

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Evaluación de un derivado de la Adenosina sobre la metástasis
ósea inducida por el cáncer de mama**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Citlalli Oyuki Mendoza Chacón

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Citlalli Oyuki Mendoza Chacón

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas

Dra. Nora Gabriela Velasco Loyden

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Citlalli Oyuki Mendoza Chacón** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Evaluación de un derivado de la Adenosina sobre la metástasis ósea inducida por el cáncer de mama

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

El cáncer de mama (CM) es considerado como el tipo de cáncer con mayor incidencia y la principal causa de muerte en mujeres en el mundo. Cuando el cáncer está avanzado y ha migrado a otros órganos y específicamente a los huesos, se conoce como metástasis ósea. Los tratamientos actuales ofrecen a los pacientes un panorama favorable cuando el cáncer está en estadio temprano; sin embargo, aún no existe una terapia que cure la metástasis ósea. La adenosina y sus derivados han demostrado su potencial en la regulación del crecimiento tumoral y la supervivencia de las células cancerosas. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial anticancerígeno de un derivado de la adenosina (IFC 305) sobre células de cáncer de mama 4T1 *in vitro* mediante ensayos de proliferación, migración, ciclo celular y apoptosis; así mismo, su efecto en un modelo *in vivo* de metástasis ósea. Los datos demuestran que el fármaco IFC 305 disminuye la proliferación y migración de la línea celular 4T1 dependiendo de la concentración utilizada. Por otro lado, no induce apoptosis a las 24 horas de tratamiento, pero sí un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Sin embargo, el tratamiento con IFC 305 de ratones con metástasis ósea, no tuvo efecto en la disminución de las lesiones osteolíticas. Estudios futuros son necesarios para optimizar la dosis y tratamiento necesario para el modelo *in vivo*. En conclusión, nuestro trabajo demostró el potencial anticancerígeno del IFC 305 en ensayos *in vitro*, a través de la inhibición del crecimiento celular y la migración de las células cancerígenas, y sienta las bases para futuros estudios *in vivo* que demuestren su potencial terapéutico para el tratamiento de la metástasis ósea causada por el cáncer de mama.

Palabras clave: cáncer de mama, tratamientos, derivado de adenosina, metástasis

Abstract of the thesis presented by **Citlalli Oyuki Mendoza Chacón** as a partial requirement to obtain the Master of science degree in Science of Life with orientation in Biomedical innovation and Bionanotechnology.

Evaluation of an Adenosine derivative on breast cancer induced bone metastases

Abstract approved by:

PhD. Patricia Juárez Camacho
Thesis Director

Breast cancer is the type of cancer with the highest incidence and the leading cause of death in women due to this condition. When cancer cells migrate to other organs, especially bones, it is known as bone metastasis. Although the prognosis for some patients may be favorable due to early detection and treatment, there is still no therapy to cure bone metastasis by breast cancer. Adenosine and its derivatives have demonstrated their relevance in controlling proliferation, immune response, and apoptosis in different types of cancer. In this project, the anticancer potential of the drug IFC 305, a derivative of adenosine, on bone metastasis induced by breast cancer was evaluated both *in vitro* and *in vivo*. To evaluate the effect of IFC 305 on cell proliferation and migration of the 4T1 murine breast cancer cell line, the MTT assay and wound healing assay were used, respectively. The drug inhibited the proliferation and migration of 4T1 cells in a dose-dependent manner. To understand the underlying mechanism, apoptosis and the cell cycle were analyzed by flow cytometry. Results showed that after 24 hours of exposure to the drug, the effect on apoptosis is minimal. However, it was found that 4T1 cells were arrested in the G0/G1 phase of the cell cycle. However, IFC 305 treatment of mice with bone metastasis did not reduce osteolytic lesions. Future studies are necessary to optimize the dose and treatment necessary for the *in vivo* model. In conclusion, our work demonstrates the anticancer potential of IFC 305 on *in vitro* assays, through the inhibition of cell growth and migration of cancer cells. These studies seed the bases for future *in vivo* studies that demonstrate the IFC 305 therapeutic potential for the treatment of bone metastasis caused by breast cancer.

Keywords: Breast cancer, treatments, adenosine derivate, metastasis

Dedicatoria

Para las personas que han sido un rayo de luz en la oscuridad, gracias por ayudarme a abrir mis alas y dejarme volar.

Para todos los que me han apoyado a lo largo de este camino. Especialmente para aquellos que han permanecido conmigo a pesar de las circunstancias.

Para mi hermana, cualquier complicación luce más sencilla cuando veo la dulzura de tus actos.

Para mi familia, gracias por creer en mí.

A ti, que fuiste y serás una estrella brillante en mi cielo nocturno.

Para la máxima expresión de amor y sabiduría. De ti, por ti y para ti; nunca dejes de asombrarme.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por darme la oportunidad de pertenecer a este programa de posgrado y especialmente, al Departamento de Innovación Biomédica (DIB), por permitirme usar las instalaciones para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría a través del número de registro 1134640 dentro del programa de becas de posgrado.

Al laboratorio 305-Sur del Instituto de Fisiología Celular (IFC) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), dirigido por la Dra. Chagoya, por proveerme amablemente el fármaco IFC-305, que fue de vital importancia para este proyecto de investigación.

A los miembros que conforman el comité de tesis: A la Dra. Victoria Chagoya y la Dra. Gabriela Velasco por brindarme amablemente la molécula para realizar este trabajo, sus sugerencias y su completa disposición para atender mis dudas; a la Dra. Meritxell Riquelme, gracias por sus valiosos comentarios, sus dudas y sus puntuales observaciones que enriquecieron este proyecto; al Dr. Eugenio Méndez, gracias por sus preguntas de perspectiva, su paciencia, su apoyo e interés.

A la Dra. Patricia Juárez Camacho. Gracias por aceptarme en su grupo de investigación y creer en mí. Le agradezco su entusiasmo, su orientación y todo su apoyo a lo largo de este trayecto.

Al Dr. Pierrick Fournier, por su apoyo para realizar los ensayos de citometría de flujo, por compartirme su conocimiento e instruirme durante la realización de los experimentos *in vivo*. A la Dra. Johanna Bernáldez, por la capacitación brindada en cuarto de cultivo celular y por atender mis dudas. También al Dr. Felipe Olvera, por su apoyo para la obtención de las radiografías utilizadas en este trabajo.

A mis compañeros del PnP Lab con los que tuve el placer de coincidir. Gracias por apoyarme con mis dudas, ser amables y pacientes conmigo, y hacer del aprendizaje algo que se disfruta.

A Alcira, Brenda, Tonatzin, Sharlin, Hugo y Kev. Gracias por acobijarme y acompañarme en este trayecto; por nuestras pláticas de ciencia y de la vida, por su apoyo brindado dentro y fuera de

laboratorio, y porque hicieron de mi estancia en Ensenada una experiencia que atesoro en mi corazón.
¡Qué vivan los waffles, el atole y las acuarelas!

A los amigos que hice durante este trayecto, especialmente a David. Gracias por tu apoyo dentro y fuera de laboratorio, por tu confianza depositada en mí y sobre todo, por tu amistad.

A mis amigos de toda la vida (los que están y los que se han ido), gracias por creer en mí e impulsarme a descubrir nuevos horizontes. Especialmente a Helena, gracias por tu apoyo y amistad a lo largo de tantos años.

A mis padres, gracias por su incondicional apoyo a lo largo de mis años de estudio y abrazar mis sueños tanto como lo hago yo.

A mi familia, gracias por creer en mí siempre.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Cáncer de mama.....	2
1.1.2 Metástasis	2
1.1.3 Metástasis ósea del cáncer de mama y sus tratamientos	4
1.1.4 Adenosina: síntesis y funciones biológicas.....	6
1.1.5 Receptores celulares de la adenosina.....	7
1.1.6 Adenosina y sus derivados	8
1.1.6.1 Adenosina, análogos y el cáncer	9
1.1.6.2 Derivado de la adenosina y su potencial clínico	10
1.2 Justificación.....	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	11
Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Cultivo celular.....	12

2.1.1	Preparación del fármaco IFC 305	12
2.2	Ensayos de actividad celular	12
2.2.1	Curvas de crecimiento celular	12
2.2.2	Proliferación celular	13
2.2.3	Migración celular.....	13
2.2.4	Ensayo de apoptosis.....	14
2.2.5	Ciclo celular	14
2.3	Evaluación en un modelo in vivo de metástasis ósea	15
2.3.1	Preparación de las células	16
2.3.2	Inoculación intracardiaca	16
2.3.3	Tratamiento con fármaco IFC 305.....	16
2.3.4	Colecta de tejidos	17
2.4	Análisis estadístico	17
Capítulo 3.	Resultados	18
3.1	Curva de crecimiento de la línea celular 4T1	18
3.2	Evaluación de la viabilidad y proliferación celular	18
3.2.1	El fármaco IFC 305 disminuye la proliferación celular dependiendo de la concentración	18
3.3	Evaluación del fármaco IFC 305 sobre la migración celular	20
3.3.1	IFC 305 a diferentes concentraciones inhibe la migración celular a las 24 horas.....	20
3.4	Efecto del fármaco IFC 305 en la inducción de apoptosis.....	20
3.4.1	El fármaco IFC 305 no induce apoptosis en la línea celular 4T1 a las 24 horas de tratamiento	20
3.5	Evaluación del fármaco IFC 305 sobre el ciclo celular.....	22
3.5.1	El fármaco IFC 305 incrementa el número de células en la fase G0/G1 dependiendo de la concentración.....	22
3.6	Evaluación del fármaco IFC 305 en un modelo murino	24

Capítulo 4. Discusión.....	26
4.1 Ensayos <i>in vitro</i>	26
4.2 Modelo in vivo.....	28
Capítulo 5. Conclusiones	30
Capítulo 6. Literatura citada	31

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Principales eventos en la cascada metastásica. Las células del tumor primario pierden la cohesión intracelular y migran a través de los vasos sanguíneos, resistiendo las diferentes tensiones ocasionadas por el flujo de sangre. Finalmente, salen del torrente y se adaptan al nuevo microambiente para colonizar el órgano distante. Modificado de Fares et al., 2020...	3
Figura 2. Círculo vicioso de la metástasis ósea osteolítica. Las células liberan factores, principalmente PTHrP, involucrado en la osteoclastogénesis. Estos factores incrementan la expresión de RANKL, que induce la formación de hueso y la reabsorción. La reabsorción ósea libera factores de crecimiento que inducen el incremento de PTHrP por las células de cáncer, asegurando el crecimiento del tumor. Modificado de Kingsley et al., 2007.	5
Figura 3. Metabolismo de la adenosina y su transporte dentro y fuera de la célula. En el exterior, la adenosina es generada a partir de sus precursores ATP, ADP y AMP por medio de las enzimas CD39 y CD73 y desaminada por ADA. La adenosina entra a la célula por medio los transportadores (ENTs) y se metaboliza a inosina, S-adenosilhomocisteína (SAH) o 5'AMP. Modificado de Borea et al., 2018.	7
Figura 4. Expresión de los receptores de membrana de la adenosina: A1R, A2a, A2b y A3. Su activación inhibe o estimula el adenilato ciclasa, provocando un aumento o disminución de AMPc. Modificado de Mazziotta et al., 2021	8
Figura 5. Curva de crecimiento de la línea celular 4T1 durante 24, 48 y 72 h. Por medio de diluciones seriadas, se estimó la cantidad de células por sembrar para alcanzar una confluencia del 80% a diferentes rangos de tiempo. Las células se observaron a través de un microscopio invertido a una magnificación de 4X y 10X	18
Figura 6. Ensayo de proliferación celular de la línea 4T1 en 24 y 48 horas de exposición al fármaco IFC 305. Se midió la absorbancia de las células 4T1 en presencia del fármaco IFC 305 a 570 nm a las 24 horas (A) y 48 horas (B). Prueba estadística ANOVA de una vía, post test de Bonferroni. *Datos significativos $p < 0.05$	19
Figura 7. Ensayo de proliferación celular de la línea 293T en 24 y 48 horas de exposición al fármaco IFC 305. Se midió la absorbancia de las células 293T en presencia del fármaco IFC 305 a 570 nm a las 24 horas (A) y 48 horas (B). Prueba estadística ANOVA de una vía, post test de Bonferroni. *Datos significativos $p < 0.05$	19
Figura 8. Efecto del fármaco IFC 305 en la migración celular de la línea 4T1 a las 24 horas de exposición. La evaluación se realizó midiendo el área de la placa sin células a través de un seguimiento fotográfico cada 4 horas. (A) Imágenes representativas del grupo control y el fármaco IFC 305 a diferentes concentraciones y a través del tiempo en las células 4T1. (B) Diferencias en el área de la herida a través del tiempo, la medición se realizó en el programa ImageJ. Las barras de error representan el error estándar de la media. Prueba estadística ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.	21

- Figura 9. Análisis de apoptosis de células 4T1 a las 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de IFC-305. Se utilizó Alexa Fluor 488-Anexina V y IP y posteriormente las células se analizaron en el citómetro de flujo. Se muestran los porcentajes de las subpoblaciones celulares en cada cuadrante: Q4, células viables; Q2 y Q3, células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente; Q1, células necróticas 22
- Figura 10. Evaluación del efecto d IFC305 sobre el ciclo celular de la línea 4T1 a las 24 horas de exposición mediante citometría de flujo. A) Histogramas obtenidos del citómetro de flujo para representar la intensidad de fluorescencia de IP en las muestras analizadas. B) Porcentaje de subpoblaciones distribuidas en diferentes fases del ciclo celular.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11. Modelo de metástasis ósea en ratones hembra Balb/C. A) Radiografías representativas de las lesiones osteolíticas después de 10 días de la inoculación; las flechas nos muestran las lesiones osteolíticas. B) Cuantificación del área abarcada por las lesiones osteolíticas en fémur y tibia. Analizado por medio de ANOVA de una vía..... 24
- Figura 12. Gráfica de la variación de peso en los ratones Balb/C durante 9 días de tratamiento. Los ratones fueron pesados cada 2 días. Durante la evaluación, los ratones tratados con IFC-305 disminuyeron su peso en comparación con grupo control. Analizado por medio de ANOVA de dos vías. 25

Capítulo 1. Introducción

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una proliferación celular anormal y la capacidad de las células para diseminarse a otros órganos en un proceso denominado metástasis (Seto et al., 2010). En mujeres, el cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer con mayor incidencia y la principal causa de muerte por este padecimiento. En 2020 se registraron 2.3 millones de casos nuevos de cáncer de mama en el mundo y 685,000 defunciones a causa de esta enfermedad (Sung et al., 2021). Específicamente en México, los decesos por CM en mujeres representan el 17% del total de muertes relacionados con cáncer, convirtiéndose en un problema de salud pública (INEGI, 2022).

