

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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**



**Doctorado en Ciencias
en Nanociencias**

**Efectos del derivado de adenosina IFC-305 en la progresión y
metástasis del cáncer de mama triple negativo**

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

Presenta:

Claudia Alcira Espinoza González

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Claudia Alcira Espinoza González

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Marina Macías Silva

Dr. Andrés Zárate Romero



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Claudia Alcira Espinoza González** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Nanociencias.

Efectos del derivado de adenosina IFC-305 en la progresión y metástasis del cáncer de mama triple negativo

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Directora de tesis

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una forma agresiva de cáncer sin receptores hormonales, lo que limita las opciones de tratamiento. Por eso, la búsqueda de nuevas terapias es fundamental. En este contexto, el compuesto IFC-305, un derivado de adenosina ha mostrado un potencial prometedor. Esta tesis se enfoca en evaluar el efecto del IFC-305 en la viabilidad y migración de las células de CMTN, su impacto en una vía de señalización clave para la metástasis, y su eficacia en el tratamiento de metástasis óseas. Se realizaron experimentos in vitro para analizar la toxicidad de IFC-305 en células sanas y cancerosas. A diferencia de las células sanas, que no mostraron cambios significativos en su viabilidad, las células de CMTN experimentaron una reducción notable. A concentraciones de 10 y 20 mM, el compuesto disminuyó significativamente la viabilidad de las células cancerosas después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Además, se evaluó el efecto del compuesto en la capacidad de las células de CMTN para migrar. A concentraciones de 5, 10 y 20 mM, el IFC-305 redujo la migración celular. Este hallazgo es importante, ya que la migración es un paso crucial en la diseminación metastásica del cáncer. Para entender el mecanismo de acción de IFC-305, se estudió su impacto en la vía de señalización de TGF- β , que juega un papel clave en la progresión tumoral y la metástasis. Los resultados mostraron que el IFC-305, a altas concentraciones, inhibe la activación de esta vía al reducir la fosforilación de las proteínas SMAD2/3, que son mediadoras de la señalización del TGF- β . Se sabe que la vía de TGF- β también regula la expresión del gen PMEPA1, que se ha relacionado con la progresión del tumor y la metástasis ósea. El tratamiento con IFC-305 disminuyó los niveles de mRNA de este gen, lo que apoya la idea de que el compuesto interrumpe la señalización del TGF- β . Finalmente, se evaluó el efecto terapéutico del IFC-305 en un modelo de ratón con metástasis ósea. Se indujo la metástasis en los ratones y luego se les administró IFC-305 siguiendo tres esquemas de dosificación. Todos los esquemas mostraron una reducción significativa del área de las lesiones osteolíticas. El tratamiento más efectivo fue la administración de 100 mg/kg en días alternos, que logró una reducción del 68.9 % en el tamaño de las lesiones. Curiosamente, la dosificación de 50 mg/kg en días alternos fue más eficaz que la dosificación diaria de la misma cantidad, lo que sugiere que la frecuencia de la dosis es un factor importante en la efectividad del compuesto. En conclusión, este estudio demuestra que el IFC-305 inhibe la viabilidad y migración de células de CMTN, interrumpe la vía de señalización de TGF- β y reduce eficazmente las lesiones óseas en un modelo animal. Estos hallazgos validan el potencial del IFC-305 como un agente terapéutico prometedor para el tratamiento de la metástasis ósea en el cáncer de mama triple negativo.

Palabras clave: Derivado de adenosina, IFC-305, Cáncer de mama, TGF- β , Metástasis ósea

Abstract of the thesis presented by **Claudia Alcira Espinoza González** as a partial requirement to obtain the PhD of Science degree in Nanoscience.

Effects of the adenosine derivative IFC-305 on the progression and metastasis of Triple-Negative Breast Cancer

Abstract approved by:

Patricia Juárez Camacho, Dra.
Thesis Director

Triple-negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive subtypes of breast cancer, distinguished by its high metastatic potential and the absence of hormone receptors, which severely limits available therapeutic options. Consequently, the search for novel compounds with therapeutic potential is of critical importance. IFC-305, an adenosine derivative, has demonstrated promising anti-tumor activity in preclinical models of hepatocellular carcinoma. In this study, both *in vitro* and *in vivo* models were employed to evaluate the effect of IFC-305 on the viability of healthy and cancer cells, its impact on cell migration, its modulation of the TGF- β signaling pathway—a key driver of metastatic progression—and its potential therapeutic efficacy in the treatment of breast cancer bone metastasis. The effect of IFC-305 on cell viability was tested *in vitro*. In healthy cells, no significant reduction in cell viability was observed even at the highest concentrations (10 and 20 mM) after 24 h. In contrast, TNBC cells exhibited a marked decrease in viability at these concentrations across all time points tested (24, 48, and 72 h). Additionally, wound healing assays revealed that IFC-305 significantly inhibited cancer cell migration, particularly at concentrations of 5, 10, and 20 mM after 24 h, suggesting an anti-migratory effect relevant to metastatic dissemination. At the molecular level, Western blot analysis was conducted to assess the phosphorylation of SMAD2/3, key cytoplasmic mediators of the canonical TGF- β signaling pathway. In the absence of TGF- β 1, SMAD2/3 phosphorylation remained at basal levels; however, upon TGF- β stimulation, a robust increase in phosphorylation was observed. Treatment with IFC-305 at higher concentrations (10 and 20 mM) significantly attenuated SMAD2/3 phosphorylation, indicating that IFC-305 may inhibit the activation of the TGF- β /SMAD signaling axis in TNBC cells. TGF- β signaling has been shown to contribute to the maintenance of cancer stem cells (CSCs) in breast cancer, in part by upregulating the expression of PMEPA1, a TGF- β -responsive gene involved in modulating this pathway. In the present study, IFC-305 treatment resulted in decreased mRNA levels of Pmepa1, supporting its role in downregulating this signaling cascade associated with tumor progression and bone metastasis. *In vivo*, a mouse model of bone metastasis was established via intracardiac inoculation of 4T1 cells. Mice were treated with IFC-305 at different dosing schedules: 50 mg/kg daily, 50 mg/kg every 2 days, and 100 mg/kg every 2 days. All treatment groups showed a significant reduction in osteolytic lesion area compared to controls. Notably, the most substantial reduction (68.9%) was observed in the group receiving 100 mg/kg every 2 days. Interestingly, the 50 mg/kg every 2 days regimen proved more effective than daily administration, suggesting that dosing frequency modulates the therapeutic activity of IFC-305. Collectively, these findings highlight the therapeutic potential of IFC-305 in mitigating bone metastases in TNBC and underscore the relevance of targeting the TGF- β signaling pathway in this context.

Keywords: Adenosine derivative, IFC-305, Breast cancer, TGF- β , Bone metastases.

Dedicatoria

A mi mami, Claudia Alcira González García,

Porque no importa la distancia, siempre te siento cerquita, abrazándome con tus palabras, sosteniéndome con tu amor incondicional. Gracias por ser mi refugio, mi mejor amiga, mi confidente, mi fuerza en los momentos difíciles y mi alegría en los días buenos. Por escucharme, por impulsarme cuando dudé de mí, por no dejarme rendir, por recordarme quién soy y de dónde vengo. Este logro es tanto tuyo como mío, porque sin tu amor, sin tu esfuerzo, sin tu ejemplo, este sueño jamás habría sido posible. Te amo con cada pedacito de mi alma, y siempre, siempre, serás mi mayor inspiración.

A mis abuelos, Concepción García Acuña y Ramón González Godoy,

Porque su amor ha sido mi refugio, su cariño mi motor y su ejemplo mi guía. Sus abrazos, sus llamadas, sus palabras llenas de sabiduría han sido mi ancla en cada paso de este camino. Gracias por enseñarme con su vida el verdadero significado del esfuerzo, la humildad y la familia. Gracias por celebrar conmigo cada pequeño triunfo como si fuera el más grande, por darme la certeza de que nunca camino sola. Todo lo que soy, lleva un pedacito de ustedes.

A mi sobrina, Liah Nirvana Camacho Jara,

Porque desde que llegaste iluminaste mi vida y le diste un nuevo propósito. Beba, quiero que sepas que todo lo que hago, también lo hago por ti. Para que veas que los sueños se alcanzan, que las metas se logran y que no hay adversidad que pueda detenernos cuando creemos en nosotras mismas. Siempre estaré aquí para ti, para impulsarte, para aplaudirte, para recordarte que el mundo es tuyo. Mi amor por ti es infinito.

A mi prometido, Miguel Emiliano Ventura Macías,

Por ser mi compañero de vida, mi apoyo incondicional, mi paz en medio del caos. Gracias por creer en mí incluso en los momentos en los que yo misma dudé, por sostenerme cuando sentí que flaqueaba, por recordarme con cada palabra y cada gesto que no estoy sola. Este capítulo llega a su fin, pero el siguiente lo escribiremos juntos, y eso me emociona. Gracias por caminar a mi lado, por ser mi amor, mi hogar y mi futuro.

“Si te aflige alguna cosa externa, no es ella quien te molesta, sino tu propio juicio sobre ella. Y está en tu poder borrar ese juicio ahora mismo.”

- Marco Aurelio

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) – Departamento de Innovación Biomédica (DIB) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) – Departamento de Bionanotecnología, por brindarme el espacio, la confianza y la formación que han sido fundamentales para la obtención de mi grado doctoral.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado a través del número de *Curriculum vitae* universal (CVU) 783573 dentro del programa de becas de posgrado nacional, lo que hizo posible la realización de mis estudios de doctorado.

A mi asesora de tesis, Dra. Patricia Juárez, por su apoyo incondicional, paciencia y enseñanza a lo largo de estos años. Su guía ha sido clave en mi crecimiento como investigadora, impulsándome siempre a salir de mi zona de confort al motivarme a participar en congresos, cursos y talleres. Elegí trabajar con usted porque sabía que el doctorado no sería un camino fácil y porque usted entiende que, además de ser científicos, también somos humanos, siempre promoviendo un equilibrio en nuestras vidas.

A mi comité de tesis, gracias por el tiempo y esfuerzo dedicados a mi formación, por compartir su experiencia y pasión por la ciencia, y por cada palabra de aliento que me motivó a dar lo mejor de mí:

- Dr. Rafael Vázquez, por su confianza y por abrirme las puertas de su laboratorio desde el inicio de mi doctorado.
- Dr. Pierrick Fournier, por su dedicación, paciencia y la invaluable capacitación en las técnicas de laboratorio utilizadas, además de compartir su conocimiento y buenas prácticas científicas.
- Dra. Marina Macías, por sus preguntas siempre acertadas que me impulsaron a profundizar en el estudio de las vías de señalización.
- Dr. Andrés Zárate, por su generosidad al compartir su conocimiento en expresión y purificación de proteínas, así como por hacerme sentir parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Verónica Villagrana, por su invaluable guía y enseñanza a lo largo de mi formación. Su apoyo fue fundamental, especialmente en el aprendizaje del protocolo de ensamblaje y desensamblaje de partículas tipo virus como agentes de nanovehículos.

A la Dra. Denisse Re, directora de estudios de posgrado del CICESE, por su apoyo en la etapa final de este proceso.

A la Dra. Catalina López Bastidas, coordinadora del posgrado en Nanociencias, y a la M.P.C.C. Laura A. Rosales Vásquez, asistente de coordinación, por su respaldo en los trámites administrativos del posgrado CICESE-UNAM, así como por su ayuda constante y por estar siempre al pendiente durante el proceso más complicado y desafiante de esta etapa. Gracias por no dejarnos rendirnos y por ser un apoyo continuo, tanto en lo académico como en lo personal.

A todo el personal administrativo del CICESE: Dolores Sarracino, Norma Fuentes, Citlali Romero, Elizabeth Rubí, Álvaro Armenta, Ruth Eaton y Nadua Dajlala, por su amabilidad y disposición, siempre con una sonrisa.

A mis profesores: Isabel Pérez, Leonel Cota, Jimena Carrillo, Rubén Cadena, Elizabeth Ponce, Edna Sánchez, Pierrick Fournier, Patricia Juárez y Aida Cortés, por compartir su conocimiento y motivación en cada etapa de mi doctorado.

Al Dr. Pierrick Fournier, M.C. Samanta Jiménez, Dr. Ricardo González, M.C. Brenda Iduarte, M.C. Tonatzin Zertuche, M.C. Hugo Velásquez y M.C. Sharlin Landeros, por su colaboración en la realización de experimentos *in-vivo* y por fomentar un ambiente de trabajo cálido y coordinado.

A los equipos técnicos de investigación:

- Departamento de Innovación Biomédica: Dra. Johana Bernáldez, M.C. Samanta Jiménez, Dr. Ricardo González y Dr. Jahaziel Gasperin, por su apoyo en el uso de equipos y técnicas.
- Departamento de Biotecnología Marina – CICESE: Dra. Edna Sánchez, por su apoyo en el uso del equipo ChemiDoc Imaging System.

- Departamento de Bionanotecnología – UNAM: M.I. Itandehui Betanzo, Dra. Ana Rodríguez y M.C. Elizabeth Loreda, por su asistencia en el manejo de equipos.
- Instituto de Biotecnología – UNAM: Biol. Felipe Olvera, por su experiencia en el análisis de huesos por radiografía.

A mi grupo de investigación, *Ensenada Bone and Cancer Research*, dirigido por la Dra. Patricia Juárez y el Dr. Pierrick Fournier, por su valioso apoyo y por alentarnos a dar siempre lo mejor de nosotros como futuros científicos. A mis compañeros del laboratorio, PnP, por su compañerismo inquebrantable durante las largas jornadas de trabajo.

A los alumnos que tuve el privilegio de guiar durante su servicio social: Clarissa Nieto, Jeshua Vázquez y Verónica Olachea, por su entusiasmo y dedicación, que me enseñaron la importancia de la paciencia y me motivaron a mejorar día a día.

A mis compañeros y amigos de Bionano, quienes me hicieron sentir parte de su comunidad con su calidez y apoyo constante: Gloria Salinas, Kendra Ramírez, Carlos Medrano, Mariana Herrera, Elizabeth Loreda, Sheila Magdaleno, Milton Naranjo y Fidel Ruiz.

A mis grandes amigos, Tonatzin Zertuche, Brenda Iduarte, Oyuki Mendoza, Hugo Velasquez y Kevin Martínez por acompañarme en los momentos más difíciles, por cada café compartido, cada risa y cada conversación que me dio fuerza para continuar.

A mis suegros, Alma Macías y Miguel Ventura, y a mi cuñada, Abril Ventura, por su constante apoyo, sus palabras de aliento y por estar presentes en esta etapa tan importante de mi vida.

A mi familia González García, tíos y primos, por su amor incondicional, su apoyo inquebrantable y por recordarme siempre de dónde vengo y hacia dónde voy.

A mi papá, Pedro Rosales Grano, gracias por estar siempre presente, por tu apoyo silencioso pero constante, y por demostrarme con el ejemplo que este camino llamado doctorado puede recorrerse con integridad, esfuerzo y paciencia.

A Ashtanga Yoga Baja Club, por su calidez, amabilidad y la hermosa energía que siempre transmiten. Su compañía fue un gran sostén emocional durante uno de los momentos más complicados de mi proceso de tesis. Encontrarme con ustedes hizo una gran diferencia.

Me siento profundamente agradecida con la vida, con Dios y con el universo por darme la oportunidad de dedicarme a aquello que verdaderamente me apasiona y me inspira.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	xiii
Lista de tablas.....	xv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Cáncer de mama	3
1.1.1.1 Características biológicas del cáncer de mama	4
1.1.2 Metástasis y cascada metastásica en el cáncer	6
1.1.3 Metástasis ósea y ciclo vicioso osteolítico	8
1.1.4 Tratamientos actuales en clínica.....	10
1.1.5 Función de la vía de señalización del TGF- β en cáncer de mama y metástasis a hueso	12
1.1.5.1 Mecanismo de la vía de señalización del TGF- β	15
1.1.6 Derivado de adenosina IFC-305: definición, mecanismo de acción y aplicaciones	17
1.1.7 Efectos del IFC-305 en cáncer y su posible aplicación en metástasis ósea	19
1.2 Hipótesis	21
1.3 Objetivos	21
1.3.1 Objetivo general	21
1.3.2 Objetivos específicos.....	21
Capítulo 2. Metodología.....	22

2.1	Compuesto derivado de adenosina IFC-305	22
2.1.1	Preparación del compuesto IFC-305	22
2.2	Cultivo celular	22
2.3	Viabilidad celular en células CMTN <i>in-vitro</i>	23
2.4	Migración celular de células metastásicas a hueso <i>in-vitro</i>	24
2.5	Metástasis ósea en modelo murino <i>in-vivo</i>	24
2.5.1	Mantenimiento de ratones	24
2.5.2	Preparación de células para inoculación intracardiaca	25
2.5.3	Inoculación intracardiaca	25
2.5.4	Tratamiento con el compuesto derivado de adenosina IFC-305	26
2.5.5	Colecta de huesos.	26
2.5.6	Análisis de radiografías	27
2.5.7	Obtención de lisados y cuantificación de proteínas	27
2.5.8	Electroforesis y transferencia de proteínas	28
2.6	Análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR	29
2.6.1	Cultivo celular y extracción de RNA total	29
2.6.2	PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)	30
2.6.3	Análisis estadísticos	31
Capítulo 3.	Resultados	32
3.1	Viabilidad celular en células CMTN <i>in-vitro</i>	32
3.2	Migración celular de células metastásicas a hueso <i>in-vitro</i>	33
3.3	Métastasis osea en modelo murino <i>in-vivo</i>	35
3.4	Análisis del estado de activación de las proteínas Smad por Western-blot	37
3.5	Análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR	39
Capítulo 4.	Discusión	41

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas.....	46
Literatura citada	47

