



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA



Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina
(CICSaB)



**Receptores purinérgicos asociados a quimiorresistencia en pacientes
con cáncer de mama**

TESIS QUE PRESENTA

LE. Osiel González Hernández

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ana María Estrada Sánchez

Septiembre 2021

Créditos institucionales

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Molecular y Traslacional del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección de la Dra. Diana Patricia Portales Pérez y la Dra. Ana María Estrada Sánchez. Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con numero 745970 a Osiel González Hernández. Este proyecto recibió apoyo del proyecto CONACYT-FOSEC SEP-Investigación Básica A1-S-26479. Este proyecto fue aprobado por el Fondo de Apoyo a la Investigación de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, con el convenio C20-FAI-1065-66. También se contó con el apoyo FORDECYT-PRONACES/40757/2020. Además, se contó con el apoyo y participación del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

Tesis que presenta

LE. Osiel González Hernández

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ana María Estrada Sánchez

ASESORA INTERNA

Dra. Esther Layseca Espinosa

JURADO:

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Dra. Ana María Estrada Sánchez

Dra. Esther Layseca Espinosa

Septiembre 2021

Dedicatorias

A mis padres, Rosa Elena Hernández Cruz y Antonio González Silva. Este logro es tan suyo como mío.

A mis abuelos, en especial a mi abuela Ma. Juana Silva Ventura. Espero estén orgullosos de mí, donde quiera que se encuentren.

A las pacientes que formaron parte de este estudio y a todas aquellas mujeres que se encuentran luchando contra el cáncer de mama.

Agradecimientos

Primeramente, a mis padres, por apoyarme en todos los aspectos incondicionalmente, por darme la oportunidad de perseguir mis sueños, por ser ese motor que me impulsa a ser mejor cada día, por trabajar tan duro para que mis hermanos y yo seamos alguien en la vida, por todos sus sacrificios. Saben que los amo infinitamente y espero estén tan orgullosos de mí, como yo de ustedes.

A mis hermanitos, porque son un gran soporte para mí, por su apoyo, por su compañía, por su amor y cariño, por todas las risas y peleas. ¡Los amo guangos!

A mi comité de tesis, a la Dra. Diana por todo su apoyo, por siempre estar al pendiente de todos sus alumnos, por confiar en mí y mis capacidades, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por todos sus consejos y apoyo. A la Dra. Ana María, por sus consejos y palabras de aliento, por siempre mostrarse dispuesta a ayudar. A la Dra. Esther, por sus opiniones y consejos para mejorar mi trabajo, por ser parte de mi formación.

A mis compañeros de laboratorio y al equipo DPPP, ya que sin toda su ayuda no hubiera podido sacar adelante este trabajo, por sus enseñanzas, consejos y tips y por hacer de mi estancia allí, algo muy agradable.

A la Dra. Martha, por ser quien me introdujo al mundo de la ciencia, por impulsarme a continuar estudiando y preparándome, por todo su apoyo y por creer tanto en mí, por todo lo que me enseñó y por ser una guía y modelo a seguir.

A mis compañeros de generación, porque son unas personas muy especiales, por todos los momentos buenos y de estrés que compartimos juntos, por hacer de estos dos años de maestría algo memorable, los quiero.

A mis amigos, por apoyarme siempre, por ser esos cheerleaders incondicionales, por creer en mí, por emocionarse por mis logros, por todo lo que me dan y aportan. En especial agradezco a mi mejor amiga Karen, por ser ese soporte a lo largo de estos 13 años de amistad, por su amor, por estar en las buenas y malas, por escucharme y darme ánimos las veces que sentía que ya no podía, por apoyarme en todo. Te amo por siempre y para siempre.

Al Osiel de hace dos años y al de ahora, por atreverse, por luchar por sus sueños, por no rendirse, por perseverar, por salirse de su zona de confort, por dar lo mejor de sí y por siempre intentar. ¡Se logró!

Receptores purinérgicos asociados a quimiorresistencia en pacientes con cáncer de mama

Osiel González-Hernández¹, Víctor Manuel Ruiz-Rodríguez¹, Eneida Turiján-Espinoza¹, Miguel Ernesto Martínez-Leija¹, Esther Layseca-Espinosa¹, Ana María Estrada-Sánchez², Diana Patricia Portales-Pérez¹.

¹ Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB)

² División de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

Palabras clave: cáncer de mama, receptores purinérgicos, quimiorresistencia, receptor P2X7A, receptor P2X7B.

Correspondencia: Diana Patricia Portales Pérez

dportale@uaslp.mx

Resumen

Introducción: El cáncer de mama continúa siendo un problema de salud mundial y la quimiorresistencia contribuye en el número de muertes que se presentan. La quimiorresistencia se ha relacionado con los receptores purinérgicos de la familia P2X. El receptor P2X7, P2X1 y P2X4 contribuyen en el proceso inflamatorio y la respuesta inmune al unirse al ATP. Las isoformas del receptor P2X7 (A y B) aumentan la sensibilidad al ATP, la formación de un poro y la actividad apoptótica. **Objetivo:** Determinar la expresión de estos receptores y las isoformas del P2X7 (A y B) a nivel de RNAm en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama que presenten o no quimiorresistencia. **Metodología:** Se aislaron células mononucleares de sangre venosa periférica de pacientes con cáncer de mama del área de oncología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” antes de la quimioterapia (ciclo 1) y al término de la misma, seis meses después (ciclo seis). La quimioterapia fue neoadyuvante (quimioterapia administrada previo a la cirugía) y se eligió a las pacientes que estaban bajo el esquema de tratamiento FAC (5-Fluoruracilo, Adriamicina y Ciclofosfamida). Se realizó la extracción de RNA, se sintetizó del cDNA y finalmente la qPCR. **Resultados:** Se detectó una disminución de la expresión relativa de los receptores P2X7B, P2X1 y P2X4 en las pacientes con cáncer de mama comparada a la de los sujetos control (mujeres aparentemente sanas). Al agrupar a las pacientes en sensibles y quimiorresistentes y en los tiempos de quimioterapia 1 (Q1) y quimioterapia 6 (Q6) y compararlas con el grupo control, se encontró una disminución significativa de P2X7B en el grupo de pacientes resistentes en la Q6, para el caso de P2X4 la disminución significativa se observó en el grupo de pacientes sensibles en la Q6; y en ambos grupos de pacientes quimiorresistentes; en la Q1 y Q6. Las pacientes, de acuerdo a su IMC, mostraron niveles disminuidos de P2X7B en los grupos de normopeso (N) y sobrepeso (SP) y para P2X4 se observó una disminución en los tres grupos de pacientes normopeso, sobrepeso y obesidad. Los niveles de receptores estudiados no se modificaron por la presencia de algún subtipo molecular o por DM2. **Conclusiones:** La evaluación de receptores purinérgicos de la familia P2X relacionados por el efecto sobre células inmunes podría ser considerado un biomarcador de la adecuada respuesta a la quimioterapia o en su defecto a la resistencia a los fármacos bajo el esquema FAC.