Aunque el pronóstico para algunos pacientes puede ser favorable debido a la detección temprana y los diferentes tratamientos que existen, el 75% de los pacientes con cáncer de mama avanzado presenta una migración al sistema óseo, haciendo del hueso el tercer sitio metastásico más común (Chaffer & Weinberg, 2011; Eckhardt et al., 2012; Tahara et al., 2019).

Los pacientes con metástasis ósea desarrollan padecimientos que disminuyen su calidad de vida tales como dolor óseo intenso, fracturas patológicas, compresión de la médula espinal, movilidad reducida e hipercalcemia (Macedo et al., 2017).

Los tratamientos actuales para los pacientes con metástasis intentan prolongar la vida y disminuir las afectaciones que conlleva el cáncer metastásico por medio de terapias sistémicas tales como la quimioterapia y la terapia hormonal. Sin embargo, aún no existe un tratamiento que cure el cáncer de mama metastásico a los huesos.

Ante tal panorama, existe una creciente necesidad de desarrollar nuevas terapias que puedan ser utilizadas contra el cáncer. Algunos fármacos provienen de moléculas endógenas relacionadas con el metabolismo celular, tal es el caso de la adenosina y sus derivados, que han demostrado su potencial anticancerígeno al regular procesos relacionados con la proliferación, supervivencia y la apoptosis en diferentes tipos de cáncer (Panjehpour & Karami-Tehrani, 2008; Tsuchiya & Nishizaki, 2015; de Sánchez et al., 2018).

Por tal motivo, en este trabajo se abordó el estudio del fármaco, IFC-305, un derivado de la adenosina como una nueva estrategia para el tratamiento de la metástasis ósea inducida por el cáncer de mama.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama se desarrolla en el epitelio glandular mamario cuando existe una proliferación celular anormal y acelerada dentro de los lóbulos y/o ductos que conforman la mama. Su establecimiento está asociado con diferentes factores de riesgo relacionados con el género, estilo de vida y la predisposición genética (Dimri et al., 2005; Momenimovahed & Salehiniya, 2019).

En la clínica, existen diferentes descripciones para clasificar el estadio en que se encuentran los distintos tipos de cáncer. Para CM y otras neoplasias, el sistema TNM es la herramienta más utilizada por los médicos en el que “T” representa el tamaño del tumor primario, “N” el número de ganglios linfáticos cancerosos y “M” la metástasis si el cáncer migró a otros tejidos del cuerpo.

Al ser el CM una enfermedad muy heterogénea, la evaluación patológica también debe considerar las características biológicas del tejido tumoral tales como el tipo y el grado histológico, el estatus endócrino del receptor estrogénico (ER), el receptor de progesterona (EP) y del receptor tipo 2 al factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) además del índice de proliferación Ki67 (Hong & Xu, 2022). Actualmente, se han definido 4 subtipos de CM con base en el perfil molecular: luminal A, luminal B, HER2+ y triple negativo (TNBC). Estas subcategorías permiten identificar la agresividad del cáncer y la terapia que podría ser funcional para cada paciente (Orrantia-Borunda et al., 2022).

El CM triple negativo (TNBC) se refiere a los tumores que carecen de la expresión de ER, EP y HER2. Este subtipo molecular representa el 10-15% de todos los carcinomas de mama y tiene mayor incidencia en mujeres hispanas y africanas menores de 40 años (Bauer et al., 2007). En comparación con los otros subtipos, TNBC tiene un comportamiento agresivo que disminuye el tiempo de supervivencia de los pacientes y aumenta la probabilidad de metástasis (Dent et al., 2007).

1.1.2 Metástasis

La metástasis es un proceso de propagación que permite a las células del tumor primario migrar a diferentes órganos del cuerpo. Dicho proceso está compuesto por una serie de interacciones dinámicas

entre las células sanas y las células cancerosas y es denominado cascada metastásica (Eckhardt et al., 2012).

El inicio de la cascada metastásica está asociado con la inestabilidad cromosómica ocasionada por diferentes mutaciones en las células que conforman el tumor y que les brindan la habilidad de invadir y resistir los diferentes tipos de estrés a través de la transición epitelio-mesenquimal (EM). Una vez que las células han perdido la cohesión intercelular, entran al torrente sanguíneo (intravasación), migran a tejidos lejanos (circulación), salen del torrente sanguíneo (extravasación), se adaptan al nuevo microambiente y lo colonizan (Figura 1) (Chaffer & Weinberg, 2011; Eckhardt et al., 2012; Fares et al., 2020).

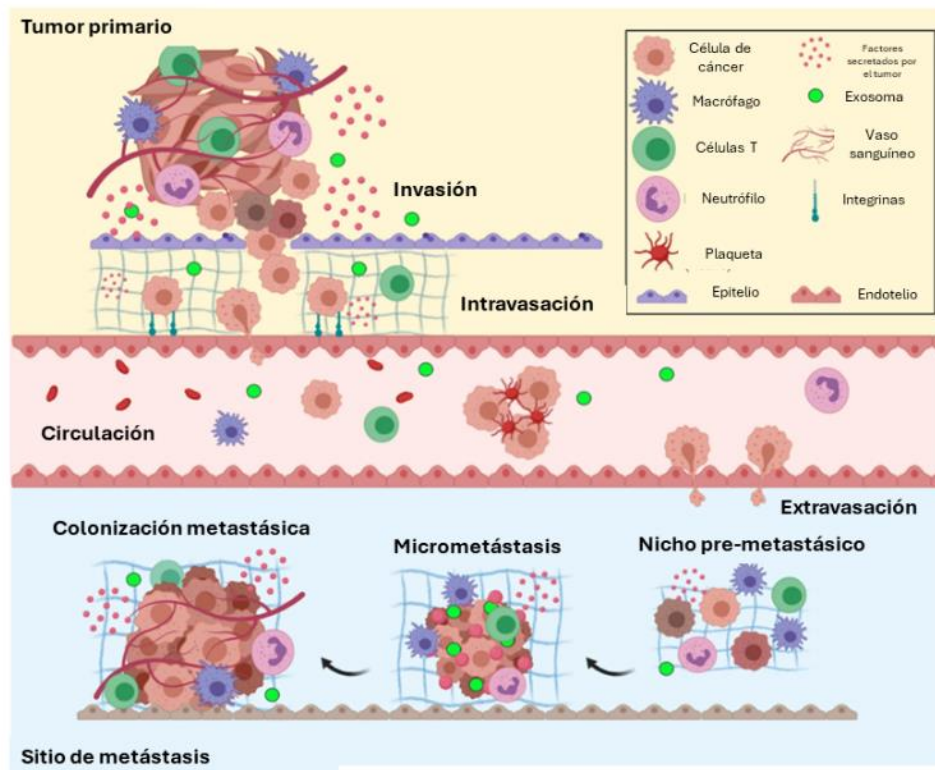


Figura 1. Principales eventos en la cascada metastásica. Las células del tumor primario pierden la cohesión intracelular y migran a través de los vasos sanguíneos, resistiendo las diferentes tensiones ocasionadas por el flujo de sangre. Finalmente, salen del torrente y se adaptan al nuevo microambiente para colonizar el órgano distante. Modificado de Fares et al., 2020.

La propagación de las células de cáncer no es aleatoria; su afinidad por algunos órganos está relacionada con la hemodinámica a través del organismo y su interacción con un microambiente lejano que les permita su proliferación, considerando el sitio de llegada como el “suelo fértil” y las células de cáncer

como la semilla que germinará (Paget, 1889; Ewing, 1928). A pesar de que el proceso se considera ineficiente, ya que únicamente el 0.01% de las células que migran del tumor primario al órgano distante logran desarrollar un tumor secundario, la metástasis es responsable del 90% de las muertes asociadas al cáncer (Chaffer & Weinberg, 2011; Luzzi et al., 1998).

1.1.3 Metástasis ósea del cáncer de mama y sus tratamientos

Además del hígado y el pulmón, los huesos son el tercer órgano más común de metástasis para diferentes tipos de cáncer y el primer sitio de recaída para el 75% de los pacientes con cáncer de mama y próstata metastásico (Fornetti et al., 2018; González-Quevedo & Moriel-Garceso, 2019; Macedo et al., 2017).

El esqueleto axial, incluyendo la columna vertebral, la caja torácica, los huesos pélvicos y la parte proximal del fémur, representa el área ósea frecuentemente colonizada por las células de cáncer. Dicho patrón está asociado con el alto contenido de médula ósea roja indicando procesos hematopoyéticos activos y por ende, diversos tipos de células y una matriz extracelular rica en factores de crecimiento como TGF β , IGF 1 y 2, FGF y citocinas lo que proporciona una mayor supervivencia a las células cancerosas (Coleman, 2006; Sowder & Johnson, 2019).

En condiciones saludables, el sistema óseo posee un microambiente dinámico que permite su constante renovación y reemplazo a través de células específicas del hueso: los osteoclastos, encargados de la reabsorción ósea y los osteoblastos, que forman el nuevo hueso.

Sin embargo, cuando las células cancerosas se establecen en los huesos, estimulan de manera directa o indirecta la formación y reabsorción ósea derivando diferentes tipos de metástasis óseas: osteolíticas, caracterizadas por la destrucción anormal del hueso; osteoblásticas, en las cuáles hay una formación de hueso; y mixtas, que es una combinación de lesiones osteolíticas y osteoblásticas (Croucher et al., 2016; Macedo et al., 2017).

En pacientes con cáncer de mama, la metástasis de tipo osteolítica es la más común. Cuando las células se establecen en el hueso liberan factores que estimulan la formación de osteoclastos y la reabsorción, entre ellos el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP). Cuando el hueso está destruido, libera otros factores como TGF- β , IGF y factor de crecimiento de fibroblastos; así, esta interacción crea

un círculo vicioso que favorece al tumor incrementando su agresividad y potencial para diseminarse e incrementa la destrucción ósea (Figura 2) (Roodman, 2004).

A nivel clínico, los pacientes con metástasis ósea experimentan diferentes complicaciones, principalmente dolor, fracturas patológicas por lesiones líticas, compresión de la médula espinal e hipercalcemia (Coleman et al., 2020; Widdle et al., 2016).

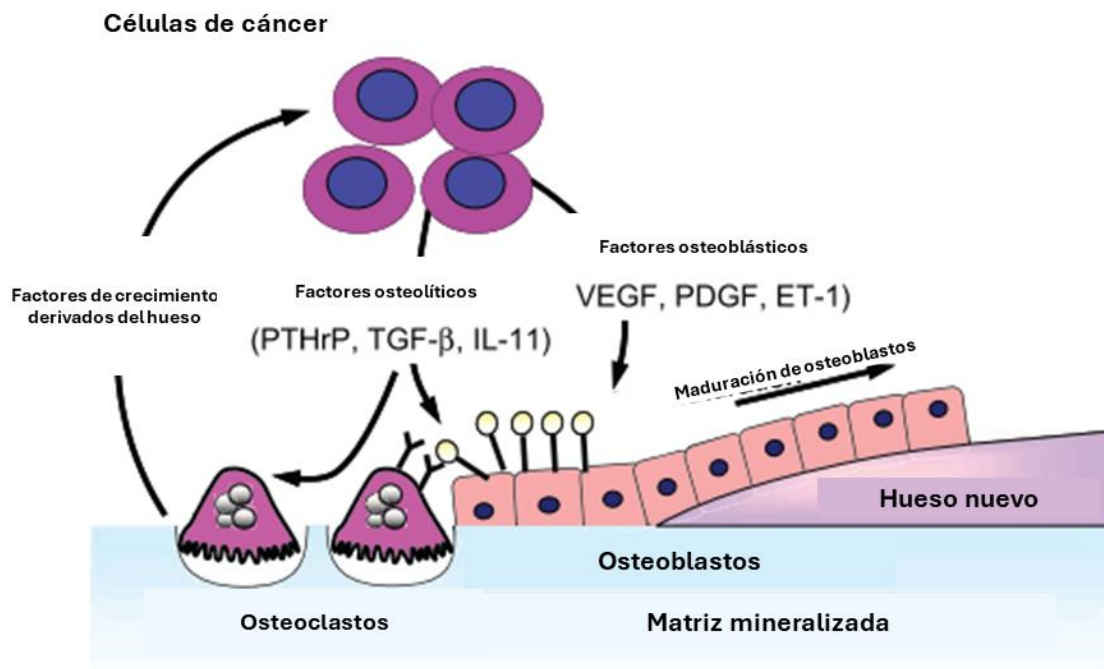


Figura 2. Círculo vicioso de la metástasis ósea osteolítica. Las células liberan factores, principalmente PTHrP, involucrado en la osteoclastogénesis. Estos factores incrementan la expresión de RANKL, que induce la formación de hueso y la reabsorción. La reabsorción ósea libera factores de crecimiento que inducen el incremento de PTHrP por las células de cáncer, asegurando el crecimiento del tumor. Modificado de Kingsley et al., 2007.

