

Sellos Institucionales

Instituto de Fisiología

Coordinación de la Licenciatura
en Biomedicina

Coordinación de Titulación y Eficiencia
Terminal de la Facultad de Medicina, BUAP



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neuroendocrinología

**Participación de Adenosina en el desarrollo del potencial
metastásico de células de cáncer de mama triple negativo,
MDA-MB 231**

TESIS

Qué para obtener el título de:

Licenciatura en Biomedicina

Presenta:

Guadalupe Mendoza Castañeda

Director de tesis

D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán

Heroica Puebla de Zaragoza, Diciembre 2018



BUAP

Oficio No SIEP / C.I. / 110/2017
Asunto: Constancia de Registro

DR. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN
GUADALUPE MENDOZA CASTAÑEDA

PRESENTES:

El Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P., a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado hace **C O N S T A R** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva por:

- **GUADALUPE MENDOZA CASTAÑEDA**
- **DR. EDUARDO MONJARAZ GUZMÁN**

Titulado:

“PARTICIPACIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE DE HIPOXIA 1A EN EL DESARROLLO DEL POTENCIAL METASTÁSICO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231”

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de registro: 22 de noviembre de 2017.

Número de Libro: 2

Número de Hoja: 53

Número de Registro: 535

Vigencia: Inicio 21 de noviembre 2017 Termina 29 de junio de 2018

ATENTAMENTE

“PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR”
H. PUEBLA DE Z., A 22 DE NOVIEMBRE DE 2017.

M.C. JOSE LUIS GANDARA RAMIREZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



D.C. JORGE ALEJANDRO CEBADA RUIZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

c.c.p. archivo
c.c.p. minutario
DC 'CECR' seal

80 AÑOS
DE UNIVERSIDAD

Facultad de Medicina 13 Sur 2702, Col. Volcanes, Puebla, Pue. C.P. 72410
01 (222) 229 55 00
Ext. 6047 y 6048

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la supervisión del D. C. Eduardo Monjaraz Guzmán.

“Después de todo, ¿Qué es un científico entonces?

Es un hombre curioso, que mira a través del ojo de una cerradura,
la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede”

Jacques-Yves Cousteau

**Participación de Adenosina en el desarrollo del potencial
metastásico de células de cáncer de mama triple negativo,
MDA-MB 231**

CONTENIDO

Abreviaturas	10
Antecedentes	12
Antecedentes generales	12
Cáncer	12
Epidemiología del cáncer	13
Cáncer de Mama.....	15
Cáncer de mama triple negativo (CaMTN).....	17
Metástasis.....	17
Transición Epitelio Mesénquima.....	17
EMT-TF SNAIL.....	19
EMT-TF TWIST	20
EMT-TF ZEB.....	20
Antecedentes específicos.....	22
Hipoxia en Cáncer.....	22
Adenosina.....	24
Factor Inducible de Hipoxia.....	29
Justificación.....	33
Hipótesis.....	34
Objetivos	34
Objetivo general	34
Objetivos específicos.....	34
Material y métodos.....	35
Línea Celular MDA-MB 231	35
Cultivo de la línea celular.....	36
Ensayos de expresión génica.....	37
Extracción de Ácido Ribonucleico Total	37
Retrotranscripción (Síntesis de ADNc).....	38
Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR).....	39
Electroforesis.....	40
Densitometría	40
Western Blot.....	40
Ensayos de migración.....	41

Análisis de datos	43
Resultados	44
Conclusiones	51
Discusión.....	53
Material suplementario.....	57
Bibliografía	58

ABREVIATURAS

AC	Adenilato Ciclasa
ADA	Adenosina Desaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ado	Adenosina
ADP	Adenosin difosfato
AK	Cinasa de Adenosina
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
C	Citosina
CaM	Cáncer de Mama
CaMTN	Cáncer de Mama Triple Negativo
CREB	Elemento de Unión de Respuesta a AMPc
C-TAD	Dominio de Transactivación en el Extremo C Terminal
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EMT	Transición Epitelio- Mesénquima
EMT-TFs	Factores de Transcripción asociados a la Transición Epitelio-Mesenquima
ENT	Transportador Equilibrativo de Nucleósidos
ERK	Cinasa Regulada por Señales Extracelulares
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
Fsk	Forskolina
FT	Factor de Transcripción
G	Guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G

HLH	Motivo de unión Hélice-Vuelta-Hélice
HRE	Elemento de Respuesta a Hipoxia
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1
Ino	Inosina
IP3	Inositoltrifosfato
N	Asparagina
NFK-B	Factor Nuclear Kappa B
N-TAD	Dominio de Transactivación en el extremo N terminal
ODDD	Elemento de Degradación Dependiente de Oxígeno
P	Prolina
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteínacinasas C
PLC	Fosfolipasa C
pO₂	Presión parcial de oxígeno
SAH	S-Adenosil L- Homocisteína
T	Timina
TAD	Dominio de Transactivación
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

ANTECEDENTES

Antecedentes generales

El cuerpo humano está conformado por miles de millones de células que crecen y se dividen organizadamente. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren, y nuevas células toman su lugar, sin embargo, este proceso se ve alterado con el desarrollo del cáncer (NCI, 2015).

Cáncer

«Cáncer» es un término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo y se caracteriza por una multiplicación rápida de células anormales que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (OMS, 2017). Aunque el cáncer es una enfermedad de etiología heterogénea, se han descrito hasta la fecha 10 alteraciones esenciales que permiten el desarrollo tumoral (Figura 1) (Hanahan y Weinberg, 2011).

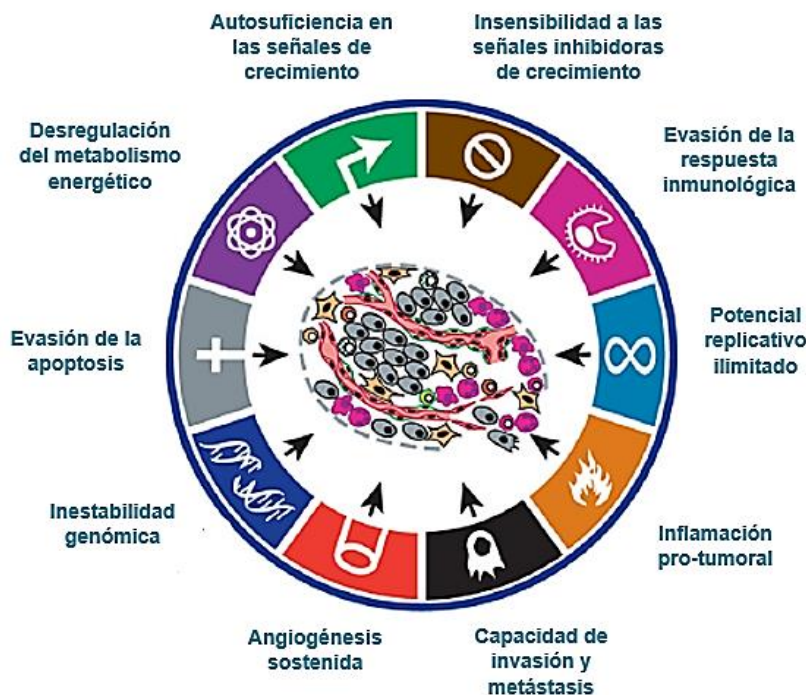


Figura 1 | Marcadores del cáncer. Diversas investigaciones sobre el cáncer han sugerido que estas características son comunes durante el desarrollo de prácticamente todos los tipos de tumores malignos, por lo que han sido designadas como “Marcadores del cáncer” (Tomada y modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).

Epidemiología del cáncer

El Cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2012, según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), se registraron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas (NCI, 2017): 4.7 millones en hombres (57%) y 3.5 millones en mujeres (43%) (Cancer Research UK, 2017). Entre la población femenina, el cáncer de mama es el más común y el de mayor tasa de mortalidad representando aproximadamente 3 de cada 20 muertes a causa de cáncer en mujeres a nivel internacional (Figura 2) siendo los países de bajos y medianos ingresos como África, Sudamérica y Centroamérica donde ocurre la mayoría de decesos (IARC,2014).

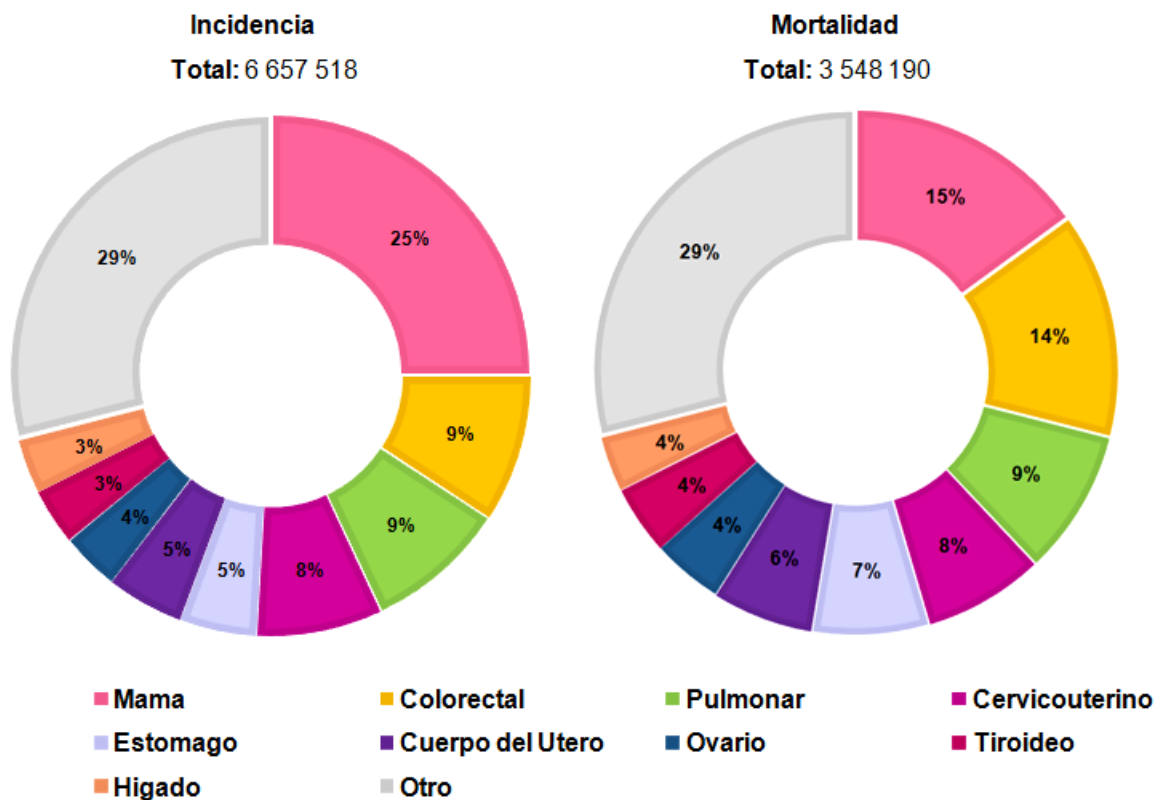


Figura 2 | Incidencia y mortalidad relacionada a cáncer en mujeres a nivel mundial. Los tipos de cáncer con mayor incidencia en la población femenina a nivel mundial son: 1) cáncer de mama (25.2%), 2) cáncer colorrectal (9.2%), 3) cáncer pulmonar (8.7%), 4) cáncer cervicouterino (7.9%) y 5) cáncer estomacal (4.8%); se observa que también son estos tipos de cáncer los de mayor mortalidad para este grupo poblacional: 1) cáncer de mama (15%), 2) cáncer pulmonar (14%), 3) cáncer colorrectal (9%), 4) cáncer cervicouterino (7.5%) y 5) cáncer estomacal (7.2%). (Tomada y modificada de IARC 2017).

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (IUCC), el cáncer es un padecimiento de alta incidencia que se ubica como la tercera causa de muerte solo después de la diabetes y las enfermedades hipertensivas; en 2014, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía reportó que, de cada 10 casos de cáncer en mujeres de 20 años y más, 3 fueron carcinomas mamarios, ocupando el primer lugar de tumores malignos para este grupo poblacional (Figura 3) siendo Chihuahua, Nuevo León y México los estados con mayor número de fallecimientos (Figura 4) (INEGI, 2017). Se estima que la incidencia y la mortalidad por cáncer de mama seguirán aumentando de manera importante en los próximos años debido al envejecimiento poblacional, cambios en los patrones reproductivos, una mayor prevalencia de los factores de riesgo y un déficit en el diagnóstico temprano (NOM-041-SSA2-2011).

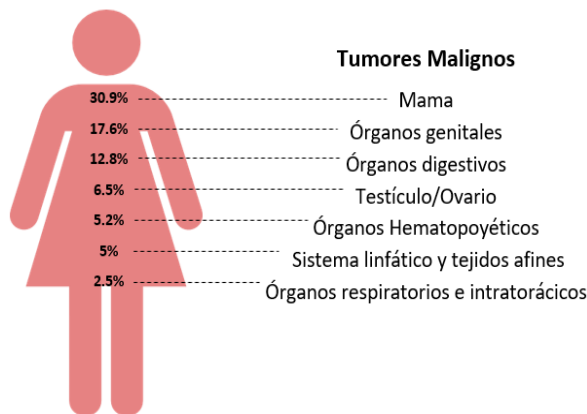
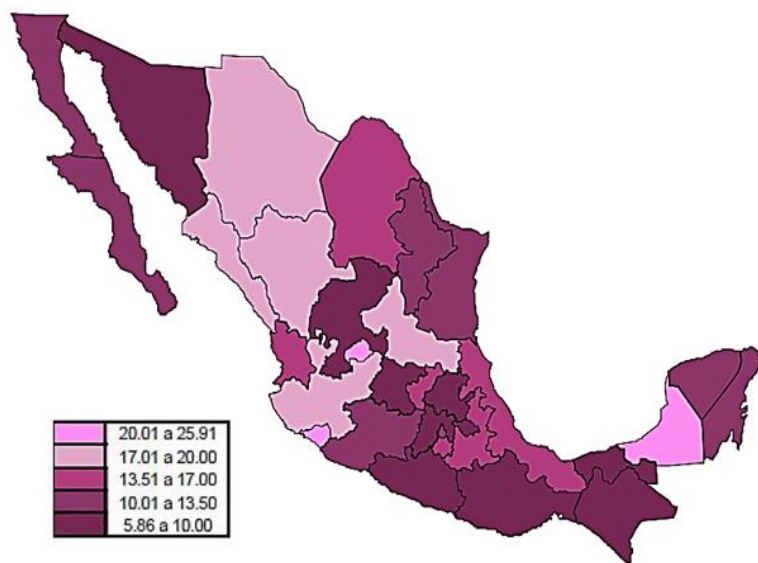


Figura 3 | Porcentaje de morbilidad hospitalaria por principales tumores malignos de la población femenina de 20 años y más en México. El cáncer de mama ocupa el primer lugar de incidencia para este grupo poblacional (30.9%), seguido por cáncer en órganos genitales (17.6%) y órganos digestivos (12.8%) (Tomada y modificada de INEGI, 2017)

Figura 4 | Tasa de mortalidad a causa de cáncer de mama por cada 100 000 mujeres de 20 años y más por entidad federativa en 2014. Los estados de Chihuahua, Nuevo León y México tuvieron más de 20 fallecimientos a causa de esta enfermedad por cada 100 000 mujeres de 20 años y más (25.91, 22.40 y 21.41, respectivamente), se observa que las tasas más altas de mortalidad se concentran en el norte del país. La entidad con la tasa más baja (5.86 muertes por cada 100 000 mujeres del mismo grupo de edad) es Campeche, le sigue Oaxaca y Quintana Roo, con menos de 10 muertes por cada 100 000 (Tomada de INEGI, 2016).



Cáncer de Mama

El cáncer de mama (CaM) es un tipo de cáncer que se desarrolla en cualquier parte del tejido mamario cuando las células de la mama comienzan a crecer en forma descontrolada (American Cancer Society, 2017). Factores endógenos y exógenos tales como género, edad (NBOCC, 2009; American Cancer Society, 2017), etnia (Breast Cancer, 2017), factores genéticos y reproductivos (McPherson et al., 2000; OPS, 2017), consumo de alcohol (Seitz et al., 2012; Liu et al., 2015), obesidad, terapia de reemplazo hormonal (OPS, 2017) e historial previo de enfermedad benigna mamaria (Bilimoria and Morrow, 1995) han sido identificados como factores de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer (Tabla 1).

Genero	Ser mujer es el principal factor de riesgo para desarrollar CaM. Aunque este cáncer no es exclusivo del sexo femenino, esta patología es 100 veces más común en mujeres que hombres (American Cancer Society, 2017).
Edad	El CaM puede ocurrir en etapas tempranas de la vida (NBOCC, 2009) pero la mayor cantidad de casos de cáncer invasivo corresponden a mujeres de 55 años o más. (American Cancer Society, 2017).
Raza/Etnia	Las mujeres blancas son más propensas que las mujeres afroamericanas, hispanas y asiáticas para padecer este tipo de cáncer, sin embargo, en este grupo poblacional es más agresivo y se encuentra relacionado a un mayor índice de mortalidad (Breast Cancer, 2017).
Factores Genéticos	Del 5 al 10% de todos los casos de CaM son atribuidos a factores genéticos siendo las mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2, PTEN y TP53 las más comunes (OPS, 2017). La mayoría de los casos de esta etiología ocurre antes de los 65 años (McPherson et al., 2000).
Factores reproductivos	Niveles elevados o una prolongada exposición a estrógenos se ha asociado como un factor de riesgo. Mujeres que comienzan a menstruar a temprana edad, con menopausia tardía o nuligestas tienen una mayor probabilidad de desarrollar esta enfermedad (OPS, 2017).
Terapia de reemplazo hormonal	La Terapia de Reemplazo Hormonal ha sido asociada como un factor de riesgo (OPS, 2017).
Consumo de alcohol	Comparado con otros órganos, la glándula mamaria es más susceptible al efecto carcinogénico del alcohol. Se ha reportado que el riesgo de sufrir CaM aumenta significativamente en 4-15% debido a la ingesta de alcohol ($\leq 12.5g$ / día) (Seitz et al., 2012; Liu et al., 2015).

