Fau - Hatta H, Hatta H Fau - Bonen A, Bonen A: **T3 increases lactate transport and the expression of MCT4, but not MCT1, in rat skeletal muscle.** (0193-1849 (Print)).
248. Petersen C, Nielsen MD, Andersen ES, Basse AL, Isidor MS, Markussen LK, Viuff BM, Lambert IH, Hansen JB, Pedersen SF: **MCT1 and MCT4 Expression and Lactate Flux Activity Increase During White and Brown Adipogenesis and Impact Adipocyte Metabolism.** *Scientific Reports* 2017, **7**(1):13101.
249. Brinton La Fau - Hoffman DA, Hoffman Da Fau - Hoover R, Hoover R Fau - Fraumeni JF, Jr., Fraumeni JF, Jr.: **Relationship of thyroid disease and use of thyroid supplements to breast cancer risk.** (0021-9681 (Print)).
250. Martínez-Iglesias O, García-Silva S Fau - Regadera J, Regadera J Fau - Aranda A, Aranda A: **Hypothyroidism enhances tumor invasiveness and metastasis development.** (1932-6203 (Electronic)).
251. Angelousi AG, Anagnostou Vk Fau - Stamatakos MK, Stamatakos Mk Fau - Georgiopoulos GA, Georgiopoulos Ga Fau - Kontzoglou KC, Kontzoglou KC: **Mechanisms in endocrinology: primary HT and risk for breast cancer: a systematic review and meta-analysis.** (1479-683X (Electronic)).
252. Hardefeldt PJ, Eslick Gd Fau - Edirimanne S, Edirimanne S: **Benign thyroid disease is associated with breast cancer: a meta-analysis.** (1573-7217 (Electronic)).
253. Bilir B Fau - Kucuk O, Kucuk O Fau - Moreno CS, Moreno CS: **Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells.** (1479-5876 (Electronic)).
254. Xu J, Chen Y, Huo D, Khramtsov A, Khramtsova G, Zhang C, Goss KH, Olopade OI: **β -catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells.** (1098-2744 (Electronic)).
255. Carter JC, Church FC: **Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility.** (1096-0945 (Electronic)).
256. Abdelali A, Al-Bader M, Kilarkaje N: **Effects of Trans-Resveratrol on hyperglycemia-induced abnormal spermatogenesis, DNA damage and alterations in poly (ADP-ribose) polymerase signaling in rat testis.** (1096-0333 (Electronic)).
257. Rodríguez Stewart RM, Raghuram V, Berry JTL, Joshi GN, Mainou BA-OX: **Noncanonical Cell Death Induction by Reassortant Reovirus. LID - 10.1128/JVI.01613-20 [doi] LID - e01613-20.** (1098-5514 (Electronic)).
258. Pasqualini JR: **Breast cancer and steroid metabolizing enzymes: the role of progestogens.** (1873-4111 (Electronic)).
259. Nogueira CR, Brentani MM: **Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines.** (0960-0760 (Print)).
260. López-Fontana CM, Sasso Cv Fau - Maselli ME, Maselli Me Fau - Santiano FE, Santiano Fe Fau - Semino SN, Semino Sn Fau - Cuello Carrión FD, Cuello Carrión Fd Fau - Jahn GA, Jahn Ga Fau - Carón RW, Carón RW: **Experimental hypothyroidism increases apoptosis in dimethylbenzanthracene-induced mammary tumors.** (1791-2431 (Electronic)).
261. Dai M, Zhang Y, Yu MA-O, Tian W: **Therapeutic applications of conditioned medium from adipose tissue.** (1365-2184 (Electronic)).
262. Skalnikova H, Motlik J Fau - Gadher SJ, Gadher Sj Fau - Kovarova H, Kovarova H: **Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines.** (1615-9861 (Electronic)).
263. Roelofsen H, Dijkstra M Fau - Weening D, Weening D Fau - de Vries MP, de Vries Mp Fau - Hoek A, Hoek A Fau - Vonk RJ, Vonk RJ: **Comparison of isotope-labeled amino acid**