Los tratamientos que existen para la metástasis ósea están enfocados en disminuir la morbilidad asociada a este evento. El tratamiento incluye radioterapia, terapia sistémica (quimioterapia), terapias dirigidas y atención ortopédica para atender las fracturas patológicas. Determinar la mejor terapia para cada paciente depende de si la metástasis está localizada, el tipo de cáncer tratamiento previo y el estado de salud en general. Sin embargo, aún no existe una terapia que cure el CM metastásico a los huesos (Macedo et al., 2017; Suva et al., 2011).

Ante tal panorama, existe un constante interés en desarrollar nuevos fármacos que tengan un efecto potencial anticancerígeno y principalmente tenga una función en la metástasis. Estos pueden ser

sintetizados a partir de extractos naturales, moléculas químicas y principalmente endógenas, tal es el caso de la adenosina y sus derivados.

1.1.4 Adenosina: síntesis y funciones biológicas

La adenosina (Ado), cuyo nombre químico es 6-amino-9- β -D-ribofuranosil-9-H-purina, es un nucleósido de purina endógeno cuya estructura consiste en una molécula de adenina ligada a un azúcar ribosa por medio de un enlace β -N9-glicosílico (Eltzschig et al., 2009).

Este nucleósido tiene una participación en el interior y el exterior de la célula. En medio extracelular, la adenosina es sintetizada por la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los nucleótidos ATP, 5'-adenosina difosfato (ADP) o adenosín monofosfato (AMP). Dicha hidrólisis ocurre por una cascada de ectonucleotidasas que incluyen CD39 (que hidroliza ATP/ADP a AMP) y CD73 (AMP a adenosina).

Una vez que la adenosina entra a la célula por medio de transportadores de nucleósidos equilibrantes (ENTs) y concentrativos (CNTs), es metabolizada rápidamente para transformarse en inosina a través de la actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA) o en AMP por medio de la enzima adenosina quinasa (AK) (Figura 3) (Eltzschig et al., 2009).

En condiciones homeostáticas, la concentración de adenosina intracelular varía entre los 10 a 200 nM sin embargo, en condiciones de estrés los niveles de adenosina extracelular se elevan de 10 a 100 μ M (Fredholm, 2007).

Ado es una molécula pleiotrópica de vital importancia en la fisiología humana que provee la base para la formación del adenosín trifosfato (ATP), molécula fundamental para la bioenergética celular y la formación de macromoléculas como los ácidos nucleicos y proteínas (Boison y Yegutkin, 2019; Layland et al., 2014).

Así mismo, la adenosina también es una molécula de señalización extracelular que está involucrada en diversas funciones del sistema cardiovascular como la vasoconstricción y vasodilatación de venas y arterias y regulando del flujo sanguíneo (Sheth et al., 2014).

Ado también ha demostrado su potencial como modulador de procesos cerebrales como el sueño, además de fungir como neuroprotector para el tratamiento del daño neuronal inducido por padecimientos como isquemia y convulsiones (Jamwal et al., 2019).

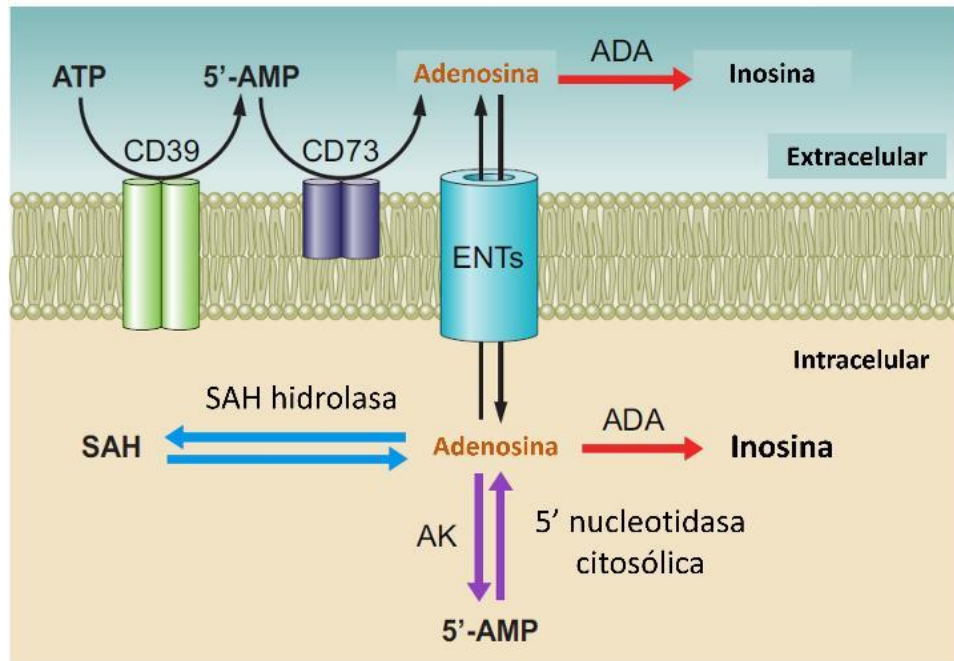


Figura 3. Metabolismo de la adenosina y su transporte dentro y fuera de la célula. En el exterior, la adenosina es generada a partir de sus precursores ATP, ADP y AMP por medio de las enzimas CD39 y CD73 y desaminada por ADA. La adenosina entra a la célula por medio de los transportadores (ENTs) y se metaboliza a inosina, S-adenosilhomocisteína (SAH) o 5'-AMP. Modificado de Borea et al., 2018.

1.1.5 Receptores celulares de la adenosina

La adenosina extracelular funciona a través de cuatro receptores purinérgicos denominados A1, A2a, A2b y A3. Son receptores de membrana de siete pasos transmembranales acoplados a una proteína G y que comprenden dos dominios: el dominio extracelular, con la amino terminal (N-terminal) que contienen sitios de glicosilación y tres loops. Por otro lado, el dominio intracelular (C-terminal) con sitios de fosforilación y palmitoilación, además de tres loops (Jamwal et al., 2019).

Los receptores han sido clasificados de acuerdo con su afinidad por la enzima adenilato ciclasa la cual regula los niveles del adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Es así como los receptores A1 y A3 están relacionados con el decremento del AMPC mientras que los subtipos A2a y A2b están relacionados con el incremento en las concentraciones de AMPC en la célula (Figura 4) (Tsuchiya y Nishizaki, 2015).

La activación de cada receptor de forma individual tiene un efecto en diferentes funciones biológicas y su patrón de expresión en la superficie celular puede variar dependiendo (Jamwal et al., 2019; Jacobson et al., 2008).

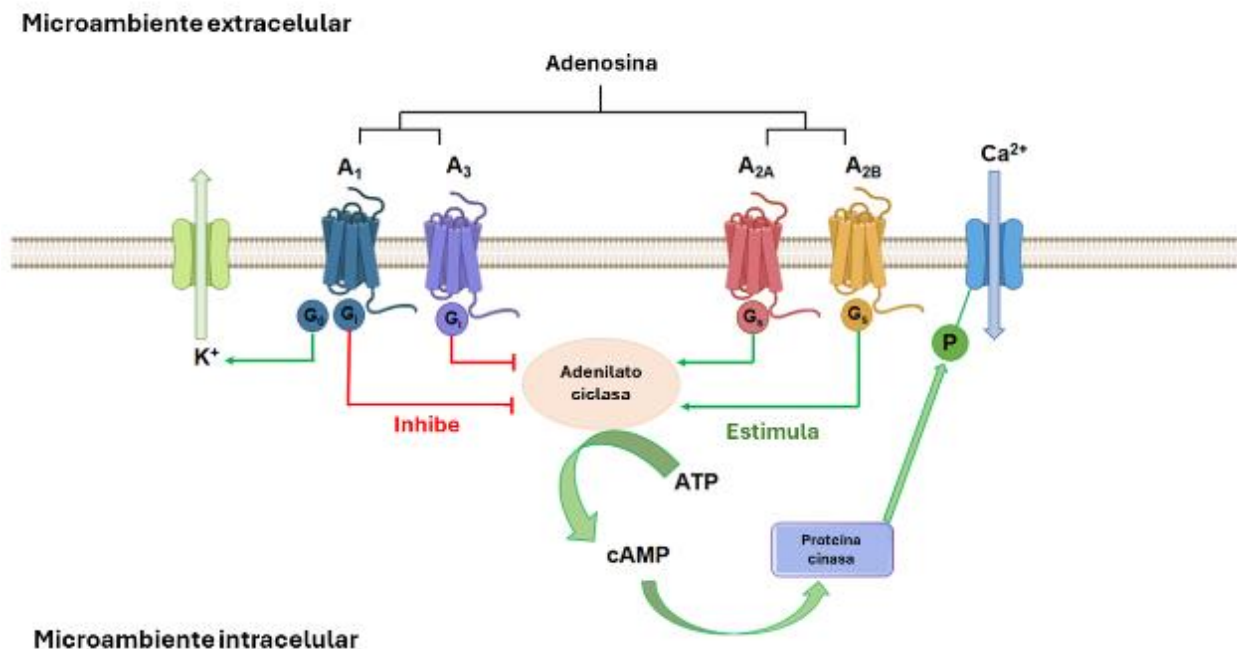


Figura 4. Expresión de los receptores de membrana de la adenosina: A1R, A2a, A2b y A3. Su activación inhibe o estimula el adenilato ciclasa, provocando un aumento o disminución de AMPc. Modificado de Mazziotta et al., 2021

1.1.6 Adenosina y sus derivados

A pesar de que la adenosina tiene diversas funciones en el organismo, su aplicación en la clínica puede estar limitada por su corta vida media en la sangre (<10 s) y la falta de selectividad hacia sus receptores (Samsel y Dzierzbicka, 2011). Por tal razón, se han sintetizado diversos análogos de la adenosina sintetizados, aumentando su afinidad por el receptor y disminuyendo los efectos secundarios.

La especificidad de los análogos hacia los receptores de la adenosina ha permitido que se utilicen como potencial tratamiento para diferentes enfermedades. Para los padecimientos cardiovasculares, los análogos y sus efectos cronotrópicos están relacionados con su alta especificidad al receptor A1 (A1R) (Da Silva et al., 2019; Ellenbogen et al., 2005; Prystowsky et al., 2003; Savelieva & Camm, 2008).

Por otro lado, la respuesta pro y antiinflamatoria de la adenosina es regulada a través de los receptores expresados en la membrana de las células del sistema inmune (Haskó & Pacher, 2008), principalmente

el receptor A2A (Ohta & Sitkovsky, 2001). Aunque los análogos en fase clínica para dicho receptor son pocos, se han utilizado potencialmente para la rinitis alérgica y el asma (Rimmer et al., 2007).

1.1.6.1 Adenosina, análogos y el cáncer

El efecto dual de los receptores se ha relacionado con el desarrollo y progresión del tumor, promoviendo la supervivencia de las células o induciendo apoptosis. Kim et al. (2008) demostraron que el agonista CI-IB-MECA inhibe la proliferación celular *in vitro* de cáncer de pulmón, arretando el ciclo celular e induciendo apoptosis en una concentración desde los 10 μ M. El mismo efecto se observó en células de leucemia (Lee et al., 2005) y glioblastoma humano (Kim et al., 2012), pudiendo estar relacionado con la regulación de la vía Wnt/NF- κ B (Ren et al., 2015).

Particularmente, se ha demostrado que el receptor A3R se encuentra sobreexpresado en las células de diferentes tipos de cáncer como leucemia (Gessi et al., 2002), cáncer de colon (Gessi et al., 2004), hepatocarcinoma (Bar-Yehuda et al., 2008) y CM (Madi et al., 2004). No obstante, considerando la concentración de adenosina y que la expresión de sus receptores está desregulada en las células enfermas, también existe evidencia de que la supresión o activación de los otros receptores puede tener un efecto en la progresión de la enfermedad.

Algunos autores han reportado que la adenosina ejerce un efecto antitumoral en un modelo *in vivo* e *in vitro* ante el cáncer de páncreas en comparación con los grupos tratados con solución salina (Yang et al., 2019). Así, el nucleósido puede regular la apoptosis de células de cáncer de colon humano (línea CW2) por medio de caspasas activadas por el receptor A1R (Saito et al., 2010) e inhibir la angiogénesis al suprimir la expresión de factores VEGF, TGF- β y CD31 en cáncer de ovario (Xia & Wang, 2019). En células de CM, el análogo de la adenosina IB-MECA, tuvo un efecto antiproliferativo en las líneas MCF-7 y ZR-75, ambas positivas para el receptor de estrógeno y sin aparente expresión del receptor A3R, mismo que se ha relacionado también con la citotoxicidad inducida a las células de la línea MDA-MB-468 (Chung et al., 2006; Lu et al., 2003; Panjehpour & Karami-Tehrani, 2008).

Varani et al. (2013) utilizaron ratas Sprague-Dawley a las cuales se les inoculó células de CM de rata (MRMT-1) para desarrollar lesiones osteolíticas y ser tratadas con el agonista del receptor A3, CI-IB-MECA, para evaluar el efecto del crecimiento tumoral en las ratas y el dolor. Los resultados *in vitro* mostraron que la expresión del receptor A3 en las células MRMT-1 aumentó la expresión de p53 y la

apoptosis. Por otro lado, en el modelo *in vivo* se produjo una reducción significativa del crecimiento tumoral.

1.1.6.2 Derivado de la adenosina y su potencial clínico

En la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y específicamente en el Instituto de Fisiología Celular, se sintetizó una sal de aspartato de adenosina, que es un derivado de la adenosina y cuyo nombre es IFC-305. Esta molécula ha mostrado interesantes resultados en los estudios preclínicos. Al tener un metabolismo tan activo, la adenosina alcanza su máxima absorción a los 20 minutos de su administración. Sin embargo, IFC-305, demostró una absorción continua a los 40 minutos y hasta 120 minutos antes de ser metabolizada, lo cual puede estar relacionado con un efecto semejante o superior al de la adenosina, pero en una dosis menor (de Sánchez et al., 2018).