Tabla 1 | Factores de riesgo para el desarrollo de CaM.

El CaM puede originarse en cualquier parte de la estructura mamaria, generándose principalmente en las células que conforman los ductos (Carcinoma ductal) o los lóbulos (Carcinoma Lobular) (Figura 5) (Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

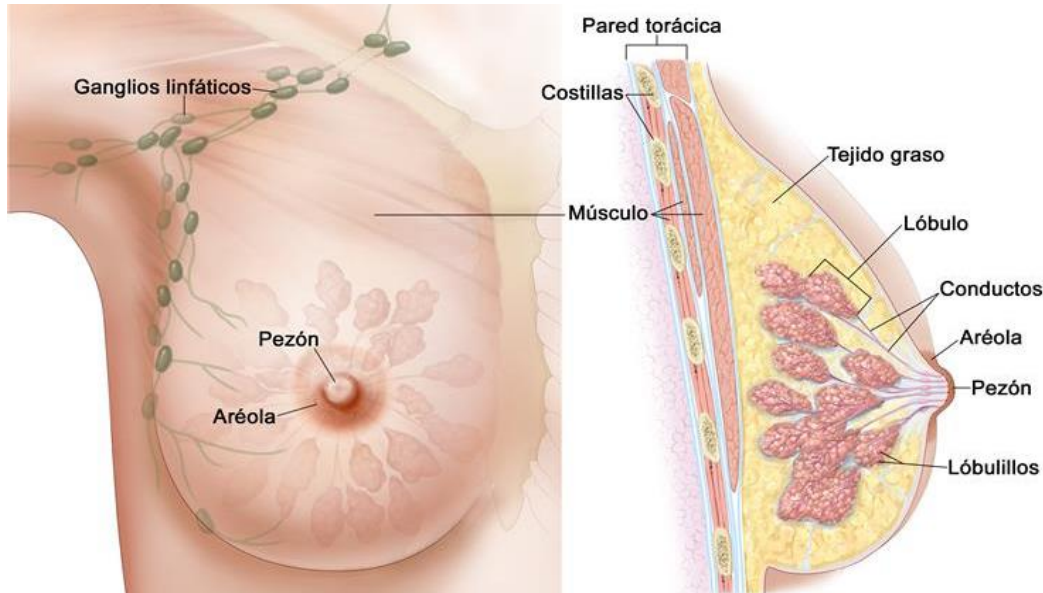


Figura 5 | Anatomía general de la mama femenina. Se muestra el pezón y la areola en la parte externa, así como un corte transversal donde se aprecia la estructura mamaria interna. La mama está constituida por 12-20 secciones altamente organizadas llamadas lóbulos, cada lóbulo conformado por numerosos lobulillos interconectados mediante ductos lactíferos (National Breast Cancer Foundation, 2016). CaM puede originarse en cualquier parte de la estructura mamaria, generándose principalmente en las células que conforman los ductos (Carcinoma ductal) o los lóbulos (Carcinoma Lobular); también pueden ocurrir otros tipos de cáncer de seno menos comunes como Tumores Filoides, Angiosarcomas o la enfermedad de Paget, teniendo su origen en el estroma mamario, las células que revisten los vasos (sanguíneos o linfáticos) y en el pezón o su alrededor respectivamente (Instituto Nacional del Cáncer, 2017). (Tomada de American Cancer Society, 2016).

Debido a la importancia para el pronóstico y la capacidad de respuesta a la terapia, el CaM se puede clasificar acorde a la presencia de 3 marcadores moleculares: Receptor de Estrógenos α (RE α), Receptor de Progesterona (RP) y el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER-2/Neu) (Moultet et al., 2016; Custódio-Santos T et al., 2017); agrupando así a los tumores mamarios como: tumores responsivos a hormonas (RE α + y/o RP+), tumores con sobre-expresión del receptor HER2 y tumores que no expresan RE α , RP y HER2. Este último grupo, debido a la ausencia de los 3 marcadores moleculares, es referido como Cáncer de Mama Triple Negativo (Chávez et al., 2010).

Cáncer de mama triple negativo (CaMTN)

El CaMTN es un subtipo de carcinoma mamario cuyo crecimiento no es estimulado por la presencia de Estrógenos, Progesterona y el Factor de Crecimiento Epidérmico Humano, por lo que es insensible a hormonoterapia y al uso de terapia dirigida para los receptores HER2, siendo la quimioterapia el tratamiento estándar para este tipo de neoplasia. Representa aproximadamente 15-20% de todos los casos de cáncer mamario y es el de peor pronóstico comparado con otros subtipos de CaM ya que es el de crecimiento más rápido, con mayor resistencia a quimioterapia, tasa más alta de recurrencia a órganos viscerales y tejidos blandos, así como incidencia de metástasis (Liedtke et al., 2008; Anders and Carey, 2009).

Metástasis

La Metástasis, la principal causa de muerte en pacientes con cáncer (Van 't Veer, 2005), se define como un proceso complejo en el que células cancerosas se separan de un tumor primario y diseminan a otras partes del cuerpo formando nuevos tumores (tumores metastásicos) (Figura 6); pese a la capacidad de generar metástasis a cualquier parte del cuerpo, cada tipo de cáncer tienen un patrón característico de diseminación a ciertos órganos (Lecanda et al., 2016). En el caso de carcinoma mamario, las células tienden a metastatizar principalmente a huesos, cerebro, pulmón e hígado (NCI, 2018). Para que las células cancerosas puedan realizar metástasis estas deben someterse a un fenómeno temporal y reversible conocido como transición Eitelio- Mesénquima.

Transición Eitelio Mesénquima

La Transición Eitelio-Mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) es un proceso complejo mediante el cual células epiteliales pierden su morfología apical-basal, los contactos célula/célula y célula/sutrato, adquiriendo un fenotipo mesénquimal que las capacita para migrar e invadir (Figura 7) (Thiery et al., 2006; Thiery JP, 2009).

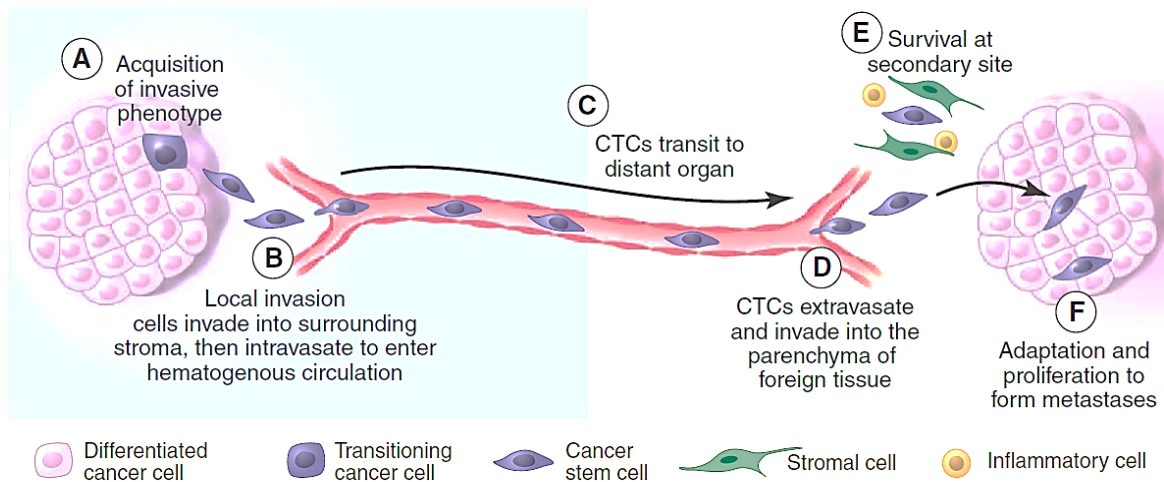


Figura 6 | Metástasis. La metástasis es un proceso complejo que comprende varias etapas: Adquisición de un fenotipo invasivo (A), Invasión local e intravasación (las células malignas degradan la lámina basal y tejido circundante y se dirigen hacia los vasos sanguíneos para ingresar al torrente sanguíneo o a vasos linfáticos) (B), Diseminación Hemática o linfática de las células tumorales circulantes (CTCs, por sus siglas en inglés (C), Extravasación e invasión del microambiente del tejido receptor (D), Supervivencia en el nuevo tejido (E) y Adaptación y proliferación para la formación de micro y macro metástasis (F) (Tomada de Chaffer and Weinberg, 2011).

La EMT, además estar implicada en procesos como el desarrollo (EMT tipo 1) y regeneración tisular (EMT tipo 2), participa en procesos patológicos como la progresión tumoral (EMT tipo 3) (Kalluri and Weinberg, 2009) donde, además de tener un rol importante en la cascada metastásica, se le ha adjudicado la capacidad de conferir características de célula madre tumoral (Morel et al., 2008) así como de quimio-resistencia en diferentes tipos de cáncer tales como glioblastoma, de páncreas, urotelial y de mama (Meifhof et al., 2015; Siebzehnrubl et al., 2013; Zheng et al., 2015). Para el CaM, diversos estudios han demostrado que el proceso de EMT es acompañado por un aumento en la resistencia a paclitaxel/ docetaxel y 5- fluorouracilo (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2012). La EMT es coordinada por la activación de un conjunto de Factores de Transcripción Asociados a la Transición Epitelio Mesénquima (por sus siglas en Ingles, EMT-TFs) (Wu et al., 2016), los cuales reprimen directa o indirectamente genes relacionados al fenotipo epitelial (Fischer et al., 2015) mientras que inducen la expresión de los genes asociados al fenotipo mesénquimal (De Craene and Berx, 2013). Entre los EMT-TFs más importantes se encuentran: Snail 1, Snail2, Twist y Zeb-1 (Singh et al., 2017).

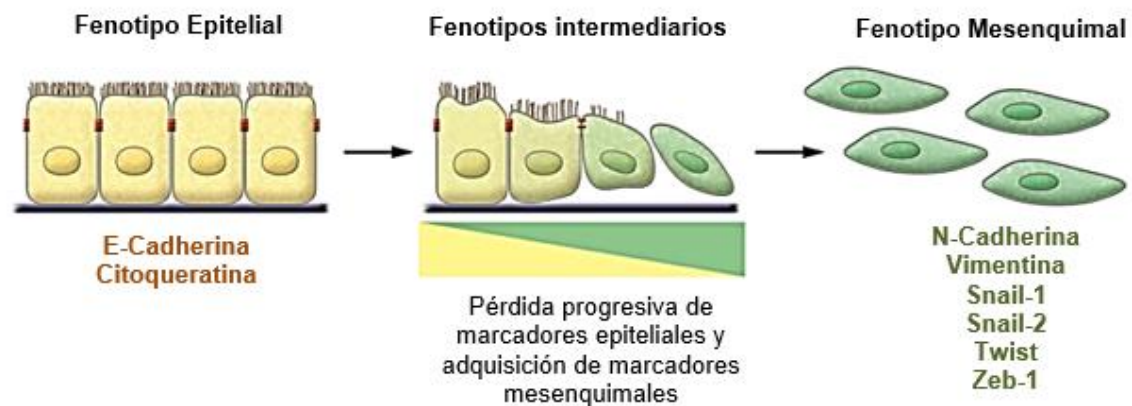


Figura 7 | Esquema de EMT. El proceso de EMT involucra la transición de célula epitelial polarizada a una célula mesenquimal móvil. Se enlistan algunos de los marcadores celulares mesenquimales y epiteliales más ampliamente descritos. Un marcador de la EMT es la pérdida de la expresión de E-cadherina, un componente central de la adhesión célula-célula que es requerido para la homeostasis del tejido epitelial. La pérdida de E-cadherina incrementa la capacidad invasiva in vitro y contribuye a la transición de Adenoma a Carcinoma en modelos animales (Tomada y modificada de Thyery, 2002).

EMT-TF SNAIL

Las proteínas Snail son represores transcripcionales conformados por una región carboxilo terminal con 4-6 dedos de zinc, una región central rica en residuos de serina y prolina y una región amino-terminal que contiene un elemento SNAG importante para su capacidad represora (Figura 8) (Peinado et al., 2007). De las 3 proteínas Snail identificadas en vertebrados (Snail 1, Snail 2 y Snail 3), Snail 1 y Snail 2 juegan un papel importante en la regulación de la EMT en el proceso de carcinogénesis, ya que mediante la unión a elementos E (C/A-CAGGTG) y el posterior reclutamiento del Complejo Represor Polcomb 2 (Singh et al., 2017; Lamouille et al., 2014), regulan la hipermetilación y desacetilación de histonas, disminuyendo de forma directa la transcripción de genes epiteliales (E-Cadherina, ocludina 3/4/7 y el Factor de Transcripción 2) y aumentando indirectamente la de genes mesenquimales (N-Cadherina, Zeb1 y Metaloproteinasas de matriz 2 y 9) (Bolos, et al., 2003; Cano, et al., 2000; Lamouille, et al., 2014). La actividad de las proteínas Snail es regulada mediante el control de su localización intracelular.

Entre los estímulos descritos que regulan a estos factores de transcripción (FT) se encuentran: la vía de señalización canónica y no canónica del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β por sus siglas en inglés), la vía de Cinasas Regulada por

Señales Extracelulares (ERK, por sus siglas en inglés) desencadenada por el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) así como las vías de NF- κ B (Factor Nuclear kappa B) y Notch. La expresión de Snail 1, el cual participa principalmente en el desarrollo de la EMT en etapas tempranas (Tran et al., 2011), se ha correlacionado positivamente con la metástasis, recurrencia y un peor pronóstico de supervivencia en pacientes con CaM (Moody et al., 2005; Come et al., 2006; Blanco et al., 2002).

EMT-TF TWIST

Twist 1 y Twist 2 pertenecen a la familia de FTs con motivos de unión bHLH (Figura 8) que interactúan con elementos consenso E (CANNTG) (Peinado et al., 2007); entre los genes regulados por estos FTs se incluye el receptor del factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas- α , Akt2 y Snail 2. Twist 1 puede actuar independientemente de Snail para reprimir la expresión de E-Cadherina y aumentar la N-cadherina y fibronectina; sin embargo, la represión de E-cadherina la realiza de manera indirecta, es decir, sin unirse a su región promotora (Yang y Weinberg, 2008). Se ha asociado la expresión de Twist en carcinoma mamario con metástasis a nodos linfáticos, elevado grado tumoral, represión de la expresión del ER por el reclutamiento de metiltransferasas y la interacción de histona desacetilasas, adquisición de un fenotipo CD44⁺/CD24⁻, aumento en la actividad de la enzima Aldehído deshidrogenasa 1 (Chou y Yang, 2015) y evasión de senescencia y apoptosis inducida por anoikis (Puisieux et al., 2006). Similar a los TFs Snail, diversas vías de señalización colaboran para activar al FT Twist (Lamouille et al., 2014).

EMT-TF ZEB

La familia de los FT Zeb está conformada por dos proteínas: ZEB 1, también conocido como EF1, y ZEB 2 o SIP1. Estas proteínas, con alto nivel homología, son caracterizadas por presentar 2 cluster dedos de Zinc (ZFCs, por sus siglas en inglés) separados por un homeodominio (Gheldof et al., 2012): un cluster de 4 dedos de zinc en el extremo N-terminal y otro cluster de 3 dedos de Zinc en el extremo C-terminal (Figura 8) (Comijin et al., 2001). Los FTs ZEB interactúan con el ADN a través de la unión simultánea de los dos ZFCs con secuencias E bipartitas (CACCT y CACCTG), siendo capaces de inducir de forma directa la represión de la expresión de E-Cadherina

y la expresión de vimentina, fibronectina, N-Cadherina y metaloproteinasas, facilitando la migración e invasión celular y, eventualmente, la metástasis a órganos distantes. La expresión de las proteínas ZEB es activada por diversas señales como hormonas de crecimiento, Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Crecimiento Insulínico 1 (IGF-1) y el receptor del Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas, así como las vías de señalización NF-κB, JAK/STAT3, TGFβ/Smad, Wnt, y Notch (Garg, 2013). La sobre expresión de las proteínas ZEB se ha correlacionado con un aumento en la agresividad y la capacidad metastásica en diversos tipos de carcinomas como el de ovario, endometrio, pulmón, próstata, colon, vesícula biliar, páncreas, vejiga y mama (Sánchez, 2011).