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Características distintivas del cáncer. Representación de las características específicas del cáncer según Hanahan y Weinberg, que describen las propiedades biológicas clave que permiten la progresión tumoral y la metástasis. Modificado de Hanahan & Weinberg (2011). ...	6
Figura 2. Cascada metastásica en el cáncer. Representación esquemática de la cascada metastásica, que describe las etapas clave desde la diseminación de las células tumorales hasta la formación de metástasis en órganos secundarios. Modificado de Jin & Mu (2015).....	8
Figura 3. Mecanismos del círculo vicioso en la metástasis ósea. Las células metastásicas en el hueso estimulan la actividad de los osteoclastos y osteoblastos, generando un entorno que favorece la resorción ósea y la liberación de factores de crecimiento que potencian la progresión tumoral. Modificado de Juárez & Guise (2010).	10
Figura 4. Vía de señalización canónica de TGF- β . La vía canónica de TGF- β se activa tras la unión del ligando a sus receptores de tipo I y II, promoviendo la fosforilación de SMAD2/3, que forma un complejo con SMAD4 para modular la transcripción génica. Modificado de Juárez & Guise (2010).	17
Figura 5. Efecto del compuesto IFC-305, derivado de adenosina, sobre la viabilidad celular en líneas de cáncer de mama y células no tumorales. (A) Células de riñón embrionario humano 293T, (B) células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y (C) células de cáncer de mama murino 4T1 fueron tratadas con el compuesto IFC-305 a una concentración determinada durante 24, 48 y 72 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante la medición de la densidad óptica a 570 nm, normalizada al control (100%). Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías con prueba post-test de Dunnett (**P = 0.001, ****P < 0.0001 vs. control).	33
Figura 6. El tratamiento con IFC-305 inhibe la migración e invasión de células de cáncer de mama metastásico óseo <i>in-vitro</i> a las 24 horas. (A) Imágenes representativas del ensayo de cicatrización de heridas en células MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de IFC-305 en distintos tiempos. (B) Cuantificación del cierre de la herida en MDA-MB-231. (C) Imágenes representativas del ensayo en células 4T1. (D) Cuantificación del cierre de la herida en 4T1. Los datos se presentan como gráficas lineales con media $\pm$ SEM ($n = 3$) y se analizaron mediante ANOVA de dos vías con prueba post-test de Dunnett. Imágenes adquiridas a un aumento de 10X; barras de escala = 200 nm.....	34
Figura 7. El tratamiento con IFC-305 (100 mg/kg, dosis alterna) reduce la formación de metástasis óseas en un modelo murino de cáncer de mama. Se inocularon células 4T1 en el ventrículo cardíaco izquierdo de ratones Balb/C para inducir metástasis óseas, y posteriormente se administró tratamiento con o sin IFC-305. (A) Peso corporal de los ratones durante el tratamiento. (B) Cuantificación del área de osteólisis en radiografías ($n = 6$ para IFC-305; $n = 5$ para control). Los datos se presentan como histogramas y se analizaron mediante ANOVA de una vía con prueba post-test de Dunnett.....	37
Figura 8. El compuesto IFC-305, derivado de adenosina, inhibe la activación de la vía canónica de señalización de TGF- β en células de cáncer de mama metastásico óseo <i>in-vitro</i> . Los lisados proteicos de células tratadas se analizaron mediante Western blot para evaluar los niveles de	

fosforilación de las proteínas SMAD2/3 en (A) MDA-MB-231 y (C) 4T1. La expresión de SMAD2/3 total se utilizó como control de carga. Las gráficas de cuantificación de la intensidad de grises de las bandas de Western blot se presentan para (B) MDA-MB-231 y (D) 4T1.39

Figura 9. El compuesto IFC-305, derivado de adenosina, inhibe la expresión génica de *Pmepa1* en células de cáncer de mama metastásico óseo *in-vitro*. Las células (A) MDA-MB-231 y (B) 4T1 fueron tratadas con IFC-305 durante 1 hora, seguido de la inducción con TGF- β 1 durante 1 hora. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con prueba post-test de comparaciones múltiples de Šídák (vs. control).40

Lista de tablas

Página

Tabla 1. Descripción de anticuerpos utilizados en Western blot 29

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en PCR cuantitativa 31

Capítulo 1. Introducción

El cáncer es un problema de salud pública de gran magnitud a nivel mundial. En 2022, se registraron aproximadamente 20 millones de nuevos casos y la enfermedad fue responsable de casi una de cada seis muertes (16.8 %) en general, así como de una de cada cuatro (22.8 %) entre las enfermedades no transmisibles (Bray et al., 2024). Entre los diversos tipos de cáncer, el de mama es el más frecuente en mujeres, con un nuevo diagnóstico estimado cada 18 segundos en el mundo (Harbeck et al., 2019). En 2018, se reportaron aproximadamente 2.1 millones de casos nuevos, con una incidencia anual superior a 1.6 millones (Bray et al., 2018). A pesar de los avances en diagnóstico, tratamiento y prevención, el cáncer de mama continúa siendo una de las principales causas de mortalidad femenina, con más de 500,000 muertes al año a nivel global (Jin & Mu, 2015).

El cáncer de mama es una enfermedad molecularmente heterogénea (Harbeck et al., 2019), caracterizada por distintas alteraciones genéticas y moleculares. Estas diferencias moleculares han permitido clasificar al cáncer de mama en tres subtipos principales: 1) receptor hormonal positivo y ERBB2 negativo (HR+/ERBB2-), caracterizado por la expresión de receptores de estrógeno y/o progesterona sin sobreexpresión de HER2; 2) ERBB2 positivo (ERBB2+), con sobreexpresión o amplificación del gen HER2, independientemente del estado de los receptores hormonales; y 3) cáncer de mama triple negativo (CMTN), definido por la ausencia de expresión de receptores de estrógeno, progesterona y HER2.

El CMTN representa aproximadamente el 15 % de los casos de cáncer de mama y se asocia con un peor pronóstico debido a su agresividad y alto riesgo de recurrencia, especialmente en los primeros años tras el diagnóstico (Lara-Medina et al., 2011). Además, tiene una mayor tendencia a desarrollar metástasis en órganos vitales como el cerebro, pulmones, hígado y huesos, lo que contribuye significativamente a la mortalidad asociada a esta enfermedad (Foulkes et al., 2010).

El tratamiento del cáncer de mama es multidisciplinario y se adapta a las características individuales de cada paciente. Entre las principales estrategias terapéuticas se incluyen: cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia endocrina, inmunoterapia, entre otras (Waks & Winer, 2019).

Aunque existen diversas estrategias terapéuticas, el CMTN presenta un desafío clínico debido a la falta de dianas terapéuticas específicas. La ausencia de expresión de los receptores hormonales y HER2 limita

el uso de terapias dirigidas, lo que aumenta la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Más del 90 % de las muertes por cáncer de mama metastásico se deben a la propagación de células tumorales a órganos distantes (Massagué & Obenauf, 2016). Las metástasis comprometen órganos vitales y generan múltiples tumores, los cuales son difíciles de extirpar quirúrgicamente y desarrollan resistencia a las terapias sistémicas (Harbeck et al., 2019; Massagué & Obenauf, 2016). La metástasis ósea es una complicación frecuente del cáncer de mama avanzado, presente en más del 80 % de los pacientes con enfermedad avanzada (Suva et al., 2011). El hueso proporciona un microambiente favorable para la proliferación de células tumorales, lo que puede generar complicaciones como dolor óseo, fracturas patológicas, hipercalcemia y compresión nerviosa (Weber & Kominsky, 2018). La destrucción ósea en estas metástasis está mediada principalmente por osteoclastos, y diversos factores de crecimiento liberados de la matriz ósea, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), pueden promover la progresión metastásica (Yin et al., 1998; Massagué, 2012; Batlle & Massagué, 2019).

Se ha demostrado que el TGF- β desempeña un papel clave en la metástasis del cáncer de mama al actuar directamente sobre las células tumorales, lo que facilita el desarrollo de metástasis óseas osteolíticas (Yin et al., 1998; Ganesh & Massagué, 2021; Thordur et al., 2014). Por lo tanto, comprender los mecanismos moleculares involucrados en la metástasis ósea en CMTN es crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

El derivado de adenosina IFC-305 ha demostrado tener efectos prometedores en la prevención y tratamiento del cáncer. Estudios previos han revelado que el IFC-305 inhibe el desarrollo de lesiones preneoplásicas en un modelo de hepatocarcinogénesis *in vivo*. De igual manera, se observó una reducción significativa en el área nodular positiva para γ -glutamyl transferasa (GGT), un marcador tumoral en la carcinogénesis hepática química (Velasco-Loyden et al., 2017).

En el presente trabajo, se evaluó la eficacia de IFC-305 como agente terapéutico para la metástasis ósea en el cáncer de mama. Nuestra investigación explora la capacidad de IFC-305 para modular la vía de señalización canónica de TGF- β y su impacto directo en las células cancerosas, además de evaluar sus efectos *in vivo* utilizando un modelo murino de metástasis ósea. Los hallazgos obtenidos ofrecerán nuevas perspectivas para el desarrollo de estrategias de tratamiento dirigidas a uno de los aspectos más complejos del cáncer de mama triple negativo: la metástasis.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una de las neoplasias malignas más frecuentes a nivel mundial y constituye la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (Bray et al., 2024). Se origina a partir de una proliferación descontrolada de células epiteliales en el tejido mamario, y aunque los avances en el diagnóstico y tratamiento han permitido detectar la enfermedad en etapas tempranas, sigue representando un problema de salud pública de gran magnitud debido a su alta incidencia, recurrencia y mortalidad (Harbeck et al., 2019). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2020 se diagnosticaron más de 2.3 millones de nuevos casos a nivel global, lo que equivale aproximadamente a uno de cada ocho casos de cáncer. A pesar de los avances terapéuticos, las desigualdades en el acceso a servicios médicos siguen condicionando una elevada tasa de mortalidad en regiones con recursos limitados, donde el diagnóstico tardío y la falta de tratamientos efectivos son aún una constante (Waks & Winer, 2019). Específicamente en México, los decesos por cáncer de mama en mujeres representan el 17 % del total de muertes relacionadas con cáncer, consolidándose como un problema prioritario de salud pública (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2022).

El cáncer de mama no constituye una entidad clínica homogénea, sino que comprende un espectro de subtipos con características moleculares, clínicas y pronósticas diferenciadas (Bianchini et al., 2016). Esta heterogeneidad influye directamente en su comportamiento biológico y en la respuesta al tratamiento, lo que ha impulsado el desarrollo de terapias dirigidas de acuerdo con el perfil molecular de cada tumor (Bianchini et al., 2016). Entre estos subtipos, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa un desafío particular en la práctica clínica (Zardavas et al., 2015).

El CMTN se caracteriza por la ausencia de expresión de receptores hormonales de estrógeno (ER) y progesterona (PR), así como del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), lo que limita las opciones terapéuticas a quimioterapia citotóxica y confiere a este subtipo un fenotipo más agresivo, con mayor capacidad de invasión, metástasis temprana y peor pronóstico general (Zardavas et al., 2015). Se estima que el CMTN representa entre el 10% y el 20% de todos los cánceres de mama y afecta de forma desproporcionada a mujeres jóvenes, particularmente aquellas de origen latinoamericano y afrodescendiente (Lara-Medina et al., 2011; Justo et al., 2013). Diversos estudios

epidemiológicos han señalado que estas poblaciones no solo presentan una mayor prevalencia del subtipo triple negativo, sino también una mayor mortalidad asociada (Lara-Medina et al., 2011).

Además, la biología del CMTN en mujeres latinas y afrodescendientes muestra perfiles moleculares más agresivos, con alteraciones en vías de señalización involucradas en la proliferación celular, la plasticidad tumoral y la evasión inmune (Lara-Medina et al., 2011). Este patrón molecular no solo contribuye a su comportamiento clínico más invasivo, sino que también ha dificultado el desarrollo de terapias efectivas que mejoren la supervivencia a largo plazo (Bianchini et al., 2016). A pesar de los esfuerzos en investigación, la ausencia de blancos terapéuticos específicos continúa siendo un obstáculo importante, subrayando la necesidad urgente de identificar nuevos compuestos con potencial terapéutico que puedan responder a las particularidades de este subtipo.

La atención actual en el campo de la oncología traslacional se ha centrado en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del CMTN, incluyendo compuestos que puedan interferir en vías de señalización implicadas en su progresión y diseminación (Zardavas et al., 2015).

1.1.1.1 Características biológicas del cáncer de mama

Las características biológicas del cáncer han sido ampliamente descritas en el modelo conceptual propuesto por Hanahan y Weinberg, quienes identificaron una serie de propiedades funcionales denominadas “hallmarks of cancer” o características específicas. Estas capacidades permiten a las células malignas sobrevivir, proliferar y diseminarse dentro del organismo (Hanahan & Weinberg, 2011). En el contexto del cáncer de mama, estas características específicas incluyen la autosuficiencia en señales proliferativas, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, inducción de angiogénesis, activación de mecanismos de invasión y metástasis, evasión del sistema inmunológico, desregulación del metabolismo celular, inflamación tumoral sostenida e inestabilidad genómica (Hanahan & Weinberg, 2011). Estos procesos, aunque descritos de forma individual, están profundamente interconectados y funcionan de manera coordinada para promover la transformación maligna, la progresión tumoral y la resistencia terapéutica.

En el cáncer de mama, la expresión y predominancia de estas características específicas varían significativamente entre los distintos subtipos moleculares, lo que refleja su notable heterogeneidad biológica (Zardavas et al., 2015). Por ejemplo, en los subtipos luminales se observan alteraciones

predominantes en vías hormonales y proliferativas, mientras que en el cáncer de mama HER2 positivo destaca la amplificación del gen ERBB2, asociada con una activación constante de rutas mitogénicas (Waks & Winer, 2019). Sin embargo, es en el cáncer de mama triple negativo (CMTN) donde estas características adquieren una expresión más agresiva y multifactorial (Foulkes et al., 2010). La ausencia de receptores hormonales y HER2 en el CMTN excluye el uso de terapias dirigidas convencionales, lo que hace evidente la dependencia de este subtipo a múltiples mecanismos adaptativos y compensatorios que favorecen su progresión (Zardavas et al., 2015).

Numerosos estudios han demostrado que las células de CMTN presentan una elevada plasticidad fenotípica, lo que les permite transitar entre estados epiteliales y mesenquimales (Lara-Medina et al., 2011). Esta transición, conocida como Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés), potencia la capacidad migratoria, invasiva y de resistencia a tratamientos, favoreciendo la formación de metástasis en órganos distantes como el hueso, el pulmón y el cerebro (Jin & Mu, 2015). Asimismo, la EMT está estrechamente relacionada con la adquisición de propiedades similares a células madre tumorales, lo que incrementa su capacidad de autorrenovación, evasión inmune y resistencia a quimioterapias citotóxicas (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por otro lado, en el CMTN se ha documentado una elevada actividad de la vía de señalización de TGF- β , un regulador clave en la progresión tumoral y la formación de metástasis (Xie et al., 2018). En fases iniciales, esta vía puede actuar como supresor tumoral, pero en etapas avanzadas promueve la invasión, angiogénesis, remodelación del microambiente y evasión inmunológica (Imamura et al., 2012). Su sobreactivación en el contexto del cáncer de mama triple negativo ha sido vinculada a una mayor carga metastásica, particularmente en sitios óseos, donde establece un círculo vicioso entre las células tumorales y el microambiente óseo (Leivonen & Kähäri, 2007).

Además, las alteraciones epigenéticas, como la hipermetilación de promotores tumorales o la disregulación de microRNAs, también contribuyen a la reprogramación funcional de las células de CMTN (Harbeck et al., 2019). Estas modificaciones no solo promueven la expresión de genes implicados en la proliferación, migración y angiogénesis, sino que también limitan la efectividad de los tratamientos convencionales, incrementando la probabilidad de recurrencia tumoral (Leivonen & Kähäri, 2007). Esta complejidad biológica ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que vayan más allá del enfoque genético clásico, integrando mecanismos epigenéticos y metabólicos en el desarrollo de nuevas terapias (Di et al., 2019).

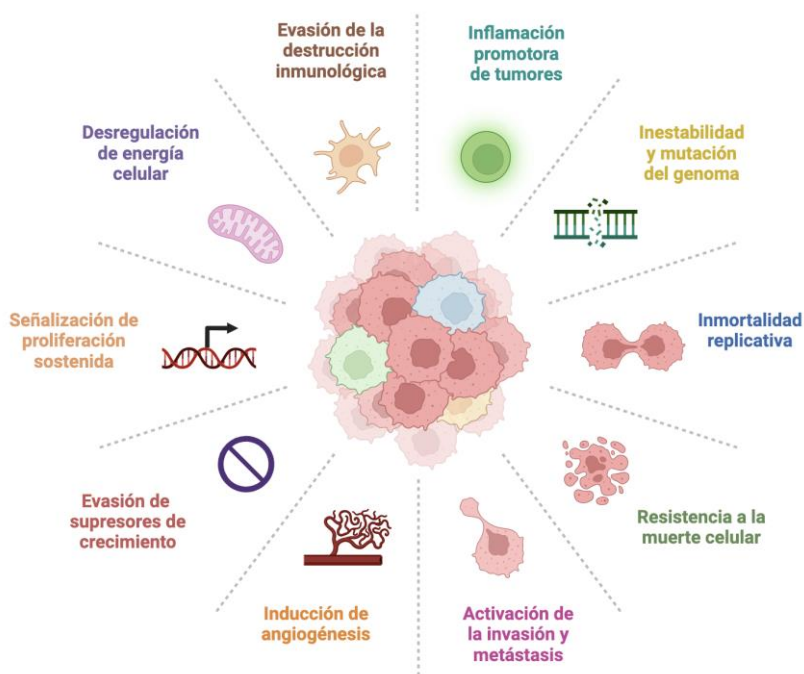


Figura 1. Características distintivas del cáncer. Representación de las características específicas del cáncer según Hanahan y Weinberg, que describen las propiedades biológicas clave que permiten la progresión tumoral y la metástasis. Modificado de Hanahan & Weinberg (2011).

1.1.2 Metástasis y cascada metastásica en el cáncer

La metástasis representa uno de los procesos más complejos y letales en la progresión del cáncer, siendo responsable de más del 90% de las muertes asociadas a esta enfermedad (Nguyen et al., 2009). Lejos de ser un evento aleatorio, la metástasis es el resultado de una serie de pasos altamente organizados que forman parte de la denominada cascada metastásica (Nguyen et al., 2009). Este proceso inicia localmente en el tumor primario y culmina con la colonización exitosa de células tumorales en tejidos distantes, donde forman lesiones secundarias que comprometen la función de órganos vitales (Chiang & Massagué, 2008).

La primera etapa de esta cascada es la transición epitelio-mesenquimal, un programa celular que permite a las células tumorales perder sus características epiteliales —como la adhesión celular— y adquirir un fenotipo mesenquimal, caracterizado por una mayor motilidad e invasividad (Zhang & Stuelten, 2024). Este cambio fenotípico otorga a las células tumorales la capacidad de desprenderse del tumor primario, invadir el estroma circundante y acceder a vasos linfáticos o sanguíneos, un proceso conocido como intravasación (Esposito et al., 2018). Una vez en la circulación, las células deben resistir el

estrés mecánico del flujo sanguíneo, evitar el reconocimiento y ataque del sistema inmunológico, y sobrevivir en un entorno hostil hasta alcanzar sitios anatómicos distantes (Massagué & Obenauf, 2016).

Posteriormente, las células metastásicas deben adherirse al endotelio, atravesar la barrera vascular (extravasación) y adaptarse al microambiente del nuevo tejido para establecer micrometástasis (Nguyen et al., 2009; Luzzi et al., 1998). Este proceso no siempre culmina en la formación inmediata de una lesión visible, ya que muchas células pueden entrar en un estado de latencia tumoral, permaneciendo viables pero no proliferativas por periodos prolongados (Esposito et al., 2018). La reactivación de estas células latentes representa un riesgo persistente de recaída, incluso años después de haber controlado el tumor primario, y constituye uno de los principales retos en el tratamiento del cáncer avanzado (Fares et al., 2020).

La cascada metastásica es regulada por una interacción compleja entre señales intrínsecas del tumor y factores extrínsecos del microambiente (Guisse, 2002). Diversas citoquinas, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular participan activamente en este proceso. Entre ellos, destaca la vía de señalización de TGF- β , la cual desempeña un papel dual en el cáncer: mientras que en etapas tempranas puede actuar como supresor del crecimiento tumoral, en fases avanzadas promueve la EMT, la migración celular, la inmunosupresión y la remodelación del microambiente, facilitando la metástasis (Esposito et al., 2018). En el contexto del cáncer de mama, y particularmente en el subtipo triple negativo, la activación sostenida de TGF- β se ha asociado con una mayor agresividad y capacidad metastásica, especialmente hacia el tejido óseo (Xie et al., 2018).