Introducción

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres y representa 16% de los tumores malignos diagnosticados, particularmente en América se reportan más de 462,000 mujeres y casi 100,000 mueren a causa de esta enfermedad. Para el año 2030, se prevé que el número de mujeres diagnosticadas con este tipo de cáncer aumente en un 34%.^(1,2) En México las tasas de mortalidad por tumor maligno de mama han tenido una tendencia al alza y en este último año se ubicó con 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de igual o mayor a 20 años de edad. Por lo anterior, el cáncer de mama es uno de los principales problemas de salud pública, ya que puede afectar a la población femenina en edad productiva (20 a 59 años), que representa el 27% de la población total del país.^(3,4)

Una de las principales estrategias terapéuticas en el cáncer de mama es la quimioterapia. Sin embargo, algunas pacientes presentan quimiorresistencia; este es un fenómeno multifactorial, en el que están involucrados varios mecanismos que incluyen incremento en la reparación del ADN, tolerancia al estrés o mecanismos de evasión de la apoptosis.⁽⁵⁾ Actualmente se ha establecido la relación entre la señalización purinérgica y el cáncer, donde el ATP y la adenosina actúan como moléculas de señalización extracelular, generando proliferación y supervivencia de las células tumorales.⁽⁶⁾ El ATP es un componente bioquímico abundante en el microambiente de las células cancerosas y mediante la unión a sus receptores promueve el crecimiento y representa la fuente principal del inmunosupresor adenosina.⁽⁷⁾

A nivel extracelular las moléculas de ATP y adenosina activan receptores específicos entre ellos, el subgrupo de receptores P1 que reconocen como ligando a adenosina, e incluyen 4 receptores acoplados a proteínas G (A1, A2A, A2B y A3).⁽⁸⁾ Por su parte el ATP se une a receptores de la familia P2, los cuales se subdividen en receptores inotrópicos P2X, que constan de 7 miembros (P2X1-7) y los receptores metabotrópicos P2Y; de los cuales se han descrito 8 receptores (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14). El receptor purinérgico P2X7 es el más ampliamente estudiado, y junto con P2X1 y P2X4 participan en la activación de los linfocitos para eliminar células cancerosas.⁽⁹⁾

El receptor P2X4 es uno de los más sensibles al ATP, activándose con concentraciones de 3-10 μM ; la unión del ATP permite la apertura del canal iónico. Este receptor se expresa ampliamente en neuronas centrales y periféricas, en la microglía y células inmunes, entre otros tipos celulares.⁽¹⁰⁾ Por otro lado, P2X1 se expresa en plaquetas y neutrófilos, regulando la quimiotaxis y su estado de activación.⁽¹¹⁾

En lo que respecta a P2X7, se han identificado 9 isoformas del receptor (P2X7A-J), siendo P2X7A la forma de tamaño completo, es decir el receptor P2X7 con todos los aa, y bien caracterizada del receptor.⁽¹²⁾ Esta isoforma es la más grande con una longitud de 595 aa donde del aa 113/125 corresponden al extremo C-terminal, al cual se le ha asociado que tras la prolongada estimulación con ATP da lugar a la formación de un “macroporo” de un diámetro de 8.5 Å que aumenta la permeabilidad celular y que favorece la apoptosis. Por otro lado, la isoforma B, carece de este extremo C-terminal por lo que es incapaz de formar este poro en la membrana, sin embargo, conserva sus funciones de canal iónico y además modula las funciones del receptor P2X7A en el control del crecimiento celular. Ambas isoformas pueden formar heterotrímeros y así potenciar sus funciones. También se ha identificado que P2X7B se expresa más que P2X7A en algunos tipos celulares y que desempeña un rol más positivo en el organismo, por lo que los efectos que desencadenarán en las células que los expresan dependerán de los niveles de expresión de cada receptor.⁽¹³⁾

En la actualidad se ha demostrado que ambas isoformas comparten una actividad promotora de tumores, que acelera el crecimiento de las células cancerosas y se asocia con un pobre pronóstico en distintos tipos de cáncer.⁽¹⁴⁾ Otro punto importante, por lo que es relevante el estudio de la expresión de estos receptores es que a raíz del tratamiento quimioterapéutico, se ha reportado que algunos fármacos además de tener efectos directos sobre las células cancerosas también muestran efectos sobre las células del sistema inmune. Las células cancerosas al ser dañadas liberan a circulación y al microambiente tumoral patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), en los que se encuentra el ATP, el cual puede ser reconocido por los receptores purinérgicos, y contribuir a la activación de los linfocitos y eliminación de las células tumorales.⁽¹⁵⁾

Con base a lo anterior, es necesario estudiar la participación de estos receptores en cáncer de mama y su relación con la quimiorresistencia con el fin de evaluar estrategias terapéuticas alternas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar los perfiles de expresión los receptores P2X: P2X7A, P2X7B, P2X1 y P2X4 a nivel de mRNA en células mononucleares de pacientes con cáncer de mama que presentaron o no quimiorresistencia.

Materiales y métodos

Tipo de estudio.

El diseño del estudio fue transversal, descriptivo y comparativo y el tipo de investigación es cuantitativa y observacional. El presente proyecto se llevó a cabo en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de San Luis Potosí y en el Laboratorio de Medicina Molecular y Traslacional del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).

Pacientes.

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” con número 14-17. El muestreo fue no probabilístico por conveniencia, es decir de acuerdo a las características que las pacientes tenían y que las hacían idóneas para el estudio. Se seleccionó a pacientes con diagnóstico de cáncer de mama del servicio de Oncología, con una respuesta adecuada o no a la quimioterapia, y bajo el esquema FAC (5-Fluoruracilo, Adriamicina y Ciclofosfamida) que firmaran su consentimiento informado. Se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia (Q1) y al ciclo número 6 (Q6); el periodo de recolección de muestras fue de 2017-2018, y las muestras se almacenaron a -80°C con RNA later (Thermo Fisher Scientific) hasta su procesamiento. Se trabajó con un total de 19 pacientes, de las cuales 10 fueron clasificadas como quimiorresistentes y 9 como sensibles, obteniendo en total 33 muestras; 18 de la Q1 y 14 de la Q6. Debido a que es una población de difícil acceso y que por motivos de la enfermedad algunas pacientes no logran terminar su tratamiento, no se logró tener ambas muestras de todas las pacientes, por lo que al momento del análisis estadístico se optó por pruebas no pareadas.

La clasificación de las pacientes en las categorías de sensibles o resistentes se realizó por el médico oncólogo, con base en lo establecido por lineamientos y guías aprobadas por la Secretaría de Salud. De manera breve, la evaluación de la respuesta se realiza después de cada ciclo de quimioterapia neoadyuvante, y posterior a la administración de tres a cuatro ciclos, se recomienda evaluar la respuesta clínica y radiológica al tratamiento mediante mastografía y/o ultrasonido. Con base en los resultados, si existe respuesta objetiva se continuará el tratamiento neoadyuvante hasta completarlo, si no hay respuesta o se observan datos de progresión, se sugiere considerar cambio de esquema de quimioterapia por dos a cuatro ciclos más.

Además, se recolectaron muestras de 6 donadoras sanas que no refirieran ninguna enfermedad crónica o aguda que pudiera interferir con la expresión de los receptores purinérgicos, de igual forma que no presentaran sobrepeso u obesidad, para su comparación con el grupo de estudio.

Separación de células mononucleares de sangre venosa periférica (PBMC).

Se trabajó con células mononucleares (PBMC) aisladas de sangre venosa periférica mediante el método de gradiente de densidad por Ficoll Histopaque (Sigma Aldrich). De manera breve, primero se diluyó la sangre con Buffer Salino de Fosfatos (PBS) en una relación 1:1, y se transfirió lentamente a un tubo con Ficoll, para posteriormente centrifugar a 2500 rpm (500xg) por 20 minutos a 25°C. Después, se recuperó el anillo de las PBMC y se realizó un lavado con PBS, para finalmente cuantificar las células en la cámara de Neubauer y evaluar la viabilidad celular por el método de Azul de Tripano.

RT-qPCR.