En 2017, se evaluó el efecto hepatoprotector de IFC-305 en un modelo de hepatocarcinogénesis inducido por dietilnitrosamina (DEN) en ratas, durante 6, 12 y 18 semanas. Los autores reportaron una inhibición del desarrollo de lesiones preneoplásicas, asociado a la disminución de la proliferación celular y no de la apoptosis, demostrando el efecto quimiopreventivo de IFC-305 (Velasco-Loyden et al., 2017). Adicionalmente, en un mismo modelo, se ha comprobado que IFC-305 es capaz de modificar la composición de los lípidos de la membrana, aumentando la síntesis de cardiolipina y fosfatidilcolina (manuscrito enviado a revisión).

Considerando que la disfunción mitocondrial se relaciona con varias enfermedades en el hígado, también en 2017, Chávez et al. evaluaron las alteraciones mitocondriales funcionales y metabólicas en ratas a las que se les indujo cirrosis-carcinoma hepatocelular con DEN y tratadas con IFC-305. Sus resultados demostraron que el IFC-305 es capaz de mantener y restaurar la función mitocondrial indicando un potencial tratamiento para la hepatocarcinoma o como terapia adyuvante.

1.2 Justificación

El CM es el tipo de cáncer con mayor incidencia y la principal causa de muerte por esta enfermedad en mujeres de todo el mundo. A pesar de que el diagnóstico puede ser favorable como consecuencia de una detección temprana, el CM metastásico está relacionado con el 75% de muertes a causa de esta

enfermedad. La metástasis ósea es el tipo de metástasis más frecuente de los pacientes con CM y está relacionada con padecimientos que afectan la calidad de vida de los pacientes de forma drástica. Desafortunadamente, los tratamientos actuales únicamente reducen o retrasan la metástasis ósea, sin embargo, no son curativos; por esta razón, existe una creciente necesidad de desarrollar nuevas terapias enfocadas a esta etapa de la enfermedad. Los derivados de la adenosina y, especialmente IFC 305, han demostrado un potencial anticancerígeno en diferentes tipos de cáncer y con diferentes mecanismos relacionados con el crecimiento, la proliferación y migración de las células. Por tales motivos, este trabajo de investigación tiene como enfoque evaluar el potencial anticancerígeno del fármaco IFC-305, un derivado de la adenosina, sobre la metástasis ósea causada por el CM.

1.3 Hipótesis

El fármaco IFC-305, un derivado de la adenosina, tendrá un efecto en la proliferación y migración de las células *in vitro* y podrá prevenir la metástasis ósea *in vivo* en un modelo murino.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial anticancerígeno del fármaco IFC-305 sobre la proliferación y migración de las células de cáncer de mama *in vitro* y la metástasis ósea *in vivo* en un modelo murino.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del fármaco IFC-305 sobre la proliferación y la migración de la línea celular 4T1 *in vitro*.
2. Estudiar el efecto del fármaco IFC-305 sobre el ciclo celular y la apoptosis de la línea celular 4T1 *in vitro*.
3. Determinar el efecto anticancerígeno del fármaco IFC-305 *in vivo* sobre la metástasis ósea causada por el cáncer de mama en un modelo murino.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Para los ensayos que se describen a continuación se utilizó la línea celular 4T1 (CRL-2539, American Type Cell Collection) derivada de tumores murinos y que imitan al cáncer de mama humano en etapa IV. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico (Ab/Am). También se cultivó la línea celular 293T (CRL-3216, American Type Cell Collection) que son células epiteliales derivadas del riñón de un paciente; se mantuvieron en medio DMEM con 10% de SFB y 1% de Ab/Am. Ambas líneas permanecieron en incubación a 37°C 5% de CO₂. Todos los ensayos se realizaron cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80%.

2.1.1 Preparación del fármaco IFC 305

El fármaco IFC-305, sal de aspartato de adenosina preparada con base libre de adenosina (Patente No. MX220780; MX 207422; US 8,507,459 B2) fue provisto amablemente por la Dra. Victoria Chagoya, de la UNAM, quien lo sintetiza en su laboratorio. El fármaco IFC 305 se utilizó a una concentración de 40 mM para crear un stock del cual se obtuvieron las diluciones utilizadas en los ensayos. Para su preparación se disolvió el fármaco en medio RPMI-1640 sin SFB y se mantuvo en baño maría a una temperatura aproximada de 70°C para su posterior agitación en vórtex. Se alternó entre agitación y baño maría hasta que la adenosina se disolvió. Finalmente, se agregó el SFB 10% y Ab/Am 1%.

2.2 Ensayos de actividad celular

2.2.1 Curvas de crecimiento celular

Para determinar el número de células necesarias para alcanzar a una confluencia adecuada a 24 y 48 horas en los ensayos posteriores, se realizó una curva de crecimiento de la línea celular 4T1. Para esto, se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución 1:2 comenzado con 1×10^4 células, las cuales

fueron sembradas en una placa de 96 pocillos considerando 100 μL por pozo y por cuadruplicado. La confluencia celular se midió a las 24, 48 y 72 horas utilizando un microscopio invertido

2.2.2 Proliferación celular

La actividad metabólica celular es un indicador de la viabilidad celular, la proliferación y la citotoxicidad que un fármaco puede ocasionar en las células. Para cuantificar este indicador se utiliza un ensayo colorimétrico cuyo principio radica en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (MTT) a cristales de formazán de color púrpura por medio de la enzima succinato deshidrogenasa, la cual está únicamente en las mitocondrias de las células viables. Es decir, el color púrpura en la disolución es proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas. Posteriormente, se cuantifica la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro.

Para determinar la viabilidad celular y la citotoxicidad del IFC-305 sobre la línea celular 293T y 4T1, en una placa de 96 pozos se sembraron 1×10^4 células 293T en 100 μL de medio DMEM y 6×10^3 células 4T1 en medio RPMI-1640, en ambos casos por cuadruplicado. Después de estar expuestas a diferentes concentraciones del IFC-305 durante 24 y/o 48 horas, se agregaron 20 μL de MTT por pozo, se incubaron nuevamente durante 5 horas a 37°C y finalmente se agregó el buffer de lisis 0.01M HCl 10% SDS. Las células se incubaron una vez más durante 20 horas para posteriormente leer su absorbancia a 570 nm.

2.2.3 Migración celular

Para evaluar los efectos del fármaco IFC 305 sobre la migración celular se realizó el ensayo de la herida. Para dicho ensayo, en una placa de 6 pozos se sembraron 1.8×10^5 de células 4T1. Alcanzada la confluencia de 80%, se sometieron a un periodo de inanición por 12 horas; en dicho periodo, las células permanecieron con medio RPMI-1640 sin SFB. Posteriormente, la monocapa se rasgó con una punta de 200 μL en el diámetro de cada pozo; se retiró el medio de cultivo RPMI-1640, se realizó un lavado con PBS y se aplicó medio de cultivo suplementado (10% SFB, 1% Ab/am) con el fármaco IFC 305 a concentraciones de 20, 10 y 5 mM. Se marcaron tres regiones distintas en cada pozo se realizó un registro fotográfico a las 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas. Finalmente, se usó el Software ImageJ y se comparó el área promedio de cada brecha entre el grupo control y el grupo con tratamiento.

2.2.4 Ensayo de apoptosis

Para determinar si el fármaco IFC 305 induce apoptosis, se realizó una doble tinción con Yoduro de propidio (PI) y Anexina FITC V utilizando el Kit FITC AnnexinV/Dead Cell Apoptosis with FITC Annexin V and PI para citometría de flujo de Invitrogen, número de catálogo V13242.

En una placa de 6 pozos se sembraron 2×10^5 células por pozo de la línea celular 4T1 y se mantuvieron incubación durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio y se agregó medio RPMI-1640 suplementado y adicionado con el fármaco IFC 305 a las concentraciones de 5, 10 y 20 mM. Además, se utilizaron como controles técnicos RPMI-1640 suplementado (control negativo) y H_2O_2 a 0.5 y 8 mM (control positivo).

Nuevamente se incubaron las células durante 24 horas. Después del periodo de incubación, se recolectó el medio y el PBS que fue utilizado para lavar los pozos con la finalidad de recuperar las células que se encontraban en suspensión. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron a $1000g \times 10 \text{ min}$ a $4^\circ C$. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron $500 \mu L$ de PBS frío y se centrifugó nuevamente a $1000g \times 10 \text{ min}$ a $4^\circ C$.

El sobrenadante se retiró nuevamente y se resuspendió el pellet con 1 mL de PBS. Se realizó el conteo celular para obtener un volumen de 200,000 células en 1 mL de PBS. Una vez más se centrifugaron las células a $1000g \times 10 \text{ min}$ a $4^\circ C$, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en $20 \mu L$ de la solución amortiguadora de unión de anexina 1X. Se añadieron $1 \mu L$ de FITC-Annexin V y $1 \mu L$ de Pi ($20 \mu g/mL$) a cada suspensión celular; se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron $80 \mu L$ de la solución amortiguadora de anexina, se homogenizó y se mantuvieron las muestras en hielo.

Se analizaron 20,000 a 30,000 eventos por condición midiendo la fluorescencia de emisión a 530 nm y $>575 \text{ nm}$ en el citómetro.

2.2.5 Ciclo celular

Para determinar el efecto causado por el fármaco IFC 305 sobre el ciclo celular, se realizó un análisis por citometría de flujo para medir el contenido de ADN en las células mediante la tinción con yoduro de

propidio (IP). Para esto, se sembraron 2×10^5 células 4T1 en placas de cultivo de 60mm y permanecieron en incubación durante 24 horas. Posteriormente, se sometieron a un periodo de inanición de 14 horas en el cual las células permanecieron con medio RPMI-1640 basal, es decir, sin suero fetal bovino (SFB).

Después de este periodo, se procedió a hacer un cambio de medio para aplicar el medio con fármaco IFC-305 a 20, 10 y 5 mM. Como control positivo (C+) se utilizaron células con medio basal y como control negativo (C-) células con medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10% y Ab/Am 1%. Nuevamente, las células se incubaron durante 24 horas.

Terminado el tiempo de exposición al fármaco, las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. El contenido celular se colocó en un tubo falcon de 15 mL y se realizó un conteo celular para obtener una densidad celular de 500,000 células por mililitro. Se centrifugó el contenido celular a $800g \times 5 \text{ min}$ a 4°C . Se retiró el sobrenadante y se lavó con 2 mL de PBS frío para centrifugar nuevamente a $800g \times 5 \text{ min}$ a 4°C . Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 500 μL de PBS frío. Las células se llevaron al vórtex y mientras se agitaban lentamente, se les agregaron 4.5 mL de etanol frío al 70% y se incubaron durante 18 horas a -20°C .

Después del periodo de incubación, se hicieron dos lavados con 10 ml de PBS. En ambos casos, las células se centrifugaron a $1000g \times 10 \text{ min}$ a 4°C . Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 500 μL de buffer que contenía PI (1 mg/mL) y RNAasa (10 mg/mL). Se incubaron las células por 60 minutos a 37°C . Finalizado el periodo, se llevaron al citómetro de flujo donde se midieron entre 10,000 y 20,000 eventos.

2.3 Evaluación en un modelo in vivo de metástasis ósea

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones hembra de cinco semanas de la cepa Balb/C. Los animales se mantuvieron en grupos de cuatro hembras en cajas con una cama de aserrín de grado laboratorio en el sistema optimice. La temperatura del cuarto en donde los ratones permanecen es de 24°C , con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. El alimento sólido y el agua se suministraron *ad libitum*. El manejo/eutanasia de los ratones se realizó de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

2.3.1 Preparación de las células

Se preparó una suspensión celular de células 4T1 en donde se consideró una concentración de 1×10^6 cel/mL. Después de dos lavados con PBS, las células se tripsinizaron y posteriormente se centrifugaron (250g x10 min a 4°C). El *pellet* fue resuspendido en PBS a 4°C con 10 mL de PBS a 4°C, posteriormente se llevó a un volumen final de 50 mL y se centrifugaron las células (250g, 10 min a 4°C). Esta secuencia de pasos se repitió una vez más. Finalmente, se realizó un conteo celular con una dilución de azul de tripano utilizando una cámara de Neubauer en el microscopio invertido.

2.3.2 Inoculación intracardiaca

Para la inoculación intracardiaca, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (100mg/kg) y xilacina (8 mg/kg) inyectado de forma intraperitoneal. Cuando se confirmó la ausencia de reflejos, se depiló el área torácica colocando crema depiladora (Nair) con apoyo de un isopo, después de 3 minutos, la crema fue retirada con gasas húmedas (agua tibia). Los ratones depilados permanecieron en un tapete térmico y se les untó solución para evitar la resequeadad ocular (este paso se repitió constantemente hasta que los ratones despertaron de la anestesia).

Los ratones se posicionaron sujetando las extremidades superiores e inferiores con cinta adhesiva. Cada ratón recibió una inoculación de 100 μ L de PBS que contenía 10^5 células entre la tercera y cuarta costilla izquierda en posición vertical en un ángulo de 90°. Al retirar la jeringa se mantuvo el área presionada por 30 segundos para evitar la pérdida de sangre. Una vez finalizada la inoculación, los ratones permanecieron en el tapete térmico y se les administraron 250 μ L de PBS para mantenerlos hidratados. Así mismo, se les realizó un corte en la oreja para diferenciarlos. RC: oreja derecha, LC: oreja izquierda, BC: ambas orejas y NC: sin corte en las orejas.

2.3.3 Tratamiento con fármaco IFC 305

El fármaco IFC 305 se disolvió en solución salina 0.9% a una concentración de 20 mg/mL. Posteriormente, se ajustó su pH a 7.4 con NaOH y se almacenó a 4°C. Se administró a los ratones en una dosis diaria de 100 mg/kg y 50 mg/kg por vía intraperitoneal durante 9 días. Los tratamientos comenzaron un día después de la inoculación intracardiaca.