Además, estudios recientes han revelado que la plasticidad celular es un componente esencial en la metástasis. Esta plasticidad permite a las células tumorales adaptarse a distintos nichos metastásicos, modificar su metabolismo, evadir la respuesta inmune y resistir tratamientos antineoplásicos (Liu et al., 2021). En el CMTN, este fenómeno es particularmente relevante, dado que estas células carecen de blancos terapéuticos específicos y muestran una elevada heterogeneidad intra-tumoral (Leivonen & Kähäri, 2007). La capacidad de alternar entre estados epiteliales y mesenquimales, así como de adquirir propiedades similares a células troncales, les confiere una ventaja evolutiva que dificulta su eliminación (Searcy & Johnson, 2024).

Por otra parte, se ha propuesto que las células tumorales no viajan exclusivamente como unidades individuales, sino también como grupos celulares o clusters metastásicos, los cuales presentan una mayor eficiencia metastásica al preservar interacciones celulares beneficiosas (Schuster et al., 2021).

Estos clusters son menos susceptibles a la apoptosis inducida por pérdida de anclaje (anoikis) y parecen tener una mayor capacidad para iniciar colonias tumorales en órganos secundarios (Schuster et al., 2021).

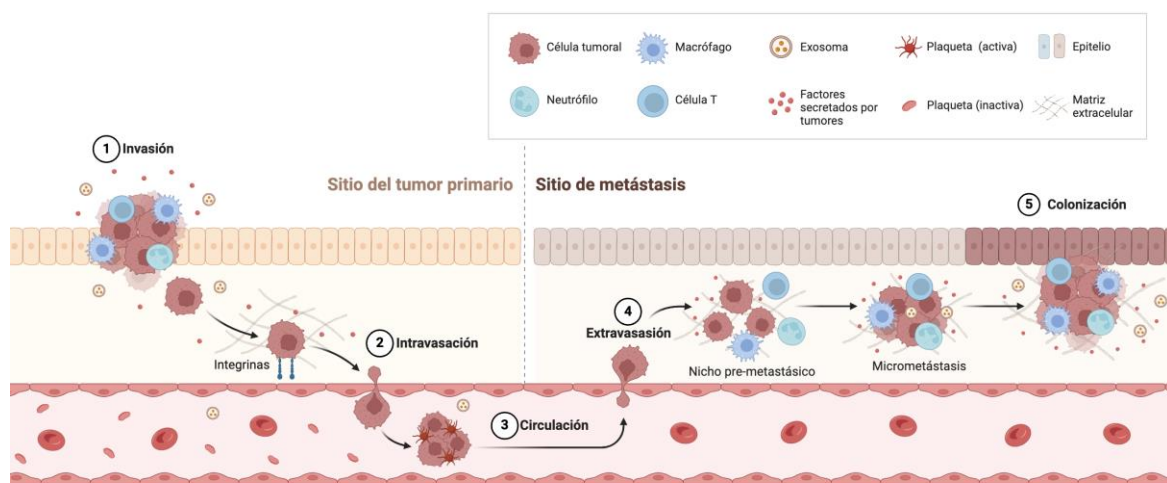


Figura 2. Cascada metastásica en el cáncer. Representación esquemática de la cascada metastásica, que describe las etapas clave desde la diseminación de las células tumorales hasta la formación de metástasis en órganos secundarios. Modificado de Jin & Mu (2015).

1.1.3 Metástasis ósea y ciclo vicioso osteolítico

En el cáncer de mama, el hueso constituye uno de los sitios preferenciales para el desarrollo de metástasis, particularmente en etapas avanzadas de la enfermedad (Akhurst & Hata, 2012). Se estima que más del 80 % de las pacientes con cáncer de mama metastásico desarrollan lesiones óseas, lo que convierte a la metástasis ósea en una complicación clínica de gran relevancia (Suva et al., 2011). Esta forma de diseminación secundaria no solo compromete la integridad estructural del esqueleto, sino que también agrava el pronóstico, reduce la supervivencia y deteriora significativamente la calidad de vida de las pacientes (Fares et al., 2020).

El tejido óseo proporciona un microambiente altamente dinámico y especializado, compuesto por células óseas, matriz extracelular mineralizada y una abundante red de factores de crecimiento, como el TGF- β , IGF-1, PDGF y BMPs (Guisse, 2002). Durante el proceso metastásico, las células tumorales que han migrado al hueso logran aprovechar este entorno rico en señales tróficas para promover su supervivencia, proliferación y expansión (Esposito et al., 2018). La metástasis ósea derivada del cáncer de mama suele ser de tipo osteolítico, es decir, se caracteriza por una destrucción progresiva del hueso

debido a la activación exacerbada de osteoclastos, las células responsables de la resorción ósea (Guise, 2002).

El fenómeno osteolítico en este contexto ha sido descrito mediante el modelo del ciclo vicioso, en el cual las células tumorales establecen una interacción patológica con el microambiente óseo (Guise, 2002). En este proceso, las células cancerosas secretan una serie de factores osteolíticos —entre ellos, la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP)— que inducen la diferenciación y activación de los osteoclastos. Esta activación incrementa la resorción de la matriz ósea, liberando al mismo tiempo factores de crecimiento que se encuentran almacenados en el hueso, como el TGF- β (Esposito et al., 2018).

La liberación de TGF- β desde la matriz ósea reabsorbida no es un evento pasivo; por el contrario, alimenta directamente la agresividad tumoral al promover la expresión de genes que aumentan la producción de PTHrP en las células tumorales, reforzando así la activación osteoclástica (Guise, 2002). Esta retroalimentación positiva intensifica tanto la destrucción ósea como la progresión del tumor, generando un circuito de daño constante que potencia la carga metastásica en el esqueleto (Esposito et al., 2018). Además, se ha observado que el TGF- β participa en la regulación de la plasticidad tumoral, favoreciendo la transición epitelio-mesenquimal y la adquisición de un fenotipo más invasivo por parte de las células metastásicas (Searcy & Johnson, 2024).

Este ciclo vicioso osteolítico no solo tiene consecuencias a nivel celular y molecular, sino que también se traduce en una serie de manifestaciones clínicas que impactan profundamente en las pacientes (Esposito et al., 2018). Entre las más comunes se encuentran las fracturas patológicas, el dolor óseo crónico, la hipercalcemia maligna, la compresión medular y la limitación funcional, todos ellos eventos que disminuyen la calidad de vida y aumentan la morbilidad. Estas complicaciones suelen requerir intervenciones ortopédicas, radioterapia paliativa y terapias dirigidas a preservar la masa ósea, lo que incrementa la carga clínica y económica de la enfermedad (Guise, 2002).

En el contexto del cáncer de mama triple negativo (CMTN), la metástasis ósea representa un desafío aún mayor (Foulkes et al., 2010). Este subtipo, caracterizado por su alta agresividad y falta de blancos terapéuticos, muestra una marcada capacidad de colonizar el hueso y de activar de manera sostenida el ciclo vicioso osteolítico (Guise, 2002). Las células del CMTN presentan una fuerte activación de la vía TGF- β , lo que potencia su capacidad de adaptación al microambiente óseo y su resistencia a terapias convencionales (Leivonen & Kähäri, 2007). La identificación de este eje como un modulador central del

proceso metastásico ha impulsado el desarrollo de estrategias terapéuticas que buscan interrumpir dicha retroalimentación (Massagué, 2008; Ganesh & Massagué, 2021; Batlle & Massagué, 2019).

En conjunto, la metástasis ósea y el ciclo vicioso osteolítico representan un eje central en la fisiopatología del cáncer de mama avanzado (Guise, 2002). Su entendimiento detallado permite no solo una mejor caracterización del comportamiento metastásico del tumor, sino también la identificación de blancos moleculares estratégicos para el desarrollo de nuevas terapias que puedan mejorar el pronóstico y la calidad de vida de las pacientes afectadas.

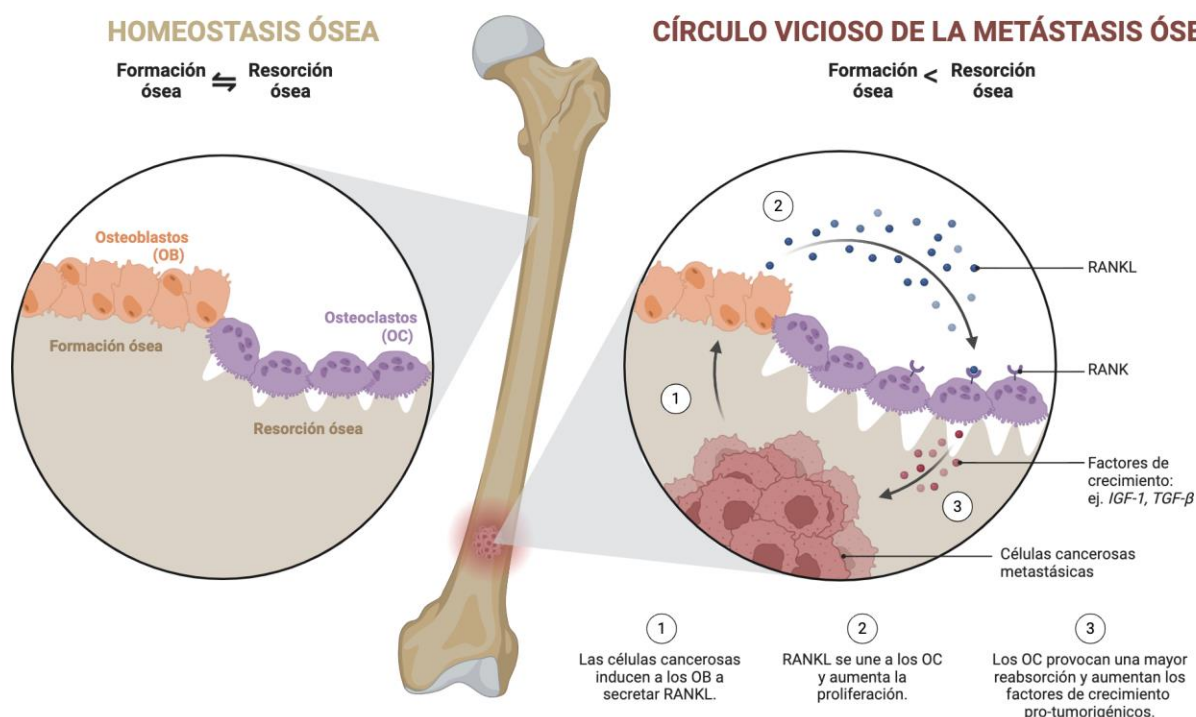


Figura 3. Mecanismos del círculo vicioso en la metástasis ósea. Las células metastásicas en el hueso estimulan la actividad de los osteoclastos y osteoblastos, generando un entorno que favorece la resorción ósea y la liberación de factores de crecimiento que potencian la progresión tumoral. Modificado de Juárez & Guise (2010).

1.1.4 Tratamientos actuales en clínica

El tratamiento del cáncer de mama ha evolucionado de forma significativa en las últimas décadas, integrando múltiples modalidades terapéuticas con el objetivo de mejorar la supervivencia y reducir la recurrencia (Waks & Winer, 2019). Actualmente, el abordaje clínico se basa en un enfoque multidisciplinario que incluye cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia (Cleator et al., 2007). La selección del tratamiento depende de diversos factores clínicos,

como el estadio de la enfermedad, la edad y la condición general de los pacientes, así como de las características moleculares del tumor, que definen los subtipos biológicos del cáncer de mama (Waks & Winer, 2019).

En tumores luminales, caracterizados por la expresión de receptores hormonales de estrógeno (ER) y/o progesterona (PR), la hormonoterapia constituye uno de los pilares del tratamiento (Waks & Winer, 2019). Fármacos como el tamoxifeno, los inhibidores de aromatasa y los supresores de la función ovárica han demostrado ser efectivos en reducir el riesgo de recaída y mejorar la supervivencia a largo plazo. Estos tratamientos pueden utilizarse en monoterapia o en combinación con quimioterapia dependiendo del riesgo clínico y la carga tumoral (Waks & Winer, 2019).

Por su parte, los tumores que sobreexpresan el receptor HER2 se benefician de terapias dirigidas que han modificado el curso natural de este subtipo. Agentes como trastuzumab, pertuzumab y lapatinib, así como conjugados del tipo anticuerpo-fármaco, como el trastuzumab-emtansina (T-DM1), actúan bloqueando la señalización mediada por HER2 y han mostrado un impacto positivo en la tasa de respuesta, en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global (Waks & Winer, 2019). Estos tratamientos se utilizan tanto en el contexto adyuvante como en enfermedad metastásica, y su eficacia ha quedado demostrada en múltiples estudios clínicos internacionales (André & Zielinski, 2012).

En contraste, el cáncer de mama triple negativo (CMTN), definido por la ausencia de ER, PR y HER2, no cuenta con blancos terapéuticos específicos (Waks & Winer, 2019). Esta limitación ha hecho que la quimioterapia citotóxica siga siendo la principal opción terapéutica, tanto en etapas tempranas como en la enfermedad avanzada (Waks & Winer, 2019). Fármacos como las antraciclinas, taxanos y compuestos basados en platino han mostrado eficacia en el control inicial de la enfermedad; sin embargo, la tasa de recaída sigue siendo alta, y la duración de la respuesta es frecuentemente limitada en pacientes con enfermedad metastásica (Cleator et al., 2007)(André & Zielinski, 2012).

La biología agresiva del CMTN, junto con su heterogeneidad intratumoral, sugiere la participación de mecanismos de resistencia y plasticidad celular que comprometen la eficacia terapéutica (Harbeck et al., 2019). A ello se suma su alta propensión a formar metástasis, especialmente en órganos como el pulmón, cerebro y hueso (Brook et al., 2018). En este contexto, la inmunoterapia ha comenzado a perfilarse como una alternativa viable en subgrupos seleccionados. En particular, el uso de inhibidores de puntos de control inmunológico, como los anticuerpos anti-PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) y anti-PD-L1 (atezolizumab), ha mostrado resultados alentadores cuando se combinan con quimioterapia en

pacientes con expresión positiva de PD-L1, como fue evidenciado en el estudio IMpassion130 (Schmid et al., 2017; Waks & Winer, 2019). No obstante, la aplicabilidad clínica de esta estrategia aún está restringida por la necesidad de biomarcadores específicos y la respuesta limitada en ciertos perfiles moleculares (Cleator et al., 2007).

Paralelamente, el estudio de rutas de señalización implicadas en la progresión del CMTN ha permitido identificar posibles dianas moleculares emergentes (Bianchini et al., 2016). Una de las más relevantes es la vía de señalización del TGF- β , cuya activación se ha asociado con una mayor capacidad invasiva, regulación del microambiente tumoral e inducción de la transición epitelio-mesenquimal (Brook et al., 2018). El papel de esta vía en la promoción de la metástasis ósea ha sido particularmente destacado, abriendo la posibilidad de intervenir terapéuticamente en distintos puntos del proceso metastásico.

1.1.5 Función de la vía de señalización del TGF- β en cáncer de mama y metástasis a hueso

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citocina pleiotrópica que regula numerosos procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, adhesión, movimiento, metabolismo, apoptosis, reparación tisular e inflamación (Massagué, 2012; Massagué & Sheppard, 2023; David & Massagué, 2018). En el contexto del cáncer, esta molécula desempeña un papel particularmente complejo, ejerciendo funciones contradictorias que dependen del estadio de la enfermedad y del microambiente tumoral (Massagué, 2012a). Inicialmente en las células normales y durante las fases iniciales de la carcinogénesis, el TGF- β actúa como un supresor tumoral al mantener la homeostasis epitelial, promover la apoptosis en células premalignas que sufren estrés oncogénico, especialmente aquellas con mutaciones en RAS (como KRAS o HRAS), el TGF- β puede desencadenar la apoptosis. Un mecanismo clave es la transición epitelio-mesenquimal, donde el TGF- β , en colaboración con RAS/MAPK, induce SNAIL, que reprime KLF5. La ausencia de KLF5 lleva a SOX4 a activar genes pro-apoptóticos como BIM y BMF, también inhibe la proliferación celular deteniendo el ciclo celular al inducir la detención del crecimiento celular mediante el aumento de la expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas como p15INK4, p21CIP1, p27KIP1 y p57KIP2, y disminuyendo la expresión de MYC (Massagué, 2012; Akhurst & Hata, 2012; Batlle & Massagué, 2019)(Massagué & Sheppard, 2023).

Sin embargo, a medida que el cáncer progresa, las células tumorales desarrollan mecanismos sofisticados para evadir los efectos supresores del TGF- β (Massagué & Sheppard, 2023). Esto puede

ocurrir de varias maneras. En primer lugar, mediante la inactivación de componentes clave de la vía de señalización del TGF- β , como las mutaciones en sus receptores o en las proteínas Smad (especialmente Smad4), lo que anula por completo su capacidad supresora (Massagué, 2012). En segundo lugar, las células tumorales pueden realizar alteraciones posteriores que deshabilitan selectivamente solo el brazo supresor del tumor, conservando otras funciones reguladoras del TGF- β que luego son "secuestradas" en su beneficio (Batlle & Massagué, 2019; Lee & Massagué, 2022). Finalmente, cambios epigenéticos, como la hipometilación del promotor de PDGF-B o la regulación de micro-RNAs (miRNAs), pueden permitir que el TGF- β estimule la proliferación celular y la transición epitelio-mesenquimal (Massagué, 2012; Thordur et al., 2014; Lee & Massagué, 2022).

Una vez que el tumor ha logrado evadir los efectos supresores del TGF- β , las células cancerosas pueden sobreproducirlo, lo que activa una serie de procesos que favorecen la malignidad (Aggarwal & Massagué, 2012; Massagué, 2012). El TGF- β promueve la progresión tumoral al aumentar el fenotipo maligno de los tumores, estimulando la proliferación de ciertas células cancerosas y la generación de miofibroblastos que producen metaloproteinasas y citocinas pro-tumorales (Massagué, 2012; Batlle & Massagué, 2019). Además, una de sus principales contribuciones es la inducción de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), un proceso clave donde las células epiteliales pierden su polaridad y adquieren características mesenquimales, lo que les confiere mayor motilidad e invasividad (Batlle & Massagué, 2019; Wang et al., 2024). En el cáncer avanzado, el TGF- β es un agente pro-metastático crucial, ya que fomenta la diseminación a distancia y, en el contexto de las metástasis óseas, impulsa un ciclo de retroalimentación positiva para el crecimiento tumoral (Massagué, 2012; Wang et al., 2024). También promueve la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso esencial para la metástasis. Finalmente, el TGF- β derivado del tumor contribuye a la evasión de la respuesta inmune al crear un microambiente inmunosupresor, suprimiendo la función de células inmunes como los linfocitos T y las células NK, y promoviendo el agotamiento de los linfocitos T CD8+, lo que contribuye a la resistencia a la inmunoterapia (Thordur et al., 2014; Ganesh & Massagué, 2021; David & Massagué, 2018).