Se realizó la extracción de RNA total por el método de TRIZOL (Ambion). La síntesis de cDNA se realizó utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems). Para la qPCR se utilizó el termociclador CFX96 (Bio-Rad), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) y los primers específicos para los receptores purinérgicos (P2X1, P2X4, P2X7A y P2X7B), también se utilizó B-Actina como control endógeno (T4 Oligo). Con base en la amplificación de estos, se calculó la expresión relativa mediante el método $2^{-\Delta Cq}$.

Análisis estadístico.

Se aplicó pruebas de normalidad como Shapiro Wilk, para corroborar la distribución de los datos. Para datos no paramétricos se utilizaron las pruebas de U de Mann-Whitney para comparar las diferencias de dos grupos y Kruskal Wallis para comparar la diferencia de más de dos grupos. Para datos paramétricos se utilizó una T de Student no pareada para comparar dos grupos y ANOVA de una vía para la comparación de más de dos grupos. Se trabajó con un nivel de significancia con un valor de $p \leq 0.05$ y con un intervalo de confianza del 95%. Los datos se analizaron en el programa estadístico GraphPad Prism versión 8.0.

Resultados

Características antropométricas y clínicas de la población de estudio.

Para el presente estudio se trabajó con un total de 19 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama; 10 pacientes fueron clasificadas como resistentes y 9 como sensibles a la quimioterapia según se describió en material y métodos. El promedio de edad de las participantes fue de 47.9 ± 9.0 , con un peso corporal promedio de 71.0 ± 21.6 kg y 1.54 ± 0.07 m de talla. De acuerdo al Índice de Masa Corporal (IMC) se clasificó a las pacientes en: normopeso (18.5-24.9), sobrepeso (25-29.9) y obesidad (>30), el IMC promedio fue de 29.6 ± 6.7 kg/m²; 7 participantes presentaban obesidad, 6 con sobrepeso y 6 con normopeso. Por otro lado, la mayoría de las pacientes, es decir 11, se encontraban en un estado premenopáusico y 7 con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2 y 5 pacientes con hipertensión arterial. Tres pacientes refirieron antecedentes heredofamiliares de cáncer, 13 lo negaron y 3 lo desconocían. De las características clínicas de cáncer de mama se registró que la mayoría de las pacientes presentaban el subtipo molecular luminal B (n=6) y una minoría los subtipos triple negativo y luminal A (n= 4); en cuanto al subtipo histológico el más abundante fue el ductal (n=13) y el menor el lobulillar (n=1). El receptor que se encontró positivo en la mayoría de las mujeres fue HER2+ (n=11) y el que menor se presentó fue el receptor de progesterona (n=7). En relación con el tamaño de tumor, la mayoría de las pacientes se encontró en la clasificación T3 (n=9) y la minoría en T2 (n=2).

Respecto al grupo control, este estuvo conformado por 6 mujeres aparentemente sanas, cuyo promedio de edad fue 28.6 ± 5.3 , 57.6 ± 7.6 kg de peso corporal y 1.61 ± 0.08 m de talla. En cuanto a su IMC, todas se encontraron dentro de la categoría de normopeso, con un IMC promedio de 22.12 ± 1.32 .

Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en sujetos control y pacientes con cáncer de mama.

La expresión de los receptores purinérgicos en distintos tipos de cáncer, se ha asociado con la proliferación y desarrollo de tumores y resistencia a los fármacos utilizados en la quimioterapia. En particular P2X7 es de los más estudiados, sin embargo, aún hay muy pocos estudios que evalúen la participación de las distintas isoformas del receptor P2X7 y más aún en cáncer de mama. Por lo que en este trabajo se evaluó la expresión de receptores purinérgicos a nivel de RNAm en las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama comparadas con la expresión en los sujetos control. En la Figura

1 se muestran una disminución en los niveles de la expresión relativa de P2X7B (Fig. 1B), P2X1 (Fig. 1C) y P2X4 (Fig. 1D) comparada a la de los sujetos control ($p=0.0193$, $p=0.0394$ y $p=0.0016$ respectivamente). En contraste, los niveles de P2X7A (Fig. 1A) entre el control y las pacientes con cáncer de mama fueron similares, aunque se observa una expresión ligeramente menor en el grupo de pacientes con cáncer de mama. Por otro lado, se destaca que en los 4 receptores estudiados las pacientes con cáncer de mama presentan una gran heterogeneidad en los niveles de expresión, y en algunas ocasiones los niveles son más bajos a los obtenidos en el grupo control.

Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en sujetos control y en pacientes con cáncer de mama sensibles y resistentes, en la quimioterapia 1 y 6.

Enseguida, se clasificó a las pacientes de acuerdo a su respuesta a la terapia neoadyuvante; sensibles y quimiorresistentes. Después se comparó la expresión de los receptores purinérgicos de las pacientes sensibles o quimiorresistentes tanto en la Q1 como en la Q6. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre la expresión relativa de P2X7A, P2X7B, P2X1 y P2X4 (datos no mostrados) en los dos tiempos de quimioterapia, a pesar de ser evidente que los niveles de expresión de dichos receptores tiende a disminuir en la Q6.

Sin embargo, cuando se comparó con el grupo control, la expresión relativa de los receptores purinérgicos en las pacientes sensibles y resistentes en la Q1 y Q6 vs el grupo de sujetos control, se observó una disminución significativa de P2X7B en el grupo de pacientes resistentes en la Q6 vs el grupo control (Fig. 2B, $p=0.0141$). Para el receptor P2X4 se observó niveles menores en el grupo de las pacientes sensibles en la Q6 (Fig. 2D, $p=0.0111$), también se observó valores disminuidos de P2X4 respecto a los dos grupos de pacientes resistentes, tanto en la Q1 y Q6 (Fig. 2D, $p=0.0023$ y $p=0.0087$, respectivamente) al compararse con el grupo control. Para P2X7A (Fig. 2A) y P2X1 (Fig. 2C) no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de pacientes y los controles, sin embargo, se observa una tendencia a disminuir en las pacientes resistentes.

Expresión de receptores purinérgicos en sujetos control y en pacientes con cáncer de mama con un peso normal, sobrepeso y obesidad.

Debido a que el sobrepeso y la obesidad se consideran estados crónicos inflamatorios de baja intensidad, y que los receptores purinérgicos responden a ATP, un DAMP que se libera en estados de estrés e inflamación, se evaluó si la expresión de dichos receptores pudiera verse afectada en un

escenario inflamatorio como lo es tanto el cáncer de mama como el sobrepeso y la obesidad. En la Figura 3 se clasificó a las pacientes con cáncer de mama de acuerdo a su IMC en tres categorías: normopeso (N), sobrepeso (SP) y obesidad (OB) y se comparó con el grupo control. En cuanto a la expresión de P2X7A (Fig. 3A) y P2X1 (Fig. 3C) no se observaron cambios significativos, sin embargo, comparado con el grupo control hay una tendencia a disminuir la expresión de estos receptores en las pacientes con cáncer de mama independientemente de su IMC. En P2X7B (Fig. 3B) se observó una disminución significativa en los grupos de normopeso y sobrepeso ($p=0.0447$ y $p=0.0483$, respectivamente). El grupo con obesidad (OB) no se observaron diferencias significativas y tendió a mostrar una expresión mayor que los otros dos grupos normopeso (N) y sobrepeso (SP). Finalmente, la expresión relativa de P2X4 (Fig. 3D) se encontró disminuida en los tres grupos de pacientes (N; $p=0.012$, SP; $p=0.0301$ y OB; $p=0.0148$), lo que resulta interesante ya que este receptor es el que se expresa en linfocitos y es muy importante para la activación de dichas células.