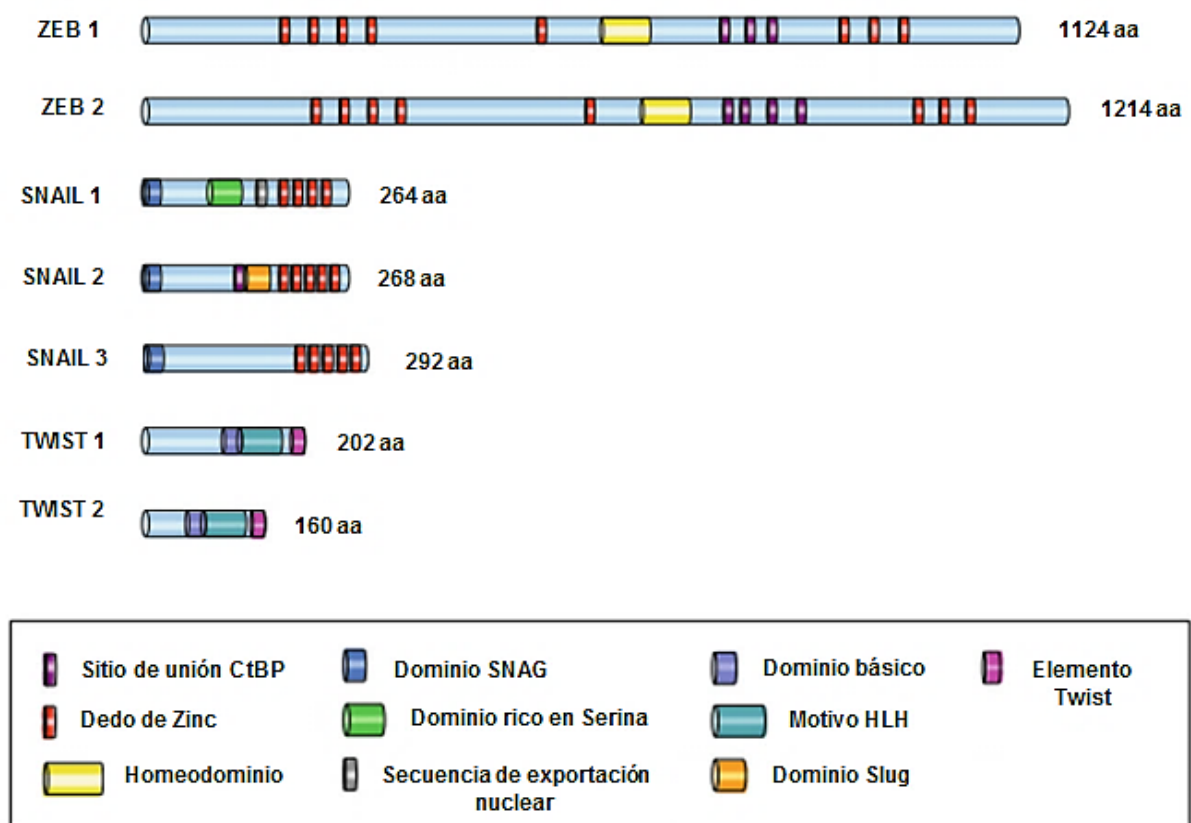


Figura 8 | Esquema estructural de los EMT-TFs: ZEB 1 humano (Secuencia de referencia del GenBankAAA20602.1). ZEB 2 humano (AA127103), SNAIL 1 humano (NP_005976.2), Snail 2 Humano (NP_003059.1), SNAIL 3 humano (NP_840101), Twist 1 humano (NP_000465.1) y Twist 2 (NP_476527.1) (Tomado de Sánchez et al., 2012).

Antecedentes específicos

Hipoxia en Cáncer

Debido a la proliferación rápida y descontrolada de las células de cáncer, un tumor en desarrollo genera una demanda creciente de oxígeno conforme este se expande (Eales et al., 2016). Se sabe que los vasos sanguíneos existentes en un tumor sólido son estructural y funcionalmente anormales e ineficientes comparados con la vascularización de tejidos normales, resultando en áreas isquémicas con pobre perfusión de oxígeno. Cualquier región de un tumor sólido en el cual la demanda de oxígeno supere su suministro dará como resultado un área con hipoxia (Semenza, 2010). La hipoxia es una condición que se presenta cuando la presión parcial de oxígeno en un tejido se encuentra por debajo de los niveles fisiológicos (Span and Bussink, 2015). Investigaciones realizadas en las últimas dos décadas han demostrado la prevalencia de áreas con hipoxia dentro de tumores sólidos como en el caso de cáncer cervicouterino, vulva, próstata, recto, páncreas, pulmón, cerebro, piel y mama (Vaupel and Mayer, 2007), detectándose regiones con una presión parcial de Oxígeno ($pO_2 \leq 10$ mm Hg (Figura 9) (Vaupel et al, 2001).

En el CaM, la hipoxia se ha identificado como un indicador adverso para el pronóstico del paciente (Gilkes, 2016) ya que se ha asociado con un riesgo significativamente mayor de sufrir metástasis (Hong et al., 2016) y con el fracaso de terapias como cirugía (Brizel et al., 1996), quimioterapia (Hammond y Giaccia, 2006), radioterapia e inmunoterapia (Brown y Wilson, 2004).

Entre las diversas alteraciones producidas por la hipoxia intratumoral junto con la isquemia, se encuentra un aumento en la concentración de adenosina (Ado), siendo que *in vitro* sea observado que, en condiciones de hipoxia, existe un aumento en la expresión de ectonucleotidasas CD39 y CD73, una actividad reducida de la cinasa de adenosina (AK) (Decking et al., 1996) y adenosina desaminasa (ADA) y una disminución en la capacidad de los transportadores ENT. En CaM, la ausencia del receptor a estrógenos se ha correlacionado con una alta expresión de CD73, (Spychala et al., 2004), un factor adicional que contribuye al incremento de Ado en el microambiente tumoral en este tipo de cáncer.

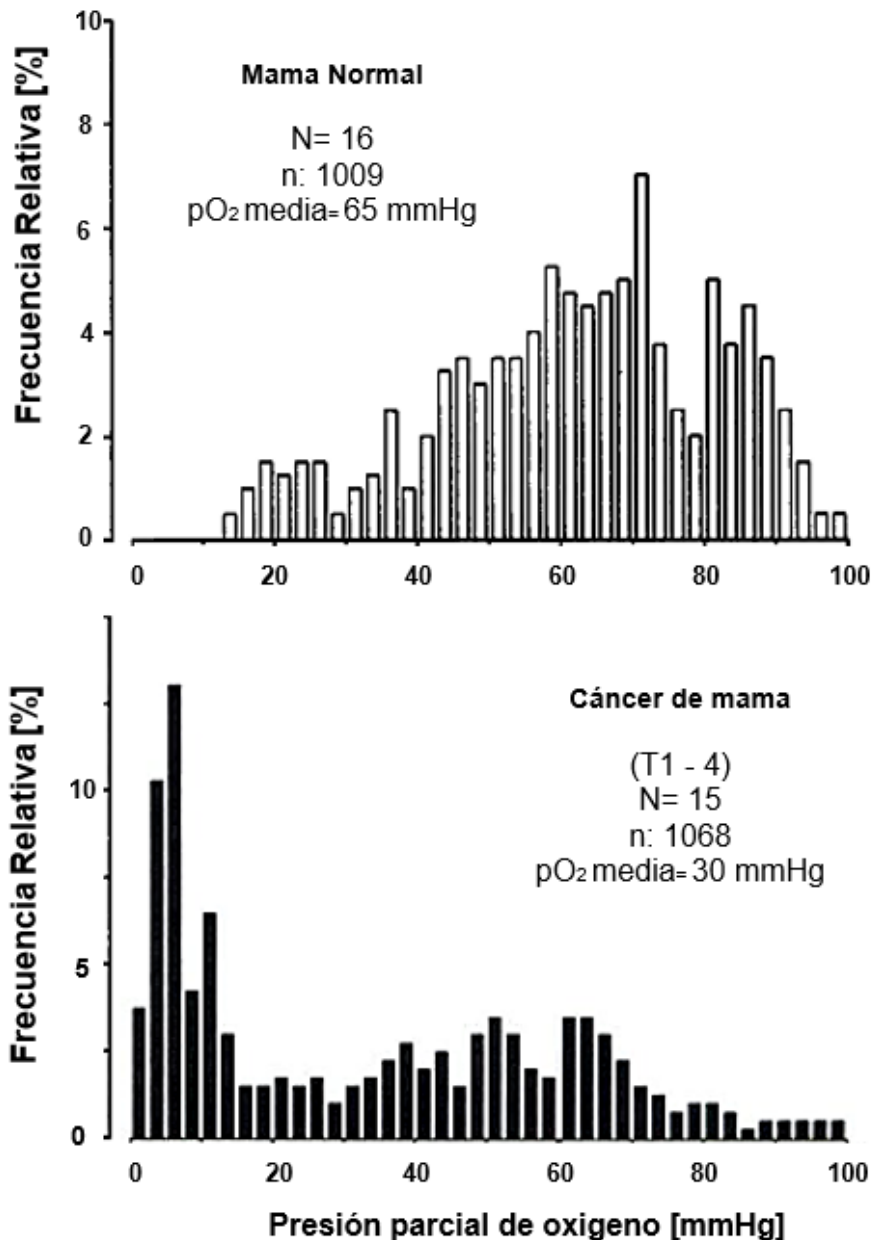


Figura 9 | Distribución de las frecuencias de la pO₂ medida en tejido mamario normal (arriba) y tejido proveniente de carcinoma mamario de estadios T1-T4 (abajo). Vaupel y colaboradores reportaron que la pO₂ promedio del tejido mamario sano es de 65mm Hg mientras que en caso de carcinoma mamario el valor promedio de pO₂ es de 28 mm Hg, presentándose regiones intratumorales con una pO₂ entre 0 y 2.5 mm Hg. N, número de pacientes; n, numero de mediciones de pO₂. (Tomada y modificada de Vaupel et al, 1991).

La concentración de Ado intersticial medida usando la técnica de microdialisis se encuentra entre 0.5-2 μ M en condiciones basales y de 10 a 15 μ M bajo condiciones isquémicas en el ventrículo izquierdo de perro (Van Wylen et al., 1990) mientras que incrementa de 2 a 40 μ M en el estriado de rata después de 15 minutos de isquemia (Hagberg et al., 1987). En caso de tumores sólidos en modelos murinos la concentración

de Ado incrementa de 0.2 a 2.4 μM , la cual es de 10 a 20 veces más alta comparada con la concentración de tejido sano adyacente (Blay et al., 1997). La Ado, presente en altas concentraciones en el microambiente tumoral, puede causar la inhibición o la estimulación del crecimiento del tumor dependiendo del tipo de cáncer (Allard et al., 2016; Muller- Haegele et al., 2014).

Adenosina

Ado es un nucleósido de purina conformado por la unión de una base nitrogenada, Adenina, con un anillo de ribosa por medio de un enlace β -glucosídico, que se encuentra implicada en diversos procesos biológicos como el metabolismo energético, biosíntesis de nucleótidos (Eltzsching HK, 2009) así como en modulación de la frecuencia cardíaca y de presión arterial (Layland et al., 2014). La Ado, presente tanto en el espacio intra y extracelular, es producida dentro de la célula ya sea por la síntesis de novo o por la hidrólisis de Adenosín Monofosfato (AMP) y de S-adenosil L-homocisteína (SAH); la Ado intracelular puede ser fosforilada nuevamente para formar AMP por acción de AK, metabolizada para formar Inosina (Ino) por medio de la enzima Adenosina Desaminasa o transportada al exterior de la célula (Bahreyni et al., 2018; Fredholm et al., 2007) (Figura 10). La Ado extracelular se origina de la hidrólisis de las moléculas precursoras ATP, ADP y AMP que pueden liberarse del espacio intracelular durante la lisis, necrosis, apoptosis, exocitosis o a través de proteínas membranales: transportadores o hemicanales (Lazarowski, 2012). Durante la hipoxia o procesos inflamatorios las células endoteliales pueden liberar ATP de manera activa (Burnstock, 2002), se ha demostrado que las plaquetas activadas liberan el ADP almacenado en vesículas vía liberación granular, generando una fuente adicional de nucleótidos extracelulares susceptibles a ser metabolizados (Weissmuller et al., 2008). Las ectonucleotidasas CD39 y CD73 son enzimas que, respectivamente, se encargan de hidrolizar ATP y ADP a AMP y el AMP a Ado (Fredholm et al., 2007).

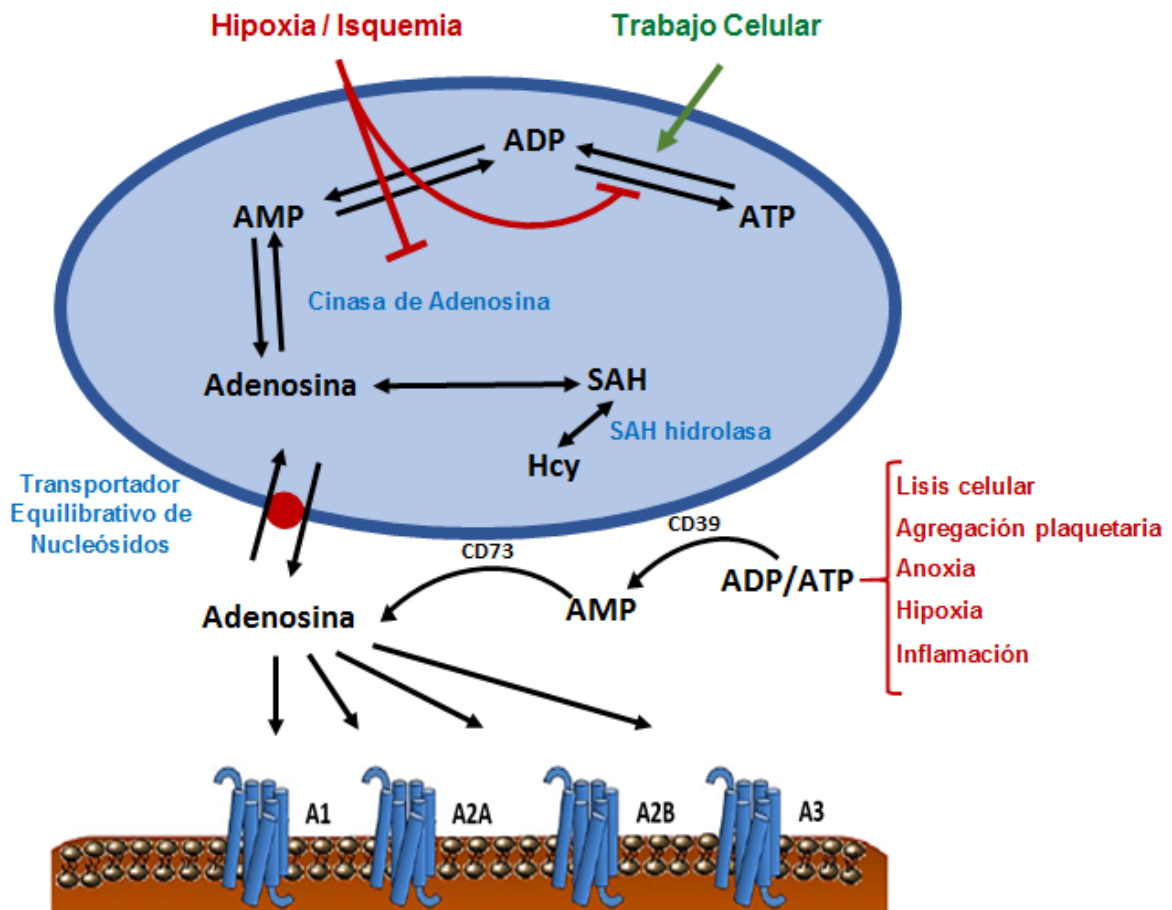


Figura 10 | Esquema ilustrativo de algunas vías importantes en la regulación de la concentración de adenosina extracelular (Tomada y modificada de Fredholm et al., 2014).

Receptores a Adenosina

Hasta la fecha se ha descrito que Ado es capaz de unirse a 4 receptores pertenecientes a la familia P1 de receptores purinérgicos ubicuamente expresados que pertenecen a la superfamilia GPCR (Receptores acoplados a proteínas G): A1, A2A, A2B y A3, la activación de estos receptores induce vías de señalización específicas (Figura 11) (Fredholm et al., 2011). El receptor A1 se encuentra acoplado a las proteínas Gi/Go, provocando la disminución de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y el aumento en los niveles de Diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP3). Los receptores A2A y A2B, por medio de la activación de Gs, incrementan los niveles intracelulares de AMPc permitiendo la activación de la enzima PKA y la fosforilación de CREB (Kull et al., 2000); A2B, también activa a Gq, estimulando la actividad de fosfolipasa C (PLC), generando un incremento en los niveles de IP3 y DAG. El receptor A3, a través de la

interacción con Gi y Gq inhibe a adenilato ciclasa (AC) y estimula PLC (Fredholm et al., 2001a). Ejemplos de respuestas fisiológicas típicas asociadas a la activación individual de los ARs son: bradicardia mediada por Ado vía activación de A1R, vasodilatación o inhibición de la agregación plaquetaria por la activación de A2A, pre condicionamiento isquémico de diferentes órganos por la activación de A2B y la de granulación de mastocitos dependiente del receptor A3 (Eltzsching HK, 2009).