2.3.4 Colecta de tejidos

El décimo día después de la inoculación intracardiaca, los ratones fueron eutanasiados. Posteriormente, se recolectó el hígado y las extremidades inferiores, las cuales se limpiaron con el bisturí para quitar la mayor parte del músculo. Se le realizó un corte entre el fémur y la tibia a la extremidad inferior izquierda, conservando la tibia en formalina al 10%. Por otro lado, el fémur se recolectó y fue almacenado a -80°C . El fémur y la tibia de la extremidad inferior derecha permanecieron unidos y se almacenaron en formalina al 10% en forma de "L". El hígado se extrajo completo sin embargo, sólo se almacenaron 0.5 cm^2 en formalina al 10%.

Las muestras se conservaron en formalina 10% durante 48 horas, posteriormente se lavaron con solución salina 0.9% durante dos horas y finalmente se colocaron en etanol al 70% hasta su procesamiento. Los huesos extraídos se enviaron al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (Instituto de Biotecnología, Cuernavaca), donde se realizaron las radiografías por medio del sistema In-Vivo Xtreme (Bruker).

2.4 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y fueron analizados con el paquete computacional GraphPad Prism. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante ANOVA unidireccional o ANOVA bidireccional, seguido del post test Bonferroni o Tukey, dependiendo del caso. Se consideraron resultados significativos aquellos con una $p < 0.05$.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Curva de crecimiento de la línea celular 4T1

Antes de realizar los ensayos de actividad celular, se estimó la cantidad de células a sembrar para alcanzar una confluencia de 80% a las 24 y 48 horas. Por tal razón, se realizó una curva de crecimiento de la línea celular 4T1. En la figura 5 se observa que la cantidad aproximada de células para alcanzar una confluencia celular de 80% a las 24h es de 5,000 células por pozo. Por otro lado, también se observa que la proliferación de la línea celular 4T1 es aproximadamente el doble en un tiempo de 24 a 48 horas.

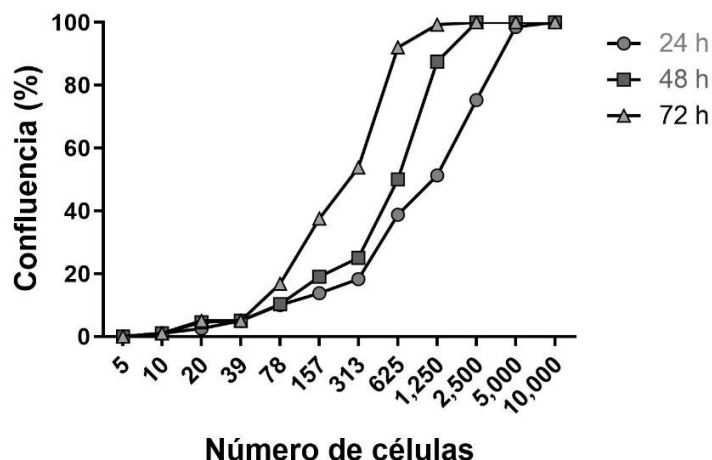


Figura 5. Curva de crecimiento de la línea celular 4T1 durante 24, 48 y 72 h. Por medio de diluciones seriadas, se estimó la cantidad de células por sembrar para alcanzar una confluencia del 80% a diferentes rangos de tiempo. Las células se observaron a través de un microscopio invertido a una magnificación de 4X y 10X

3.2 Evaluación de la viabilidad y proliferación celular

3.2.1 El fármaco IFC 305 disminuye la proliferación celular dependiendo de la concentración

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico que tiene el fármaco IFC 305 sobre la línea celular 4T1 y 293T, se realizó el ensayo de viabilidad MTT. Por tal razón, las líneas celulares se trataron con diferentes concentraciones del fármaco IFC 305. La proliferación de las células 4T1 a las 24 horas de tratamiento disminuyó en presencia del fármaco comparación con el grupo control, a partir de la concentración de

0.625 mM (Figura 6A); no obstante, la IC50 se observa a partir de 5 mM. Para las 48 horas, el efecto sigue siendo significativo (Figura 6B).

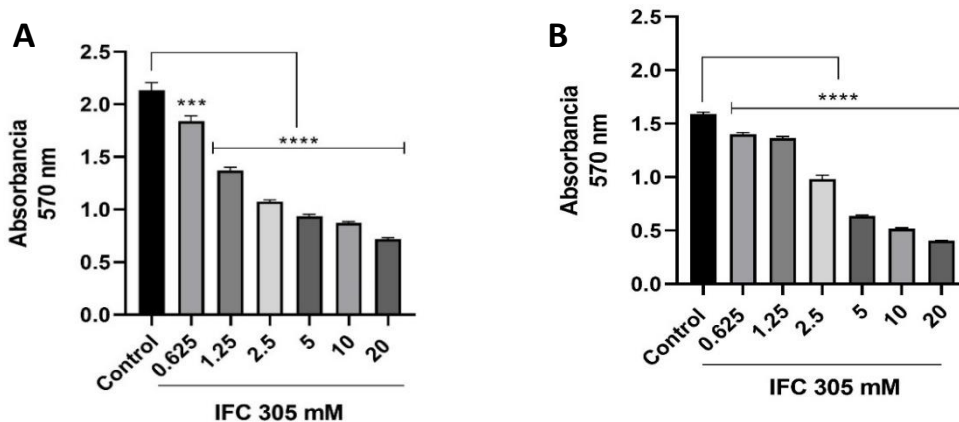


Figura 6. Ensayo de proliferación celular de la línea 4T1 en 24 y 48 horas de exposición al fármaco IFC 305. Se midió la absorbancia de las células 4T1 en presencia del fármaco IFC 305 a 570 nm a las 24 horas (A) y 48 horas (B). Prueba estadística ANOVA de una vía, post test de Bonferroni. *Datos significativos $p < 0.05$

En las células 293T existe una disminución en la viabilidad celular en comparación con el control a las 24 horas de exposición ante el fármaco en la concentración de 2.5 mM. Sin embargo, no parece tener un efecto dependiente de la concentración (Figura 7A). Por otro lado, a las 48 horas observamos que la proliferación celular disminuye a partir de 0.625 mM (Figura 7B).

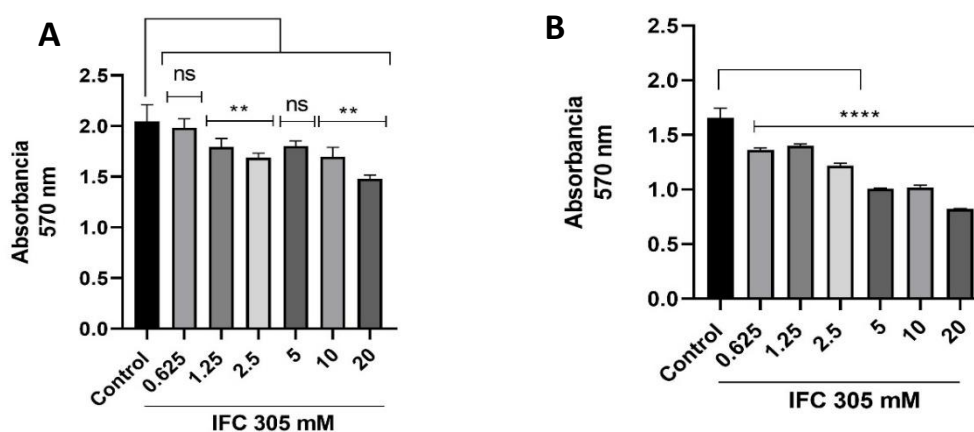


Figura 7. Ensayo de proliferación celular de la línea 293T en 24 y 48 horas de exposición al fármaco IFC 305. Se midió la absorbancia de las células 293T en presencia del fármaco IFC 305 a 570 nm a las 24 horas (A) y 48 horas (B). Prueba estadística ANOVA de una vía, post test de Bonferroni. *Datos significativos $p < 0.05$

3.3 Evaluación del fármaco IFC 305 sobre la migración celular

3.3.1 IFC 305 a diferentes concentraciones inhibe la migración celular a las 24 horas

Las células cancerosas poseen la capacidad de migrar e invadir a diferentes tejidos. Para evaluar el efecto de IFC 305 sobre la migración celular de la línea 4T1, se realizó el ensayo de la herida. El registro fotográfico se llevó a cabo durante 36 horas; sin embargo, a partir de las 28 h, el grupo control alcanzó una confluencia del ~100%. Por tal razón, la evaluación únicamente se realizó hasta 24 horas.

De acuerdo con los datos obtenidos y representados en la figura 8A, el IFC-305 inhibe la migración de las células 4T1 a partir de la concentración de 5 mM, evitando el cierre de la herida. Después de las 24 horas de exposición al tratamiento, se muestra una diferencia significativa entre el área de la herida del grupo control (células con medio RPMI-1640 suplementado) y las células con fármaco a 5, 10 y 20 mM (Figura 8B).

3.4 Efecto del fármaco IFC 305 en la inducción de apoptosis

3.4.1 El fármaco IFC 305 no induce apoptosis en la línea celular 4T1 a las 24 horas de tratamiento

Con base en los resultados obtenidos en la proliferación celular, el análisis de apoptosis se realizó a las 24 horas de tratamiento; y considerando las concentraciones del fármaco a 5, 10 y 20 mM. Como control técnico positivo para apoptosis se utilizó H₂O₂ a 0.5 mM y 8 mM y como control negativo, células que permanecieron en medio RPMI-1640 suplementado 10%SFB y 1% Ab/Am.

Por otro lado, también se evaluó el efecto del fármaco a las 48 horas de exposición; sin embargo, la confluencia en la monocapa celular de los controles alcanzaba el ~100%, ocasionando que las células se desprendieran de la placa y dificultando el análisis

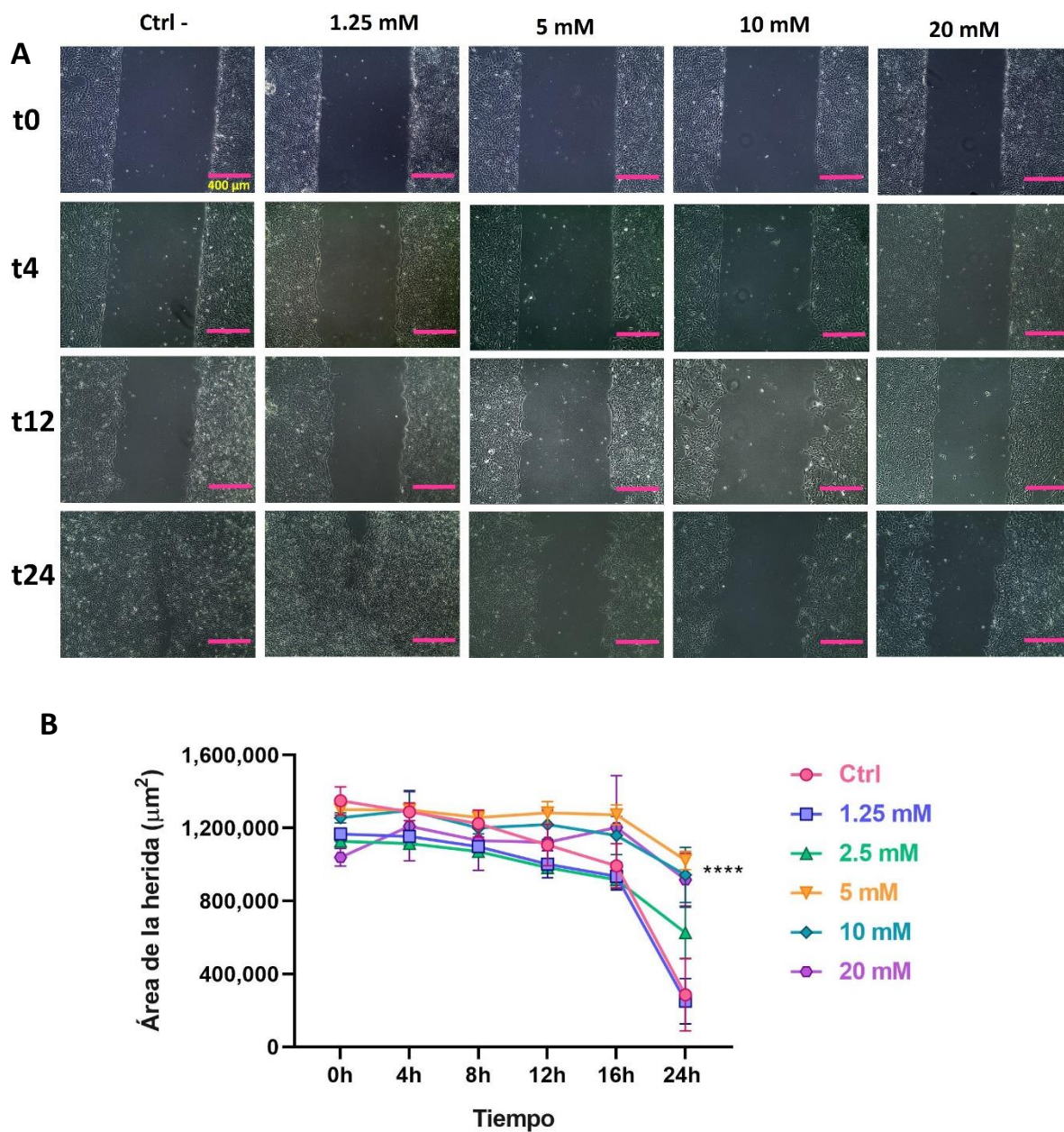


Figura 8. Efecto del fármaco IFC 305 en la migración celular de la línea 4T1 a las 24 horas de exposición. La evaluación se realizó midiendo el área de la placa sin células a través de un seguimiento fotográfico cada 4 horas. (A) Imágenes representativas del grupo control y el fármaco IFC 305 a diferentes concentraciones y a través del tiempo en las células 4T1. (B) Diferencias en el área de la herida a través del tiempo, la medición se realizó en el programa ImageJ. Las barras de error representan el error estándar de la media. Prueba estadística ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni.