En el cáncer de mama, la señalización mediada por TGF- β está particularmente implicada en la transición epitelio-mesenquimal, un proceso en el cual las células tumorales pierden sus características epiteliales —como la expresión de E-cadherina— y adquieren un fenotipo mesenquimal que les confiere mayor motilidad, resistencia a la apoptosis y capacidad invasiva (Liu et al., 2021). Este cambio fenotípico es un paso crucial en la diseminación metastásica, y se ha demostrado que TGF- β es uno de los inductores más potentes de EMT en distintos modelos de cáncer (Harbeck et al., 2019). En el subtipo triple negativo de cáncer de mama, esta vía se encuentra frecuentemente sobreactivada, contribuyendo a su fenotipo

altamente agresivo, a la generación de células con propiedades de células madre tumorales y a su adaptación a entornos hostiles, como los tejidos metastásicos (Xie et al., 2018).

Además de su papel en la progresión primaria del tumor, TGF- β desempeña un rol fundamental en la metástasis ósea, una de las complicaciones más frecuentes y devastadoras en el cáncer de mama avanzado (Xie et al., 2018). Durante la resorción del hueso inducida por osteoclastos activados, se libera TGF- β desde la matriz ósea, donde normalmente se encuentra en forma latente (Juárez & Guise, 2011). Una vez liberado, este factor actúa sobre las células tumorales presentes en el hueso, estimulando la expresión de genes como PTHrP (parathyroid hormone-related protein), que a su vez potencia la diferenciación y activación de nuevos osteoclastos (Xie et al., 2018). Este mecanismo establece un ciclo vicioso osteolítico, en el cual la actividad osteoclástica genera más TGF- β , que estimula más actividad tumoral, perpetuando tanto la destrucción ósea como el crecimiento metastásico (Guise, 2002).

Este eje patológico no solo amplifica la carga metastásica en el hueso, sino que también contribuye al deterioro clínico de las pacientes, provocando dolor óseo, fracturas patológicas, hipercalcemia y otros eventos esqueléticos que afectan la movilidad, funcionalidad y calidad de vida (Suva et al., 2011). Además, la activación de la vía del TGF- β en el microambiente óseo favorece la inmunosupresión local, dificultando la respuesta del sistema inmunológico contra las células tumorales residuales y favoreciendo la latencia tumoral o su posterior reactivación (Yang et al., 2010).

La señalización del TGF- β se caracteriza por su notable complejidad, en parte debido a su capacidad para interactuar con otras rutas moleculares claves implicadas en la progresión tumoral. Este crosstalk funcional ocurre no solo con la vía de Smads, sino también con otras rutas como PI3K/AKT, MAPK y Wnt/ β -catenina, lo que permite una regulación más dinámica y contexto-dependiente de procesos como la proliferación, diferenciación y migración celular (Yan et al., 2009). Esta interconexión amplifica su capacidad de modular la expresión génica, la remodelación del microambiente tumoral y la plasticidad celular (Massagué, 2012). La sobreactivación de TGF- β permite a las células de cáncer de mama triple negativo adquirir características de alta malignidad, invadir tejidos, formar metástasis en órganos específicos y evadir la respuesta inmune y la efectividad de las terapias. Por ello, contrarrestar esta vía es una estrategia clave para el desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos (Batlle & Massagué, 2019; Liu et al., 2021; Massagué & Sheppard, 2023).

Entender el papel central del TGF- β en la progresión del cáncer de mama y su metástasis ósea es esencial para delinear tratamientos más efectivos (Juárez & Guise, 2011). Su participación tanto en la inducción

de EMT como en el establecimiento y perpetuación del ciclo osteolítico lo convierte en un mediador clave del comportamiento metastásico (Suva et al., 2011). Por ello, esta vía representa un eje estratégico para la intervención terapéutica en subtipos de alto riesgo como el CMTN, donde las opciones actuales continúan siendo limitadas.

1.1.5.1 Mecanismo de la vía de señalización del TGF- β

La vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) se inicia con la unión de la citocina a su complejo de receptores en la membrana plasmática (Massagué, 2012a). Estos receptores pertenecen a la familia de cinasas de residuos de serina/treonina quinasas y se clasifican en dos tipos: TGF- β receptores tipo I (T β RI) y tipo II (T β RII) (Massagué, 2012a). Tras la unión del ligando, el T β RII fosforila y activa a T β RI, desencadenando así una cascada intracelular de señalización (Massagué, 2012a). Esta activación permite la fosforilación de las proteínas intracelulares SMAD2 y SMAD3, que conforman el núcleo de la vía canónica de TGF- β (Schmieder & Hill, 2007).

Una vez fosforiladas, SMAD2/3 forman un complejo con SMAD4, la única SMAD común, y este complejo se transloca al núcleo celular, donde regula la transcripción de genes diana (Schmieder & Hill, 2007). Esta regulación transcripcional está estrechamente modulada por la disponibilidad de cofactores, la cromatina accesible y el contexto celular, lo que determina si la señalización tendrá un efecto supresor o pro-oncogénico (Massagué, 2012). En condiciones fisiológicas normales o en estadios tempranos de transformación celular, la vía del TGF- β y sus mediadores SMAD promueven la detención del ciclo celular y la apoptosis, pero en células tumorales avanzadas, como las del cáncer de mama triple negativo, esta señalización puede adquirir funciones que promueven la progresión de la enfermedad. Esta dualidad o funcionalidad contextual del TGF- β es una característica bien establecida (Schmieder & Hill, 2007; Massagué, 2012). La inversión funcional de la vía de TGF- β en tumores avanzados se debe, en parte, a una combinación de factores que alteran la selección de genes blanco por el complejo SMAD (Massagué & Xi, 2012). Esto incluye mutaciones y reprogramación epigenética que modifican la respuesta celular al TGF- β (Massagué & Xi, 2012; Massagué, 2012b). Adicionalmente, la sobreexpresión de cofactores también desempeña un papel crucial. En este contexto, la pérdida genética de genes diana supresores, como CDKN2B en ciertos cánceres, o la acción de oncogenes como HER2 en cáncer de mama o PI3K en gliomas, pueden debilitar a los cofactores SMAD con función supresora (por ejemplo, FOXO y C/EBP β) (Massagué, 2012; David & Massagué, 2018). Esta desregulación permite que la vía TGF- β , en lugar de suprimir el tumor, active genes protumorales que, en condiciones normales, estarían silenciados

(Schmierer & Hill, 2007). En este nuevo contexto tumoral, la señalización SMAD favorece la migración celular, la evasión inmune, la remodelación del microambiente y la transición epitelio-mesenquimal, contribuyendo así a la progresión metastásica (Xie et al., 2018). Además, la interacción de SMADs con factores de transcripción como AP-1 permite la activación de genes implicados en la metástasis ósea, incluyendo IL-11, un mediador clave en la activación osteoclástica y la promoción del ciclo vicioso osteolítico (Guise, 2002).

Más allá de su vía canónica mediada por SMADs, el TGF- β también puede activar diversas rutas no canónicas que contribuyen significativamente a su papel pro-oncogénico (Massagué, 2012). La capacidad del TGF- β para promover la progresión del cáncer en etapas avanzadas se debe a una reorientación de su señalización en un contexto celular alterado por mutaciones oncogénicas y cambios epigenéticos (Ganesh & Massagué, 2018; Lee & Massagué, 2022). Esto permite que las vías de TGF- β , tanto las canónicas (mediadas por SMADs) como las no canónicas (como las que involucran a PAR6 o a las vías MAPK/PI3K en colaboración), promuevan activamente procesos clave en el cáncer, como la invasión, la metástasis y la inmunosupresión (Massagué, 2012; Batlle & Massagué, 2019; Lee & Massagué, 2022). Entre ellas se incluyen las MAP cinasas (ERK1/2, JNK y p38), PI3K/AKT, las GTPasas tipo Rho y la vía de NF- κ B. Estas vías adicionales amplifican su efecto biológico al modular procesos celulares fundamentales como la supervivencia, el metabolismo, la dinámica del citoesqueleto y la respuesta inflamatoria. Estas rutas paralelas no solo actúan en conjunto con la vía SMAD, sino que también pueden operar de forma independiente, generando respuestas celulares más complejas, sostenidas y específicas según el tipo celular y el microambiente tumoral (Guise, 2002).

La activación conjunta de vías canónicas y no canónicas por el TGF- β le confiere una notable plasticidad funcional, permitiendo que esta citocina actúe como un integrador de señales diversas que guían el destino celular en función del contexto (Massagué, 2012a). En el caso del CMTN, esta red de señalización contribuye a su elevada capacidad adaptativa, su agresividad biológica y su potencial metastásico, especialmente hacia el hueso (Guise, 2002). Estas propiedades hacen de la vía del TGF- β una de las rutas más relevantes y complejas en la biología del cáncer de mama, con implicaciones clínicas que aún están siendo exploradas en profundidad.

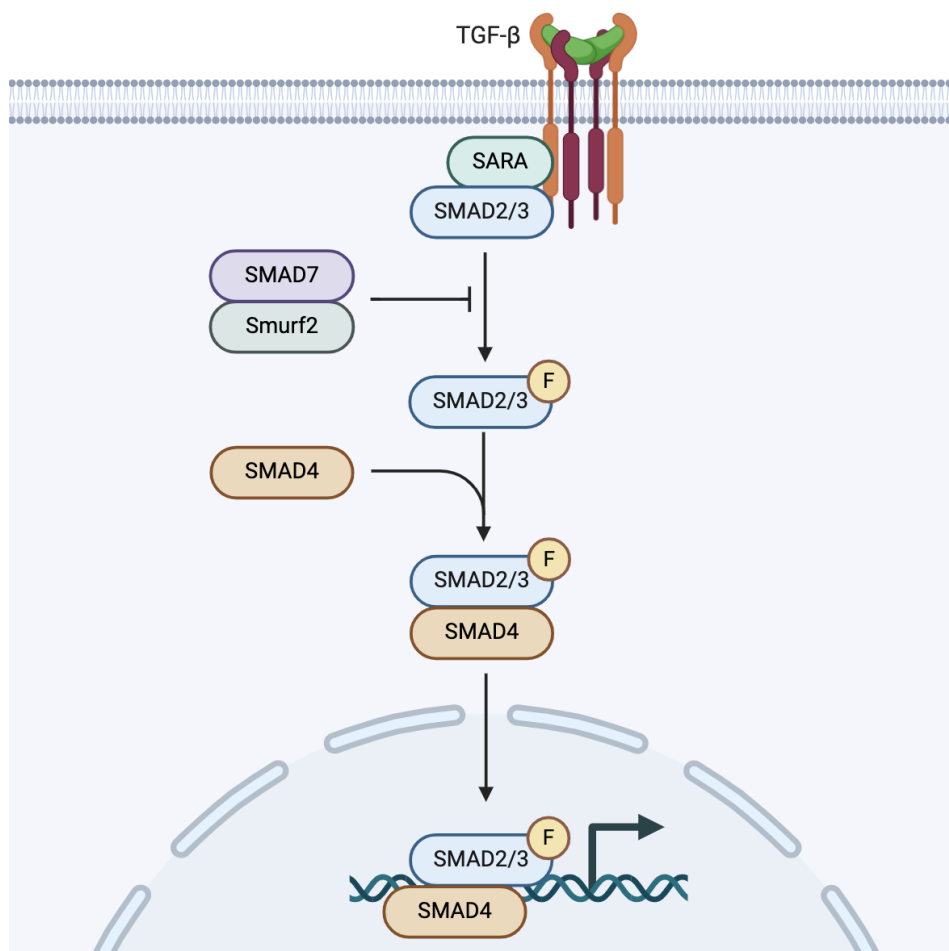


Figura 4. Vía de señalización canónica de TGF-β. La vía canónica de TGF-β se activa tras la unión del ligando a sus receptores de tipo I y II, promoviendo la fosforilación de SMAD2/3, que forma un complejo con SMAD4 para modular la transcripción génica. Modificado de Juárez & Guise (2010).

1.1.6 Derivado de adenosina IFC-305: definición, mecanismo de acción y aplicaciones

El compuesto IFC-305 es un derivado sintético de adenosina desarrollado en México, específicamente es una sal de aspartato de adenosina, diseñado originalmente para intervenir en procesos epigenéticos alterados en enfermedades hepáticas crónicas (Chagoya de Sánchez & Hernández-Muñoz, 2004). Desde su creación, ha sido ampliamente evaluado en modelos preclínicos de fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular, donde ha mostrado un perfil farmacológico prometedor caracterizado por propiedades antifibróticas, antiinflamatorias y antiproliferativas (Velasco-Loyden et al., 2017; Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2018; García-Carrillo et al., 2024). Estos efectos lo han posicionado como un agente terapéutico con potencial traslacional, inicialmente en patologías del hígado, y más

recientemente, en otras enfermedades que comparten alteraciones epigenéticas y moleculares similares, como el cáncer (Velasco-Loyden et al., 2017).

A nivel molecular, el mecanismo de acción de IFC-305 se centra en la modulación del metabolismo de los grupos metilo, específicamente mediante la regulación del equilibrio entre S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH) (Lozano-Rosas et al., 2020). Este balance es crucial para mantener una adecuada disponibilidad de donadores de metilo, lo cual permite la correcta metilación del DNA, RNA y proteínas (García-Carrillo et al., 2024). La disrupción de este metabolismo metílico es un evento común en procesos tumorales, donde se observa hipometilación genómica global junto con hipermetilación específica de promotores tumorales, alterando la expresión génica y facilitando la progresión maligna (Velasco-Loyden et al., 2017). La capacidad de IFC-305 para restaurar este equilibrio confiere al compuesto un mecanismo epigenético de acción, con implicaciones directas sobre la regulación génica, la estabilidad genómica y la diferenciación celular (Velasco-Loyden et al., 2010).

Adicionalmente, IFC-305 ha demostrado ser capaz de modular vías de señalización relevantes para la progresión tumoral, incluyendo la vía de TGF- β , una de las rutas más ampliamente implicadas en procesos de fibrosis, inmunosupresión y metástasis (Velasco-Loyden et al., 2010). En particular, se ha observado que IFC-305 induce la expresión de Smad7, un inhibidor endógeno de la señalización canónica mediada por Smad2/3 (Velasco-Loyden et al., 2010). Esta regulación negativa interfiere con la propagación de señales profibróticas y pro-oncogénicas derivadas de TGF- β , lo cual puede tener efectos terapéuticos significativos en contextos donde esta vía se encuentra desregulada (Velasco-Loyden et al., 2017; Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2018).

Los estudios preclínicos realizados en modelos animales de fibrosis hepática han mostrado que IFC-305 es capaz de reducir significativamente la expresión de genes profibróticos como TGF- β 1, Col1a1 y α -SMA, además de atenuar el fenotipo miofibroblástico de las células estrelladas hepáticas, principales efectoras del proceso fibrótico (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2018). Este efecto reprogramador sugiere una capacidad del compuesto para revertir parcialmente la activación celular asociada a la progresión de la enfermedad. Asimismo, se ha descrito una disminución de los niveles de la colágena depositada y una mejoría estructural del parénquima hepático, lo cual refuerza su perfil antifibrótico (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2018).

En el contexto del hepatocarcinoma, investigaciones demostraron que el IFC-305 reduce la proliferación celular, disminuye la expresión de oncogenes como Glypican-3 (GPC3) y marcadores de proliferación

como Ki-67, al tiempo que promueve la restauración de características fenotípicas asociadas a una mayor diferenciación celular (Rodríguez-Aguilera et al., 2018). Estos hallazgos indican que el IFC-305 no solo detiene la expansión tumoral, sino que podría revertir, al menos parcialmente, el fenotipo dediferenciado de las células malignas, lo cual representa un objetivo importante en terapias dirigidas a tumores sólidos (Velasco-Loyden et al., 2017).

El conjunto de estos resultados sugiere que el IFC-305 posee un mecanismo de acción multifactorial, combinando la modulación epigenética, la interferencia en vías de señalización clave y la reversión de fenotipos patológicos (Rodríguez-Aguilera et al., 2018). Su estudio en modelos distintos al hepatocarcinoma se ha ido expandiendo progresivamente, dado que muchos de los procesos biológicos que regula —como la metilación del DNA, la señalización del TGF- β y la plasticidad celular— también están involucrados en otros tipos de cáncer, incluyendo subtipos agresivos como el cáncer de mama triple negativo (García-Carrillo et al., 2024; Bianchini et al., 2016). Por lo tanto, este derivado de adenosina representa un candidato terapéutico de interés para la investigación oncológica actual, particularmente en el desarrollo de enfoques dirigidos a cánceres con limitadas opciones de tratamiento.

1.1.7 Efectos del IFC-305 en cáncer y su posible aplicación en metástasis ósea

Hasta el momento, la mayoría de los estudios realizados con el IFC-305 han estado enfocados en enfermedades hepáticas, particularmente en fibrosis y hepatocarcinoma, los mecanismos moleculares que regula este derivado de adenosina sugieren un potencial terapéutico más amplio que trasciende el ámbito de la hepatología (Velasco-Loyden et al., 2017; Velasco-Loyden et al., 2010). La capacidad del compuesto para intervenir en rutas epigenéticas, restaurar patrones de metilación alterados y modular vías de señalización clave lo convierte en un candidato atractivo para el estudio en diversas enfermedades con componentes epigenéticos, inflamatorios y proliferativos, como es el caso del cáncer (Rodríguez-Aguilera et al., 2018; García-Carrillo et al., 2024).

En el contexto oncológico, el IFC-305 ha demostrado efectos antitumorales indirectos, especialmente a través de la reprogramación epigenética y la inhibición de rutas de señalización asociadas a la progresión maligna (Velasco-Loyden et al., 2017; Velasco-Loyden et al., 2010). En modelos de hepatocarcinoma, el compuesto ha reducido la expresión de oncogenes, disminuido la proliferación celular y promovido la diferenciación tumoral, lo cual evidencia una capacidad para contrarrestar algunos de los hallmarks del cáncer (Velasco-Loyden et al., 2017; Velasco-Loyden et al., 2010). Estos hallazgos respaldan la hipótesis

de que el IFC-305 podría ser útil en otras neoplasias sólidas, especialmente aquellas caracterizadas por una fuerte activación de vías como la del TGF- β , la plasticidad celular y la desregulación epigenética (Velasco-Loyden et al., 2010; Rodríguez-Aguilera et al., 2018).

En este sentido, su posible aplicación en cáncer de mama triple negativo, particularmente en modelos con metástasis ósea, resulta especialmente relevante (Brook et al., 2018). Este subtipo de cáncer de mama carece de blancos terapéuticos definidos y presenta una elevada capacidad metastásica, siendo el hueso uno de los principales sitios de diseminación (Käkönen & Mundy, 2003). En este microambiente, las células tumorales interactúan estrechamente con el tejido óseo y activan un ciclo vicioso osteolítico mediado por la liberación del TGF- β , lo que perpetúa tanto la destrucción ósea como la progresión tumoral (Guise, 2002). La capacidad del IFC-305 para modular la señalización de TGF- β , promoviendo la expresión de inhibidores endógenos como Smad7, podría ofrecer un enfoque terapéutico novedoso al interferir en este circuito patológico (Velasco-Loyden et al., 2010).