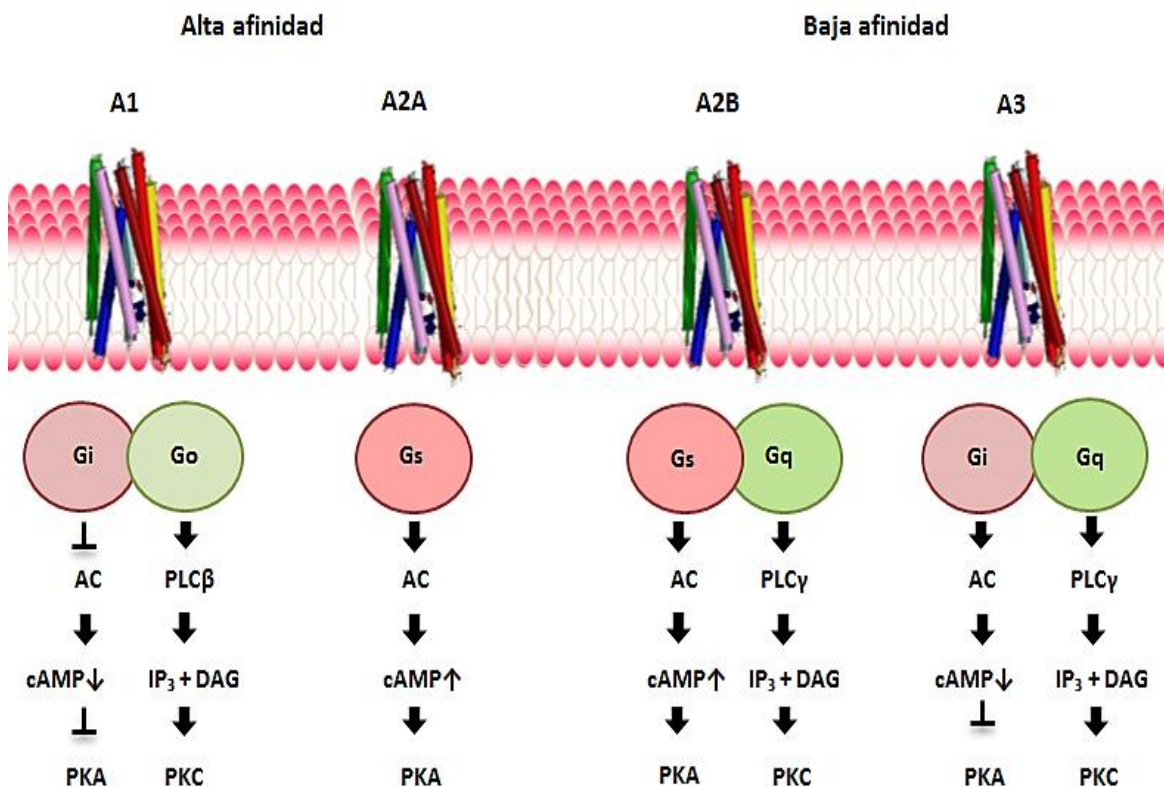


Figura 11 | Vías de señalización mediadas por Ado en una célula diana. La unión de Ado a sus 4 receptores modifica la actividad de Adenilato ciclasa (AC) aumentando los niveles de cAMP (A2A y A2B) o disminuyéndolos (A1 y A3). Los cambios en los niveles de cAMP resultan en la activación o en la inhibición de diversas funciones celulares. Dos receptores también se encuentran acoplados a proteínas Gq (A2B y A3), por lo que también activan la vía de PLC (Tomada y modificada de Cronstein and Sitkovsky, 2018).

Fredholm y colaboradores en 2001, reportaron que Ado es equipotente para 3 tipos de receptores a Ado; mientras que A1, A2A y A3 tienen valores de EC₅₀ entre 10nM y 1μM (Hasko et al., 2008), la activación del receptor A2B requiere concentraciones de Ado que exceden 10 μM (EC₅₀ de 23.5μM) (Tabla 2) (Fredholm et al., 2001b). Dado que en condiciones fisiológicas las concentraciones de Ado permanecen por debajo de 1 μM (30- 200nM en condiciones basales) (Fredholm et al., 2014), la activación de A1,

A2A o A3 puede ocurrir (Hasko et al., 2008), en contraste, el receptor A2B, debido a las altas concentraciones de Ado que requiere para ser activado, solo puede ser funcional bajo alteraciones patológicas como la hipoxia, inflamación o isquemia (Fredholm et al., 2001b), condiciones características del microambiente tumoral.

Receptor				
	A1	A2A	A2B	A3
EC ₅₀ (μM)				
Adenosina	0.31 (0.18-0.53)	0.73 (.056-0.95)	23.5 (16.2-64.1)	0.29 (0.18-0.53)

Tabla 2 | Valores de EC₅₀ de los receptores para Ado (Tomado de Fredholm et al., 2001b).

Adenosina y el desarrollo del cáncer

Uno de los principales efectos de Ado en el desarrollo del cáncer es su papel como inmunosupresor de la respuesta antitumoral, inhibiendo la activación de linfocitos T, la adhesión de células T activadas a células tumorales y la degranulación de células natural killer. Se ha demostrado que la activación del receptor A1 induce quimiotaxis de células tumorales en melanoma (Woodhouse et al., 1998), sin embargo, agonistas del mismo tipo de receptor a Ado, inhibe el desarrollo tumoral en leucemias y glioblastomas (D'Ancona et al., 1993; Synowitz et al., 2006). Los receptores A2, a través de la expresión de factores angiogénicos como VEGF y bFGF, son capaces de inducir el crecimiento de cáncer de próstata, colon y pulmón (Lutty and McLeod, 2003; Sexl et al., 1997). Estudios *in vitro* han demostrado un efecto opuesto del receptor A2B en el desarrollo tumoral: el uso de agonistas no específicos (NECA) para los receptores a Ado induce apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 en líneas celulares de cáncer de ovario con alta expresión del receptor A2B (Hajiahmadi et al., 2015), mientras que la activación de este mismo receptor promueve la proliferación de células provenientes de cáncer de próstata y glioblastoma (Wei et al., 2013; Lui et al., 2014). Se ha reportado que la activación de A3 inhibe el crecimiento de tumores de colon, próstata y melanoma.

Con respecto al CaM (Figura 12), Desment y colaboradores, demostraron que la supresión del receptor A2B inhibe la migración, invasión y crecimiento en células de CaMTN incluyendo a la línea celular MDA-MB 231 y LM2 (Desment et al., 2013); así mismo, la alta expresión de CD73 se ha correlacionado con un peor pronóstico en pacientes con este subtipo de cáncer (Spsychala et al., 2004).

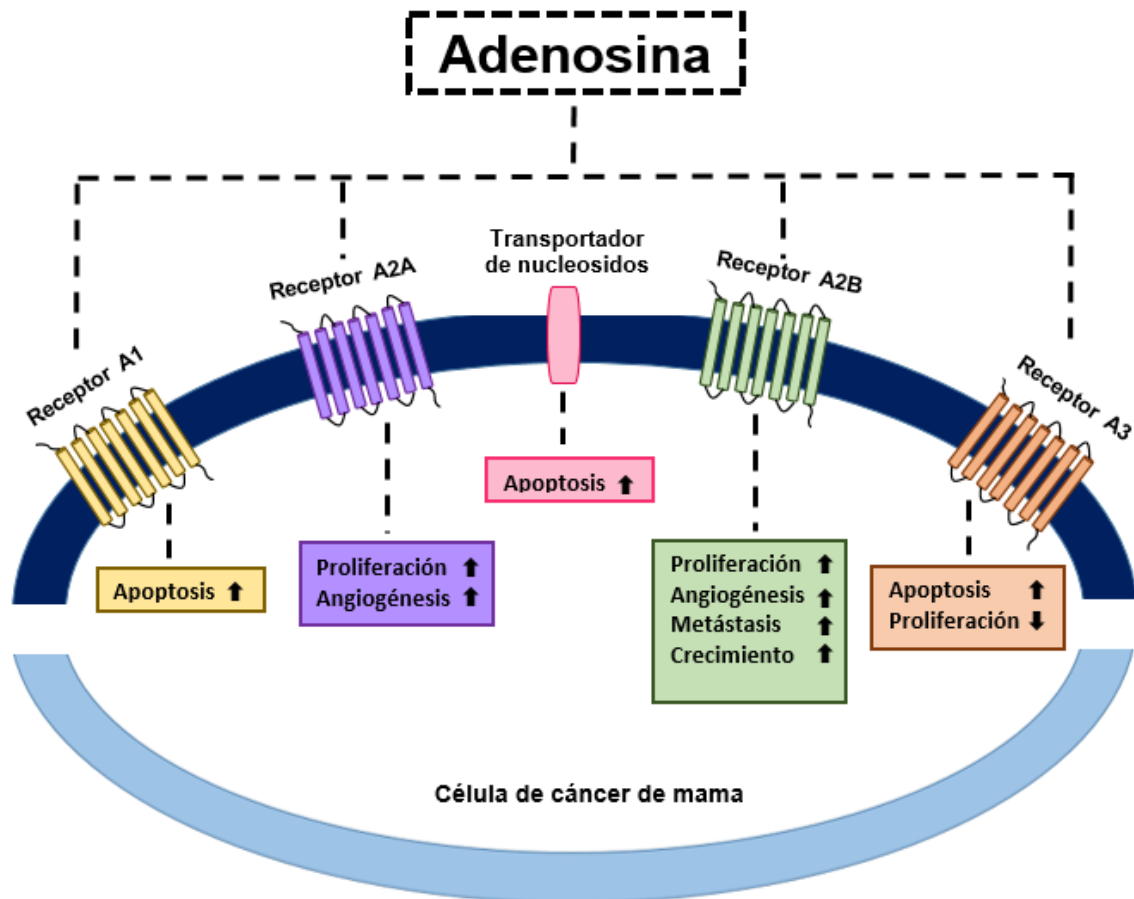


Figura 12 | Efectos de la activación de los receptores a Ado en CaM. Ado a través de la activación de sus diferentes receptores regula la proliferación, apoptosis y metástasis en células de CaM (Tomada y modificada de Bahreyni et al., 2018).

Factor Inducible de Hipoxia

La principal vía para la adaptación a un microambiente con hipoxia es la estabilización de los Factores de Transcripción Inducibles de Hipoxia. Los Factores Inducibles de Hipoxia (HIF) son proteínas heterodiméricas pertenecientes a la familia de proteínas con dominios PAS- bHLH. Están conformadas por una subunidad α sensible a oxígeno y una subunidad β expresada de forma constitutiva, juntas, la subunidad α y la β regulan la transcripción de cientos de genes en respuesta a la disponibilidad de oxígeno (Semenza, 2000). Existen 3 isoformas de la subunidad α : HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , y solo una subunidad β , HIF-1 β . En comparación con HIF-1 α y HIF-2 α , se dispone de poca información sobre la función biológica y la localización de HIF-3 α . Sobre HIF-2 α , se sabe que es una proteína de expresión restringida a riñones, cerebro, corazón, pulmón, páncreas, hígado e intestino delgado, mientras que la subunidad HIF-1 α es de expresión ubicua (Chiavarina et al., 2012). La subunidad HIF-1 α contiene dos dominios de Transactivación (TAD), uno en el extremo amino terminal (N-TAD) y otro en el extremo carboxilo terminal (C-TAD) (Masound and Li, 2015). C-TAD modula la actividad transcripcional de HIF-1 α en condiciones de hipoxia ya que interactúa con coactivadores como CBP/p300; N-TAD es responsable de estabilizar a HIF-1 α ya que, en superposición con este dominio, se encuentra al Dominio de Degradación Dependiente de Oxígeno (ODDD) (Figura 13) (Bruick RK and McKnight SL, 2001).

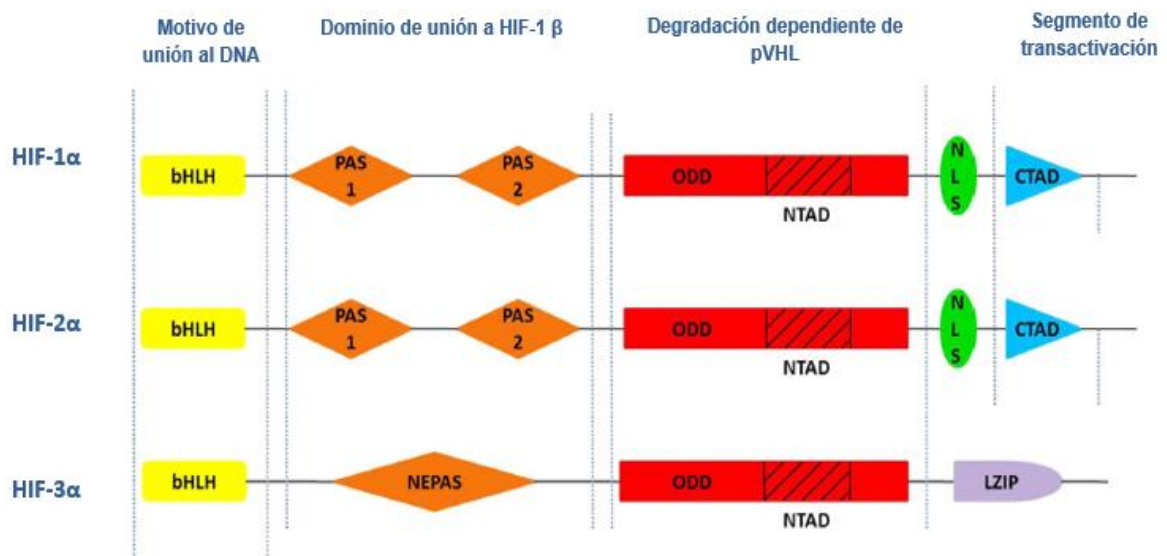




Figura 13 | Estructura de las subunidades de la proteína heterodimérica HIF. Se observa que HIF-1 α y HIF-2 α comparten diversos elementos estructurales entre lo que se incluye: el dominio de unión al ADN (bHLH) y a HIF-1 β (PAS), la señal de localización nuclear (NLS) y los dominios de transactivación (N-TAD y C-TAD). Se puede apreciar que, a diferencias de las subunidades α , HIF-1 β no posee un elemento ODDD (Tomada y modificada de Joseph et al., 2018).

El principal mecanismo de regulación de esta proteína es a nivel postraduccional siendo los niveles de oxígeno el mayor mecanismo de control. En condiciones de normoxia, HIF-1 α es sujeto a hidroxilación en residuos conservados de prolina (P) y asparagina (N) (P402, P564 y N804) en el dominio de transactivación N-TAD y ODDD (Prabhakar and Semenza, 2015). El proceso de hidroxilación es realizado por enzimas prolil-hidroxilasas (PHD) (Semenza, 2010) que utilizan O^{+2} , Fe^{+2} y α -cetoglutarato como substratos, generando dióxido de carbono y succinato como productos (Conway et al., 2001). La hidroxilación bloquea el reclutamiento del coactivador CBP/p300 e induce la interacción de HIF-1 α con la proteína supresora de tumores Von Hippel- Lindau (VHL) la cual recluta una ubiquitin ligasa E3 que cataliza la ubiquitinización de HIF-1 α , marcándolo para su degradación por el proteosoma (Figura 14) (Kaelin and Ratcliffe, 2008). En la hipoxia, el proceso de hidroxilación es inhibido, permitiendo la acumulación HIF-1 α y su translocación al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β promoviendo la transcripción de genes (Schito and Semenza, 2016) por la unión a secuencias 5-RCGTG-3 (R, purina (A o G)), conocidas como Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE, por sus siglas en inglés) (Figura 15) (Semenza, 2010). Se conocen más de 1,500 genes regulados por la unión de HIF-1 α / HIF-1 β a un elemento en HRE (Prabhakar NR and Semenza, 2015).

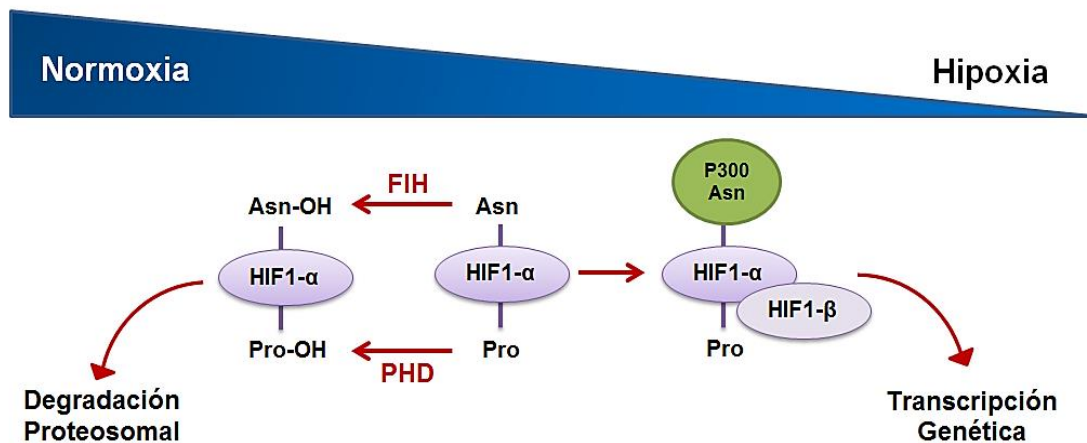


Figura 14 | Mecanismo de regulación de HIF-1α por oxígeno. La hidroxilación dependiente de oxígeno regula la degradación y trans-activación de HIF-1α. La hidroxilación de N804 en el dominio N-TAD bloquea la interacción de HIF-1α con CBP/p300, mientras que la hidroxilación de P402 y P564 en el ODDD permite la interacción de HIF-1α con la ubiquitin ligasa E3. En hipoxia este proceso es inhibido, por lo que se permite el reclutamiento del coactivador CBP/p300 y la dimerización con HIF-1β (Poth et al., 2013).