Las muestras fueron analizadas a través del citómetro de flujo para determinar los porcentajes de células viables, negativas para IP y Anexina (Q4); en los cuadrantes Q3 y Q2, la población celular en apoptosis temprana (positivas para Anexina) y tardía (positivas para Anexina e IP), respectivamente. Finalmente,

el cuadrante Q1, células necróticas (positivas para IP). Como se observa en la figura 9, las células tratadas con IFC-305 muestran un porcentaje de células viables semejantes al control (90% aproximadamente) en las tres condiciones de tratamiento a 20, 10 y 5 mM. De acuerdo con los resultados, el fármaco no induce apoptosis en la línea celular 4T1 a las 24 horas de exposición y en las concentraciones evaluadas en este experimento. Sin embargo, es necesario replicar el ensayo para obtener resultados consistentes.

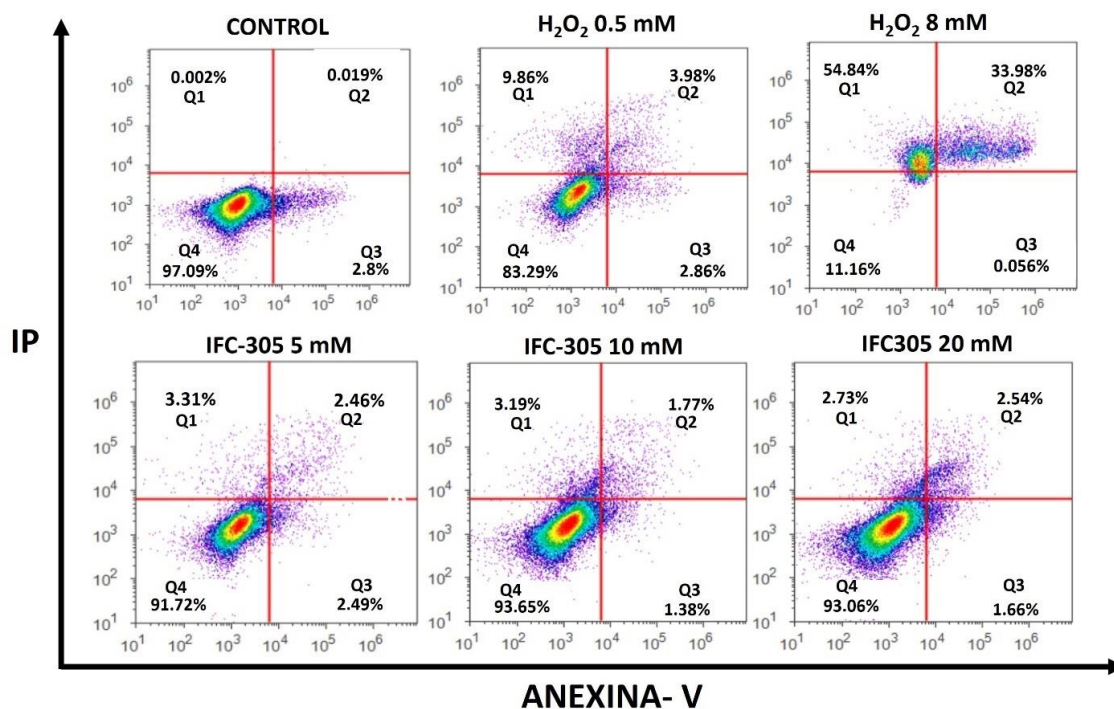


Figura 9. Análisis de apoptosis de células 4T1 a las 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de IFC-305. Se utilizó Alexa Fluor 488-Anexina V y IP y posteriormente las células se analizaron en el citómetro de flujo. Se muestran los porcentajes de las subpoblaciones celulares en cada cuadrante: Q4, células viables; Q2 y Q3, células en apoptosis temprana y tardía, respectivamente; Q1, células necróticas

3.5 Evaluación del fármaco IFC 305 sobre el ciclo celular

3.5.1 El fármaco IFC 305 incrementa el número de células en la fase G0/G1 dependiendo de la concentración

Para comprender los efectos inhibitorios de IFC 305 sobre la proliferación celular de la línea celular 4T1, se analizó la distribución del ciclo celular después de 24 horas de tratamiento. Se consideraron como

control positivo las células que permanecieron en medio RPMI-1640 sin suero fetal bovino (SFB) y como control negativo, células tratadas con medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10% y Ab/Am 1%.

Como se muestra en la figura 10A, los porcentajes de las células en la fase G0/G1 aumentan de acuerdo con la concentración del fármaco evaluada, siendo menor a 5 mM (38.05%) y mayor a 20 mM (68.6%). Por otro lado, al disminuir la concentración del fármaco, observamos que el porcentaje de células en fase G0/G1 disminuye y la fase S aumenta, siendo semejante a la que tiene el control positivo y negativo (Figura 10B).

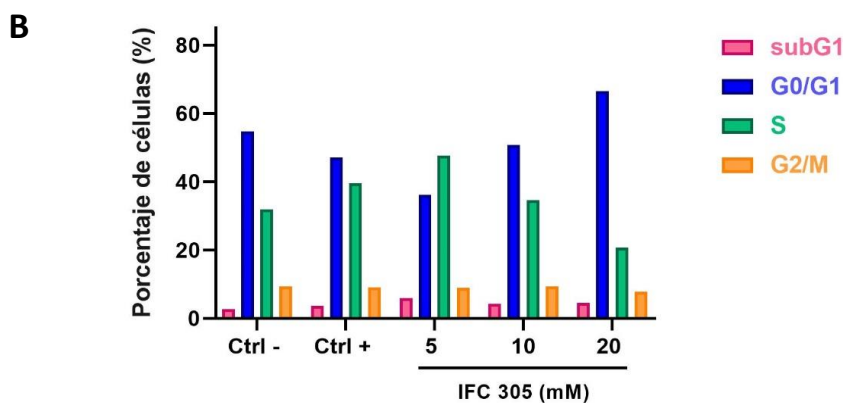
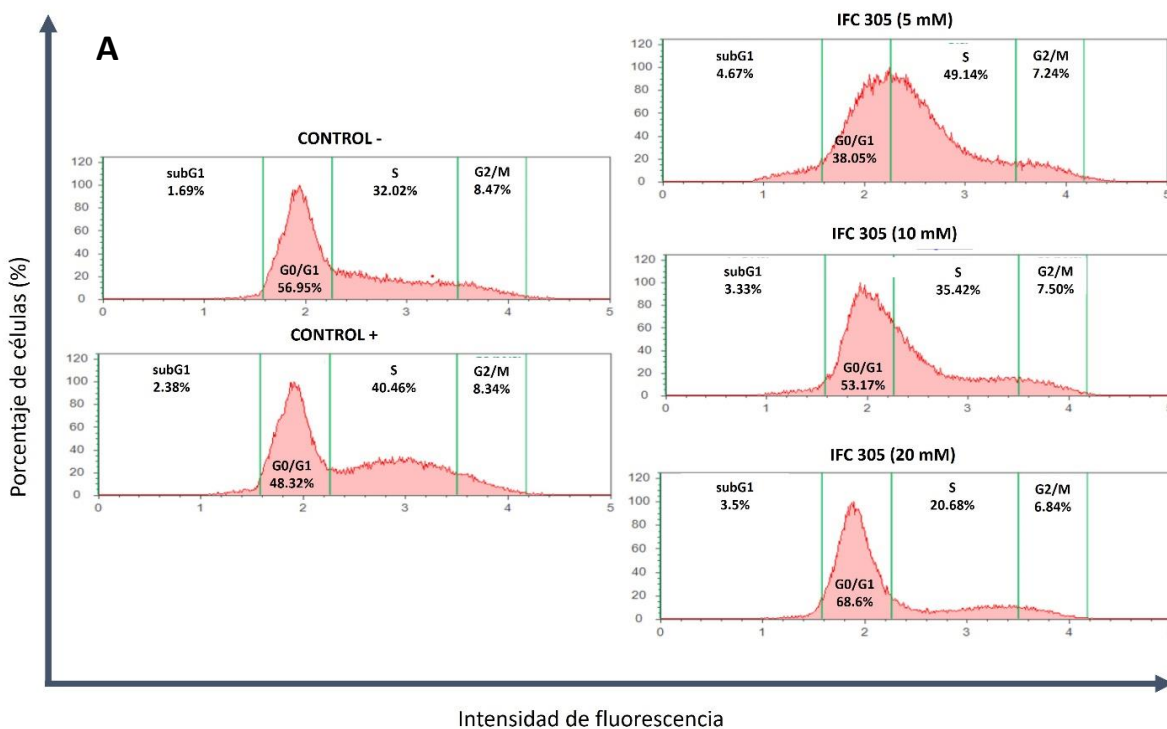


Figura 10. Evaluación del efecto d IFC305 sobre el ciclo celular de la línea 4T1 a las 24 horas de exposición mediante citometría de flujo. A) Histogramas obtenidos del citómetro de flujo para representar la intensidad de fluorescencia de IP en las muestras analizadas. B) Porcentaje de subpoblaciones distribuidas en diferentes fases del ciclo celular.

Estos resultados demuestran que el fármaco IFC 305 induce un arresto celular en la fase G0/G1 del ciclo celular a las 24 horas de tratamiento, dependiendo de la concentración a la que estén expuestas las células. Es necesario realizar más ensayos para obtener resultados consistentes; así mismo, probar concentraciones aumentadas del fármaco esperando obtener un arresto de las células 4T1 en fase G0/G1 directamente proporcional.

3.6 Evaluación del fármaco IFC 305 en un modelo murino

Con la finalidad de evaluar el efecto del fármaco sobre la metástasis ósea de un modelo murino. Se realizó una inoculación intracardiaca con la línea celular 4T1 a 24 ratones hembra de la cepa Balb/C. Se dividieron en tres grupos (n=8): grupo A, cuyo tratamiento consistió en una dosis de adenosina de 100 mg/kg; grupo B, cuya dosis de adenosina fue de 50 mg/kg y el grupo C, al cual se le administró solución salina.

Los tratamientos fueron administrados durante 9 días y el décimo día, se les realizó una eutanasia. Los ratones desarrollaron lesiones osteolíticas. Sin embargo, no hubo diferencia entre el grupo control y las dosis evaluadas en cuanto al área de osteólisis; incluso se observó en el grupo tratado con 50 mg/kg un ligero incremento de las lesiones osteolíticas pero no de manera significativa en comparación con el control (Figura 11 A).

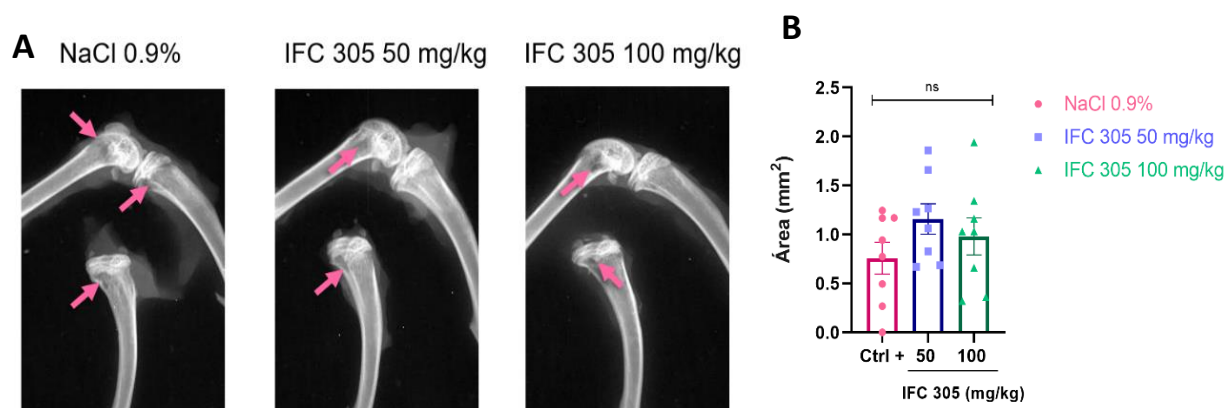


Figura 11. Modelo de metástasis ósea en ratones hembra Balb/C. A) Radiografías representativas de las lesiones osteolíticas después de 10 días de la inoculación; las flechas nos muestran las lesiones osteolíticas. B) Cuantificación del área abarcada por las lesiones osteolíticas en fémur y tibia. Analizado por medio de ANOVA de una vía.

En relación con el peso corporal, disminuyó hasta 1 gr después de la inoculación intracardiaca, en comparación con el peso registrado un día antes de la intervención. Por otro lado, durante el tratamiento, los grupos tratados con diferentes concentraciones de IFC 305 disminuyeron su peso gradualmente, existiendo una diferencia significativa entre los ratones tratados con solución salina y con la dosis más elevada del fármaco, 100 mg/kg (Figura 12).