- incorporation rates (CILAIR) provides a quantitative method to study tissue secretomes.** (1535-9484 (Electronic)).
264. Antuna-Puente B, Feve B Fau - Fellahi S, Fellahi S Fau - Bastard JP, Bastard JP: **Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity.** (1262-3636 (Print)).
265. Sarkanen JR, Ruusuvoori P Fau - Kuokkanen H, Kuokkanen H Fau - Paavonen T, Paavonen T Fau - Ylikomi T, Ylikomi T: **Bioactive acellular implant induces angiogenesis and adipogenesis and sustained soft tissue restoration *in vivo*.** (1937-335X (Electronic)).
266. Fu X, Fang L Fau - Li H, Li H Fau - Li X, Li X Fau - Cheng B, Cheng B Fau - Sheng Z, Sheng Z: **Adipose tissue extract enhances skin wound healing.** (1067-1927 (Print)).
267. Grant RW, Dixit VD: **Adipose tissue as an immunological organ.** (1930-739X (Electronic)).
268. Lu Z, Yuan Y, Gao J, Lu F: **Adipose tissue extract promotes adipose tissue regeneration in an adipose tissue engineering chamber model.** (1432-0878 (Electronic)).
269. [<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MUC4>]
270. Kang SW, Lim Sw Fau - Choi SH, Choi Sh Fau - Shin KH, Shin Kh Fau - Chun BG, Chun Bg Fau - Park IS, Park Is Fau - Min BH, Min BH: **Antisense oligonucleotide of clusterin mRNA induces apoptotic cell death and prevents adhesion of rat ASC-17D Sertoli cells.** (1016-8478 (Print)).
271. Taliaferro-Smith L, Nagalingam A Fau - Zhong D, Zhong D Fau - Zhou W, Zhou W Fau - Saxena NK, Saxena Nk Fau - Sharma D, Sharma D: **LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells.** (1476-5594 (Electronic)).
272. Tian Y, Wang C, Chen S, Liu J, Fu Y, Luo YA-O: **Extracellular Hsp90 α and clusterin synergistically promote breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via LRP1. LID - jcs228213 [pii] LID - 10.1242/jcs.228213 [doi].** (1477-9137 (Electronic)).
273. Yong J, von Bremen J, Ruiz-Heiland G, Ruf S: **Adiponectin Interacts In-Vitro With Cementoblasts Influencing Cell Migration, Proliferation and Cementogenesis Partly Through the MAPK Signaling Pathway.** (1663-9812 (Print)).
274. Liu Y, Men C, Xu Y, Zhao K, Luo L, Dong D, Yu Q: **Clusterin promotes growth and invasion of clear cell renal carcinoma cell by upregulation of S100A4 expression.** (1875-8592 (Electronic)).
275. Kase H, Hattori Y Fau - Jojima T, Jojima T Fau - Okayasu T, Okayasu T Fau - Tomizawa A, Tomizawa A Fau - Suzuki K, Suzuki K Fau - Banba N, Banba N Fau - Monden T, Monden T Fau - Satoh H, Satoh H Fau - Akimoto K, Akimoto K Fau - Kasai K *et al*: **Globular adiponectin induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway in vascular endothelial cells.** (0024-3205 (Print)).

10. AGRADECIMIENTOS

Con mi más sincero sentimiento agradezco a/al:

INC, por haberme permitido interiorizarme en mi proyecto de doctorado y conocer a las hermosas personas del Labo 4 e IMBECU.

CONICET por otorgarme una beca que me permitió crecer profesionalmente.

IMBECU, mi segundo hogar, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y por el hermoso componente humano que hasta el día de hoy tiene.

Mis directores de beca: “Ruben”, que no dudó en comprometerse conmigo y abrirme las puertas de mi querido Laboratorio 4; y “Coty” que más que mi directora es mi par, por acompañarme codo a codo en cada una de las etapas del complejo proceso que es el doctorado.

Mis tutores Eduardo Callegari y Marcela Vázquez por guiarme en este interesante proceso.

Mis compañeros de trabajo y colegas:

- Virgi, por sus constantes correcciones y su poderoso ímpetu para darme ánimos;
- Flavi S., por su paz y sus consejos de becaria Postdoc;
- Vicky Victoria, por su compañía en tardes y noches de experimentos;
- Esteban Lozano, por sus chistosas charlas que lograban hacerme reír;
- Dieguito, por todos esos ratos donde, con pucho de por medio, me enteraba de la actualidad;
- Maripi, por todos los reactivos y materiales prestados, por su dulzura y tranquilidad;
- Elisa, por su mano de obra experta en el microscopio y sus fervorosos saludos matutinos;
- Susi y Marta, por prestarme con toda predisposición las fuentes de poder y la cuba de transferencia para los infinito western blots realizados;
- Ani, por “salvarme las papas” siempre con sus buffers y buena predisposición.
- Paula, Juan, Maritza y Hernán, “los chicos del bioterio”, por proveerme de animales y de sus buenas prácticas de manejo.