En cáncer, esta proteína heterodimérica facilita el desarrollo tumoral ya que puede incidir de manera positiva en diferentes marcadores del cáncer: angiogénesis vía Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) (Shweiki et al., 1992); el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) por la sobreexpresión de represores transcripcionales como Snail (Imai et al., 2003), Twist (Yang et al., 2008), TCF3, ZFH1A, y ZFH1B (Krishnamachary et al., 2006); mediando la des-diferenciación celular y promoviendo un estado “stem cell like” por regulación de los genes OCT4, Notch, c-Myc, y la telomerasa (Keith and Simon, 2007); y promoviendo la inestabilidad genómica por regulación epigenética del gen BCRA1 (Lu et al., 2011).

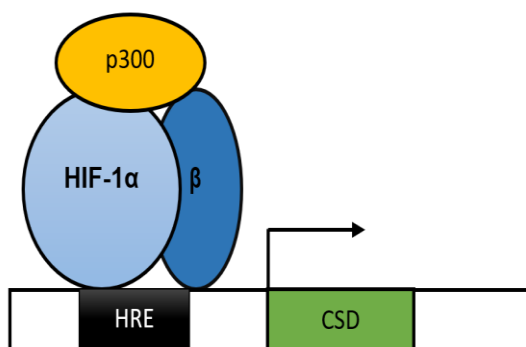


Figura 15 | Regulación Transcripcional por HIF-1α. El heterodímero HIF-1α/ HIF-1β se une a elementos HRE en el promotor de diversos genes diana y recluta diversos coactivadores como p300 para así poder activar el proceso de transcripción de genes codificadores de proteínas (CDS, por sus siglas en inglés) (Semenza GL., 2010).

Aunque la condición de hipoxia intratumoral es el mecanismo más importante que subyace al aumento de los niveles de HIF-1 α en las células cancerosas (Semenza, 2010), la actividad HIF también está modulada por mutaciones somáticas en oncogenes y genes supresores de tumores, infección por virus tumorales, citocinas y otras moléculas de señalización presentes en el microambiente tumoral (Schito y Semenza, 2015) como lo es el Óxido nítrico (Aparicio OE, 2017).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial ya que es el tipo de cáncer más común y el de mayor mortalidad entre la población femenina, siendo que el 90% de muertes por esta patología es ocasionada por la diseminación de células tumorales a tejidos distantes como huesos, cerebro, pulmón e hígado. El cáncer de mama triple negativo, aunque solo representa del 15-20% de todos los casos de carcinoma mamario, es el de peor pronóstico en comparación con otros subtipos de cáncer ya que es el de crecimiento más rápido y con mayor incidencia de metástasis. Actualmente, dada la falta de blancos moleculares para su tratamiento genera un pobre pronóstico en pacientes con este subtipo de cáncer, surgiendo la necesidad de una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso metastásico para desarrollo de nuevas terapias.

Investigaciones realizadas en las últimas dos décadas han demostrado que la hipoxia es una característica de los tumores sólidos que juega un papel importante en la fisiopatología tumoral; entre las diversas alteraciones producidas por la hipoxia se encuentra aumento en la concentración de Adenosina extracelular debido a un incremento en la expresión de ectonucleotidasas, lisis o el propio metabolismo celular. La adenosina se ha correlacionado con efectos protumorales y antitumorales dependiendo del tipo de cáncer.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran un efecto protumoral de adenosina sobre la capacidad proliferativa en un modelo de cáncer de mama triple negativo, las células MDA- MB-231, por lo que el presente proyecto decidimos evaluar el efecto que ejerce Adenosina en la expresión de marcadores relacionados a la transición Epitelio mesénquima así como la capacidad migratoria y angiogénica de esta misma línea celular, lo que nos permitirá un mayor entendimiento de los procesos moleculares implicados en el desarrollo metastásico de este subtipo de cáncer pudiendo contribuir en un futuro al desarrollo de nuevas terapias para su tratamiento efectivo.

HIPÓTESIS

La Adenosina promueve el desarrollo del potencial metastásico de células de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB 231, mediante la expresión de factores de transcripción asociados a la transición epitelio mesénquima y de factores angiogénicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto que ejerce Adenosina en el potencial metastásico de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB 231.

Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión de ARNm que codifica para los receptores de Adenosina A1, A2A, A2B y A3 en la línea celular MDA-MB 231.
2. Evaluar, a nivel de proteína, la presencia del receptor de adenosina A2B en células MDA-MB 231.
3. Determinar el efecto que ejerce Adenosina sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231.
4. Evaluar el efecto de Adenosina sobre la expresión de ARNm que codifica para los factores de transcripción Snail 1, Snail 2, Twist y Zeb en la línea celular MDA-MB 231.
5. Determinar si la presencia de Adenosina regula los niveles de ARNm que codifica para los factores angiogénicos HIF-1 α y VEGF en las células MDA-MB 231.
6. Evaluar el efecto que ejerce adenosina sobre acumulación de HIF-1 α a nivel de proteína en la línea celular MDA-MB 231.
7. Investigar el efecto de Forskolina en la expresión del ARNm que codifica para los factores de transcripción Snail 1, Snail 2, Twist y Zeb, así como para los factores angiogénicos HIF-1 α y VEGF en las células MDA-MB 231.
8. Determinar el efecto de adenosina sobre la expresión del receptor A2B en las células MDA-MB 231.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la investigación del cáncer de mama humano se dispone de una amplia variedad de líneas celulares; de los modelos más utilizados para el estudio del CaMTN se encuentra la línea celular MDA-MB- 231, la cual fue empleada para la realización de este proyecto.

Línea Celular MDA-MB 231

Las células de cáncer de mama MDA-MB 231 fueron aisladas de efusión pleural proveniente de una mujer caucásica de 51 años en el MD. Anderson Cancer Center en 1973 (Sigma, 2017). Con morfología de tipo epitelial (Figura 16), las células MDA-MB 231 se han clasificado con un inmunoperfil triple negativo y caracterización molecular de baja Claudina. Esta línea celular es invasiva in vitro y, cuando se introduce directamente en la circulación, ha resultado un modelo útil en el estudio del proceso metastásico (Holliday and Speirs, 2011).

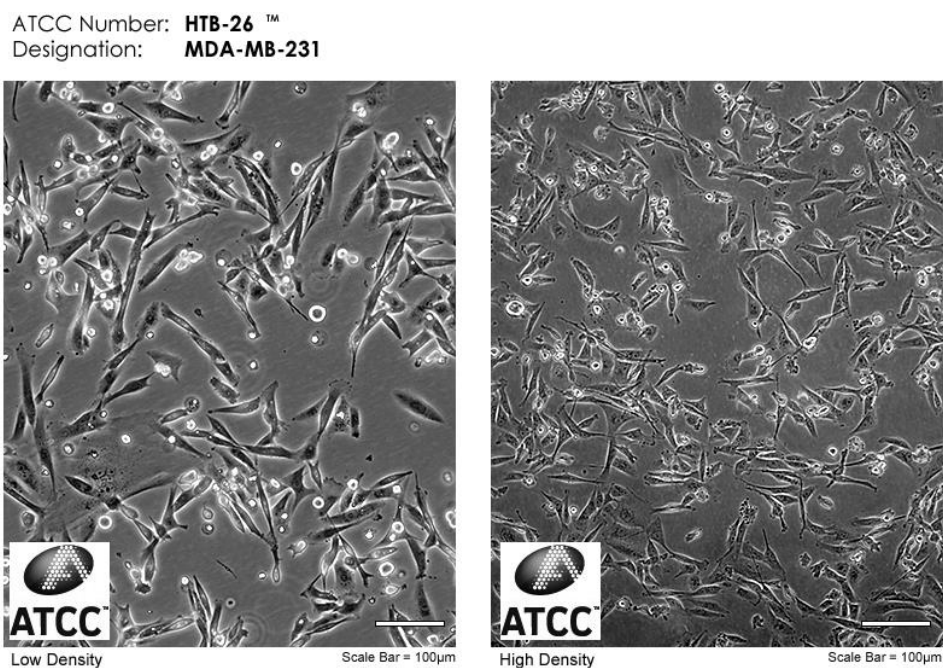


Figura 16 | Microfotografía de células MDA-MB 231 a baja (izquierda) y alta (derecha) densidad (ATCC, 2017).

Cultivo de la línea celular

Las Células MDA-MB 231 fueron cultivadas en matraces planos de poliestireno para cultivo celular de 25 cm² con medio de cultivo Advanced-DMEM (Gibco®, EUA) suplementado con 4% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de una mezcla antibiótico-antimicótico (10,000 µg/ml de estreptomina y 10,000 unidades/ml de penicilina y 25 µg/ml de anfotericina B. Los matraces se mantuvieron en una incubadora a 37 °C y con una mezcla de 5% CO₂ y 95% aire. Cuando el cultivo celular alcanzó un 90% de confluencia se realizó un proceso de tripsinización, por lo que se retiró el medio, se lavó 2 veces con 5 ml de buffer de fosfatos (PBS) estéril y se agregó una solución salina de Tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma-Aldrich) para despegar las células del matraz. Después de 5 minutos de reposo, se agregaron 4 ml de medio de cultivo Advanced DMEM suplementado, se re-suspendió y, la suspensión celular, se transfirió a un tubo cónico estéril de 15 ml que se centrifugó a 1,200 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió con 4 ml de medio de cultivo Advanced DMEM suplementado. A partir de esta nueva suspensión celular se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre así como sembrar placas de 6 pozos para los ensayos de expresión génica y migración, o matraces para extracción de proteínas (Figura 17).

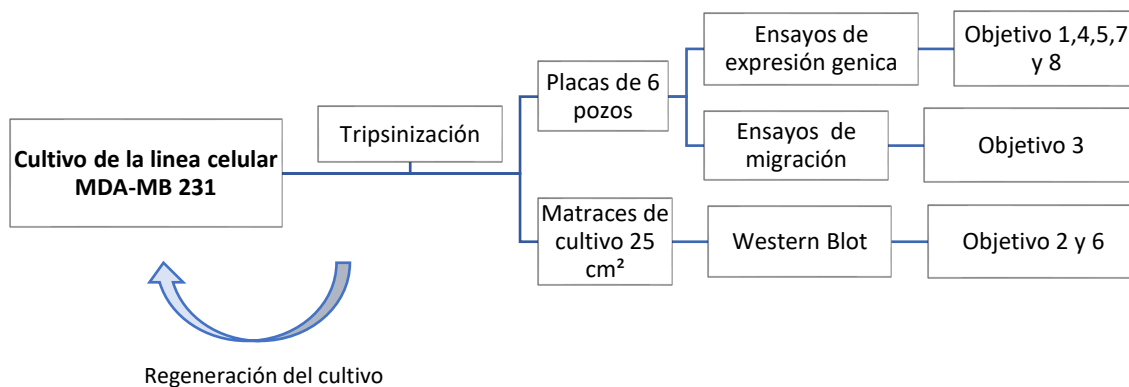


Figura 17 | Esquema de trabajo para los experimentos de este proyecto. El modelo celular para los experimentos de la presente tesis fue la línea de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB 231. Las células se mantuvieron en medio Advanced-DMEM suplementado con 4% de SFB, 1% de L-glutamina y 1% de antibiótico-antimicótico y cuando alcanzaron una confluencia del 100%, el cultivo se sometió a un proceso de tripsinización, a partir del cual se tomaron alícuotas tanto para regeneración del matraz madre como para sembrar placas de 6 pozos y matraces de 25 cm² para posteriores experimentos.

Ensayos de expresión génica

Para los ensayos de expresión génica se hizo extracción de ARN total, ensayos de RT-PCR, electroforesis y análisis densitométrico:

Extracción de Ácido Ribonucleico Total

Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia de 60%, se recambio el medio de cultivo y se iniciaron los diferentes tratamientos. Al finalizar la duración de cada condición experimental, se lavó 2 veces con 2 ml de PBS y se procedió a realizar la extracción de ARN total con el kit FavorPrep™, Total RNA Purification Mini Kit® (Favorgene) siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 18): Se agregó 350 µL de FARB Buffer a cada pozo de la placa de cultivo celular y se incubó en el agitador de placas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el lisado celular a un filtro blanco con su respectivo tubo colector y se centrifugó a 16,100 rcf durante 2 minutos. El filtrado se transfirió a un tubo de Eppendorf de 1.5 ml (No provisto por el kit) donde se adicionó 350 µL de etanol al 70%, se vortexeo y el contenido se transfirió a una columna FARB con su respectivo tubo colector. Se centrifugó a 16,100 rcf durante dos minutos y se desechó el filtrado. Para realizar los lavados, con el fin de eliminar restos celulares, se agregaron 500 µL de Wash Buffer 1 a la columna FARB, se centrifugó durante dos minutos a 16,100 rcf y se eliminó el filtrado para adicionar posteriormente 700 µL de Wash Buffer 2, se centrifugó durante dos minutos a 16,100 rcf y se desechó el filtrado. Para recolectar las muestras se colocó la columna FARB en un tubo de elución, se agregaron 50 µL de agua libre de ARN-asas al centro de la membrana de la columna FARB, se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y finalmente se centrifugó durante 2 minutos a 16,100 rcf. La determinación de concentración de ARN total se realizó mediante espectrofotometría, por lo que se utilizaron 4 µL de muestra (Biophotometer, Eppendorf), el resto se almacenó a -20°C.

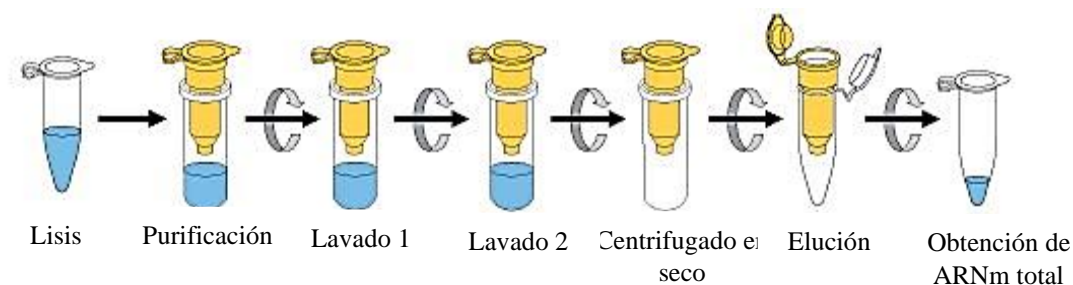


Figura 18 | Representación esquemática del proceso de Extracción del Ácido Ribonucleico Total mediante el kit FavorPrep™, Total RNA Purification Mini Kit® (Favorgene).

Retrotranscripción (Síntesis de ADNc)

A partir de las secuencias de ARN, por medio de la enzima transcriptasa reversa, se realizó la síntesis de una cadena complementaria de ADN (ADNc). La Retrotranscripción se realizó empleando el kit comercial “High Capacity cADN Reverse Transcription (Applied Biosystems)” siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada reacción de 20 μ l se agregaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen
<i>Buffer RT</i>	2 μ l
<i>dNTPs</i>	0.8 μ l
<i>Primers Random</i>	2 μ l
<i>Transcriptasa Reversa MULL</i>	1 μ l
<i>Agua libre de RNAsas</i>	3.2 μ l

Y, a partir de una muestra de ARN de concentración conocida, se tomó el volumen necesario para una concentración final de 2 μ g. En base a este volumen, se realizó el respectivo ajuste de la cantidad de agua libre de RNAsas para completar 11 μ l totales entre la muestra y el agua que, posteriormente se adicionaron al tubo de reacción con sus respectivos reactivos. La RT se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) bajo el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente a 4°C. El ADNc se almacena a -20°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR)

A partir de las muestras de ADNc, se realizó la técnica de PCR para amplificar un fragmento específico de ADN. La PCR se realizó empleando el kit comercial Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para cada reacción de 20 μ l se agregaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen
Dream Taq	10 μ l
Agua libre de nucleasas	6 μ l
Primer Forward	1 μ l
Primer Reverse	1 μ l
ADNc	2 μ l
Total	20 μ l

Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron con el software online de la empresa IDT-ADN y SIGMA-ALDRICH; sus características son las siguientes:

Oligonucleótido	Secuencia (5'->3')	Temperatura de alineamiento (C°)	Tamaño del producto (pb)
<i>HIF-1α</i>	F: TCTCCATCTCCTACCCACATAC	61.7	309
	R: GATCGTCTGGCTGCTGTAATAA	63	
<i>Receptor A1 adenosina</i>	F: TACTTCCACACCTGCCTCATGGTT	60.2	421
	R: ACACTTTCTTGTGAGCTGCTTGC	60.2	
<i>Receptor A2a adenosina</i>	F: AACTTCTTTGCCTGTGTGCTGGTG	60.2	893
	R: TTCCTCAGAACCCAAGCCCTTCTT	60.3	
<i>Receptor A2b adenosina</i>	F: GAAAGCTGCTGCCTTGTCAAGTGT	60.2	633
	R: AGTGCTCAAGAGAGGCAGTCCATT	60.2	
<i>Receptor A3 adenosina</i>	F: TGGCCCATCTCACTTCCTGAAACA	60.5	756
	R: TAAGCTTGACCCGCAAGTATCGGT	60.3	
<i>hVEGF</i>	F: CTGAGCCTCTCTACCCCAGG	65.2	327
	R: GAGCAGGAAGAGGATGAGGG	65.2	
<i>Snail-1</i>	F: CCTTCGTCCTTCTCCTCTACTT	61.7	388
	R: GGCAGTGGTACTTCTTGACATC	62.5	
<i>Snail-2</i>	F: CTCTCTCCTCTTTCCGGATACT	61.7	235
	R: CAGTGCAGCTGCTTATGTTG	63.5	
<i>Twist-1</i>	F: AGCTGAGCAAGATTTCAGACCCTCA	60	452
	R: AGAATGCAGAGGTGTGAGGATGGT	60.1	
<i>Zeb-1</i>	F: TTCAGCATCACCAGGGCAGTC	66.6	736
	R: GAGTGGAGGAGGCTGAGTAG	60.6	
β - actina	F:CAAAGACCTGTACGCCAACAC	64.4	211
	R:CATACTCCTGCTTGCTGATCC	63.7	

La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) con el siguiente protocolo: 30 segundos a 94°C para la fase de desnaturalización del ADNc, 30 segundos con la T_m del par de primers para la fase de alineamiento de los oligonucleótidos y 1 minuto a 72°C para la fase de elongación. Estas condiciones se repitieron 35 ciclos y finalmente la temperatura descendió a 4°C. Las muestras se almacenaron a 4°C.