Expresión de receptores purinérgicos en pacientes con cáncer de mama sensibles y resistentes de acuerdo al subtipo molecular.

Se ha relacionado al subtipo molecular del cáncer de mama con la agresividad del mismo y la respuesta al tratamiento, por esta razón se analizaron los datos de las pacientes de acuerdo al subtipo Luminal A, Luminal B, HER2+ o Triple negativo en sensibles o resistentes a la quimioterapia. Los resultados obtenidos del análisis muestran una gran variabilidad en cuanto a la expresión relativa de P2X7A, P2X7B, P2X1 y P2X4 (Fig. 4A-4D) y por el número reducido de muestras analizadas no se observó diferencias significativas. Sin embargo, nuevamente se resalta que en el caso de las pacientes resistentes presentaran una tendencia a disminuir la expresión de los 4 receptores purinérgicos estudiados.

Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en pacientes con cáncer de mama y diabetes mellitus tipo 2.

Dada la estrecha relación entre la obesidad y la DM2, y por ende con los procesos inflamatorios, se procedió a agrupar a las participantes que además de tener cáncer de mama presentaran diagnóstico de DM2 y comparar la expresión de los receptores con aquellas que solo contaran con diagnóstico de cáncer de mama. Como se puede observar en la Figura 5 (Fig. 5A-5D), los 4 receptores no mostraron cambios significativos entre los dos grupos de estudio, los niveles de expresión relativa son muy parecidos entre sí.

Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en pacientes con cáncer de mama de acuerdo al tamaño del tumor.

Se agruparon las participantes de acuerdo a la clasificación del tamaño de tumor, para verificar si esta condición pudiera influir en la expresión relativa de los receptores purinérgicos en PBMC. Sin embargo, no se observó diferencias entre los distintos grupos de pacientes para la expresión de P2X7A (Fig. **6A**), P2X7B (Fig. **6B**), P2X1 (Fig. **6C**) y P2X4 (Fig. **6D**). No obstante, aquellos pacientes en el grupo T3 es el que presenta una expresión más elevada de los 4 receptores, seguido por el grupo T4 y finalmente el grupo T2.

Discusión

Los linfocitos T y otras células del sistema inmune desarrollan mecanismos efectores que ayudan en el control de la proliferación de las células cancerosas evitando así, la formación de tumores sólidos.

⁽¹⁶⁾ Las estrategias terapéuticas empleadas en oncología, van encaminadas a eliminar no solamente a las células cancerosas, sino también en generar una adecuada respuesta inmune en contra de las células malignas.⁽¹⁷⁾

Por lo anterior, en el presente trabajo se investigó el rol de los receptores purinérgicos cuya función se ha descrito en la activación de los linfocitos T. Es importante resaltar que hasta el momento los resultados del presente estudio son los primeros que se centran en los cambios en la expresión de los receptores purinérgicos a nivel de mRNA relacionados a la quimiorresistencia en cáncer de mama. Se encontró la expresión relativa de P2X7B, P2X1 y P2X4 disminuida en las pacientes con cáncer de mama respecto al grupo control. Además, se hizo el análisis de los datos en grupos de pacientes sensibles o quimiorresistentes en los tiempos de Q1 y Q6. Es así que se pudo detectar una disminución significativa de P2X7B en el grupo de quimiorresistentes en la Q6 comparado con el grupo control. Resulta interesante correlacionar los resultados de este trabajo con datos previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación, donde se reportó un aumento significativo de P2X7 en los linfocitos T CD8+ de pacientes con cáncer de mama sensibles a la quimioterapia y como en el grupo de quimiorresistentes no se observó cambios.⁽¹⁸⁾ La diferencia podría atribuirse a la presencia de las isoformas de P2X7; P2X7A y P2X7B y cuya expresión es mayor en células sanguíneas con funciones diferentes ⁽¹²⁻¹³⁾. Nuestro trabajo encontró diferencias en la expresión de estas isoformas a nivel de RNAm aunque es importante remarcar que es necesaria la evaluación a nivel de proteína y en subpoblación de linfocitos T CD8+, T CD4+ y monocitos.

Se ha descrito la participación de las isoformas de P2X7 en pacientes con leucemia mieloide aguda, con niveles altos de P2X7B en los resistentes a la quimioterapia y propensos a la recaída, mientras que aquellos que expresan niveles más altos de la isoforma A presentaron una mejor respuesta a antraciclinas como danorrubicina.⁽¹⁴⁾ La danorrubicina induce la liberación de ATP en el microambiente tumoral, por el daño a las células malignas,⁽¹⁹⁾ por lo que la concentración de ATP en el micromedioambiente tumoral puede tener implicaciones distintas en las células cancerosas o en las células inmunes. Un mecanismo propuesto para la isoforma A de P2X7 es facilitar la entrada de los fármacos por la apertura del macroporo en la membrana y en contraste la isoforma P2X7B al carecer

de esta función protege a las células cancerosas evitando la entrada de danorrubicina. En lo que respecta a nuestros resultados y en otro escenario distinto, no se encontró cambios significativos en la expresión de P2X7A, sin embargo, los pacientes sensibles tienden a presentar niveles más altos de este receptor los cuales disminuyen en la Q6, y como los pacientes quimiorresistentes tienen niveles más bajos de la isoforma A con la administración de la quimioterapia. La isoforma P2X7B mostró un comportamiento similar a la isoforma A; tendencia a disminuir su expresión en los grupos de pacientes con cáncer de mama en los quimiorresistentes en la Q6. Estos resultados muestran la expresión de los receptores purinérgicos en células mononucleares de sangre venosa periférica, por lo que están acordes a su participación en los linfocitos T en el escenario de cáncer de mama, donde estos patrones de expresión modificarían su función antitumoral. La isoforma P2X7A mostraría un efecto negativo ya que posterior a la activación con ATP por un periodo corto de tiempo (2s), actúa como un canal iónico no selectivo que facilita el flujo de iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ ; mientras que su estimulación prolongada (4s) genera la formación de un macroporo en la membrana permeable a moléculas mayores a 900 Da,⁽²⁰⁾ conduciendo a procesos apoptóticos en los linfocitos. En el caso de P2X7B, al solo poseer la función de canal iónico, tendría como resultado una potenciación en la activación de los linfocitos así como su proliferación, favoreciendo su acción antitumoral al trasladarse de circulación al microambiente tumoral; por lo que es coherente su disminución en las pacientes quimiorresistentes.