A pesar de estos fundamentos, aún no existen estudios publicados que evalúen directamente el efecto del IFC-305 en modelos de cáncer de mama, lo que representa una oportunidad importante en la investigación traslacional. No obstante, la eficacia ya documentada en modelos de fibrosis hepática y hepatocarcinoma, así como su efecto regulador sobre rutas pro-oncogénicas, constituye un argumento sólido para extender su evaluación a nuevos contextos oncológicos. En particular, considerando que la vía del TGF- β desempeña un papel central en la transición epitelio-mesenquimal, la migración celular, la evasión inmune y la metástasis ósea, la exploración de los efectos del IFC-305 en modelos preclínicos de CMTN podría abrir nuevas perspectivas terapéuticas.

El presente trabajo tiene como propósito evaluar, por primera vez, el efecto de IFC-305 en un modelo de cáncer de mama triple negativo con metástasis ósea en un modelo murino, abordando aspectos fundamentales de la biología tumoral como la viabilidad celular, la migración, la modulación de la señalización de TGF- β y la formación de lesiones osteolíticas. Este enfoque permitirá, no solo determinar la eficacia del compuesto en un entorno altamente agresivo y clínicamente desafiante, sino también explorar su mecanismo de acción en un tipo de cáncer que hasta ahora cuenta con opciones terapéuticas limitadas y un pronóstico desfavorable.

La validación experimental de los efectos antimetastásicos del IFC-305 en este modelo podría representar un paso relevante hacia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, centradas en la inhibición de rutas clave implicadas en la progresión del CMTN y su diseminación ósea. De demostrarse su eficacia, este derivado de adenosina podría posicionarse como una alternativa innovadora dentro del

arsenal terapéutico oncológico, particularmente en pacientes con alta carga metastásica y limitada respuesta a los tratamientos convencionales.

1.2 Hipótesis

El compuesto derivado de adenosina IFC-305 disminuirá la proliferación, la migración celular, y modulará negativamente la vía de señalización de TGF- β en el cáncer de mama triple negativo, lo que resultará en una reducción de la metástasis ósea *in-vivo* y, por lo tanto, promoverá efectos antitumorales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del derivado de adenosina IFC-305 sobre la proliferación, migración celular y la regulación de la vía de señalización de TGF- β en cáncer de mama triple negativo, así como su impacto en la metástasis ósea *in-vivo*, con el propósito de determinar su potencial terapéutico.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de IFC-305 en la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo y células sanas mediante el ensayo de MTT.
2. Evaluar el impacto de IFC-305 en la migración celular de células metastásicas a hueso mediante ensayos de migración *in-vitro*.
3. Examinar la modulación de la vía de TGF- β por IFC-305 en células CMTN mediante Western blot.
4. Confirmar la participación de la vía de TGF- β en los efectos de IFC-305 mediante análisis de expresión génica por RT-qPCR *in-vitro*.
5. Evaluar el efecto del IFC-305 en la metástasis ósea mediante estudios *in-vivo*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Compuesto derivado de adenosina IFC-305

El IFC-305 es un compuesto derivado de la adenosina, específicamente la sal aspartato de adenosina (ácido-2-aminosuccínico-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-5-(hidroximetil)tetrahidrofurano-3,4-diol (1:1)). Fue adquirido de Probiomed S.A. de C.V. (<http://www.probiomed.com.mx>, Ciudad de México, México) en forma de polvo sólido blanco con las siguientes propiedades fisicoquímicas: peso molecular de 400.34 g/mol, punto de fusión de 285 °C, y solubilidad en agua. La síntesis de este compuesto está descrita en las siguientes patentes: MX220780, MX207422, US8507 y US459B2.

2.1.1 Preparación del compuesto IFC-305

Para los tratamientos *in-vitro*, el compuesto IFC-305 se disolvió en medio de cultivo, dependiendo de la línea celular utilizada y la concentración requerida. Para lograr su completa disolución, la solución se mantuvo en baño maría a 70 °C con agitación magnética, y posteriormente se ajustó a pH= 7.4. Finalmente, se añadió suero fetal bovino y antibiótico/antimicótico antes de su uso en los experimentos.

Para los tratamientos *in-vivo*, las dosis del IFC-305 se calcularon en función del peso corporal de los ratones. El compuesto se disolvió en solución salina al 0.9%, utilizada como vehículo para su administración. Similar al protocolo *in-vitro*, la disolución se realizó en baño maría a 70 °C con agitación magnética, y posteriormente se ajustó a pH fisiológico. La solución final se almacenó a 4 °C hasta su uso en los experimentos.

2.2 Cultivo celular

Se utilizaron tres líneas celulares en este estudio: 293T (células de riñón embrionario humano), MDA-MB-231 (células de cáncer de mama humano) y 4T1 (células de cáncer de mama murino). Todas las líneas celulares fueron adquiridas de la Colección Americana de Tipos Celulares (ATCC, por sus siglas en inglés), garantizando su autenticidad y calidad.

Las células 293T y MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium, Corning), mientras que las 4T1 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Corning). Ambos medios fueron suplementados con suero fetal bovino (SFB, 10 % v/v, Biowest) para proporcionar los nutrientes esenciales para el crecimiento celular. Adicionalmente, se añadió una solución de antibiótico/antimicótico (1 % v/v, penicilina-estreptomicina/anforeticina B, Corning) para prevenir posibles contaminaciones.

Para el subcultivo y resuspensión de las células descritas anteriormente se utilizó una solución de tripsina-EDTA (0.05 % – 0.53 mM, Corning) debido a que son líneas celulares adherentes. Todas las células fueron mantenidas en condiciones óptimas de cultivo, a 37 °C en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂, asegurando un ambiente estable para su crecimiento y proliferación.

2.3 Viabilidad celular en células CMTN *in-vitro*

Se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de metil tiazol tetrazolio (MTT). Para ello, se utilizaron las líneas celulares 293T, MDA-MB-231 y 4T1 se sembraron en placas de 96 pozos con densidades de 10,000, 8,000 y 5,000 células/cm², respectivamente, asegurando una confluencia del 70-80% a las 24 horas.

Una vez alcanzada la confluencia deseada, se añadió el tratamiento con el compuesto IFC-305 en concentraciones de 0 (como control), 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mM, y se incubaron durante 24, 48 o 72 horas. Al finalizar cada tiempo de tratamiento, se adicionó MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, 5 mg/mL) en cada pozo y se incubó durante 5 horas en condiciones controladas (37 °C, 5 % CO₂, atmósfera húmeda). Este compuesto es reducido por enzimas mitocondriales de células viables, generando cristales de formazán púrpura, cuya intensidad colorimétrica es proporcional a la viabilidad celular.

Para detener la conversión de MTT a formazán, se agregó una solución de ácido clorhídrico (0.01 M) y dodecilsulfato sódico (10 % p/v), incubándose por 16 horas. Finalmente, la absorbancia se midió a 570 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas Epoch (Biotek).

2.4 Migración celular de células metastásicas a hueso *in-vitro*

Para evaluar el efecto del compuesto IFC-305 en la migración celular, se llevó a cabo un ensayo de cicatrización de herida. En este experimento, se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo con potencial metastásico MDA-MB-231 y 4T1, las cuales fueron sembradas en placas de 12 pozos con densidades de 8,000 y 5,000 células/cm², respectivamente, asegurando una confluencia del 75-85 % a las 24 horas.

Una vez alcanzada la confluencia deseada, las células fueron sometidas a un periodo de ayuno en medio de cultivo sin suero fetal bovino durante 14 horas, con el objetivo de sincronizar el ciclo celular y minimizar la proliferación durante el ensayo. Posteriormente, se realizó trazó una línea sobre la monocapa celular utilizando la punta de una micropipeta de 200 µL, generando un espacio libre que permitió evaluar la migración celular.

Tras la creación de la herida, se realizaron lavados con PBS para eliminar las células desprendidas y evitar interferencias en la medición. Luego, se añadió medio de cultivo completo suplementado con IFC-305 en concentraciones de 0, 5, 10 y 20 mM. La progresión del cierre de la herida fue monitoreada mediante la captura de imágenes continuas durante 24 horas utilizando un microscopio Etaluma™, lo que permitió realizar un análisis cuantitativo de la migración celular en respuesta al tratamiento.

2.5 Metástasis ósea en modelo murino *in-vivo*

2.5.1 Mantenimiento de ratones

Los protocolos se llevaron a cabo conforme a la normativa federal para el cuidado y experimentación con animales, establecida en la NOM-062-ZOO-1999. Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/C, obtenidos de la empresa Círculo ADN S.A. de C.V. Los ratones fueron alojados en un cuarto con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y una temperatura controlada de 24 °C. Se mantuvieron en el sistema Optimice® (Animal Care Systems), con un máximo de cinco hembras por caja, donde tuvieron acceso ad libitum a agua y alimento (Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010, LabDiet). El sustrato de las cajas consistió en madera triturada (Harlan, Teklad), el cual se reemplazó cada 14 días al transferir a los

ratones a cajas limpias con nuevo sustrato. Como material de enriquecimiento ambiental, se les proporcionaron pañuelos desechables para anidación y tubos de cartón.

Antes de iniciar los experimentos, todos los ratones pasaron por un periodo de aclimatación de una semana. Aquellos que recibieron inoculaciones de células cancerosas fueron monitoreados diariamente para detectar signos de dolor o incomodidad. En caso de presentar estas señales, se les aplicó eutanasia humanitaria y fueron excluidos del experimento correspondiente.

2.5.2 Preparación de células para inoculación intracardíaca

Se preparó una suspensión de células individuales 4T1 (10^5 células en 100 μ L de PBS) a partir de monocapas confluentes. Un día antes, se realizó un cambio de medio para asegurar que las células se mantuvieran en fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas (250 g, 10 min, 4 °C). Los pellets celulares se resuspendieron en PBS frío (4 °C) y todas las células recuperadas de los tubos se combinaron en un tubo cónico de 50 mL, complementando con PBS frío hasta alcanzar un volumen final de 40 mL. Se realizó una nueva centrifugación (250 g, 10 min, 4 °C), seguida de dos lavados adicionales con PBS frío. Finalmente, las células se resuspendieron en un pequeño volumen de PBS frío (~5 mL). La cuantificación de células viables se llevó a cabo mediante dilución con azul de tripano y conteo en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico invertido.

2.5.3 Inoculación intracardiaca

Para la inoculación intracardiaca, los ratones fueron pesados y marcados en la cola con un marcador indeleble. Posteriormente, se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilasina (5-10 mg/kg) utilizando una jeringa de insulina (1 mL, aguja 0.5 x16 mm). Se verificó la profundidad de la anestesia presionando entre los dedos de las patas traseras para confirmar la ausencia de reflejos. A continuación, se depiló el área torácica aplicando crema depilatoria (Nair™, piel sensible) con un hisopo de algodón, retirándola después de 90 segundos con gasas húmedas (agua a 37 °C). Los ratones depilados se colocaron en un tapete térmico y se les aplicó ungüento oftálmico (Stye™) para prevenir la resequedad ocular, repitiendo la aplicación hasta su recuperación anestésica.

Para la inmovilización, se fijaron simétricamente con cinta adhesiva en las patas delanteras y la cintura, asegurando la posición de la caja torácica con los dedos índice y anular. Se administró una inoculación de 100 μL (10^5 células) con una jeringa de 1 mL y aguja de 26 gauges, insertada en posición vertical (90°) entre la tercera y cuarta costilla izquierda. La presencia de flujo sanguíneo en la aguja confirmó la correcta inserción en el ventrículo cardíaco izquierdo, tras lo cual se inyectaron las células. Luego, se aplicó presión en el sitio de punción durante 30 segundos para prevenir la pérdida de sangre.

Finalmente, los ratones fueron colocados nuevamente en el tapete térmico y recibieron 250 μL de PBS (37°C) para hidratación y recuperación. Se realizó un pequeño corte en la oreja para su identificación: derecha (1°), izquierda (2°), ambas (3°), ambas en forma de "V" (4°) y sin corte (5°). Una vez que recuperaron la movilidad, fueron trasladados a sus cajas.

2.5.4 Tratamiento con el compuesto derivado de adenosina IFC-305

El compuesto IFC-305 se resuspendió en solución salina al 0.9% para su administración. Los ratones fueron divididos en grupos experimentales y recibieron, de manera intraperitoneal, ya sea solución salina como control o IFC-305 en tres diferentes dosis: 50, 100 y 150 mg/kg, el volumen administrado variaba entre 200-300 μL , esto dependiendo del peso de los ratones. Las aplicaciones se realizaron en días alternados a lo largo del experimento.

El tratamiento inició un día después de la inoculación de las células 4T1, asegurando que la administración del compuesto coincidiera con las primeras etapas del desarrollo tumoral. Durante todo el protocolo, los ratones fueron monitoreados para evaluar su estado general, peso corporal y signos de malestar asociados a la administración del fármaco.

2.5.5 Colecta de huesos.

Diez días después de la inoculación intracardiaca, se realizó la eutanasia de los ratones siguiendo los protocolos establecidos para el bienestar animal. Inmediatamente después, se procedió a la recolección de los huesos de las extremidades inferiores, incluyendo el fémur y la tibia de ambos lados.

Los huesos extraídos fueron depositados en una solución de formalina al 10 % en disposición de “L” para su adecuada fijación. Las muestras permanecieron en formalina durante 48 horas para asegurar la preservación de los tejidos óseos. Posteriormente, se realizaron lavados con solución salina al 0.9 % durante 2 horas para eliminar restos de fijador, y finalmente, los huesos fueron transferidos a etanol al 70 %. Cada muestra fue almacenada en frascos debidamente rotulados hasta su posterior procesamiento.

Para el análisis radiográfico, los huesos se sometieron a rayos X utilizando el sistema de imagen In-vivo Xtrem (Bruker). Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Instituto de Biotecnología de la UNAM, campus Cuernavaca, México.

2.5.6 Análisis de radiografías

La cuantificación de las áreas osteolíticas se realizó en las extremidades inferiores, específicamente en el fémur y la tibia de ambos lados. Para el análisis, se utilizaron imágenes radiográficas procesadas mediante el software ImageJ. El estudio se llevó a cabo mediante un ensayo ciego, asignando a cada radiografía un número aleatorio generado con la herramienta random.org, lo que garantizó la imparcialidad en la evaluación.

Una vez completado el análisis, los códigos asignados a las imágenes fueron revelados para la agrupación de los datos. Posteriormente, se calculó el promedio de las áreas osteolíticas por ratón en cada grupo experimental. Finalmente, los datos fueron procesados y representados gráficamente utilizando el software GraphPad Prism, permitiendo la comparación entre grupos y la interpretación de los resultados.

2.5.7 Obtención de lisados y cuantificación de proteínas

En este experimento, se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y 4T1, sembradas en placas de 12 pozos con densidades de 8,000 y 5,000 células/cm², respectivamente, para alcanzar una confluencia del 80 % en 24 horas. Posteriormente, las células fueron sometidas a un período de ayuno en medio de cultivo sin suero fetal bovino (SFB) durante 8 horas, con el objetivo de minimizar su proliferación.

A continuación, se realizó un pretratamiento de 1 hora con IFC-305 en concentraciones de 0, 1, 5, 10 y 20 mM, seguido de la eliminación del medio y dos lavados con PBS. Posteriormente, se añadió medio de cultivo fresco con el mismo tratamiento y se adicionó TGF- β 1 (5 ng/mL) por 1 hora.

Finalizada el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y lisadas en 100 μ L de solución amortiguadora de lisis SDS, complementada con cOmplete™, un cóctel de inhibidores de proteasa, y PhosSTOP™, un inhibidor de fosfatasa (Roche). Las muestras se incubaron en hielo durante 10 minutos y posteriormente fueron centrifugadas a 14,000 g y 4 °C por 10 minutos para la recuperación del sobrenadante.

La concentración de proteínas se determinó mediante un ensayo colorimétrico Micro BCA (Thermo Scientific™) en placas de 96 pozos, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación, se utilizó una curva estándar generada con diluciones de albúmina de suero bovino, y la lectura de densidad óptica a 562 nm se llevó a cabo en un lector de placas Epoch (Biotek).

2.5.8 Electroforesis y transferencia de proteínas

Las muestras de lisados celulares (45 μ g de proteína) se prepararon añadiendo tampón de carga 5X (Thermo Scientific™) suplementado con β -mercaptoetanol. Tras su homogeneización, las proteínas fueron desnaturalizadas mediante incubación a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % (SDS-PAGE) utilizando un sistema Mini-PROTEAN (BioRad) y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, 0.45 μ m, Cytiva) mediante un sistema de transferencia semi-seco (Trans-Blot SD Semi-Dry, BioRad).

Las membranas fueron bloqueadas con una solución amortiguadora TBST 1X (0.1 M Tris-HCl, pH 7.6; 0.15 M NaCl; 0.1 % v/v Tween-20) suplementada con 5 % de leche semidescremada, manteniéndolas en agitación constante a 4 °C durante 1 hora. Posteriormente, se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario diluido en TBST con leche o BSA al 5 % (p/v) (Tabla 1). Luego de la incubación, se realizaron lavados con TBST para eliminar el anticuerpo primario no conjugado y se procedió a una nueva incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 1 hora (Tabla 1), seguida de lavados adicionales con TBST.

La detección de proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck) y el fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad). Para analizar proteínas adicionales en la misma membrana, los anticuerpos fueron eliminados mediante incubación con solución amortiguadora de stripping (glicina 0.75 % p/v, SDS 0.5 % p/v, pH 2.5) a 60 °C durante 30 minutos. Luego, se realizaron lavados con TBST, seguidos de un nuevo bloqueo y la incubación con el siguiente anticuerpo de interés.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Fiji (Schindelin et al., 2012), y la cuantificación se realizó mediante la medición del valor medio gris de las bandas.

Tabla 1. Descripción de anticuerpos utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Marca	Especie	Dilución	Diluyente
Anti-Smad2/3 fosforiladas	Cell Signaling	Conejo	1:500	TBST – leche (5% p/v)
Anti-Smad2/3	Cell Signaling	Conejo	1:1,000	TBST – BSA (5% p/v)
Anti-Conejo IgG-HRP	Sigma Aldrich	Cabra	1:40,000	TBST – leche (5% p/v)

2.6 Análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR

2.6.1 Cultivo celular y extracción de RNA total

En este estudio, se emplearon las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y 4T1, las cuales fueron cultivadas en placas de 12 pozos con densidades de siembra de 8,000 y 5,000 células/cm², respectivamente. Esta disposición permitió alcanzar una confluencia aproximada del 80 % en un periodo de 24 horas. Una vez lograda la confluencia deseada, las células fueron sometidas a un período de inanición en medio de cultivo sin suero fetal bovino (SFB) durante 8 horas, con el propósito de reducir la proliferación celular y sincronizar su estado fisiológico antes del tratamiento.

Posteriormente, se aplicó un pretratamiento con el compuesto IFC-305 en concentraciones de 0, 1, 5, 10 y 20 mM durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar posibles residuos del compuesto. Acto seguido, se añadió medio

de cultivo fresco con las mismas concentraciones de IFC-305 y se procedió a la adición de TGF- β 1 (5 ng/mL), durante un periodo de 18 horas.