Mis compañeros y amigos del Labo 4:

- “Silviningüi”, por su experticia en histología y por todas sus charlas con mate de por medio;
- Vicky Arrieta, por su “encantadora sonrisa” y sus chistes y comentarios pesados;
- Mati Bum Bum, por su “hermoso ser” y la constante ayuda en los experimentos;
- Roci y Larita; por la frescura de becarias recién llegadas que me recordaban a mis viejos tiempos;
- Carlita, Josi, Ceci, por todas las charlas de pasillo y los almuerzos compartidos;

A todos por su infinita paciencia y ayuda, porque todos los días consiguieron sacarme una sonrisa y aliviar la rutina, por su amistad sincera.

Con todo mi amor y desde mi corazón dedico esta tesis a:

Los angelitos de mi vida, que no presenciaron físicamente todo este largo proceso, pero sé que ayudaron en él:

- Papá, porque siempre me impulsaste a hacer lo que me gustaba y porque me potenciaste en todas mis buenas cualidades;
- Juan, mi segundo papá, por terminar de moldear mi carácter y por mostrarme que siempre se puede;
- Abu Nené, por tu infinito cariño y por dejarme siempre hacer picardías, por confiar en mi potencial;
- Abu Yeye, por cuidar de mi mamá cuando más lo necesitaba.

Mi hermosa familia:

- Mamá, por enseñarme la resiliencia, por nunca bajar los brazos y siempre estar bien para mí;
- Pablo y Mariano, por ser excelentes hermanos y por su permanente camaradería;
- Abu Chicha, por todos los mates cebados mientras charlábamos de mi día laboral, por todas las velitas encendidas y las plegarias elevadas a tus Santos para que tu nieta rindiera bien y tuviera todos los éxitos asegurados,
- Paula y Sofi, por ser unas perfectas y cariñosas cuñadas;
- Pau y tía Ale, por siempre estar a la distancia apoyando y enviando buenas vibras;
- Mica, Jose, Mafi, a toda la hermosa familia de Juan;

Mis tíos Ale, Cristi y Gaby, por estar pendientes de toda la etapa de escritura de este manuscrito, por abrirme las puertas de su casa y brindarme su hermoso cariño, por preocuparse siempre por mi bien estar;

A todos por tenerme toda la paciencia en mis malos días; por acompañarme, cada uno a su manera, en este interesante camino; por siempre estar unidos y no dejar que ninguno se quede atrás; por el infinito amor.

Mis amigos y amigas del alma:

- Estefi y Fla, por ser los pilares de mi vida desde que las conozco, por ser parte de mí ser prácticamente; por escucharme, aconsejarme o quizás solo estar a mi lado en los peores momentos, así como también en los más divertidos y hermosos; por todos los vasos de cerveza, gin, fernet, vino, etc., etc., que hemos levantado para brindar por la felicidad de la otra, por intentar no dejarme caer y por levantarme siempre que caí;
- Luisa y Naty, por ser más que amigas mi segunda mamá y mi hermana; por tener la más sincera y larga amistad de mi vida, por siempre estar a la distancia;
- Estelita de mi corazón, mi otra mamá prestada;
- Andre, Belu, Gaby, Aye, mis amigas de la facu, por compartir mi formación universitaria, estar en cada mesa de examen haciendo hinchada o simplemente

esperando, por todas esas hermosas tardes y noches de esmaltado de uñas y de un sinfín de comida;

- Mati, Lean, Gera, mis amigos del gimnasio, por compartir esos días interminables de entrenamiento insalubre, por tenerme paciencia con la técnica y soportar mis miedos en esos momentos; por los infinitos asados con infinitos brindis, por los hermosos viajes que me han enseñado lo que es la verdadera amistad, por todos los viajes que aún nos faltan hacer;
- Guido, Nadin, Mari y May; por todas las charlas laborales y no laborales compartidas, por los días de Guido's Fest vividos;
- Germán, Agus, Joha y Nuni, mis amigos de la secundaria, por las mañanas de desayuno o las tardes de merienda, por seguir brindándome su cariño y amistad;
- May, flaca linda, por tu loca y hermosa amistad;
- Ger y Yayos, por los hermosos y divertidos momentos vividos en "Sanfran";
- Estefi, comadre, por el hermoso ahijado que me has dado, por todas esas noches de boliche y esos eventos en bodegas que pudimos disfrutar, por las experiencias compartidas en largos años de tu amistad de "fierro";
- Belén y Dani, Romi y Rodri, Vicky y Fer, por los consejos brindados, por la sincera amistad;
- Noe, Carlita y Ani, por tantos mates cebados y tantas risas vividas.