Otro hallazgo interesante es en los receptores P2X4 y P2X1 tanto en las pacientes sensibles como en las quimiorresistentes. Estos resultados serían relevantes debido a que ambos receptores también son importantes en la activación de los linfocitos con la liberación de ATP por parte de los canales panexina-1 en la sinapsis inmunológica. P2X4 y P2X1 presentan una función de canal iónico y permiten el influjo de Ca^{2+} lo que genera la activación del factor de transcripción NFAT.⁽²¹⁾ Por lo tanto, la disminución en la expresión de ambos receptores podría afectar a los linfocitos T por la administración de los medicamentos utilizados en la quimioterapia y esto a su vez modificar la respuesta de las pacientes a este tratamiento. La infiltración de células inmunes al microambiente tumoral es un evento benéfico por la actividad antitumoral, incluso la cantidad de este infiltrado inmune sirve como factor pronóstico y puede ser un indicador del éxito de las estrategias terapéuticas, así como de la posible recurrencia o remisión de la enfermedad.⁽²²⁾

Por otro lado, el sobrepeso y la obesidad, son eventos inflamatorios crónicos de baja intensidad por lo que son un factor de riesgo importante para el desarrollo de distintos tipos de malignidades incluyendo el cáncer de mama; lo que en conjunto proporciona un escenario inflamatorio, que contribuye a la

inestabilidad genómica, modificaciones epigenéticas, proliferación y diseminación de las células cancerosas.⁽²³⁾ En nuestra población de pacientes con cáncer de mama al observar que la mayoría de ellas presentaba sobrepeso y obesidad (68.3%) se realizó el análisis en aquellas pacientes con un IMC mayor a 25 y los niveles de los receptores purinérgicos. Datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo, muestran como la expresión a nivel de proteína de P2X1 disminuye en linfocitos T CD4+ de sujetos con un IMC ≤ 25 ,⁽²⁴⁾ lo cual concuerda con lo que se encontró en el presente trabajo a nivel de RNAm en PBMC. Sin embargo, para P2X4 en ese mismo estudio se reportaron niveles más altos en los sujetos con un IMC ≤ 25 y menor en aquellos con un peso normal, contrario a lo que se encontró en el presente trabajo. Esto puede deberse a que en las pacientes con cáncer de mama se presentan múltiples disfunciones en el organismo y expuestas a la quimioterapia que podría modificar el proceso inflamatorio causado por el sobrepeso u obesidad. Además, la quimioterapia podría alterar también la expresión de los receptores purinérgicos, sin embargo, esto es algo que aún se desconoce, ya que en la actualidad no hay estudios que evalúen el posible efecto que los fármacos tendrían sobre la función y expresión de estos receptores en PBMC.

El cáncer de mama se puede clasificar por la presencia o ausencia de receptores como el de estrógenos (ER), progesterona (PR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu), así como el marcador de proliferación celular Ki67. Lo anterior, permite la elección del tratamiento a emplear, así como prever una respuesta favorable o desfavorable a la quimioterapia.⁽²⁵⁾ El subtipo molecular del tumor de mama puede ser indicio de la respuesta que presentará la paciente a la quimioterapia, siendo el triple negativo el de peor pronóstico y el Luminal A esta asociado a un mejor pronóstico.⁽²⁶⁾ Al momento de comparar la expresión de los receptores de acuerdo al subtipo molecular de las pacientes, se observó una gran variabilidad en la expresión de los mismos, sin llegar a observarse diferencias significativas. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran para que el P2X7 a nivel de proteína no presenta una asociación con los subtipos Triple negativo, HER2+ y Luminal B,⁽¹⁸⁾ por lo que aún es desconocido si estos receptores pueden influir en la respuesta al tratamiento en cáncer de mama dependiendo del subtipo molecular del tumor. Sin embargo, en nuestros resultados pareciera que las pacientes quimiorresistentes presentan niveles más bajos de P2X7A, P2X7B, P2X1 y P2X4 por lo que será relevante incluir un número mayor de pacientes para demostrar la posible asociación entre el subtipo molecular con los niveles de los receptores purinérgicos.

La Diabetes Mellitus tipo 2 es una de las enfermedades crónico degenerativas más comunes en la población mexicana, y al igual que el sobrepeso y la obesidad tiene un componente inflamatorio muy importante, además de que la coexistencia de DM2 y cáncer de mama puede alterar los regímenes de tratamiento y la toxicidad de la quimioterapia, lo que afecta negativamente el pronóstico de las pacientes.⁽²⁷⁾ Se evaluó la expresión de los receptores purinérgicos en las pacientes que además de cáncer de mama tenían diagnóstico de DM2, los resultados mostraron niveles de expresión muy parecidos en ambos grupos, lo que tiene relación con datos obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo, en donde se observó que la expresión de P2X7 a nivel de proteína en pacientes con cáncer de mama y DM2 no presentan una alteración en su expresión.⁽¹⁸⁾ Para P2X7B, P2X1 y P2X4 sería interesante investigar su expresión a nivel de proteína en los linfocitos T CD8+ y CD4+ y corroborar si se observan cambios que permitieran dilucidar el posible papel de estos receptores en cáncer de mama.

Otro dato importante a tomar en cuenta y que es un factor pronóstico para las pacientes con cáncer de mama, es el tamaño del tumor, ya que puede ser de ayuda para la elección del tratamiento, indicio del riesgo de metástasis e incluso de la proliferación de las células malignas.⁽²⁸⁾ Por esto se analizó la expresión de P2X7A, P2X7B, P2X1 y P2X4 de acuerdo al tamaño del tumor de las pacientes, obteniendo cambios no significativos. Sin embargo, resulta interesante observar como en el caso donde el tumor medía más de 5 cm (T3) los niveles de expresión de los 4 receptores parecía ser mayor, el mecanismo y la posible implicación de estos resultados aún no está descrito y el cual podría ser explorado en estudios futuros. En lo que respecta a P2X7, anteriormente nuestro equipo de trabajo reporto un aumento en los niveles de este receptor en linfocitos T CD8+ provenientes de pacientes con un tamaño de tumor inicial menor o igual a 5 cm,⁽¹⁸⁾ como se mencionó anteriormente en el presente estudio los niveles más altos tanto de P2X7A como de P2X7B se encontraron en las pacientes que pertenecían a la categoría T3, estas diferencias pueden deberse a que en algunas ocasiones la expresión a nivel de RNAm y proteína de una molécula no siempre es la misma y los contextos pueden tener implicaciones distintas.

Los resultados del presente estudio nos permitieron generar información de la posible participación de los receptores purinérgicos en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el cáncer de mama. Sin embargo, se deberá generar nuevas estrategias para evaluar la expresión y función de estos receptores y su posible modulación o regulación en las distintas subpoblaciones de linfocitos.

Conclusiones

En el presente estudio, se analizó la participación de las isoformas P2X7A y P2X7B y los receptores P2X1 y P2X4 en cáncer de mama como posibles biomarcadores e indicadores de la respuesta a los fármacos utilizados en la quimioterapia en el esquema FAC. Estos receptores pueden proporcionar información importante en el contexto de la sensibilidad o quimiorresistencia que las pacientes presentan frente a la quimioterapia, ya que en la mayoría de las pacientes quimiorresistentes presentaban niveles de expresión aún más bajos de P2X7A, P2X7B, P2X1 y P2X4 respecto a las pacientes sensibles. Además, se pudo evidenciar como los desórdenes metabólicos e inflamatorios, como lo son el sobrepeso y la obesidad pueden influir también en los patrones de expresión de estos receptores, lo cual a su vez tener un impacto en la respuesta al tratamiento de quimioterapia.

Referencias

1. Organización mundial de la salud (OMS). Cáncer de mama: prevención y control. Enero del 2020. [consultado 19-07-21]. Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
2. Organización panamericana de la salud (OPS). Cáncer de mama. 2019. [consultado 20-07-21]. disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5041:2011-breast-cancer&Itemid=3639&lang=es
3. Organización mundial de la salud (OMS). Cáncer. Enero del 2020. [consultado 20-07-21]. Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
4. Castrezana campos MR. Geografía del cáncer de mama en México. Investigaciones Geográficas Núm. 93 Agosto 2017.
5. Leung MH, Tsoi H, Gong C, et al. A splice variant of NCOR2, BQ323636.1, confers chemoresistance in breast cancer by altering the activity of NRF2. *Cancers* 12, 533; 2020.
6. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cáncer. *Purinergic Signalling*; 9:491–540, 2013.
7. Lazarowski ER, et al. Vesicular and Conductive Mechanisms of Nucleotide Release. *Purinergic Signal*; 8(3):359-73. Sep 2012.
8. Fredholm B, IJzerman A, Jacobson K, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update. *Pharmacol Rev*; 63(1):1-34. Mar 2011.
9. Burnstock G. Purinergic Signalling: From Discovery to Current Developments. *Exp Physiol*; 99(1):16-34. Jan 2014.
10. Antonio LS 1, Stewart A, Varanda WA. Identification of P2X2/P2X4/P2X6 Heterotrimeric Receptors Using Atomic Force Microscopy (AFM) Imaging. *FEBS Lett*, 588(12):2125-8. Jun 2014.
11. Wéra O, Lecut C, Servais L, et al. P2X1 ion channel deficiency causes massive bleeding in inflamed intestine and increases thrombosis. *J Thromb Haemost*. 00:1–13, 2019.
12. Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC, et al. Identification and Characterization of Splice Variants of the Human P2X7 ATP Channel. *Biochem Biophys Res Commun*; 332(1):17-27, Jun 2005.

13. Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, et al. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J*; 24(9):3393-404, Sep 2010.
14. Pegoraro A, Orioli E, De Marchi E, et al. Differential sensitivity of acute myeloid leukemia cells to daunorubicin depends on P2X7A versus P2X7B receptor expression. *Cell Death Dis* 18;11(10):876, Oct 2020.
15. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, 14;28(6):690-714. Dec 2015.
16. Schreiber R, Old L, Smyth M. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 25;331(6024):1565-70. Mar 2011.
17. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*; 6(10):715-27. Oct 2006.
18. Ruiz-Rodríguez VM, Turiján-Espinoza E, Guel-Pañola JA, et al. Chemoresistance in Breast Cancer Patients Associated With Changes in P2X7 and A2A Purinergic Receptors in CD8+ T Lymphocytes. *Front Pharmacol*; 11: 576955. 2020.
19. Lecciso M, Ocadlikova D, Sangaletti S, et al. ATP Release from Chemotherapy-Treated Dying Leukemia Cells Elicits an Immune Suppressive Effect by Increasing Regulatory T Cells and Tolerogenic Dendritic Cells. *Front Immunol*, 22;8:1918. Dec 2017.
20. Lara R, Adinolfi E, Harwood C, et al. P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Front Pharmacol*, 4;11:793. Jun 2020.
21. Woehrle T, Yip I, Elkhail A, et al. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 4;116(18):3475-84. Nov 2010.
22. Gajewski T, Schreiber H, Fu Y. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*; 14(10):1014-22, Oct 2013.
23. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*, 1;32(19-20):1267-1284. Oct 2018.
24. Ruiz-Rodríguez VM, Cortes-García JD, Briones-Espinoza MJ. P2X4 Receptor as a Modulator in the Function of P2X Receptor in CD4+ T Cells From Peripheral Blood and Adipose Tissue. *Mol Immunol*; 112:369-377, Aug 2019.
25. Al-Thoubaity FK. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Ann Med Surg (Lond)*. 49:44-48; 2019.

26. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, et al. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers, 23;5(1):66. Sep 2019.
27. Zhao X, Ren G. Diabetes mellitus and prognosis in women with breast cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore) ;95(49):e5602, Dec 2016.
28. Foulkes W, Reis-Filho J, Narod S. Tumor size and survival in breast cancer--a reappraisal. Nat Rev Clin Oncol, 7(6):348-53. Jun 2010.

Pie de figuras

Figura 1. Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en sujetos control y pacientes con cáncer de mama.

El RNAm de los receptores purinérgicos se midió mediante qPCR y mediante el método de 2^{-dCq} . **A)** expresión relativa de P2X7A, **B)** P2X7B, **C)** P2X1 y **D)** P2X4 en las pacientes con cáncer de mama comparados con la expresión en los sujetos control. Los datos son presentados como promedio \pm DS, se realizó una T de Student no pareada y se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. CAMA= cáncer de mama.

Figura 2. Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en sujetos control y en pacientes con cáncer de mama sensibles y resistentes, en la quimioterapia 1 y 6.

Se representa la **A)** expresión relativa de P2X7A, **B)** P2X7B, **C)** P2X1 y **D)** P2X4 en las pacientes con cáncer de mama que eran sensibles y resistentes al tratamiento, medidos en la quimioterapia 1 (Q1) y la quimioterapia 6 (Q6) comparados con la expresión en los sujetos control. Los datos son presentados como promedio \pm DS, se realizó una ANOVA de una vía para P2X7A, P2X7B y P2X4. Los datos son presentados como mediana más rango intercuartílico, se realizó un Test de Kruskal Wallis en el caso de P2X1. Se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa. ** $p \leq 0.01$

Figura 3. Expresión de receptores purinérgicos en sujetos control y en pacientes con cáncer de mama con un peso normal, sobrepeso y obesidad.

Se analizó el RNAm de los receptores purinérgicos mediante el método de 2^{-dCq} . **A)** expresión relativa de P2X7A, **B)** P2X7B, **C)** P2X1 y **D)** P2X4 en las pacientes con cáncer de mama agrupadas de acuerdo a su índice de masa corporal y comparadas con la expresión en los sujetos control. Los datos son presentados como promedio \pm DS, se realizó una ANOVA de una vía. Se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. N= normopeso, SP= sobrepeso y OB= obesidad.

Figura 4. Expresión de receptores purinérgicos en pacientes con cáncer de mama sensibles y resistentes de acuerdo al subtipo molecular.

Se representan los niveles de RNAm de los receptores purinérgicos y mediante análisis por el método de 2^{-dCq} . **A)** expresión relativa de P2X7A, **B)** P2X7B, **C)** P2X1 y **D)** P2X4 en las pacientes con cáncer de mama agrupadas de acuerdo a la clasificación molecular. Los datos son presentados como

mediana más rango intercuartílico, se realizó un Test de Kruskal Wallis. Se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa. S= sensibles, R= resistentes.

Figura 5. Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en pacientes con cáncer de mama y diabetes mellitus tipo 2.

Se presenta el RNAm de los receptores purinérgicos utilizando los primers específicos para cada receptor. **A)** expresión relativa de P2X7A, **B)** P2X7B, **C)** P2X1 y **D)** P2X4 en las pacientes con cáncer de mama comparados con la expresión en las pacientes que además estaban diagnosticadas con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Los datos son presentados como promedio \pm DS, se realizó una T de Student no pareada y se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa. CAMA= cáncer de mama. Cuadro negro= Normopeso, Rojo= Sobrepeso, Azul= Obesidad.

Figura 6. Expresión de receptores purinérgicos a nivel de mRNA en pacientes con cáncer de mama de acuerdo al tamaño del tumor.

El RNAm de los receptores purinérgicos se evaluó mediante qPCR y el método de 2^{-dCq} . **A)** expresión relativa de P2X7A, **B)** P2X7B, **C)** P2X1 y **D)** P2X4 en las pacientes con cáncer de mama agrupadas de acuerdo a la clasificación del tamaño del tumor. Los datos son presentados como mediana más rango intercuartílico, se realizó un Test de Kruskal Wallis para P2X7A, P2X7B y P2X1. Los datos son presentados como promedio \pm DS, se realizó una ANOVA de una vía en el caso de P2X4. Se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa.

Tabla 1. Características antropométricas y clínicas de las pacientes con cáncer de mama.