Electroforesis

La amplificación de los productos de interés se evaluó mediante la separación electroforética de los productos de PCR en geles de agarosa al 1.2% usando Bromuro de Etidio (BrEt) como agente revelador. Cada muestra a cargar se preparó mezclando 9 µL de producto de PCR y 15 µL de ADN Loading Dye 1x (Thermo Scientific, EUA), de los cuales, se tomaron 13 µL y se depositaron en un pozo del gel. El marcador de peso molecular se elaboró con 20µL de ADN Loading Dye 1x y 10 µL de Gene Ruler 100pb ADN Laddery (Thermo Scientific, EUA); se cargó 14µL del mix de marcador de peso molecular en 2 pozos diferentes. El gel se dejó correr durante 80 minutos a 65 V y se obtuvieron 3 fotografías utilizando el sistema de imagen Chemidoc (Bio Rad, EUA) y el programa Quantitative One 4.2.0 (Bio-Rad, EUA). Cada gel se corrió por duplicado.

Densitometría

Se realizó el análisis densitométrico de las imágenes obtenidas de los geles de electroforesis con el programa de procesamiento de imágenes digitales ImageJ desarrollado en el Instituto Nacional de la Salud (NIH, EUA).

Western Blot

Para poder determinar el nivel de proteína del receptor de Ado A2B y HIF-1 α se realizó Western Blot de la siguiente manera:

Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia de 60%, se recambio el medio de cultivo y se iniciaron los diferentes tratamientos. Al finalizar la duración de cada condición experimental las células se lisaron con 120 µl buffer RIPA y el lisado celular se centrifugó a 4° C por 30 minutos a 10,000 rpm. La cuantificación de proteínas se

realizó con el kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la separación proteica se cargaron 100 µg de proteína desnaturalizada en un gel de poliacrilamida y se realizó el corrimiento electroforético durante 140 minutos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó el bloqueo con leche no grasa al 5% durante 3 horas. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a 4° C durante toda la noche y se prosiguió a incubar con el anticuerpo secundario por 3 horas. Para detectar la señal, se adicionaron 3 ml de solución TMB (3,3', 5,5'- Tetrametil bencidina; Sigma-Aldrich) (Figura 19) y se obtuvieron 3 fotografías utilizando el sistema de imagen Chemidoc (Bio Rad, EUA) con el programa Quantitive One 4.2.0 (Bio-Rad, EUA).

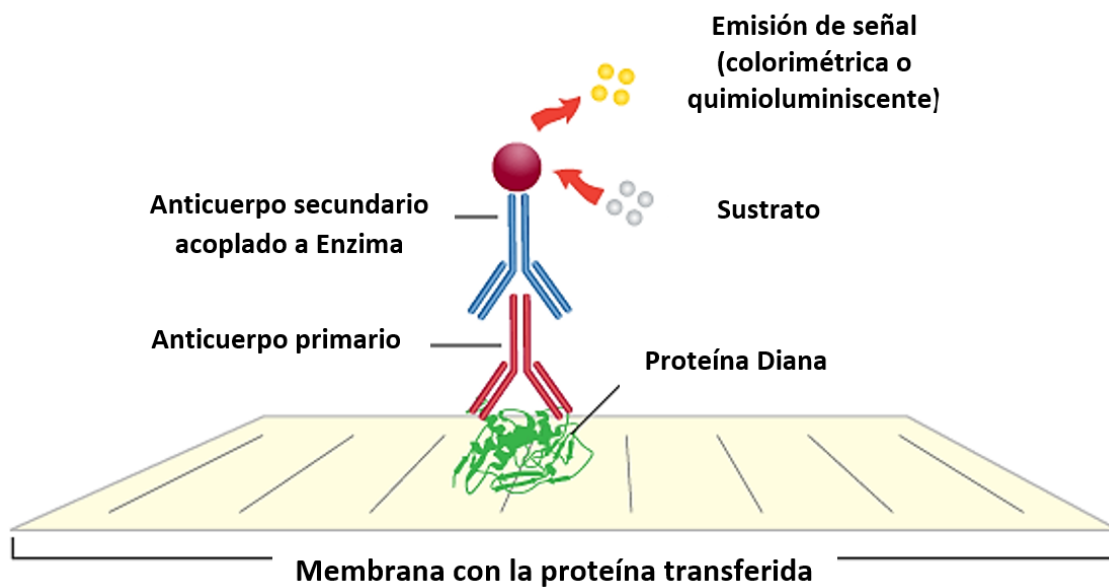


Figura 19 | Representación esquemática de principio funcional de la técnica de Western Blot.

Ensayos de migración

Para determinar la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231 inducida por Ado, se realizaron 2 ensayos diferentes: cierre de herida y migración en cámara Transwell.

Ensayo de Cierre de Herida

Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia de 60%, se iniciaron los diferentes tratamientos y, al finalizar la duración de cada condición experimental y con una punta de micropipeta P200, se realizó una herida en la monocapa de células, se retiró el medio y se lavó con 2 ml de PBS estéril. Para evaluar el cierre de Herida, se agregó medio de cultivo DMEM suplementado tratado y la placa se mantuvo durante 18 horas en una incubadora a 37 °C con una mezcla de 5% CO₂ y 95% aire. Finalmente se retiró el medio y se lavó 3 veces con 2 ml de PBS. Las células se fijaron con una solución de metanol-acetona y se tiñeron con cristal violeta al 0.5%. Se tomaron 5 micrografías de campos aleatorios de cada pozo con un microscopio de campo claro Laica DM1000 utilizando el objetivo 4X, una cámara Jenoptik Jena modelo ProgRes10 plus y el programa ProgRes CapturePro 2.1. El análisis de cierre de herida se realizó con el programa ImageJ.

Ensayo en Cámaras Transwell

Las células MDA-MB 231 fueron cultivadas en placas de 6 pozos y mantenidas con medio Advanced DMEM suplementado. Una vez que se alcanzó el 60% de confluencia se iniciaron pre-tratamientos de 48 horas. Terminados los pretratamientos, en el cuarto de cultivo, se lavó dos veces con 2 ml PBS estéril, se adicionó 500 µl de tripsina estéril durante 5 minutos a cada pozo y se agregó 1 ml de medio DMEM libre de suero fetal bovino. Se recuperó la suspensión celular y se realizaron dos alícuotas, una de 500 µl y otra de 1000 µl. A partir de la alícuota de 500 µl se realizó el conteo celular con un citómetro de flujo portátil (Scepter® 2.0) y se realizaron los cálculos necesarios para poder obtener 30 000 células de cada condición.

Para el ensayo de migración se utilizaron cámaras Transwell® con membranas de policarbonato de poros de 8 µm. A la parte inferior de la cámara se agregó 800µl de medio DMEM libre de suero fetal bovino condicionado y, a la parte superior, se adicionó 350 µl de medio DMEM suplementado condicionado y el volumen necesario para tener 30,000 células en cada condición. Se incubó 20 horas a 37 °C, 5% CO₂ y 95% aire.

Terminado el tiempo de migración se eliminó el medio de cultivo y se limpió la parte externa de cada inserto con un hisopo. Las células se fijaron con una solución de metanol-acetona y se tiñeron con cristal violeta al 0.5%. Se tomaron 3 micrografías de campos aleatorios con un microscopio de campo claro Laica DM1000 utilizando el objetivo 10X, una cámara Jenoptik Jena modelo ProgRes10 plus y el programa ProgRes CapturePro 2.1. El conteo celular se realizó con el programa ImageJ.

Análisis de datos

El análisis estadístico y las gráficas se realizarán con el software SigmaPlot 11.0. Se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes.

RESULTADOS

Las células MDA-MB 231, en condiciones basales, expresan ARNm que codifica para los receptores de Adenosina A1, A2A, A2B y A3

Inicialmente, decidimos investigar si nuestro modelo experimental, la línea celular MDA-MB 231, expresaba el ARNm que codifica para los receptores de Ado A1, A2A, A2B y A3, por lo que se realizaron ensayos de expresión génica. Se muestra que las células MDA-MB 231 expresan el ARNm que codifica para los 4 receptores, siendo predominantemente expresado el receptor A2B (Figura 20).

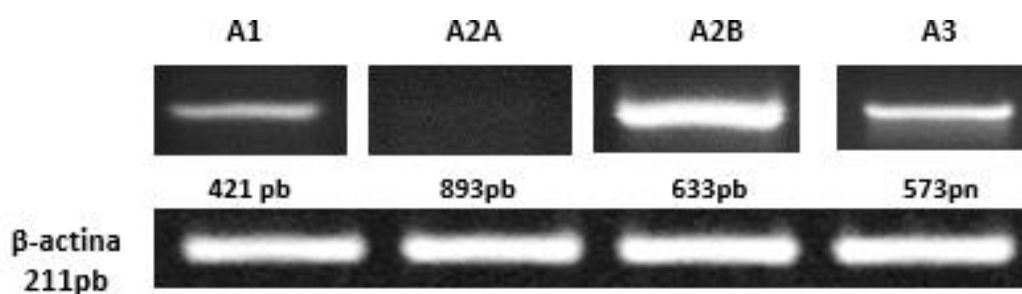


Figura 20 | Expresión basal del ARNm que codifica para los receptores A1, A2A, A2B y A3 en la línea celular MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino y una solución de antibiótico-antimicótico. Cuando se alcanzó una confluencia de 100% se extrajo el ARN total, se realizó RT-PCR y los productos finales fueron separados electroforéticamente. Se muestra la presencia del ARNm que codifica para los receptores A1, A2A, A2B y A3.

La línea celular MDA-MB 231 expresa, a nivel de proteína, el receptor de adenosina A2B

En contraste con los otros tipos de receptores los cuales son activados a concentraciones fisiológicas de adenosina (30-300 nm), el receptor A2B requiere de concentraciones en el rango μ M para ser activado (EC50 de 23.5 μ M), condición presente en el microambiente tumoral, aunado a este antecedente, Panjehpour y colaboradores en 2005 reportaron la participación exclusiva del receptor A2B en respuesta a Ado en células MDA-MB 231, motivos por los que nuestra atención se centró en el receptor A2B, por lo que quisimos evaluar si este receptor, al igual que en ARNm, se expresaba a nivel de proteína.

Se observa que el receptor A2B se encuentra presente en células MDA-MB 231 en condiciones basales (Figura 21).

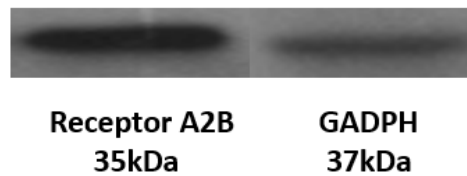
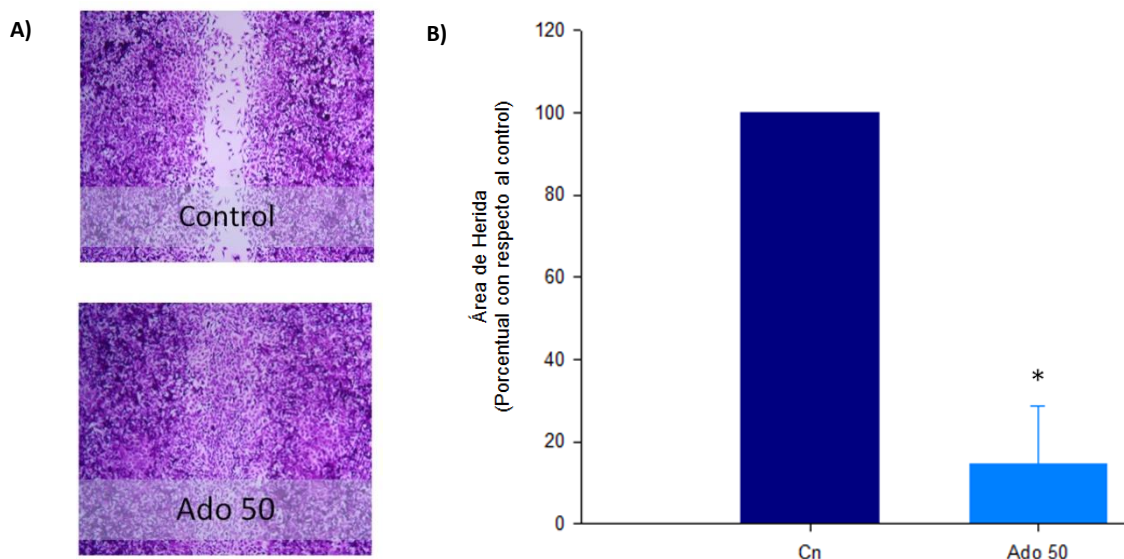


Figura 21 | Expresión basal de la proteína receptora A2B en células de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB 231. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia de 100% las células MDA-MB 231 fueron lisadas, se extrajo la proteína total y se realizó Western Blot. Se observa que la línea celular MDA-MB 231 expresa, a nivel de proteína, el receptor A2B. Se utilizó GADPH como control.

La presencia de Adenosina incrementa la capacidad migratoria del modelo celular de cáncer de mama triple negativo, las células MDA-MB 231.

Una vez comprobada la presencia del receptor A2B, decidimos investigar si Ado podía modificar la capacidad migratoria de las células MDA-MB 231, por lo que realizamos ensayos de cierre de herida y ensayos en cámaras Transwell, donde se observó que la presencia de 50 μ M de Ado durante 48 horas incrementa de forma significativa la capacidad migratoria de la línea celular ($p=0.004$) (Figura 22 B), efecto que se ve reflejado en una disminución en el área de herida de 85.6% con respecto a células que no fueron tratadas (Condición control) (Figura 22 A). Se observó un efecto similar sobre la capacidad migratoria en los ensayos en cámaras Transwell (Figura 22 C).



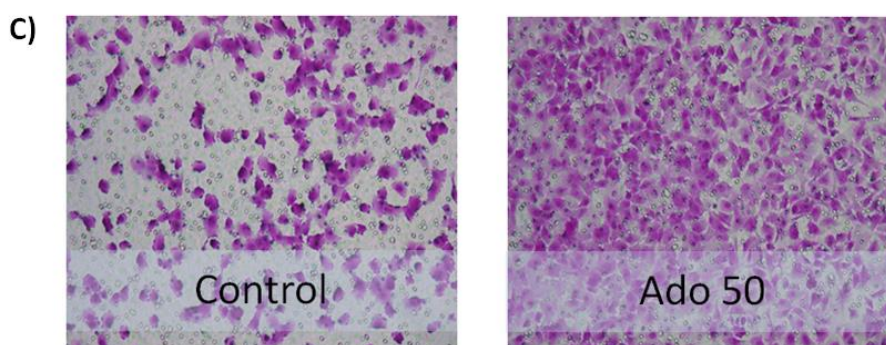


Figura 22 | Efecto de Ado en la capacidad Migratoria de células MDA-MB 231. Se realizaron ensayos de cierre de Herida y ensayos en cámara Transwell en condiciones control y tratadas con Ado durante 48 horas a una concentración 50 μ M. Se muestran imágenes representativas de campos aleatorios de los ensayos de cierre de Herida (A) y ensayos en cámaras Transwell (C). Ado fue capaz de reducir el Área de Herida en un 85.6% con respecto al control (B). Control: cn * $p \leq 0.05$ n=3

Efecto de adenosina en la expresión de TF-EMTs Snail1, Snail 2, Twist y Zeb

Además de participar en la capacidad migratoria e invasiva de las células así como en la quimiorresistencia, los TF-EMTs Snail 1, Snail 2, Twist y Zeb se ven involucrados en diversos aspectos del desarrollo del cáncer, por lo que decidimos investigar el efecto que ejercía Ado en la expresión del ARNm de dichos FT. Para lograr este objetivo las células MDA-MB 231 fueron cultivadas tanto en condiciones control como en presencia de Ado a una concentración de 50 μ M durante 48 horas y posteriormente se realizaron ensayos de expresión génica. De los resultados obtenidos se observa que nuestra línea celular expresa de forma basal el ARNm para los TF-EMTs Snail 1, Snail 2 y Zeb-1 y que el tratamiento con Ado fue capaz de mantener la expresión de los últimos dos (Figura 23 B y C), no existiendo una diferencia significativa entre el comportamiento de células tratadas y células control ($p=0.607$ y $p=0.446$), así mismo, provocó una tendencia hacia la alta en los niveles de ARNm que codifica para Snail 1 ($p=0.184$) (Figura 23 A). Nuestro modelo celular no expresó, ni en condiciones control ni en condiciones tratadas, el ARNm que codifica para Twist (Datos no mostrados).