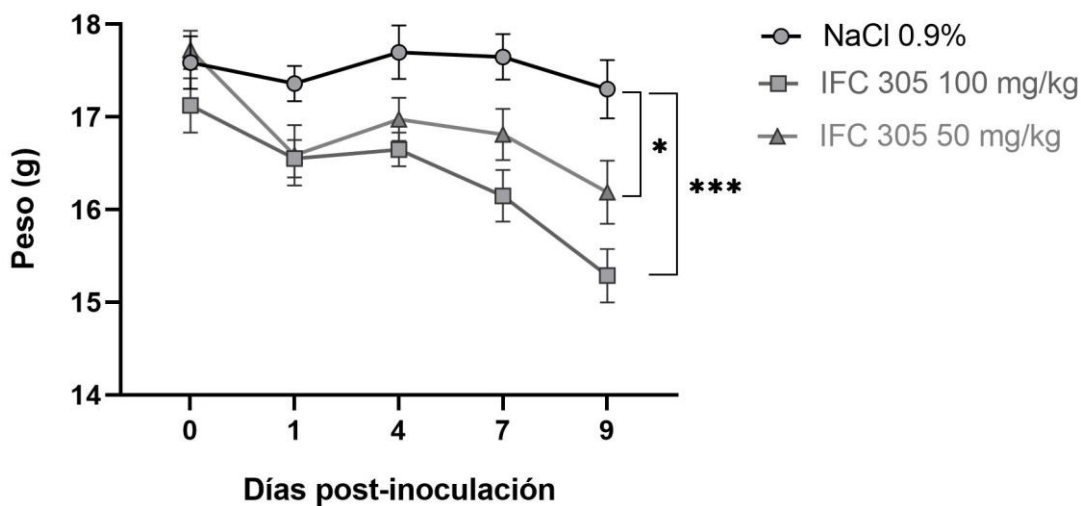


Figura 12. Gráfica de la variación de peso en los ratones Balb/C durante 9 días de tratamiento. Los ratones fueron pesados cada 2 días. Durante la evaluación, los ratones tratados con IFC-305 disminuyeron su peso en comparación con grupo control. Analizado por medio de ANOVA de dos vías.

Capítulo 4. Discusión

La metástasis ósea de CM representa un importante problema de salud pública que disminuye la calidad de vida de los pacientes causando afecciones relacionadas con el sistema óseo. Actualmente no existen tratamientos que curen este padecimiento y por ende, surge la necesidad de una buscar alternativas terapéuticas para atender esta problemática. La adenosina y sus derivados han demostrado un efecto prometedor en la inhibición del desarrollo y la progresión del cáncer. Dicha acción se adjudica, principalmente, a los receptores de membrana expresados en las células cancerosas y al metabolismo intracelular de la molécula, convirtiéndose en diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.

En este trabajo, se evaluó el potencial anticancerígeno del derivado de la adenosina, IFC-305, sobre el cáncer de mama y su metástasis ósea en un modelo *in vitro* e *in vivo*. Se demostró su efecto sobre la viabilidad celular de la línea 4T1 y 293T por medio de un ensayo MTT. Así mismo, su efecto sobre la migración celular, utilizando el ensayo de la herida, apoptosis y ciclo celular, por medio de citometría de flujo. Finalmente, se evaluó el efecto de IFC-305 sobre las lesiones osteolíticas a causa de CM a través de un modelo de metástasis ósea en ratones Balb/C. Los resultados obtenidos demuestran los efectos que tiene IFC 305 sobre el crecimiento, migración y apoptosis de células 4T1 de CM. Así mismo, sientan las bases del modelo *in vivo*, para futuras evaluaciones en modelos *in vivo* de metástasis ósea, con la finalidad de optimizar y evaluar su potencial terapéutico en esta etapa de la enfermedad.

4.1 Ensayos *in vitro*

Los resultados obtenidos muestran una inhibición en la proliferación celular de la línea 4T1 a las 24 y 48 horas de exposición al fármaco IFC 305 dependiente de la concentración, lo cual es consistente con diversos autores quienes han reportado el efecto de la adenosina sobre la proliferación celular de diferentes tipos de cáncer (Colquhoun & Newsholme, 1997; Merighi et al., 2002; Panjehpour & Karami-Tehrani, 2008) relacionándolo principalmente a la concentración extracelular de la adenosina, los niveles de expresión de sus receptores de membrana y el mecanismo de acción activado (Wu et al., 2006).

Aunque los trabajos relacionados con la expresión de receptores de adenosina en la línea celular 4T1

son pocos, Madi et al. (2004) demostraron por medio de análisis de RT-PCR que el receptor A3 tiene una mayor expresión en células provenientes del tumor (carcinoma ductal invasivo, grado III) que en células no cancerosas. Por otro lado, Panjehpour et al. (2005) reportaron que el receptor A2b se expresa en mayor medida en las células MDA-MB-231 (TNBC) y que su estimulación puede aumentar la concentración de Ca^{2+} , la cual está relacionada con diferentes procesos celulares como apoptosis, proliferación y transcripción de genes. Así mismo, Cekic et al. (2012) quienes mencionan que la inhibición de A2b disminuye el crecimiento del tumor y su potencial metastásico. Por otro lado, en las células 293T, se observó una reducción de la viabilidad celular a las 24 y 48 horas; sin embargo, de acuerdo con la ISO 10993-5:2009, esta no disminuyó debajo del 70% y por ende, no se considera citotóxica.

Para dilucidar el mecanismo involucrado con la inhibición de la viabilidad celular, se evaluó el efecto del fármaco IFC 305 sobre la apoptosis y el ciclo celular de la línea 4T1. En los resultados obtenidos no se observó una inducción de apoptosis a las 24 horas de tratamiento en ninguna de las concentraciones probadas. Este resultado podría estar relacionado con el tiempo de exposición al fármaco, ya que se ha descrito una inducción de apoptosis en diferentes líneas de CM partir de las 48 horas de exposición a la adenosina (Jafari et al., 2017, 2018); sin embargo, no fue posible realizar dicha evaluación debido a la confluencia celular en los controles negativos.

Por otro lado, se observó un arresto en la fase G₀/G₁ del ciclo celular a las 24 horas de exposición dependiendo de la concentración de IFC 305. Esto coincide con lo reportado anteriormente por Velasco-Loyden et al. (2017), quienes reportaron una disminución en las lesiones preneoplásicas en un modelo murino de hepatocarcinoma tratado con el fármaco IFC 305; sus resultados mostraron que, la disminución no es consecuencia de un incremento en la apoptosis sino un efecto anti-proliferativo debido a la inhibición del ciclo celular a través de p27 y el complejo de la ciclina E y la quinasa dependiente de ciclina tipo 2 (Cdk2). Otros autores han reportado un arresto celular en diferentes líneas celulares de cáncer de mama sin embargo, el mecanismo por el cuál ocurre varía dependiendo del tipo receptor que esté expresado. Jafari et al. (2018) demostraron que en las células madre aisladas de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 existe un arresto celular en la transición de G₁ a S por medio del receptor A2b y la regulación de la ciclina D1 y cdk4.

Para evaluar el efecto del fármaco IFC 305 sobre la migración celular se utilizó el ensayo de la herida (Wound healing assay). Se realizaron varios ensayos preliminares antes de determinar el tiempo de *starving* (retirar los factores de crecimiento del medio) que sería suficiente para que las células reiniciaran los procesos de proliferación y se encontraran en una condición semejante antes de

comenzar el experimento (Freitas et al., 2021; Grada et al., 2017). Este tipo de ensayo es ampliamente utilizado sin embargo, el efecto de migración puede ser confundido con el de proliferación y por tal razón se recomienda utilizar inhibidores de proliferación como la mitomicina C o bajas concentraciones séricas en el medio de cultivo (Freitas et al., 2021).

Los resultados mostraron una inhibición de la migración de la línea 4T1 dependiente de la concentración de IFC 305 a las 24 horas de exposición. En los ensayos realizados, se utilizó el *starving* como supresor de la proliferación y por ende, el análisis poder ser complicado al no poder distinguir si es migración o proliferación. Sin embargo, la evidencia señala de que la adenosina inhibe la migración celular (Torres et al., 2019) y que este efecto no es exclusivo de los receptores de membrana sino de los mecanismos intrínsecos de su metabolismo.

Aunque son pocos son los artículos que reportan este efecto en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, existe una controversia entre los autores. Algunos autores que mencionan que la adenosina estimula la proliferación y la migración en las células MDA-MB-231 (Fernandez-Gallardo et al., 2016) y por otro lado, se ha demostrado que la adenosina puede inhibir la migración mediante la captación extracelular de concentraciones superiores a las que muestran afinidad los receptores de membrana y modificando la homeostasis de su metabolismo a nivel intracelular en células altamente invasivas como PC3 (células de cáncer de próstata) y MDA-MB-231 (Virtanen et al., 2014). Se sugiere realizar ensayos adicionales para dilucidar el mecanismo involucrado en la inhibición de la migración sean a través de los receptores, de vías activadas por el transporte de la adenosina o modificaciones en las membranas celulares.

4.2 Modelo *in vivo*

Ante los resultados obtenidos en el modelo *in vitro*, se realizó una evaluación del efecto del fármaco sobre la metástasis ósea inducida en un modelo murino. El modelo se realizó conforme al protocolo establecido por el laboratorio de Cáncer y Hueso, permitiendo que el 100% de los ratones hembra Balb/c tuvieran una inoculación exitosa de células 4T1 y desarrollo de lesiones osteolíticas, lo que permitió evaluar el efecto del fármaco.

La adenosina ha sido probada en modelos *in vivo* de diferentes tipos de cáncer y ha demostrado un potencial para inhibir el crecimiento del tumor, como lo reportaron (Saito et al., (2010) en un modelo

de cáncer de colon en donde a partir de 100 mg/kg observaron una disminución en el crecimiento tumoral; el mismo efecto fue reportado por Xia y Wang (2019) pero en un modelo de cáncer de ovario y con una dosis menor, 60 mg/kg. Cabe destacar que los artículos en los cuáles se evalúa el efecto del IFC305 utilizan 50 mg/kg (Jiang et al., 2022) y por ende, las dosis utilizadas estuvieron dentro de ese rango.

En los resultados aquí presentados no se observó una disminución en las lesiones osteolíticas de los grupos tratados con IFC305 (50 mg/kg y 100 mg/kg) y el grupo control (NaCl 0.9%). Los estudios enfocados en el estudio de la adenosina y su efecto en la metástasis ósea son pocos. Varani et al. (2013) evaluaron el efecto de un agonista del receptor A3R sobre el desarrollo tumoral y la metástasis ósea en un modelo de in vivo de rata observando una inhibición en ambos casos, lo cual es diferente a lo que se encontró en este proyecto.

Esto puede deberse a diferentes razones: en principio, los diferentes derivados de adenosina utilizados, el régimen de administración del fármaco al ratón en el modelo usado en este proyecto (9 ocasiones) en comparación con los modelos de otro tipo de cáncer, que tienen una duración de varias semanas; así mismo, los miligramos administrados en los ratoncillos. Por tal razón, se recomienda evaluar nuevamente diferentes dosis del fármaco a distintas frecuencias.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo de investigación, se evaluó el potencial anticancerígeno del fármaco IFC 305 sobre la metástasis ósea del CM en un modelo *in vitro* e *in vivo*. Los datos mostraron que el fármaco tiene un efecto antiproliferativo en la línea de CM TNBC 4T1 a través de un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 y que no induce apoptosis a las 24 horas de tratamiento y con las concentraciones evaluadas. Por otro lado, también se demostró un efecto en la inhibición de la migración celular. Además, se evaluó el potencial del fármaco para disminuir las lesiones osteolíticas causadas por la metástasis ósea en un modelo murino. En las dosis evaluadas, no se encontró un efecto en la disminución de área de osteólisis.

Estos datos nos brindan una pauta importante de los efectos que tiene IFC 305 sobre las células de CM TNBC y su metástasis ósea, estableciendo las bases para una expectativa acerca de su uso como potencial tratamiento en esta etapa de la enfermedad.

A continuación, se describen algunas perspectivas a futuro con la finalidad de tener una mayor consistencia en los resultados y enriquecer el proyecto a corto y mediano plazo. Ampliar el rango de exposición a IFC 305 en los experimentos *in vitro*, especialmente en la evaluación de la apoptosis. Continuar evaluando el efecto de IFC 305 en estudios *in vitro* para determinar el mecanismo de acción, el origen de su potencial anticancerígeno y determinar si los efectos observados provienen de una interacción directa del fármaco con las células, o son a través de la activación de mediadores extra o intercelulares. Se sugiere evaluar diferentes dosis y régimen de tratamiento de IFC-305 en un modelo murino, con la finalidad de establecer una dosis segura y corroborar su acción sobre la metástasis ósea de CM.

Literatura citada

- Bar-Yehuda, S., Stemmer, S. M., Madi, L., Castel, D., Ochaion, A., Cohen, S., Barer, F., Zabutti, A., Perez-Liz, G., Del Valle, L., & Fishman, P. (2008). The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF- κ B signal transduction pathways. *International Journal of Oncology*, 33(2). <https://doi.org/10.3892/IJO.00000008>
- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*, 109(9). <https://doi.org/10.1002/CNCR.22618>
- Boison, D., & Yegutkin, G. G. (2019). Adenosine Metabolism: Emerging concepts for cancer therapy. *Cancer Cell*, 36(6). <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2019.10.007>
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiol Rev*, 98(1). <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>
- Cekic, C., Sag, D., Li, Y., Theodorescu, D., Strieter, R. M., & Linden, J. (2012). Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *The Journal of Immunology*, 188(1). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101845>
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331(6024). <https://doi.org/10.1126/science.1203543>
- Chávez, E., Lozano-Rosas, M. G., Domínguez-López, M., Velasco-Loyden, G., Rodríguez-Aguilera, J. R., José-Nuñez, C., De Gómez-Puyou, M. T., & De Sánchez, V. C. (2017). Functional, metabolic, and dynamic mitochondrial changes in the rat cirrhosis-hepatocellular carcinoma model and the protective effect of IFC-305. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 361(2). <https://doi.org/10.1124/jpet.116.239301>
- Chung, H., Jung, J. Y., Cho, S. D., Hong, K. A., Kim, H. J., Shin, D. H., Kim, H., Kim, H. O., Shin, D. H., Lee, H. W., Jeong, L. S., & Kong, G. (2006). The antitumor effect of LJ-529, a novel agonist to A3 adenosine receptor, in both estrogen receptor–positive and estrogen receptor–negative human breast cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0245>
- Coleman, R. E., Croucher, P. I., Padhani, A. R., Clézardin, P., Chow, E., Fallon, M., Guise, T., Colangeli, S., Capanna, R., & Costa, L. (2020). Bone metastases. *Nature Reviews Disease Primers* 6(1). *Nature Research*. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00216-3>
- Coleman, R. E. (2006). Clinical Features of Metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clinical Cancer Research*, 12(20). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0931>
- Colquhoun, A., & Newsholme, E. A. (1997). Inhibition of human tumour cell proliferation by analogues of adenosine. *Cell Biochemistry and function* 15(2). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0844\(19970601\)15:2<135::AID-CBF733>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0844(19970601)15:2<135::AID-CBF733>3.0.CO;2-G)