Pacientes n	19		Controles n	6
	Sensibles	Resistentes		
	n=9 (47.4%)	n=10 (52.6%)		
Edad (años)	47.95 ±9.03		28.67±5.32	
Peso (Kg)	71.04 ±21.60		57.67±7.66	
Talla (M)	1.54 ±0.07		1.61±0.08	
IMC (Kg/m²)	29.61 ±6.73		22.12±1.32	
	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	Normopeso
	23.7 ±0.63	27.8 ±1.74	36.2 ±6.72	N= 6 (100%)
	n=6 (31.5%)	n=6 (31.5%)	n=7 (36.8%)	
Estado menopáusico	Premenopáusico	Postmenopáusico		
	11 (57.9%)	8 (42.10%)		
Diabetes Mellitus 2	7 (36.8%)			
Hipertensión arterial	5 (26.3%)			
Antecedente familiar de cáncer	Si	Negado	Desconocido	
	3 (15.7%)	13 (68.4%)	3 (15.7%)	
Subtipo molecular	Luminal A	Luminal B	HER 2+	Triple negativo
	4 (21%)	6 (31.57)	5 (26.3%)	4 (21%)
Receptor histológico	Estrógeno	Progesterona	HER2	
	Positivo	Positivo	Positivo	
	10 (52.6%)	7 (36.9%)	11 (57.9%)	
	Negativo	Negativo	Negativo	
	9 (47.4%)	12 (63.1%)	8 (42.1%)	
Subtipo histológico	Ductal	Lobulillar	Otros	
	15 (83.3%)	1 (5.5%)	2 (11.1%)	
Estadio de diagnostico	II	III	Desconocido	
	3 (15.7%)	13 (68.4%)	3 (15.7%)	
Tamaño del tumor	T2	T3	T4	
	2 (10.5%)	9 (47.3%)	8 (42.1%)	

Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar y porcentaje. Kg= Kilogramos, M= Metros, IMC= índice de Masa Corporal, Kg/M²= Kilogramos/metro cuadrado.

Figuras

Figura 1.

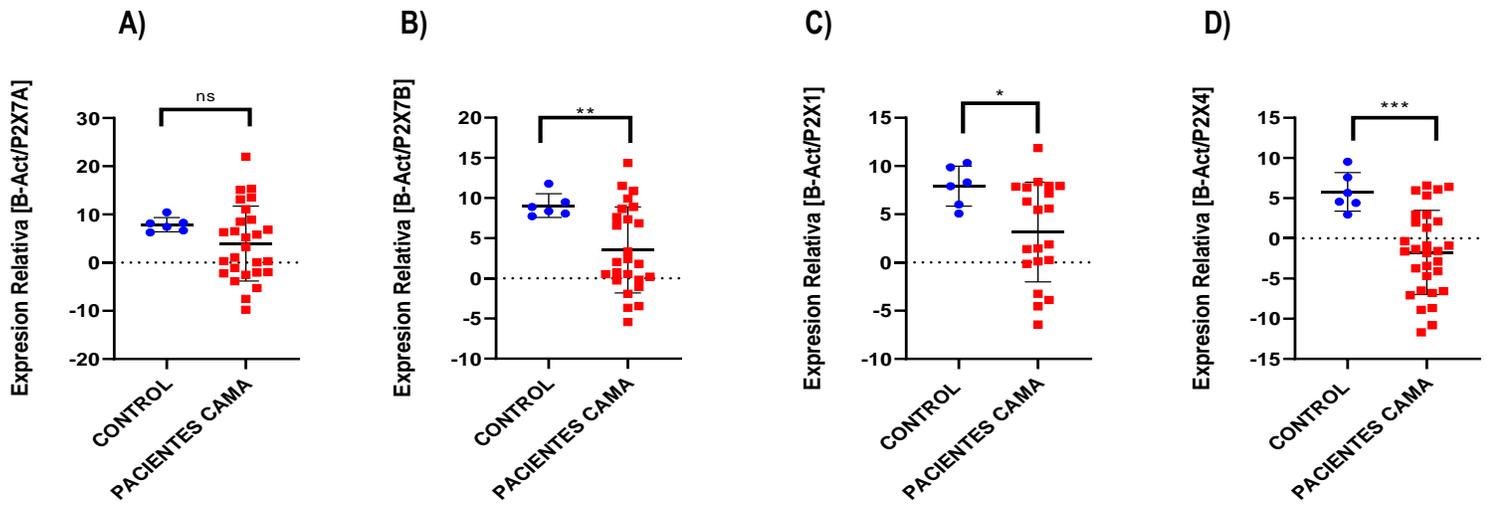


Figura 2.

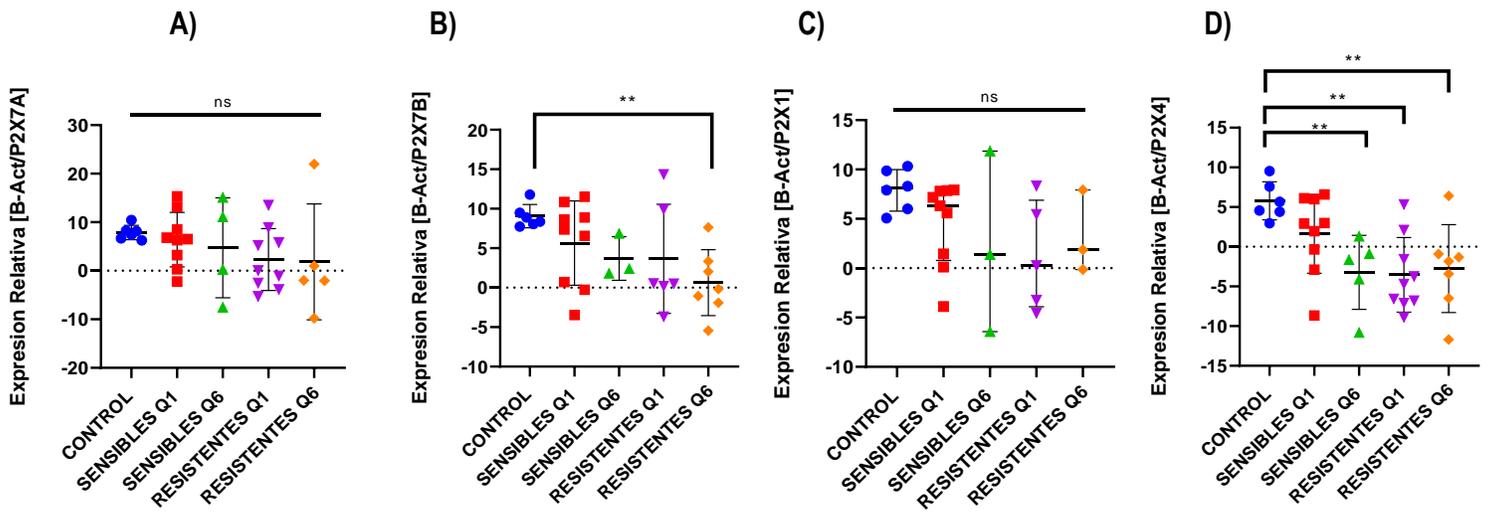


Figura 3.