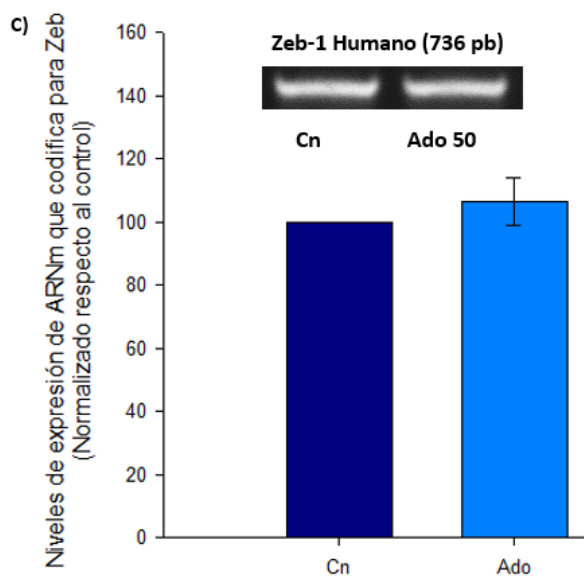
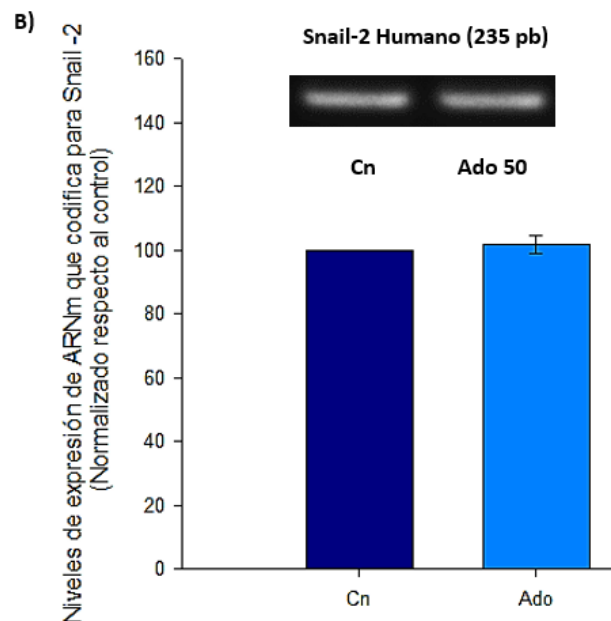
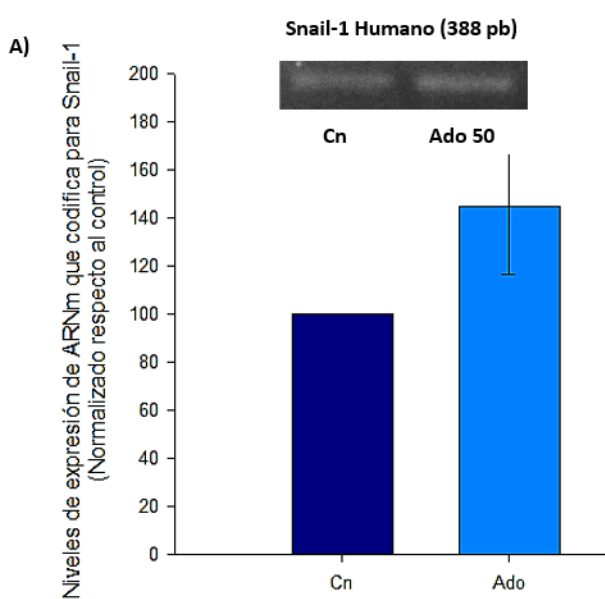


Figura 23 | Efecto de adenosina en la expresión del ARNm que codifica para los TF-EMTs Snail 1, Snail 2 y Zeb en la línea celular MDA-MB 231. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia del 60%, las células MDA-MB 231 fueron tratadas con Ado a una concentración de 50 μ M durante 48 horas y, posteriormente, se realizaron ensayos de expresión génica para evaluar el efecto de Ado en expresión del ARNm que codifica para los TF-EMT Snail 1, Snail 2 y Zeb. Se puede observar que Ado no modifica la expresión de los FT Snail 2 y Zeb, no existiendo una diferencia significativa entre el comportamiento de las células tratadas y las células control ($p=0.607$ y $p=0.446$ respectivamente) (B y C); así mismo, los tratamientos de Ado provocan una tendencia hacia el alza en los niveles de ARNm para Snail1 (A). Control: cn * $p \leq 0.05$ n=3

Adenosina es capaz de aumentar los niveles de expresión del ARNm que codifica para el factor angiogénico HIF-1 α , pero no el ARNm de VEGF.

Otro elemento a evaluar del efecto de Ado en el potencial metastásico fue la inducción de factores angiogénicos como HIF-1 α y VEGF, por lo que se realizaron ensayos de expresión génica tanto en condiciones control como en presencia de Ado. Se observó que las células MDA-MB 231 expresan de forma basal el ARNm que codifica para HIF-1 α y VEGF y que el tratamiento con Ado fue capaz de inducir la expresión del ARNm de HIF-1 α de forma dosis dependiente siendo este incremento significativo a partir de una concentración de 10 μ M ($p=0.002$) (Figura 24 A). Como HIF-1 α es una proteína regulada principalmente a nivel postraduccional, quisimos observar si el efecto inductor de Ado se mantenía a nivel de proteína; el tratamiento con Ado a 50 μ M durante 48 horas aumenta los niveles de HIF-1 α a nivel de proteína, aun en condiciones de normoxia (Figura 24 C). Así mismo este tratamiento no modificó los niveles de ARNm de VEGF ($p=0.743$) (Figura 24 B).

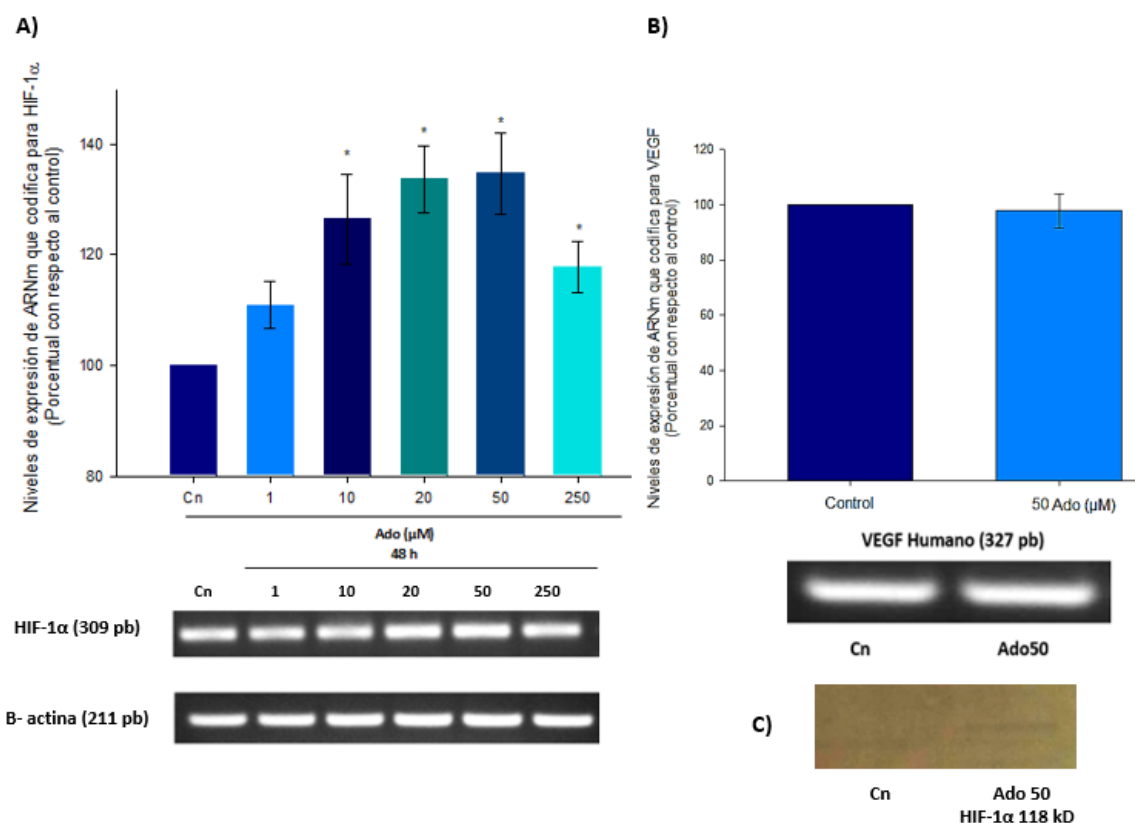


Figura 24 | Efecto de Adenosina sobre la expresión de factores angiogénicos en la línea celular MDA-MB 231. Las células MDA MB 231 fueron cultivadas en presencia de dosis crecientes de Ado durante 48 horas. Se muestra un efecto dosis dependiente en el ARNm que codifica para HIF-1 α , siendo este cambio significativo a partir de una concentración de 10 μ M ($p=0.002$) (A); de la misma manera, Ado, a una concentración de 50 μ M, indujo un incremento de la proteína HIF-1 α (C). Adenosina no modificó los niveles de ARNm para VEGF (B).

Forskolina no modifica la capacidad migratoria de las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB 231.

El receptor A2B es capaz de interactuar con dos tipos de proteínas G, Gs y Gq, activando de esta manera dos vías de señalización diferentes (la mediada por PKA y PKC). Como siguiente paso quisimos evaluar si los efectos obtenidos hasta ahora eran mediados por la activación de la vía de señalización de PKA, por lo que las células MDA-MB 231 fueron cultivadas tanto en condiciones control como en presencia de Forskolina (Fsk), un activador de la Adenilato ciclasa. Para evaluar la capacidad migratoria inducida por Fsk 10 μ M, se realizaron ensayos de cierre de Herida a las 48 horas de pretratamiento, donde se observó que la presencia de Fsk en el medio de cultivo no fue capaz de modificar la migración de las células MDA-MB 231 con respecto a células control (Figura 25).

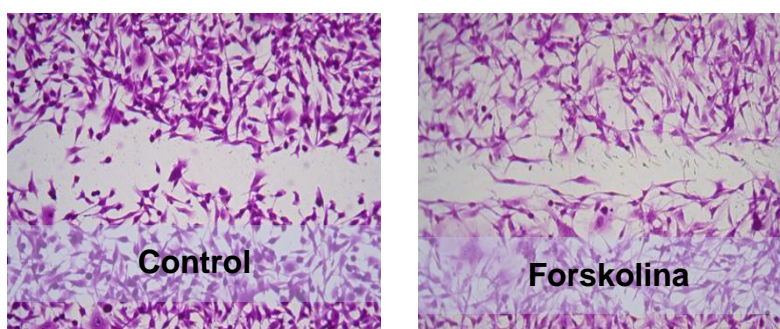


Figura 25 | Efecto de Fsk en la capacidad migratoria de células MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con Fsk a una concentración de 10 μ M durante 48 horas y, posteriormente, se realizaron ensayos cierre de herida. Se puede observar que Fsk no modifica la capacidad migratoria en nuestro modelo celular (B) con respecto a células control. n=3

Forskolina incrementa la expresión del ARNm de los FT-EMTs Snail1, Snail2 y ZEB

Así mismo se evaluó el efecto de Fsk sobre la expresión de los TF-EMTs, por lo que se realizaron ensayos de expresión génica con células tratadas con dicho fármaco a una concentración 10 μ M durante 48 horas. Se observa que la Fsk estimula significativamente la expresión del ARNm que codifica para Snail 2 y Zeb-1 ($p < 0.001$ y 0.026) (Figura 26 B y C), siendo que para Snail 1 solo causa una tendencia hacia la alta ($p = 0.57$) (Figura 26 A).

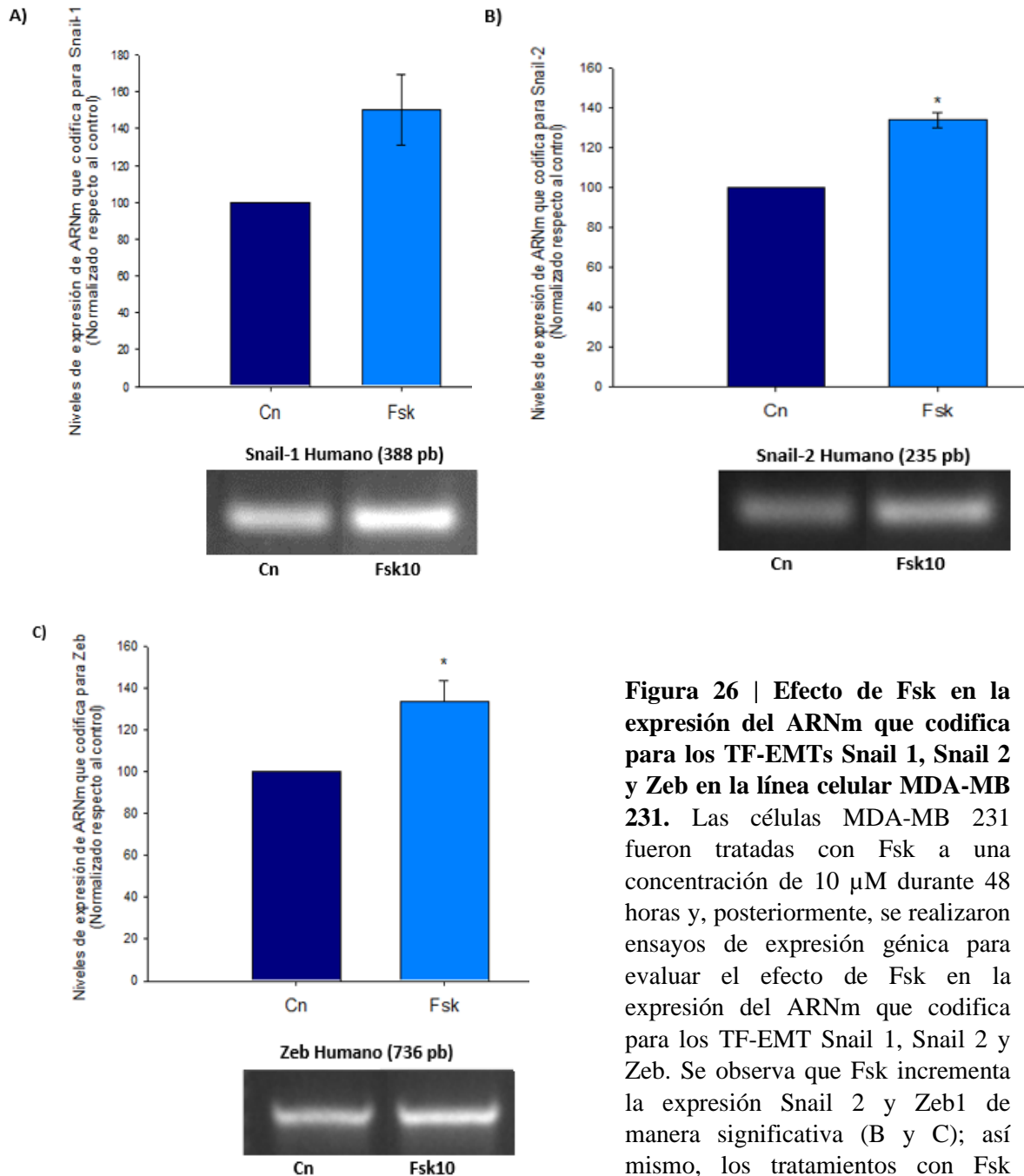


Figura 26 | Efecto de Fsk en la expresión del ARNm que codifica para los TF-EMTs Snail 1, Snail 2 y Zeb en la línea celular MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con Fsk a una concentración de 10 μ M durante 48 horas y, posteriormente, se realizaron ensayos de expresión génica para evaluar el efecto de Fsk en la expresión del ARNm que codifica para los TF-EMT Snail 1, Snail 2 y Zeb. Se observa que Fsk incrementa la expresión Snail 2 y Zeb1 de manera significativa (B y C); así mismo, los tratamientos con Fsk provocan una tendencia hacia el alta de los niveles de ARNm para Snail 1 (A). n=3

Forskolina es capaz de aumentar los niveles de expresión del ARNm que codifica para el factor angiogénico VEGF, pero no para HIF-1 α .

De igual forma, por medio de ensayos de expresión génica, se evaluó el efecto de Fsk en la expresión de los factores angiogénicos HIF-1 α y VEGF. De manera contraria al

tratamiento con Ado, la presencia de Fsk durante 48 horas a una concentración 10 μM estimula significativamente la expresión del ARNm que codifica VEGF en las células MDA-MB 231 ($p=0.006$) (Figura 27 B) pero no modifica la expresión del ARNm de HIF-1 α ($p=0.242$) (Figura 27 A).