- Croucher, P. I., McDonald, M. M., & Martin, T. J. (2016). Bone metastasis: The importance of the neighbourhood. *Nature Reviews Cancer*, 16(6). <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.44>
- Da Silva, A. S., Baldissera, M. D., & Souza, C. F. (2019). Role of adenosine in the treatment of cardiovascular diseases: Focus on hyperemia. *International Journal of Cardiology*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.05.004>
- de Sánchez, C., Isael, J., Rafael, J., de Vaca, P.-C., Dominguez-López, M., Rosas, L., & Guadalupe, M. (2018). Estudio integral de cirrosis y carcinoma hepatocelular. *Mens. Bioquim*, 42. <http://tab.facmed.unam.mx>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Dimri, G., Band, H., & Band, V. (2005). Mammary epithelial cell transformation: Insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research*, 7(4). <https://doi.org/10.1186/bcr1275>
- Eckhardt, B. L., Francis, P. A., Parker, B. S., & Anderson, R. L. (2012). Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(6). <https://doi.org/10.1038/nrd2372>
- Ellenbogen, K. A., O'Neill, G., Prystowsky, E. N., Camm, J. A., Meng, L., Lieu, H. D., Jerling, M., Shreeniwas, R., Belardinelli, L., & Wolff, A. A. (2005). Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecadenoson. *Circulation*, 111(24). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510982>
- Eltzschig, H. K., Warner, D. S., & Warner, M. A. (2009). Adenosine: An old drug newly discovered. *Anesthesiology*, 111. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181b060f2>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fernandez-Gallardo, M., González-Ramírez, R., Sandoval, A., Felix, R., & Monjaraz, E. (2016). Adenosine stimulate proliferation and migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, 11(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0167445>
- Fornetti, J., Welm, A. L., & Stewart, S. A. (2018). Understanding the bone in cancer metastasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 33(12). <https://doi.org/10.1002/JBMR.3618>
- Fredholm, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death & Differentiation*, 14(7). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402132>
- Freitas, J. T., Jozic, I., & Bedogni, B. (2021). Wound healing assay for melanoma cell migration. En: Hargadon K.M (ed). *Melanoma. Methods in Molecular Biology* (Vol. 2265, pp. 65–71). Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1205-7_4

- Gessi, S., Cattabriga, E., Avitabile, A., Gafa, R., Lanza, G., Cavazzini, L., Bianchi, N., Gambari, R., Feo, C., Liboni, A., Gullini, S., Leung, E., Mac-Lennan, S., & Borea, P. A. (2004). Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. *Clinical Cancer Research*, 10(17). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1134-03>
- Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Cattabriga, E., Iannotta, V., Leung, E., Baraldi, P. G., & Borea, P. A. (2002). A3 adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. *Molecular pharmacology*, 61(2). <https://doi.org/10.1124/MOL.61.2.415>
- González-Quevedo, D., & Moriel-Garceso, D. (2019). Bone metastases: from diagnosis to treatment. *Actualidad Medica*, 104(808). <https://doi.org/10.15568/am.2019.808.ao01>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research techniques made simple: Analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2). <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Haskó, G., & Pacher, P. (2008). A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(3). <https://doi.org/10.1189/JLB.0607359>
- Hong, R., & Xu, B. (2022). Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. En *Cancer Communications*, 42(10). <https://doi.org/10.1002/cac2.12358>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). (2022). Estadísticas a propósito del Día Internacional de la Lucha contra el Cáncer de Mama (19 De Octubre). Consultado el día 12 de febrero de 2024. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANMAMA22.pdf
- Jafari, S. M., Joshaghani, H. R., Panjehpour, M., & Aghaei, M. (2018). A2B adenosine receptor agonist induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer stem cells via ERK1/2 phosphorylation. *Cellular Oncology*, 41(1). <https://doi.org/10.1007/S13402-017-0359-Z>
- Jafari, S. M., Joshaghani, H. R., Panjehpour, M., Aghaei, M., & Zargar Balajam, N. (2017). Apoptosis and cell cycle regulatory effects of adenosine by modulation of GLI-1 and ERK1/2 pathways in CD44+ and CD24- breast cancer stem cells. *Cell Proliferation*, 50(4). <https://doi.org/10.1111/CPR.12345>
- Jamwal, S., Mittal, A., Kumar, P., Alhayani, D. M., & Al-Aboudi, A. (2019). Therapeutic potential of agonists and antagonists of A1, A2a, A2b and A3 adenosine receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 25(26). <https://doi.org/10.2174/1381612825666190716112319>
- Jiang, J., Wen, C., Li, Y., Liu, G., Chen, Z., & Zheng, D. (2022). IFC-305 attenuates renal ischemia-reperfusion injury by promoting the production of hydrogen sulfide (H2S) via suppressing the promoter methylation of cystathionine γ -lyase (CSE). *Bioengineered*, 13(5). <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2062105>
- Jacobson K.A., Bhalchandra V, J., Wang B., Klutz A., Kim Y., Ivanov A., Melman A., & Gao Z. (2008). Modified nucleosides as selective modulators of adenosine receptors for therapeutic use. En: Herdewijn, P. (ed) *Modified Nucleosides: in biochemistry, biotechnology, and medicine* (pp. 433-449). Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527623112.ch17>

- Kim, S. J., Min, H. Y., Chung, H. J., Park, E. J., Hong, J. Y., Kang, Y. J., Shin, D. H., Jeong, L. S., & Lee, S. K. (2008). Inhibition of cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis by thio-Cl-IB-MECA, a novel A3 adenosine receptor agonist, in human lung cancer cells. *Cancer Letters*, 264(2). <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.01.037>
- Kim, T. H., Kim, Y. K., & Woo, J. S. (2012). The adenosine A3 receptor agonist Cl-IB-MECA induces cell death through Ca²⁺/ROS-dependent down regulation of ERK and akt in A172 human glioma cells. *Neurochemical Research*, 37(12). <https://doi.org/10.1007/S11064-012-0855-5>
- Kingsley, L. A., Fournier, P. G. J., Chirgwin, J. M., & Guise, T. A. (2007). Molecular biology of bone metastasis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(10). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0234>
- Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K., & Berry, C. (2014). Adenosine physiology, pharmacology, and clinical applications. *J Am Coll Cardiol Interv*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2014.02.009>
- Lee, E. J., Min, H. Y., Chung, H. J., Park, E. J., Shin, D. H., Jeong S. L., & Lee, S. K. (2005). A novel adenosine analog, thio-Cl-IB-MECA, induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochemical Pharmacology*, 70(6). <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2005.06.017>
- Lu, J., Pierron, A., & Ravid, K. (2003). An adenosine analogue, IB-MECA, down-regulates estrogen receptor and suppresses human breast cancer cell proliferation 1. *Cancer Research* 63, <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/19/6413/2508112/ch1903006413.pdf>
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American Journal of Pathology*, 153(3). [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65628-3)
- Macedo, F., Ladeira, K., Pinho, F., Saraiva, N., Bonito, N., Pinto, L., & Gonçalves, F. (2017). Bone metastases: An overview. *Oncology Reviews*, 11(1). <https://doi.org/10.4081/oncol.2017.321>
- Madi, L., Ochaion, A., Rath-Wolfson, L., Bar-Yehuda, S., Erlanger, A., Ohana, G., Harish, A., Merimski, O., Barer, F., & Fishman, P. (2004). The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: Potential target for tumor growth inhibition. *Clinical Cancer Research*, 10(13). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0651>
- Merighi, S., Mirandola, P., Milani, D., Varani, K., Gessi, S., Klotz, K. N., Leung, E., Baraldi, P. G., & Borea, P. A. (2002). Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(4). <https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2002.00111.X>
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Pres)*, 11. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>
- Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414(6866). <https://doi.org/10.1038/414916a>

- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of breast cancer. En: Mayrovitz, H. N. (Ed). *Breast Cancer*, (pp. 31–42). Brisbane. <https://doi.org/10.36255/EXON-PUBLICATIONS-BREAST-CANCER-SUBTYPES>
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133(3421). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0)
- Panjehpour, M., Castro, M., & Klotz, K. N. (2005). Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A_{2B} adenosine receptors mediating a Ca²⁺ signal. *British Journal of Pharmacology*, 145(2). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706180>
- Panjehpour, M., & Karami-Tehrani, F. (2008). Adenosine Modulates Cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors. *Oncology Research*, 16. <https://doi.org/10.3727/000000007783629981>
- Prystowsky, E. N., Niazi, I., Curtis, A. B., Wilber, D. J., Bahnson, T., Ellenbogen, K., Dhala, A., Bloomfield, D. M., Gold, M., Kadish, A., Fogel, R. I., Gonzalez, M. D., Belardinelli, L., Shreeniwas, R., & Wolff, A. A. (2003). Termination of paroxysmal supraventricular tachycardia by tecadenoson (CVT-510), a novel A₁-adenosine receptor agonist. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(6). [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00987-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00987-2)
- Ren, T., Tian, T., Feng, X., Ye, S., Wang, H., Wu, W., Qiu, Y., Yu, C., He, Y., Zeng, J., Cen, J., & Zhou, Y. (2015). An adenosine A₃ receptor agonist inhibits DSS-induced colitis in mice through modulation of the NF-κB signaling pathway. *Scientific reports*, 5(9047). <https://doi.org/10.1038/SREP09047>
- Rimmer, J., Peake, H. L., Santos, C. M. C., Lean, M., Bardin, P., Robson, R., Haumann, B., Loehrer, F., & Handel, M. L. (2007). Targeting adenosine receptors in the treatment of allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(1). <https://doi.org/10.1111/J.1365-2222.2006.02546.X>
- Roodman, D. G. (2004). Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*, 350. <https://doi.org/10.1056/NEJMr030831>
- Saito, M., Yaguchi, T., Yasuda, Y., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2010). Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A₁ adenosine receptors. *Cancer Letters*, 290(2). <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2009.09.011>
- Samsel, M., & Dzierzbicka, K. (2011). Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates. *Pharmacological Reports*, 63(3). [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70573-4](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70573-4)
- Savelieva, I., & Camm, J. (2008). Anti-arrhythmic drug therapy for atrial fibrillation: current anti-arrhythmic drugs, investigational agents, and innovative approaches. *EP Europace*, 10(6). <https://doi.org/10.1093/EUROPACE/EUN130>
- Seto, M., Honma, K., & Nakagawa, M. (2010). Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Science*, 101(3). <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01452.x>

- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS15022024>
- Sowder, M. E., & Johnson, R. W. (2019). Bone as a preferential site for metastasis. *JBMR Plus*, 3(3). <https://doi.org/10.1002/JBM4.10126>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suva, L. J., Washam, C., Nicholas, R. W., & Griffin, R. J. (2011). Bone metastasis: Mechanisms and therapeutic opportunities. En *Nature Reviews Endocrinology*, 7(4). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.227>
- Tahara R. K., Brewer T. M., Theriault R. L., & Ueno N., T. (2019). Bone metastasis of breast. En Amir Ahmad (ed). *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance. Advances in Experimental Medicine and Biology*. (Vol. 1152, pp. 105-129). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_7
- Torres, Á., Erices, J. I., Sanchez, F., Ehrenfeld, P., Turchi, L., Virolle, T., Uribe, D., Niechi, I., Spichiger, C., Rocha, J. D., Ramirez, M., Salazar-Onfray, F., San Martín, R., & Quezada, C. (2019). Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of Glioblastoma Stem-like Cells through A3 Adenosine Receptor activation under hypoxia. *Cancer Letters*, 446(1). <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.01.004>
- Tsuchiya, A., & Nishizaki, T. (2015). Anticancer effect of adenosine on gastric cancer via diverse signaling pathways. *World Journal of Gastroenterology WJG*, 21(39). <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I39.10931>
- Weidle, U., Birzele F., Kollmorgen, G., & Rüger R. (2016). Molecular mechanisms of bone metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*, 13(1). <https://cgp.iarjournals.org/content/13/1/1.long>
- Varani, K., Vincenzi, F., Targa, M., Paradiso, B., Parrilli, A., Fini, M., Lanza, G., & Borea, P. A. (2013). The stimulation of A3 adenosine receptors reduces bone-residing breast cancer in a rat preclinical model. *European Journal of Cancer*, 49(2). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.06.005>
- Velasco-Loyden, G., Pérez-Martínez, L., Vidrio-Gómez, S., Pérez-Carreón, J. I., & Chagoya de Sánchez, V. (2017). Cancer chemoprevention by an adenosine derivative in a model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *Tumor Biology*, 39(2). <https://doi.org/10.1177/1010428317691190>
- Virtanen, S. S., Kukkonen-Macchi, A., Vainio, M., Elima, K., Härkönen, P. L., Jalkanen, S., & Yegutkin, G. G. (2014). Adenosine inhibits tumor cell invasion via receptor-independent mechanisms. *Molecular Cancer Research*, 12(12). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0302-T>
- Wu, L. F., Li, G. P., Feng, J. L., & Pu, Z. J. (2006). Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(4). <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00302.x>

- Xia, B., & Wang, J. (2019). Adenosine inhibits ovarian cancer growth through regulating RhoGDI2 protein expression. *Drug Design, Development and Therapy*, 13. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S219028>
- Yang, D., Zhang, Q., Ma, Y., Che, Z., Zhang, W., Wu, M., Wu, L., Liu, F., Chu, Y., Xu, W., McGrath, M., Song, C., & Liu, J. (2019). Augmenting the therapeutic efficacy of adenosine against pancreatic cancer by switching the Akt/p21-dependent senescence to apoptosis. *EBioMedicine*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.068>