Finalizada la incubación con el TGF- β 1, las células fueron lavadas nuevamente con PBS y se procedió a la extracción de RNA total utilizando el kit GeneJET RNA (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante para la purificación de RNA a partir de células en cultivo. La concentración del RNA extraído fue determinada mediante espectrofotometría con un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), asegurando su calidad y pureza antes de su almacenamiento a -20 °C para su posterior análisis.

Para evaluar la integridad del RNA purificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio, permitiendo la visualización de las bandas correspondientes al RNA ribosomal de las subunidades 28S (aproximadamente 5 kb) y 18S (aproximadamente 2 kb). La presencia de estas bandas bien definidas confirmó la integridad del material genético, garantizando su idoneidad para los análisis posteriores de expresión génica mediante RT-qPCR.

2.6.2 PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)

El análisis de expresión génica se llevó a cabo en dos etapas principales: la síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante transcripción inversa y, posteriormente, su cuantificación a través de PCR en tiempo real (qPCR).

Para la transcripción inversa, se utilizó la enzima retrotranscriptasa SuperScript II (1.25 U/ μ L, Thermo Fisher Scientific), empleando un oligonucleótido poly-T anclado (25 ng/ μ L, T4Oligo) como oligonucleótido. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L, utilizando 250 ng de RNA total como molde. La reacción de transcripción se realizó a 42 °C durante 75 minutos, seguida de la inactivación de la enzima mediante una incubación a 75 °C durante 15 minutos. Posteriormente, el cDNA obtenido fue diluido en una proporción de 1:4 con agua libre de nucleasas (grado biología molecular) y se almacenó a -20 °C hasta su uso o se utilizó inmediatamente para los análisis de qPCR.

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante qPCR utilizando el sistema termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems). Para cada reacción, se empleó la mezcla de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen) en un volumen final de 10 μ L, que incluía 1 μ L de la solución de cDNA y una concentración final

de 0.4 μ M de cada oligonucleótido. La cuantificación relativa de los niveles de mRNA se determinó mediante una curva estándar, y los valores obtenidos fueron normalizados utilizando el gen de referencia RPL32. Los oligonucleótidos específicos para cada gen se diseñaron con la herramienta Primer-BLAST y sus secuencias se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en PCR cuantitativa.

Gen	Oligonucleótido sentido (5' – 3')	Oligonucleótido antisentido (3' – 5')
RPL32 (humano)	CAGGGTTCGTAGAAGATTCAAGGG	CTTGGAGGAAACATTGTGAGCGATC
RPL32 (ratón)	CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG	CTTAGAGGACACGTTGTGAGCAATC
PMPEA1 (humano)	AGAACACTCCGCGCTTCTTA	GCTTGTGCATTCAGACCAGA
PMPEA1 (ratón)	CAGGAGGAGAGACGATGGAC	AGGTAGGGGTAGGTGGGTTG

2.6.3 Análisis estadísticos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o la prueba de Dunnett, según correspondiera. Los datos fueron procesados utilizando el software GraphPad Prism, versión 9.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Para la comparación de tres o más grupos que involucraban una única variable independiente, se empleó un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), seguido de la prueba post hoc de Dunnett. En los casos en que se analizaron dos variables independientes, se utilizó un análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA), con la prueba post hoc de Šídák cuando fue pertinente. Los resultados se presentan en forma de histogramas que indican la media, y se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $p \leq 0.05$.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Viabilidad celular en células CMTN *in-vitro*

Primeramente, se evaluó el efecto del compuesto IFC-305 en el crecimiento de células sanas y de cáncer de mama mediante el ensayo MTT, como se muestra en la Figura 5. Para este experimento, se emplearon tres líneas celulares distintas: 293T (riñón embrionario humano sano), MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) y 4T1 (cáncer de mama murino). Las células fueron tratadas con IFC-305 en un rango de concentraciones (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mM) y evaluadas a las 24, 48 y 72 horas de exposición.

Los resultados del ensayo mostraron que el IFC-305 reduce la viabilidad celular de manera dependiente del tiempo y de la concentración. En el caso de las células 293T, no se observó una reducción significativa en la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento (Figura 5A). Sin embargo, a partir de las 48 y 72 horas, comenzó a manifestarse una tendencia a la disminución de la viabilidad celular conforme aumentaba la concentración del compuesto, lo que sugiere que un tratamiento prolongado con IFC-305 podría afectar también a células no cancerosas.

En contraste, las células MDA-MB-231 mostraron una reducción más evidente en la viabilidad celular desde las primeras 24 horas de exposición, con una disminución del 20 % a concentraciones entre 0.625 y 20 mM (Figura 5B). Este efecto se intensificó con el tiempo, alcanzando una reducción del 58 % a las 48 horas y del 80 % a las 72 horas en la concentración de 20 mM, lo que indica una marcada sensibilidad de estas células al compuesto.

Por otro lado, las células 4T1 presentaron mayor resistencia al tratamiento. A las 24 horas, solo la concentración más alta (20 mM) logró reducir la viabilidad en un 35 % (Figura 5C). Sin embargo, a las 48 y 72 horas, la viabilidad celular disminuyó a partir de la concentración de 2.5 mM de IFC-305, la reducción a 20 mM es de aproximadamente un 65 % con la concentración, lo que sugiere que el efecto del IFC-305 en esta línea celular es más lento, pero aún significativo con el tiempo a partir de 2.5 mM de IFC-305.

En general, tras 48 y 72 horas de tratamiento con IFC-305, ambas líneas celulares cancerosas y las células control experimentaron una reducción pronunciada en la viabilidad celular en todas las concentraciones

evaluadas en comparación con el control sin tratamiento. Estos hallazgos sugieren que el IFC-305 tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de células de cáncer de mama de manera dependiente de la dosis y el tiempo. La notable reducción en la viabilidad de las células cancerosas, observada con el uso de IFC-305, subraya su prometedor potencial como agente terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama. No obstante, para optimizar su aplicación clínica y minimizar la incidencia de efectos adversos, es crucial incrementar la especificidad de IFC-305 hacia las células tumorales, salvaguardando la integridad de las células sanas circundantes.

Así mismo investigaciones adicionales, incluyendo estudios moleculares y modelos *in-vivo*, serán fundamentales para dilucidar con mayor precisión su mecanismo de acción y su viabilidad como agente terapéutico

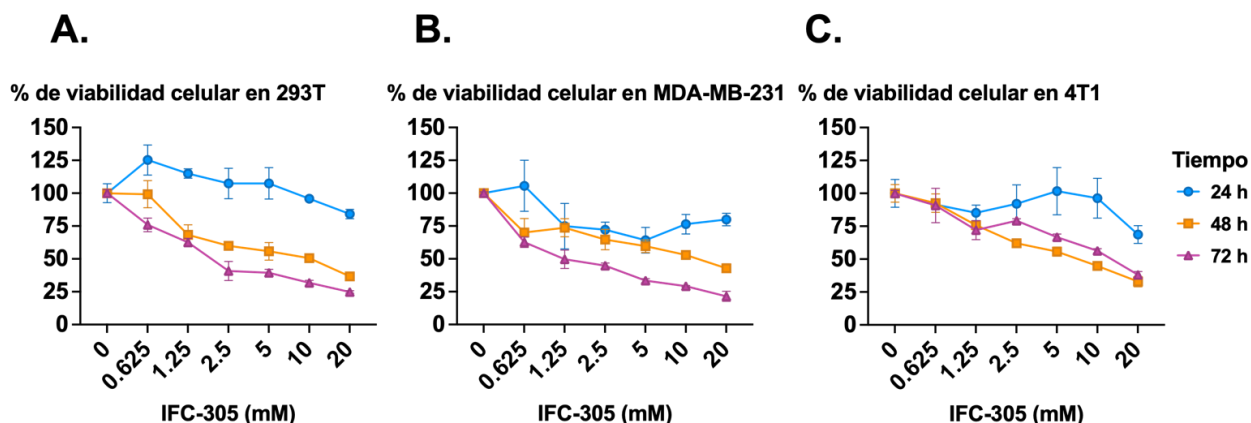


Figura 5. Efecto del compuesto IFC-305, derivado de adenosina, sobre la viabilidad celular en líneas de cáncer de mama y células no tumorales. (A) Células de riñón embrionario humano 293T, (B) células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y (C) células de cáncer de mama murino 4T1 fueron tratadas con el compuesto IFC-305 a una concentración determinada durante 24, 48 y 72 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante la medición de la densidad óptica a 570 nm, normalizada al control (100%). Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías con prueba post-test de Dunnett (**P = 0.001, ****P < 0.0001 vs. control).

3.2 Migración celular de células metastásicas a hueso *in-vitro*

Se ha comprobado que las células del tumor primario pueden desprenderse y migrar hacia órganos distantes, un proceso conocido como metástasis. Dado que la capacidad de migración celular es un paso clave en este fenómeno, se realizaron ensayos de cicatrización de heridas para evaluar el efecto del IFC-305 en la movilidad de células de cáncer de mama triple negativo.

La Figura 6A y 6C muestra los resultados del ensayo de migración celular, se analizó cualitativamente durante un período de 24 horas, comparando grupos con y sin tratamiento con el IFC-305 a concentraciones de 5, 10 y 20 mM. Las imágenes obtenidas proporcionan una representación visual del grado de migración celular y la capacidad de cierre de la herida tratados con diferentes concentraciones del tratamiento, permitiendo una evaluación inicial del efecto del compuesto IFC-305 sobre la migración celular.

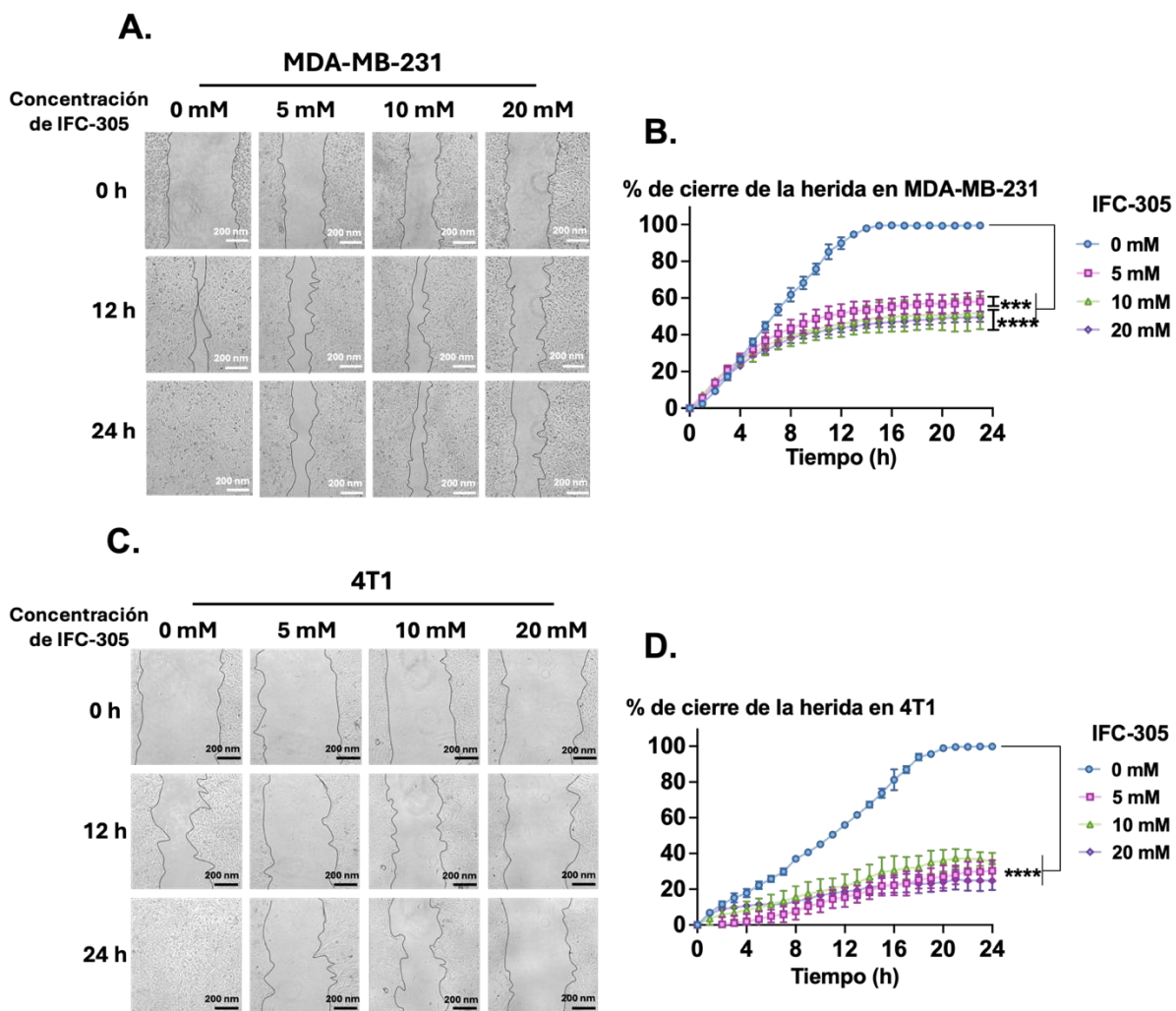


Figura 6. El tratamiento con IFC-305 inhibe la migración e invasión de células de cáncer de mama metastásico óseo *in-vitro* a las 24 horas. (A) Imágenes representativas del ensayo de cicatrización de heridas en células MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de IFC-305 en distintos tiempos. (B) Cuantificación del cierre de la herida en MDA-MB-231. (C) Imágenes representativas del ensayo en células 4T1. (D) Cuantificación del cierre de la herida en 4T1. Los datos se presentan como gráficas lineales con media $\pm$ SEM ($n = 3$) y se analizaron mediante ANOVA de dos vías con prueba post-test de Dunnett. Imágenes adquiridas a un aumento de 10X; barras de escala = 200 nm.

Así mismo, se realizó el análisis cuantitativo de las imágenes, cuyos resultados se presentan en las Figuras 6B y 6D. Los datos obtenidos revelan una reducción significativa en la migración celular tras la exposición a IFC-305. En particular, las células MDA-MB-231 mostraron una disminución notable en su capacidad migratoria, con una reducción del cierre de la herida de aproximadamente un 53 % en los grupos tratados con IFC-305 en comparación con el grupo control sin tratamiento. Este efecto fue aún más pronunciado en las células 4T1, donde la migración celular se redujo en un 70 %, lo que indica un potente efecto inhibidor sobre la motilidad celular.

Estos hallazgos sugieren que el IFC-305 ejerce un impacto significativo en la inhibición de la migración de células de CMTN. La reducción en la capacidad de migración celular sugiere que el compuesto podría estar interfiriendo con vías de señalización clave involucradas en la migración celular, lo que a su vez podría contribuir a sus posibles propiedades anti-metastásicas. Investigaciones adicionales serán esenciales para dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a este efecto y determinar el potencial terapéutico del IFC-305 en la prevención de la diseminación metastásica en el cáncer de mama triple negativo.

3.3 Métastasis osea en modelo murino *in-vivo*

Para evaluar el potencial terapéutico del derivado de adenosina IFC-305 en un modelo *in-vivo* de metástasis óseas en cáncer de mama triple negativo, se utilizó un modelo murino con ratones de la cepa Balb/C. La metástasis ósea fue inducida mediante inoculación intracardiaca de células 4T1 en el ventrículo izquierdo del corazón, lo que permitió replicar de manera eficiente la diseminación metastásica hacia el tejido óseo, simulando así el comportamiento clínico de esta enfermedad.

Tras la inoculación celular, los ratones fueron divididos en grupos y sometidos a un régimen de tratamiento con el IFC-305 bajo tres esquemas de dosificación distintos: 50 mg/kg administrados diariamente, y 50 mg/kg o 100 mg/kg administrados en días alternos. La administración del compuesto comenzó un día después de la inoculación de las células tumorales y se mantuvo a lo largo de todo el período experimental con las dosis establecidas.

Los efectos del tratamiento fueron evaluados mediante análisis radiográfico de las extremidades posteriores de los ratones (Figura 7A). Las imágenes representan a los grupos: sanos, sin tratamiento y con tratamiento de IFC-305. En el grupo control, sin tratamiento, se observó una extensa degradación

ósea, mientras que en los grupos tratados con IFC-305, la severidad de las lesiones disminuyó de manera dosis-dependiente.

El análisis cuantitativo del área osteolítica (Figura 7B) confirmó esta tendencia, mostrando una reducción progresiva en el tamaño de las lesiones en los grupos tratados con IFC-305. En el grupo control sin tratamiento, el área media de lesión osteolítica fue de 2.22 mm². En comparación, los ratones que recibieron 50 mg/kg diariamente mostraron una reducción del área de lesión a 1.64 mm², lo que equivale a una disminución del 26 %. El efecto fue aún más pronunciado en el grupo que recibió 50 mg/kg en días alternos, donde el área de lesión disminuyó a 1.32 mm², representando una reducción del 40.5 %. Finalmente, el grupo tratado con la dosis más alta (100 mg/kg en días alternos) mostró reducción significativa, con un área osteolítica de 0.69 mm², equivalente a una disminución del 68.9 % en comparación con el grupo control.

Interesantemente, la administración de la misma dosis (50 mg/kg) con diferente frecuencia de administración, mostró distintos resultados. Los ratones tratados en días alternos presentaron una reducción mayor en el área osteolítica (40.5 %) en comparación con aquellos que recibieron la administración diaria (26 %). Este resultado sugiere que la frecuencia de dosificación podría desempeñar un papel clave en la eficacia terapéutica del IFC-305, posiblemente debido a factores farmacocinéticos o farmacodinámicos que requieren ser investigados en estudios futuros. Además, el incremento de la dosis a 100 mg/kg en días alternos amplificó aún más el efecto, logrando una reducción cercana al 70 % en la extensión de las lesiones óseas.

Estos resultados resaltan el potencial del compuesto IFC-305 como una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de metástasis ósea en el CMTN. La reducción significativa en las lesiones osteolíticas sugiere que este compuesto podría contribuir a frenar la progresión metastásica y mitigar el daño óseo inducido por el cáncer. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para comprender los mecanismos moleculares subyacentes, optimizar la estrategia de dosificación y evaluar su posible aplicación en un contexto clínico.