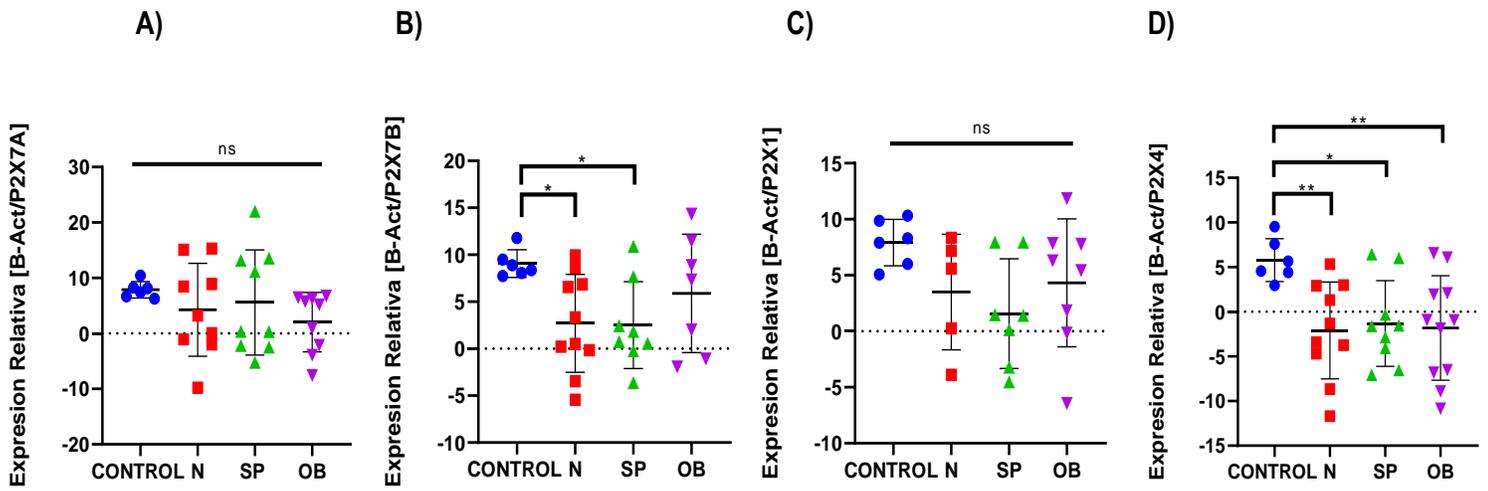


Figura 4.

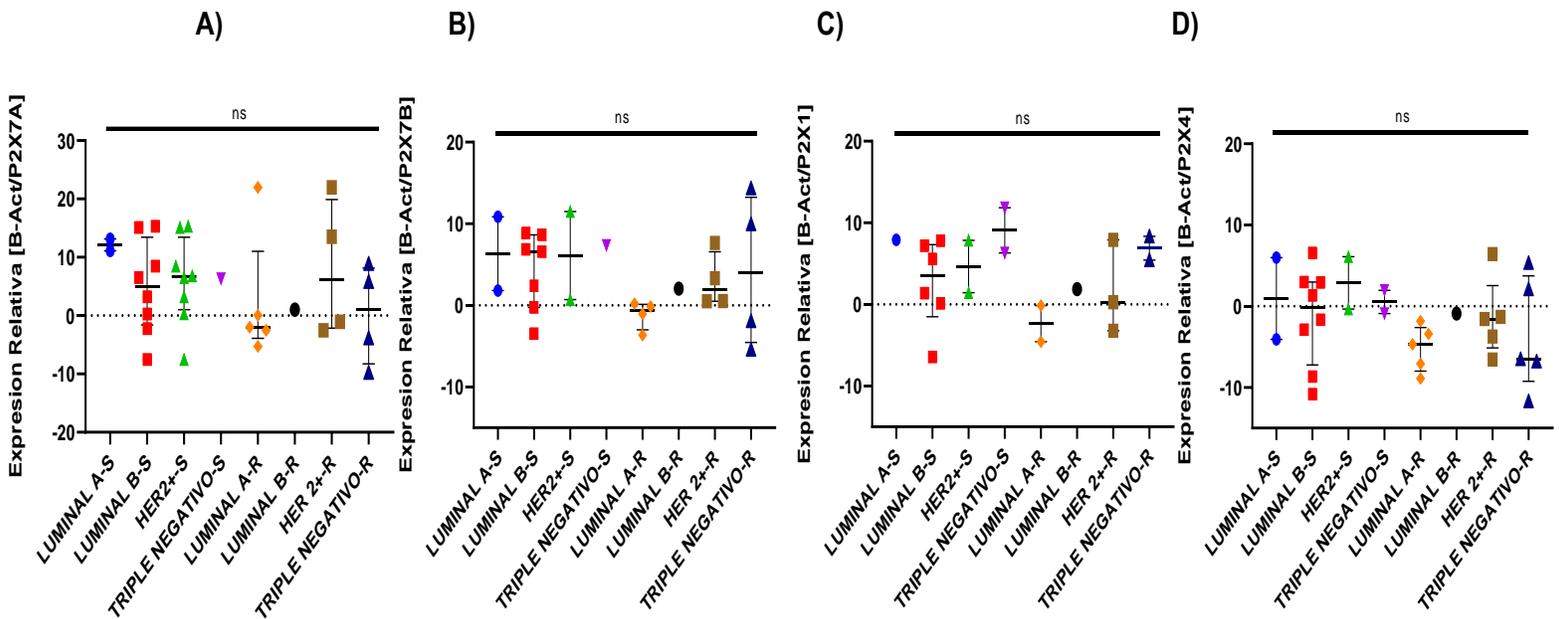


Figura 5.

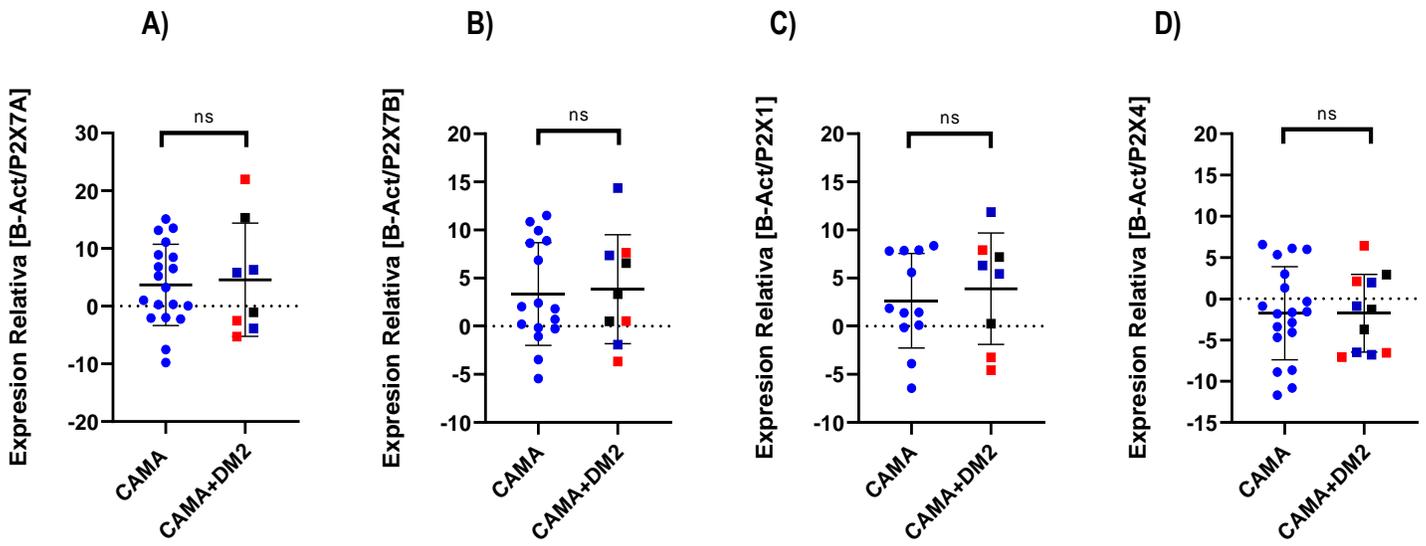


Figura 6.