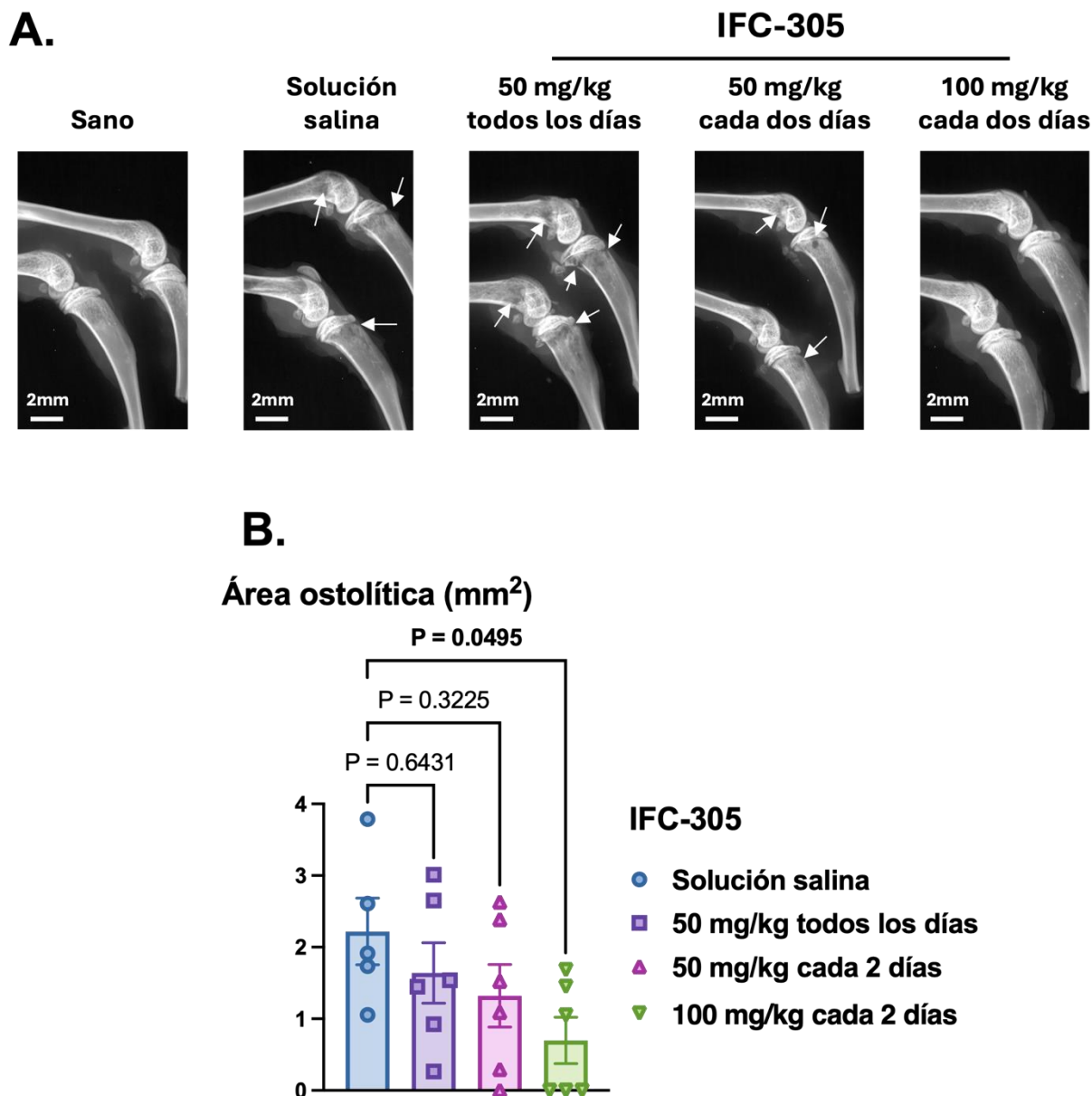


Figura 7. El tratamiento con IFC-305 (100 mg/kg, dosis alterna) reduce la formación de metástasis óseas en un modelo murino de cáncer de mama. Se inocularon células 4T1 en el ventrículo cardíaco izquierdo de ratones Balb/C para inducir metástasis óseas, y posteriormente se administró tratamiento con o sin IFC-305. (A) Peso corporal de los ratones durante el tratamiento. (B) Cuantificación del área de osteólisis en radiografías ($n = 6$ para IFC-305; $n = 5$ para control). Los datos se presentan como histogramas y se analizaron mediante ANOVA de una vía con prueba post-test de Dunnett.

3.4 Análisis del estado de activación de las proteínas Smad por Western-blot

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a la inhibición de la metástasis ósea mediada por el derivado de adenosina IFC-305, se evaluó su impacto en proteínas clave para el establecimiento y progresión de la metástasis ósea: el de TGF- β , con un enfoque particular en la

activación de las proteínas SMAD2 y SMAD3. Para ello, se realizó un análisis por Western blot para determinar el estado de fosforilación de SMAD2/3, dado que su activación es un marcador característico de la señalización mediada por TGF- β y juega un papel crucial en la progresión tumoral y la metástasis.

Como se ilustra en las Figuras 8A y 8C, la ausencia de TGF- β 1 y de tratamiento con IFC-305 resultó en la indetectabilidad de las bandas de fosforilación de SMAD2/3 (F-SMAD2/3). En contraste, las células expuestas a TGF- β 1 mostraron una banda clara con el anticuerpo F-SMAD2/3, esta banda se atribuyó a la fosforilación de SMAD2 debido al tamaño de ~ 60 kDa, la fosforilación de la proteína SMAD3 no se observó. Con esto se confirma la activación de la vía canónica de TGF- β . Para asegurar una cuantificación precisa de F-SMAD2/3, se emplearon los niveles totales de SMAD2/3 (SMAD2 en ~ 60 kDa y SMAD3 en ~ 52 kDa) como control de carga para la normalización de las bandas. En células MDA-MB-231 (Fig. 4A), el tratamiento con IFC-305 a concentraciones de 1 y 5 mM de no tuvo efecto en la fosforilación de SMAD2/3 estimulada por TGF- β 1. No obstante, a concentraciones altas de IFC-205 10 y 20 mM, se observó una reducción en la intensidad de SMAD2 fosforilada, lo que sugiere un efecto inhibitor sobre la activación de SMAD2/3 (FIG. 8A). Resultados similares se observaron en células 4T1 (Fig. 8C), donde concentraciones de 1, 5 y 10 mM de IFC-305 no disminuyeron la intensidad de la banda de SMAD2 fosforilada, mientras que, a 20 mM, la intensidad de la banda de SMAD2 fosforilada se redujo drásticamente, indicando una fuerte inhibición de la vía.

La cuantificación de los niveles de fosforilación de SMAD2/3, normalizados con respecto a SMAD2/3 total, se presenta en las Figuras 8B y 8D. De manera similar con los análisis cualitativos en las imágenes de western blot, en células MDA-MB-231, la fosforilación de SMAD2 mostró una reducción sustancial con 20 mM de IFC-305 (Fig. 8C). Este efecto fue aún más pronunciado en células 4T1 (Fig. 8D), donde se evidenció una disminución drástica en los niveles de SMAD2 fosforilada, lo que confirma una inhibición efectiva de la señalización mediada por TGF- β en CMTN.

Estos resultados sugieren que IFC-305 actúa como un modulador negativo de la vía de TGF- β en células de CMTN, al reducir la activación de SMAD2 fosforilada en un modelo dependiente de la concentración. La inhibición de esta vía es de particular interés, ya que TGF- β desempeña un papel dual en el cáncer de mama: en etapas tempranas puede actuar como un supresor tumoral, pero en fases avanzadas favorece la progresión tumoral y la metástasis. Por lo tanto, la capacidad de IFC-305 para interferir con esta señalización podría representar una estrategia terapéutica prometedora para limitar la diseminación metastásica y reducir el daño óseo inducido por el cáncer.

No obstante, estudios adicionales son esenciales para elucidar con mayor precisión los mecanismos moleculares subyacentes. Será crucial determinar si esta inhibición se logra mediante una interferencia directa con la fosforilación de SMAD2/3 o a través de la regulación de otros factores en la vía de TGF- β .

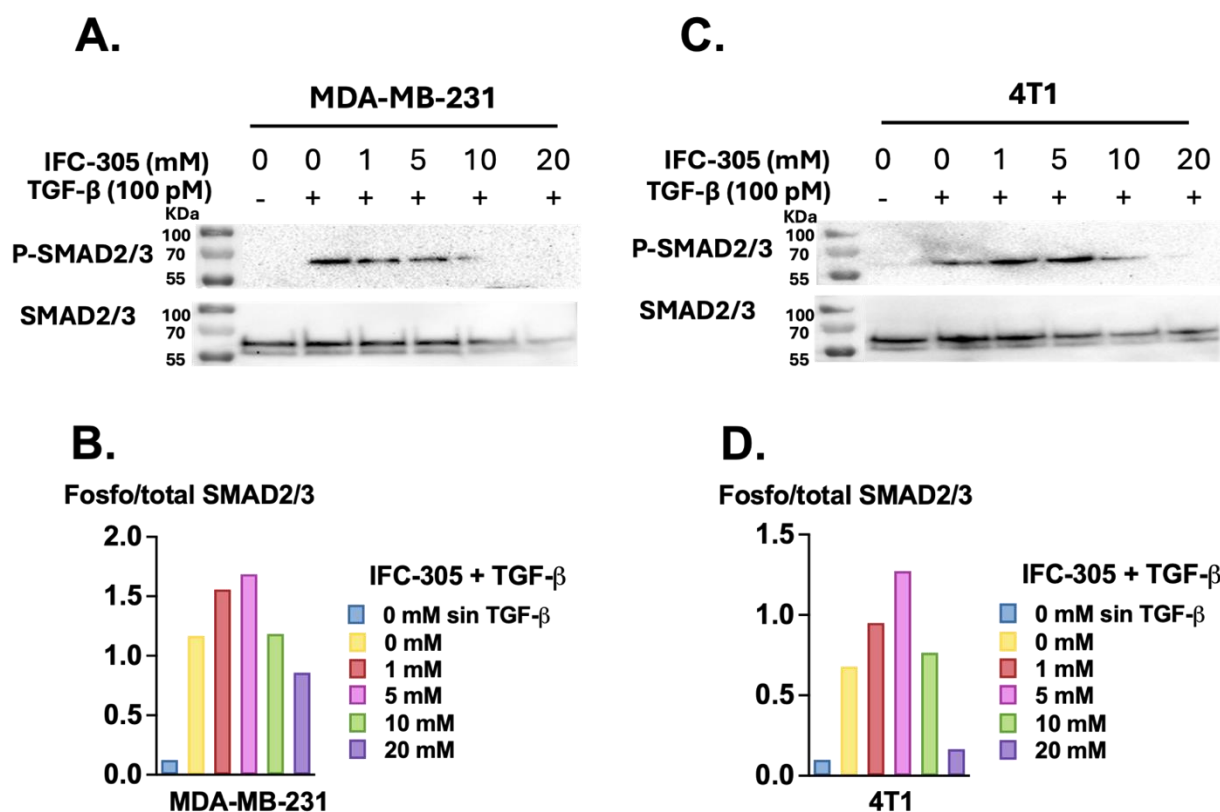


Figura 8. El compuesto IFC-305, derivado de adenosina, inhibe la activación de la vía canónica de señalización de TGF- β en células de cáncer de mama metastásico óseo *in-vitro*. Los lisados proteicos de células tratadas se analizaron mediante Western blot para evaluar los niveles de fosforilación de las proteínas SMAD2/3 en (A) MDA-MB-231 y (C) 4T1. La expresión de SMAD2/3 total se utilizó como control de carga. Las gráficas de cuantificación de la intensidad de grises de las bandas de Western blot se presentan para (B) MDA-MB-231 y (D) 4T1.

3.5 Análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR

Para evaluar el impacto de IFC-305 en la expresión de genes diana del TGF- β involucrados en la metástasis ósea, se analizó la expresión del mRNA de Pmepa1, un regulador clave de esta vía. El PMEPA1 regula negativamente el crecimiento de células de cáncer de próstata y de mama, y estas funciones pueden estar mediadas a través de la interacción de PMEPA1 con la proteína NEDD4 (Azami et al., 2015; Amalia et al., 2019). Como se ilustra en las Figuras 9A y 9B, se observa que la presencia de TGF- β 1 promovió un aumento en la expresión de Pmepa1 tanto en células MDA-MB-231 como en 4T1

comparado con el control sin tratar. En contraste, el tratamiento con IFC-305 de células tratadas con TGF- β 1 resultó en una reducción significativa de la expresión de *Pmepa1*. En particular, en células MDA-MB-231, a concentraciones de 5, 10 y 20 mM de IFC-305 disminuyeron los niveles de *Pmepa1* en comparación con los valores del grupo control sin inducción de TGF- β 1 (Fig. 9A). De manera similar, en células 4T1, se observó una disminución significativa de la expresión de *Pmepa1* con 10 y 20 mM de IFC-305 (Fig. 9B).

Por otro lado, otro resultado interesante es que en ambas líneas celulares evaluadas que han sido tratadas con el derivado de adenosina IFC-305 sin tratamiento con TGF- β , es decir el control (Fig. 9A-B), podemos observar que mientras aumentamos la dosis de IFC-305 también disminuye la expresión relativa de *Pmepa1*. Estos resultados sugieren que el IFC-305 suprime la transcripción de *PMEPA1* con y sin inducción de TGF- β 1.

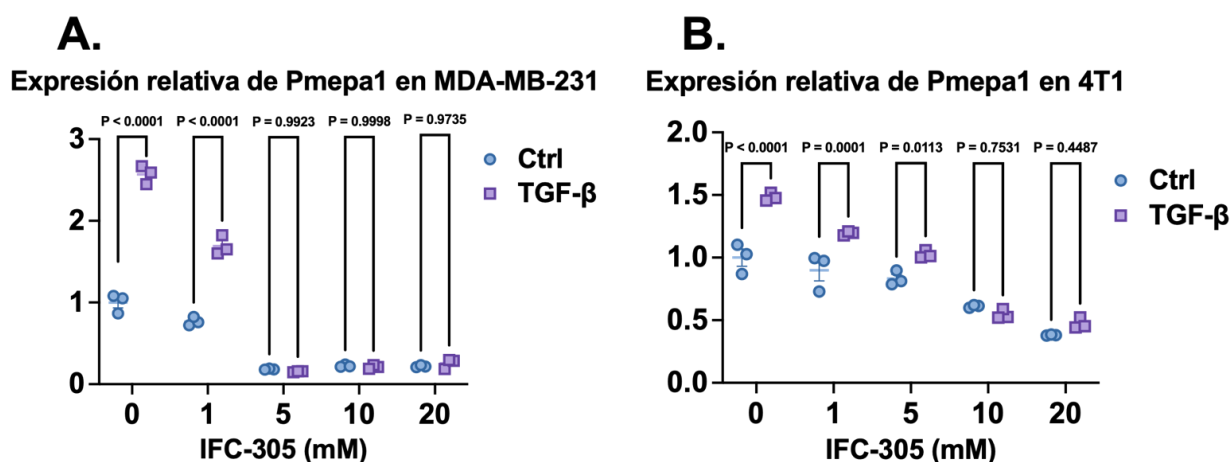


Figura 9. El compuesto IFC-305, derivado de adenosina, inhibe la expresión génica de *Pmepa1* en células de cáncer de mama metastásico óseo *in-vitro*. Las células (A) MDA-MB-231 y (B) 4T1 fueron tratadas con IFC-305 durante 1 hora, seguido de la inducción con TGF- β 1 durante 1 hora. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con prueba post-test de comparaciones múltiples de Šídák (vs. control).

Capítulo 4. Discusión

El cáncer de mama triple negativo representa uno de los subtipos más agresivos de cáncer de mama, caracterizado por su alta capacidad metastásica y la falta de opciones terapéuticas efectivas, particularmente en el contexto de la metástasis ósea. Esta problemática clínica resalta la necesidad de identificar nuevas estrategias terapéuticas que no solo limiten el crecimiento tumoral, sino que también interfieran con los mecanismos moleculares implicados en la diseminación hacia el hueso. En este trabajo se evaluó el efecto del derivado de adenosina IFC-305 en modelos *in-vitro* e *in-vivo* de CMTN, con el objetivo de determinar su impacto sobre la viabilidad celular, la migración, la metástasis ósea y la vía de señalización del TGF- β , reconocida por su papel clave en la progresión metastásica. Los hallazgos obtenidos permiten explorar el potencial de IFC-305 como agente modulador del comportamiento metastásico en este tipo de cáncer.

Nuestro estudio sobre la viabilidad celular confirma que el compuesto derivado de adenosina IFC-305 reduce significativamente la viabilidad de células de cáncer de mama triple negativo *in-vitro*, de manera dependiente de la dosis, en un periodo de 24 a 72 horas de tratamiento. Por otro lado, en células 293T no se observó una reducción significativa en la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento, pero a partir de las 48 y 72 horas, comenzó a manifestarse una tendencia a la disminución de la viabilidad celular conforme aumentaba la concentración del compuesto, lo que sugiere que un tratamiento prolongado con el IFC-305 podría afectar también a las células no cancerosas. En general, estos hallazgos sugieren que el IFC-305 tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación de células de cáncer de mama de manera dependiente de la dosis y del tiempo. La reducción significativa en la viabilidad de las células cancerosas resalta su potencial como un candidato prometedor para el tratamiento del cáncer de mama. Este efecto podría explicarse en parte por el hecho de que investigaciones previas en otros grupos de investigación han demostrado una expresión aumentada del receptor A1 de adenosina (A1AR) en tumores mamarios en comparación con tejido mamario normal. Se ha sugerido que esta sobreexpresión de A1AR juega un papel crucial en la mediación de los efectos antiproliferativos de la adenosina y sus derivados, contribuyendo a la inhibición de la proliferación celular en diversas líneas celulares tumorales, incluido el cáncer de mama (Leone & Emens, 2018). Así, posiblemente la mayor presencia de A1AR en las células de cáncer de mama podría ser un factor clave en los efectos terapéuticos observados del compuesto IFC-305 en este estudio.

Además, la activación del receptor A3 de adenosina (A3AR) ha demostrado ser un mecanismo clave en la inhibición del crecimiento y la supervivencia celular en ciertos cánceres (Tsuchiya & Nishizaki, 2015). En diversos estudios, incluyendo los realizados en células de mesotelioma maligno y melanoma humano A375, se ha reportado que la sobreexpresión y activación del A3AR suprime la proliferación e induce la apoptosis (Gessi et al., 2011). Esto se logra mediante la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt, la cual es fundamental para la supervivencia y el crecimiento celular (Leone & Emens, 2018). La activación del receptor A3 de adenosina (A3AR) mediante agonistas como IB-MECA inhibe la actividad del adenilato ciclasa (AC), lo que reduce los niveles intracelulares de AMP cíclico (cAMP). Esta disminución de cAMP conlleva una menor activación de la proteína quinasa A (PKA) y de su sustrato, la proteína quinasa B (PKB/Akt). Como resultado, se observa una disminución en la expresión de PKA y Akt en diversas líneas celulares cancerosas, como las de melanoma, lo que contribuye a la inhibición de la proliferación celular (Wilson & Mustafa, 2011). Más específicamente, esta inhibición dependiente de PI3K/Akt conduce a la supresión de la fosforilación de ERK1/2 y de la vía NF- κ B1, eventos críticos en la señalización celular que resultan en una reducción de la proliferación (Nakamura et al., 2006; Leone & Emens, 2018; Wilson & Mustafa, 2011). También se han publicado trabajos donde una expresión elevada de A3AR en diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal, puede contribuir a la progresión y malignidad tumoral (Tsuchiya & Nishizaki, 2015).

Nuestros hallazgos en la viabilidad celular de CMTN sugieren una posible relación entre la reducción observada tras el tratamiento con IFC-305 y el receptor A1 de adenosina. Dada la disminución significativa en la viabilidad celular, se vuelve crucial profundizar la investigación sobre los roles del A1AR y del A3AR en el cáncer de mama, así como su interacción con el compuesto IFC-305. Se requieren estudios posteriores para dilucidar las posibles interacciones entre estos receptores y otras vías de señalización clave. Esto permitirá comprender los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos observados y, con ello, identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

Identificar y orientar los mecanismos moleculares que impulsan la migración y metástasis tumoral sigue siendo un área crucial de investigación para mejorar las tasas de supervivencia de los pacientes con CMTN. En el ensayo de cicatrización de heridas, exploramos los efectos del compuesto IFC-305 *in-vitro*, y nuestros resultados confirman una reducción significativa en el cierre de la herida de células de CMTN tras el tratamiento con concentraciones de 5, 10 y 20 mM del derivado de adenosina IFC-305. Investigaciones en artículos previos han sugerido que la activación del receptor A2A de adenosina (A2AR) está asociada con una mayor migración celular en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (Jafari et al., 2017). Además, se ha demostrado que la adenosina aumenta la producción de TGF- β 1, una

proteína clave en la regulación de la migración celular y otros procesos celulares. Es importante señalar que la señalización de TGF- β está implicada en la inducción de la transición epitelio-mesenquimal, un proceso que facilita la migración e invasión de las células cancerosas. Curiosamente, se ha reportado que el derivado de adenosina IFC-305 puede modular la expresión de SMAD7 en células de hígado, un inhibidor natural de la vía canónica de señalización de TGF- β (Velasco-Loyden et al., 2010). Al inactivar esta vía, el derivado de adenosina podría desempeñar un papel en la supresión de las capacidades migratorias de las células cancerosas, contribuyendo así a la inhibición observada de la migración de células de CMTN en nuestro estudio.

Con base en estos hallazgos, la respuesta de las células de CMTN al tratamiento con el compuesto IFC-305 podría estar influenciada por la activación específica y el papel funcional de los receptores A2AR, así como por la activación de SMAD7, que inhibe la vía de señalización de TGF- β . Esta modulación de vías de señalización clave sugiere que el derivado de adenosina IFC-305 podría desempeñar un papel crucial en la supresión de la migración y metástasis de las células cancerosas. En consecuencia, nuestros resultados respaldan el potencial del derivado de adenosina como un enfoque terapéutico novedoso para reducir la propagación metastásica de CMTN, proporcionando una estrategia prometedora para abordar este tipo de cáncer agresivo y difícil de tratar.

En nuestro estudio de evaluación de los efectos del IFC-305 en un modelo murino de metástasis ósea, encontramos que el tratamiento con una dosis de 100 mg/kg en días alternados del compuesto IFC-305 condujo a una reducción de las lesiones osteolíticas asociadas con metástasis de cáncer de mama a los huesos. Estos resultados sugieren que el derivado de adenosina IFC-305 no solo influye en la viabilidad y migración de las células cancerosas, sino que también podría desempeñar un papel fundamental en la mitigación de la degradación ósea comúnmente observada en el cáncer de mama metastásico. La reducción de lesiones osteolíticas observada en este modelo respalda aún más los posibles beneficios terapéuticos de este derivado de adenosina IFC-305 en la lucha contra la metástasis ósea, una complicación frecuente y debilitante en pacientes con cáncer de mama.

Recordando que la señalización de TGF- β desempeña un papel crucial en la progresión de la metástasis ósea en el cáncer de mama, es importante señalar que el TGF- β se libera de la matriz ósea debido a la actividad de los osteoclastos. Una vez liberado, el TGF- β estimula a las células tumorales a secretar factores osteolíticos como la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), la interleucina-11 (IL-11) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (Velasco-Loyden et al., 2017). Estos factores contribuyen a la resorción ósea y al proceso metastásico relacionado, facilitando la propagación

de las células cancerosas al hueso. Por lo tanto, se ha demostrado que bloquear la señalización del TGF- β inhibe la metástasis ósea, lo que representa una estrategia terapéutica prometedora para prevenir la progresión del cáncer de mama hacia los huesos (Nie et al., 2016). Nuestros hallazgos muestran que el tratamiento con el derivado de adenosina IFC-305 parece afectar la señalización del TGF- β . Estudios posteriores para evaluar el efecto del IFC-305 en genes pro-osteolíticos regulados por el TGF- β son necesarios.

Se ha demostrado que la señalización del TGF- β aumenta en las células de cáncer de mama y por consiguiente aumenta la expresión del gen PMPEA1 (Nie et al., 2016). PMPEA1 se ha reportado que se encuentra sobre expresado frecuentemente en varios tumores sólidos, incluidos los de mama, colon, próstata y pulmón. Por ello, utilizamos RT-qPCR para evaluar la expresión del gen PMPEA1 bajo la inducción de TGF- β 1 y el tratamiento con concentraciones de 5, 10 y 20 mM del derivado de adenosina IFC-305. Nuestros resultados indican que el compuesto IFC-305 regula eficazmente la expresión de PMPEA1, lo que sugiere que modula la señalización de TGF- β , adicionalmente se analizó su efecto mediante Western blot. El tratamiento con concentraciones de 10 y 20 mM del derivado de adenosina IFC-305 en células de CMTN mostró una reducción en la fosforilación de las proteínas SMAD2/3. Esta inhibición de la fosforilación de SMAD2/3 indica que concentraciones más altas del derivado de adenosina suprimen la vía de señalización de TGF- β , lo que indica su potencial en la regulación de esta vía crítica en las células de cáncer de mama.

La disminución observada en la osteólisis podría atribuirse, en gran medida, a la reducción de la viabilidad celular y al arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 inducidas por el tratamiento. No obstante, los análisis por citometría de flujo mostraron que las células no entran en apoptosis (Mendoza Chacón, 2024), lo que sugiere que el IFC-305 podría estar promoviendo otras respuestas celulares, como la quiescencia, la senescencia o la autofagia. Este hallazgo plantea una posible limitación del estudio, así como una dirección relevante para investigaciones futuras.

Además de nuestros hallazgos, observamos que el derivado de adenosina IFC-305 tiene un efecto a nivel molecular en la señalización del TGF- β . Diferentes grupos de investigación han estudiado la acción de la adenosina desde diversas perspectivas, y uno de los mecanismos más importantes es su capacidad para regular la expresión de SMAD7. Donde SMAD7 actúa como un inhibidor natural de la vía de señalización de TGF- β , y al inactivar esta vía, la adenosina podría explicar la inhibición de los genes involucrados en la resorción ósea y la progresión tumoral en los huesos en nuestro estudio. Por otro lado, los artículos proporcionan información donde la adenosina ejerce sus efectos a través de la activación de los

receptores A2AR y A2BR, lo que lleva a una disminución de la señalización de TGF- β en fibroblastos y células tumorales (Jafari et al., 2017). Estudios posteriores son necesarios para confirmar que esta reducción de la señalización de TGF- β es mediada por los receptores A2AR y A2BR y/o Smad7.

Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas

En conclusión, este estudio presenta evidencia sobre las potenciales aplicaciones terapéuticas del compuesto IFC-305, un derivado de adenosina, en el cáncer de mama triple negativo, un subtipo especialmente agresivo y de difícil tratamiento. Nuestros resultados indican que el compuesto IFC-305 reduce de manera significativa la viabilidad celular y la migración en células de CMTN en estudios *in-vitro* de manera dosis dependiente. Además, en estudios preliminares, utilizando un modelo murino de metástasis ósea, muestra efectos notables en la reducción de las lesiones osteolíticas asociadas a la metástasis ósea. Asimismo, nuestra investigación destaca una interacción clave entre el IFC-305 y la vía de señalización canónica del TGF- β . El compuesto disminuye la expresión de PMPEA1, un gen que encuentra frecuentemente sobreexpresado en diversos tipos de cáncer, e inhibe la fosforilación de SMAD2/3, un paso crucial para la activación de la señalización del TGF- β . Esta modulación de inactivación, según estudios previamente publicados, podría ser posible por la regulación de la expresión de SMAD7 y/o la activación de A2AR/A2BR, lo cual sugiere un mecanismo a través del cual el IFC-305 interrumpe los efectos pro-metastásicos de TGF- β , especialmente en el contexto de la metástasis ósea. Aunque se requiere más investigación para comprender en profundidad las interacciones complejas entre la señalización de los derivados de adenosina y las diversas vías implicadas en la progresión del CMTN, nuestros resultados sugieren de manera contundente que el IFC-305 es un compuesto prometedor para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el CMTN, incluida la terapia para la metástasis ósea. Futuros estudios deberían centrarse en explorar los roles específicos de los diferentes receptores de adenosina en el CMTN y caracterizar más detalladamente los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos observados *in-vivo*, lo cual abriría la puerta a su potencial en la clínica.

Literatura citada

- Aggarwal, K., & Massagué, J. (2012). Ubiquitin removal in the TGF- β pathway. *Nature Cell Biology*, 14(7), 656–657. <https://doi.org/10.1038/ncb2534>
- Akhurst, R. J., & Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 790–811. <https://doi.org/10.1038/nrd3810>
- Amalia, R., Abdelaziz, M., Puteri, M. U., Hwang, J., Anwar, F., Watanabe, Y., & Kato, M. (2019). TMEPAI/PMEPA1 inhibits Wnt signaling by regulating β -catenin stability and nuclear accumulation in triple negative breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 59, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.03.016>
- André, F., & Zielinski, C. C. (2012). Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Annals of Oncology*, 23, 46–51. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds195>
- Azami, S., Nguyen, T. T. V., Watanabe, Y., & Kato, M. (2015). Cooperative induction of transmembrane prostate androgen induced protein TMEPAI/PMEPA1 by transforming growth factor- β and epidermal growth factor signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456, 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.107>
- Batlle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, 50(4), 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13, 674–690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74, 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brook, N., Brook, E., Dharmarajan, A., Dass, C. R., & Chan, A. (2018). Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 96, 63–78. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.01.003>
- Chagoya de Sánchez, V., & Hernández-Muñoz, R. (2004). *México Patent No. MX220780*.
- Chiang, A., & Massagué, J. (2008). Molecular basis of metastasis. *New England Journal of Medicine*, 359, 2814–2823. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0805239>

- Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncology*, 8, 235–244. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70074-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70074-8)
- David, C. J., & Massagué, J. (2018a). Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7), 419–435. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0007-0>
- Di, L., Liu, L. J., Yan, Y. M., Fu, R., Li, Y., Xu, Y., Cheng, Y. X., & Wu, Z. Q. (2019). Discovery of a natural small-molecule compound that suppresses tumor EMT, stemness and metastasis by inhibiting TGF β /BMP signaling in triple-negative breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38, 134–149. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1130-2>
- Esposito, M., Guise, T., & Kang, Y. (2018). The biology of bone metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031252>
- 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, 28–45. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Foulkes, W., Smith, I., & Reis-Filho, J. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363, 1938–1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
- Ganesh, K., & Massagué, J. (2018). TGF- β Inhibition and Immunotherapy: Checkmate. *Immunity*, 48(4), 626–628. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.037>
- Ganesh, K., & Massagué, J. (2021). Targeting metastatic cancer. *Nature Medicine*, 27(1), 34–44. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01195-4>
- García-Carrillo, R., Molina-Pelayo, F. A., Zarate-Lopez, D., Cabrera-Aguilar, A., Ortega-Domínguez, B., Domínguez-López, M., Chiquete-Félix, N., Dagnino-Acosta, A., Velasco-Loyden, G., Chávez, E., Castro-Sánchez, L., & de Sánchez, V. C. (2024). An adenosine derivative promotes mitochondrial supercomplexes reorganization and restoration of mitochondria structure and bioenergetics in a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma model. *Scientific Reports*, 14, 6348–6365. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56306-9>
- Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C., & Borea, P. A. (2011). Adenosine receptors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(5), 1400–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.020>
- Guise, T. A. (2002). The vicious cycle of bone metastases. *Journal of Musculoskel Neuronal Interactions*, 2(6), 570–572. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15758398/>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5, 66–97.

<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

- Imamura, T., Hikita, A., & Inoue, Y. (2012). The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer*, 19(2), 118–124. <https://doi.org/10.1007/s12282-011-0321-2>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, I. (2022). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). *Comunicado de Prensa Num. 591/22*, 1–5. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_LUCHACANCER2021
- Jafari, S. M., Joshaghani, H. R., Panjehpour, M., & Aghaei, M. (2017). A2B adenosine receptor agonist induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer stem cells via ERK1/2 phosphorylation. *Cellular Oncology*, 41, 61–72. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0359-z>
- Jin, X. and, & Mu, P. (2015). Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)*, 9, 23–34. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S25460.TYPE>
- Juárez, P., & Guise, T. A. (2010). TGF- β Pathway as a Therapeutic Target in Bone Metastases. *Current Pharmaceutical Design*, 16(11), 1301–1312. <https://doi.org/10.2174/138161210791034049>
- Juárez, P., & Guise, T. A. (2011). TGF- β in cancer and bone: Implications for treatment of bone metastases. *Bone*, 48(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.08.004>
- Justo, N., Wilking, N., & Jonsson, B. (2013). A Review of Breast Cancer Care and Outcomes in Latin America. *The Oncologist*, 18(3), 248–256. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0373>
- Käkönen, S. M., & Mundy, G. R. (2003). Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer*, 97(3), 834–839. <https://doi.org/10.1002/cncr.11132>
- Lara-Medina, F., Pérez-Sánchez, V., Saavedra-Pérez, D., Blake-Cerda, M., Arce, C., Motola-Kuba, D., Villarreal-Garza, C., González-Angulo, A. M., Bargalló, E., Aguilar, J. L., Mohar, A., & Arrieta, Ó. (2011). Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer*, 117(16), 3658–3669. <https://doi.org/10.1002/cncr.25961>
- Lee, J. H., & Massagué, J. (2022). TGF- β in developmental and fibrogenic EMTs. *Seminars in Cancer Biology*, 86(September), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2022.09.004>
- Leivonen, S. K., & Kähäri, V. M. (2007). Transforming growth factor- β signaling in cancer invasion and metastasis. *International Journal of Cancer*, 121(10), 2119–2124. <https://doi.org/10.1002/ijc.23113>
- Leone, R. D., & Emens, L. A. (2018). Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *Journal for*

ImmunoTherapy of Cancer, 6, 57–66. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0360-8>

- Liu, S., Ren, J., & Dijke, P. ten. (2021). Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00436-9>
- Lozano-Rosas, M. G., Chávez, E., Velasco-Loyden, G., Domínguez-López, M., Martínez-Pérez, L., & Chagoya De Sánchez, V. (2020). Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative. *Cancer Biology and Therapy*, 21(1), 81–94. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1665954>
- 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), 865–873. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65628-3)
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001.TGF>
- Massagué, J. (2012a). TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>
- Massagué, J., & Sheppard, D. (2023). TGF- β signaling in health and disease. *Cell*, 186(19), 4007–4037. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.036>
- Massagué, J., & Xi, Q. (2012). TGF- β control of stem cell differentiation genes. *FEBS Letters*, 586(14), 1953–1958. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.023>
- Mendoza Chacón, C. O. (2024). *Evaluación de un derivado de la Adenosina sobre la metástasis ósea inducida por el cáncer de mama*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Repositorio institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/407>
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2006). Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. *Anticancer Research*, 26(1), 43–48. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16475677/>
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 274–284. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>
- Nie, Z., Wang, C., Zhou, Z., Chen, C., Liu, R., & Wang, D. (2016). Transforming growth factor-beta increases breast cancer stem cell population partially through upregulating PMEPA1

- expression. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(2), 194–201. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv130>
- Pérez-Cabeza de Vaca, R., Domínguez-López, M., Guerrero-Celis, N., Rodríguez-Aguilera, J. R., & Chagoya de Sánchez, V. (2018). Inflammation is regulated by the adenosine derivative molecule, IFC-305, during reversion of cirrhosis in a CCl₄ rat model. *International Immunopharmacology*, 54(January 2017), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.019>
- Rodríguez-Aguilera, J. R., Guerrero-Hernández, C., Pérez-Molina, R., Cadena-del-Castillo, C. E., Pérez-Cabeza de Vaca, R., Guerrero-Celis, N., Domínguez-López, M., Murillo-de-Ozores, A. R., Arzate-Mejía, R., Recillas-Targa, F., & Chagoya de Sánchez, V. (2018). Epigenetic Effects of an Adenosine Derivative in a Wistar Rat Model of Liver Cirrhosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 401–413. <https://doi.org/10.1002/jcb.26192>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmid, D., Park, C. G., Hartl, C. A., Subedi, N., Cartwright, A. N., Puerto, R. B., Zheng, Y., Maiarana, J., Freeman, G. J., Wucherpennig, K. W., Irvine, D. J., & Goldberg, M. S. (2017). T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity. *Nature Communications*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01830-8>
- Schmierer, B., & Hill, C. S. (2007). TGF β -SMAD signal transduction: Molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 970–982. <https://doi.org/10.1038/nrm2297>
- Schuster, E., Taftaf, R., Reduzzi, C., Albert, M. K., Romero-calvo, I., & Liu, H. (2021). Better together: circulating tumor cell clustering in metastatic cancer. *Trends in Cancer*, 7(11), 1020–1032. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.07.001>
- Searcy, M. B., & Johnson, R. W. (2024). Epigenetic control of the vicious cycle. *Journal of Bone Oncology*, 44, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2024.100524>
- Suva, L. J., Washam, C., Nicholas, R. W., & Griffin, R. J. (2011). Bone metastasis: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(4), 208–218. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.227>
- Thordur, O., Eduard, B., & Massagué, J. (2014). Metastatic Stem Cells: Sources, Niches, and Vital Pathways. *Cell Stem Cell*, 14(3), 306–321. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.002.Metastatic>
- Tsuchiya, A., & Nishizaki, T. (2015). Anticancer effect of adenosine on gastric cancer via diverse signaling pathways. *World Journal of Gastroenterology*, 21(39), 10931–10935. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i39.10931>

- Velasco-Loyden, G., Pérez-Carreón, J. I., Agüero, J. F. C., Romero, P. C., Vidrio-Gómez, S., Martínez-Pérez, L., Yáñez-Maldonado, L., Hernández-Muñoz, R., Macías-Silva, M., & de Sánchez, V. C. (2010). Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1690–1699. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.017>
- 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), 1–12. <https://doi.org/10.1177/1010428317691190>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *Journal of the American Medical Association*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang, Y., Jia, J., Wang, F., Fang, Y., Yang, Y., Zhou, Q., Yuan, W., Gu, X., Hu, J., & Yang, S. (2024). Pre-metastatic niche: formation, characteristics and therapeutic implication. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 236. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01937-7>
- Weber, K., & Kominsky, S. L. (2018). Concept and Surgical Treatment Metastatic Bone Disease. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch106>
- Wilson, C. N., & Mustafa, S. J. (2011). Adenosine Receptors in Health and Disease. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 193). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9>
- Xie, F., Ling, L., Van Dam, H., Zhou, F., & Zhang, L. (2018). TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 121–132. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx123>
- Yan, X., Liu, Z., & Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- β signaling by Smad7. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41(4), 263–272. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp018>
- Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, 31(6), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G. R., & Guise, T. A. (1998). TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 197–206. <https://doi.org/10.1172/JCI3523>
- Zardavas, D., Irrthum, A., Swanton, C., & Piccart, M. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(7), 381–394. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.73>
- Zhang, Y. E., & Stuelten, C. H. (2024). Alternative splicing in EMT and TGF- β signaling during cancer progression. *Seminars in Cancer Biology*, 101, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2024.04.001>