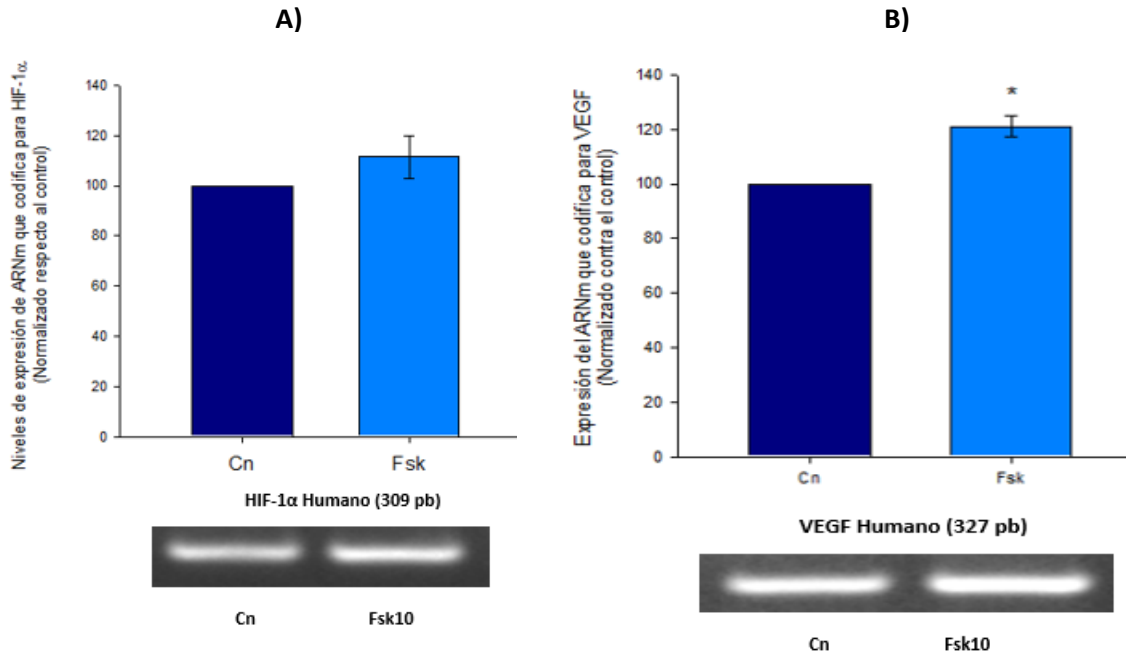
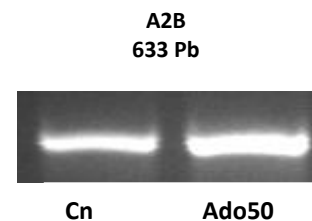


Figura 27 | Efecto de Forskolina en la expresión del ARNm que codifica para los factores angiogénicos HIF-1 α y VEGF en las células MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con Fsk a una concentración de 10 μM por 48 horas y posteriormente se realizaron ensayos de expresión génica para medir la expresión de HIF- α y VEGF. Se observa que Fsk incrementa de forma significativa la expresión VEGF (B), mientras que no modifica la expresión de HIF-1 α (A).

Efecto de Adenosina en la expresión del receptor A2B en las células de CaMTN, MDA-MB 231.

Por último, evaluamos el efecto que ejerce Ado sobre la expresión del ARNm que codifica para el Receptor A2B en células MDA-MB 231. Nuestros resultados muestran que la presencia de Ado durante 48 horas a una concentración 50 μM es capaz de incrementar la expresión de dicho ARNm en comparación a la condición control (Figura 28).

Figura 28 | Efecto de Adenosina en la expresión del ARNm que codifica para el receptor A2B en las células MDA-MB 231. Las células MDA-MB 231 fueron tratadas con Ado a una concentración de 50 μM por 48 horas. Se muestra un gel representativo de la expresión, en condiciones basales y tratadas, del receptor A2B.



CONCLUSIONES

- 1) Las células MDA-MB 231 expresan ARNm que codifica para los receptores de Adenosina A1, A2A, A2B y A3.
- 2) El receptor de adenosina A2B, a nivel de ARNm, está predominantemente expresado en la línea celular MDA-MB 231.
- 3) Adenosina mantiene el fenotipo mesénquimal de las células MDA-MB 231, favoreciendo con esto su capacidad migratoria.
- 4) Adenosina incrementa la expresión de HIF-1 α tanto a nivel de ARNm como de proteína, sin afectar la expresión del ARNm para VEGF en línea celular MDA-MB 231.
- 5) Forskolina incrementa la expresión de los TF-EMTs Snail 1, Snail 2 y Zeb1 en las células MDA-MB 231.
- 6) Forskolina es capaz de aumentar los niveles de expresión del ARNm que codifica para el factor angiogénico VEGF, pero no para HIF-1 α en las células MDA-MB 231.
- 7) Adenosina incrementa la expresión del receptor A2B en células de cáncer de mama triple negativo.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es el cáncer más común y el de mayor mortalidad entre la población femenina, siendo la metástasis la causante del 90% de muertes relacionadas a esta patología (NCI, 2018).

La hipoxia intratumoral, confirmada en carcinoma mamario por Vaupel y colaboradores (Vaupel et al., 1991), es una característica que se ha correlacionado con un peor pronóstico en pacientes con diferentes tipos de cáncer y un alto factor de riesgo para que ocurra la metástasis (Gilkes, 2016; Hong et al., 2016; Brizel et al., 1996; Hammond y Giaccia, 2006; Brown y Wilson, 2004). Entre los elementos regulados por la condición de hipoxia se encuentra un aumento en la concentración de Ado extracelular, muy probablemente debido a un aumento en la liberación de ATP y en la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, y una reducción en la actividad de la cinasa de Ado (Decking et al., 1996), de la adenosina desaminasa y de los transportadores ENT. En CaM la ausencia del receptor a estrógenos se ha correlacionado con una alta expresión de CD73, (Spsychala et al., 2004), un factor adicional que contribuye al incremento de Ado en el microambiente tumoral en este tipo de cáncer.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio por Fernández-Gallardo en 2013, demostraron que Ado tiene un efecto estimulador sobre la capacidad proliferativa de un modelo de cáncer de mama triple negativo, las células MDA-MB 231, por lo que, de manera complementaria en el presente trabajo, decidimos investigar si la presencia de Ado es capaz de incidir sobre otros indicadores del potencial metastásico en este mismo modelo celular tales como transición epitelio-mesénquima, migración y angiogénesis.

Inicialmente, investigamos si nuestro modelo experimental, las células MDA-MB 231, expresaban el ARNm que codifica para los receptores a Ado A1, A2A, A2B y A3. Nuestros resultados, en concordancia con los reportados por Panjehpour y colaboradores en el 2005, y Fernandez-Gallardo y colaboradores en el 2016, muestran que esta línea celular expresa el ARNm que codifica para estos 4 receptores, siendo predominantemente expresado el ARNm que codifica para el receptor A2B, así como la proteína respectiva.

En 2005, Panjehpour y colaboradores, demostraron que el receptor A2B participa de forma exclusiva ante la respuesta a Ado en las células MDA-MB 231, ya que al tratar esta línea celular con agonistas no selectivos para los receptores de Ado (NECA y PHPNECA) observaron un aumento en los niveles de AMPc y calcio libre intracelular, mientras que la presencia de agonistas selectivos para A1 (CCPA), A2A (CGS 21680) y A3 (CI-IB-MECA) no inducía cambios en los niveles intracelulares de AMPc y calcio, sugiriendo que la respuesta era mediada exclusivamente por el receptor A2B (Panjehpour et al., 2005).

La activación del receptor A2B influye en el mantenimiento del fenotipo mesénquimal de las células MDA-MB 231 asegurando los niveles de expresión de los diferentes factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima, tales como Snail-1, Snail-2 y Zeb 1. Nuestro modelo celular no expreso, ni en condiciones control ni en condiciones tratadas, el ARNm para Twist; este último resultado, concordante con lo reportado en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio por Ruiseco en 2015 (Ruiseco, 2015), Hernández en 2016 (Hernandez, 2016) y Avalos en 2017 (Avalos, 2017), es contrario a lo reportado por los equipos de trabajo de Li en 2013 y Tsai en 2016, ya que ellos observan la presencia de Twist en esta misma línea celular tanto a nivel de ARNm como nivel de proteína en condiciones control. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían deberse a una diferencia intrínseca presente en la línea celular ocasionada por las condiciones de su cultivo, ya que se ha observado que las diferentes concentraciones de Suero Fetal Bovino y los medios utilizados pueden provocar cambios en el transcriptoma celular (kim sw, 2015).

El fenotipo mesénquimal es una condición necesaria para la capacidad migratoria de las células tumorales. En el presente trabajo evaluamos el efecto de Ado sobre dicha capacidad, mediante ensayos de cierre de herida y ensayos en cámaras Transwell. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de Ado durante 48 horas incrementa de forma significativa la migración celular, efecto muy probablemente mediado por la activación del receptor A2B, ya que se ha reportado que el silenciamiento de este receptor en esta misma línea celular, inhibe la migración, invasión y crecimiento tumoral (Desment et al., 2013). De manera complementaria, el equipo de trabajo de Carola Ladderose en el 2016, observo que la velocidad de migración en esta línea celular disminuye de forma significativa al tratarlas con fármacos que reducen los

niveles de Ado extracelular, mientras que se ve incrementada al inhibir la degradación de Ado (Ladderose et al., 2016).

La condición de hipoxia favorece la expresión de factores angiogénicos, tales como HIF-1 α y VEGF, muy probablemente debido a la activación del receptor A2B. Esta hipótesis fue demostrada en el presente trabajo, donde la presencia de Ado induce un aumento en los niveles de expresión tanto del ARNm como de la proteína para HIF-1 α . La existencia de un efecto positivo de Ado sobre la acumulación de HIF-1 α ha sido demostrado en modelos celulares de cáncer de colon y glioblastoma en condiciones de hipoxia (Merighi et al., 2007; Merighi et al., 2006), sin embargo, Merighi y colaboradores no observaron este mismo efecto en condiciones de normoxia en un modelo de glioblastoma (Merighi et al., 2006), a diferencia de nosotros en las células MDA-MB 231, mantenidas en condiciones de normoxia, Ado si es capaz de incrementar la expresión de esta proteína. Se ha determinado ampliamente que HIF-1 α es un factor de transcripción que favorece la expresión del gen que codifica para VEGF, de manera sorprendente, en nuestras condiciones experimentales, la presencia de Ado extracelular y la consiguiente acumulación de HIF-1 α no causó un cambio significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para VEGF, sugiriendo la presencia de otros genes blanco para HIF-1 α que pudieran estar asociados con el potencial metastásico de las células tumorales.

El receptor A2B puede activar dos diferentes vías de señalización: a) AMPc/PKA y b) DAG/PKC, con el fin de correlacionar los efectos descritos de Ado con una de estas dos vías de señalización, procedimos a tratar las células MDA-MB 231 con forskolina (Fsk), un activador de la adenilato ciclasa, y por lo tanto de la vía AMPc/PKA. El tratamiento con Fsk a una concentración 10 μ M durante 48 horas ejerce efectos diferenciales con respecto a los observados en presencia de Ado, por ejemplo: a) no modifica la capacidad migratoria, b) induce un incremento en los niveles de expresión de tres factores de transcripción asociados a la transición epitelio-mesénquima (Snail 1, Snail2 y Zeb1), favoreciendo el fenotipo mesénquimal y c) Fsk si induce un incremento en la expresión del ARNm que codifica para VEGF, pero no en HIF-1 α . Estos resultados sugieren la participación de las dos vías de señalización de manera diferencial, por ejemplo, la vía AMPc/PKA está relacionada con el fenotipo mesénquimal, capacidad migratoria y la expresión de VEGF; mientras que la vía DAG/PKC pudiera estar influyendo sobre la expresión de HIF-1 α , para asegurar esto

último, tendríamos que realizar experimentos adicionales utilizando moduladores específicos de la vía DAG/PKC y evaluar los niveles de expresión de HIF-1 α .

Namkoong y colaboradores en el 2006 mostraron en células HUVEC que el tratamiento con 10 μ M de Fsk no fue capaz de modificar la expresión del ARNm de HIF-1 α , sugiriendo la participación de otra vía de señalización (Namkoong et al., 2006). Por su parte, Mizukami y colaboradores observaron que VEGF puede ser inducido por el oncogén K-ras de forma independiente de HIF-1 α en células de cáncer de colon, ya que la expresión de este factor de crecimiento era mantenida en condiciones de hipoxia aun con mutaciones en el elemento HRE en su sitio promotor o con el silenciamiento de HIF-1 α (Mizukami et al., 2004). Hasta la fecha se ha reportado que la activación aberrante del gen Ras es frecuente en diversos tipos cáncer como el de páncreas, colon y pulmón (Hanahan and Weinberg, 2011), en contraste, aunque la mutación del gen Ras es de baja incidencia en cáncer de mama (<5%), existe suficiente evidencia experimental que sugiere su participación en el desarrollo de este tipo de cáncer (Eckert et al., 2004). Adicionalmente, las células MDA-MB 231, se encuentran catalogadas como una línea celular que presenta la versión gen Ras mutado. Por lo que no se podría descartar la existencia de un mecanismo similar dependiente de la activación de AC.

Por último, evaluamos el efecto que ejerce Ado sobre la expresión del receptor A2B en células MDA-MB 231. Nuestros resultados muestran que la presencia de Ado durante 48 horas a una concentración 50 μ M es capaz de estimular la expresión del ARNm para este receptor, efecto mediado muy probablemente por HIF-1 α , ya que un análisis bioinformático de la secuencia promotora del gen *ADORA2B*, gen que codifica para el receptor A2B, se identificó un elemento responsivo a hipoxia (Material suplementario, Figura A), como lo reportado previamente por Eckle y colaboradores en 2018 (Eckle et al., 2018). La Ado a través de la activación de su receptor A2B favorece el potencial metastásico de las células MDA-MB 231, lo cual nos permite proponerlo como un blanco farmacológico para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

1 tagaacaatg gtgttggtga gggctgcaga agctgaggac ccacaggcag agagggaggg
61 atgtagaag caggtggtga ggagggactc gggcaggac ttgggggta aaaggaagca
121 agtctctgga agcagaacca gcagactgc tgatcattgg gacgtggaga aaggcgaagg
181 ctgagggtg cagcaactt ctaggggtg gtgagggtg ccaggtaac aacgaacagg
241 gtcccaggaa aaggcggcag cacaggttg gggagaatta gagatgagct tggtttgg
301 cttgttgat ttgggggac cagtctctt cctggcgaga gtcggcagtg ggggttagg
361 atctggcct caggaggctg ttagggtga agcaagat ttgggagta aggggtgag
421 **ggccacgtgg gaggcctcgg gacctgtgc** cgatccaggg tgagtgtgaa ggaaagaaa
481 aagagggccc ggggaacct ggtatttctc ggcgggtggac gaggatggga cggccacgag
541 cttgtctaa gtagaaggc agagcggggc ctagggggca gtggcgcggg cgagggtgga
601 gaacagcgt gagcctcgt gggaggcggc cggagggggc tgcagcccc gagggctcct
661 tgcagtccgg ccccgagcc tggagacagc tccggtggtg ctgcgctgcc cgagactgct
721 gcacgagcgg ggactgcggc ctcggctccc tgcctcccc gcagcccc atccagtgg
781 cctgcccggg gtgcgaggg ttagcctgga gtgactgc cccgcccggg gttgcgagg
841 cctgggggt cctctcggc cggctcctg gacctgtgg cggccggg agagcccggc
901 cccatcccag gactgccc gactggaagg cagtgcgagc actgggacac agcctccgag
961 ctgagcgtg acgggaagt ggggcaattt gtagttatc cgccgccacc aagacgcggc
1021 acggcgctg gaccggagg gccccgcgc ggcgcgaact ttgggctcgg gcgagtgggt
1081 ggtgctccgc ccagcccag acgggcgggc gcgcgggcca atgggtgcc cctctggcc
1141 gggggggcc ccgaccgtg ggtcccggc accagcccc cagccccgag gtcagaagc
1201 ggcaggcgga ggcggttcc gggcgtatg gccatgccc gcgggttca cgcggctgcc
1261 cctgcccgg cgcgcctcg gtagggggc cccggggccc agctggccc gccatgctg
1321 tggagacaca ggacgcgtg tacgtggcgc tggagctgt catgccgcg ctttcggtg
1381 cgggcaactg gctggtgtg gccgcgtgg gcacggcga cactctgag acgccacca
1441 actacttct ggtgtccctg

tgacgtc: HRE site. HIF-1a responsive element

BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Internacional para la investigación del cancer. World Cancer Report 2014.
2. American Cancer Society. 2017. ¿Qué es el cáncer de seno?. Recuperado el 11 de julio del 2017, de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>
3. American Cancer Society. 2017. Breast Cancer Risk Factors You Cannot Change. Recuperado el 19 de abril del 2017, de: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention/breast-cancer-risk-factors-you-cannot-change.html>
4. American Cancer Society. 2017. What is breast cancer in Men?. Recuperado el 6 de junio del 2017, de: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer-in-men/about/what-is-breast-cancer-in-men.html>
5. American Type Culture Collection, 2017. MDA-MB 231 (ATCC® HTB-26™) Recuperado el 26 de octubre del 2017, de: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx#characteristics>
6. Anders CK and Carey LA. 2009. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 9(9):73–81.
7. Aparicio OE. (2017). Papel del Oxido Nitrico (NO) y de las especies reactivas de nitrogeno (RNS) sobre el potencial metastasico de celulas tumorales de mama, MDA-MB 231.
8. Avalos R. (2017). Relevancia fisiológica del receptor α estrógenos β (Er β) sobre el potencial metastasico en la línea celular MDA-MB 231, proveniente de cáncer de mama.
9. Bahreyni A, Samani SS, Rahmani F, Behnam-Rassouli R, Khazaei M, Ryzhikov M, Parizadeh MR, Avan A and Hassanian SM. (2018). Role of adenosine signaling in the pathogenesis of breast cancer. *J cell physiol*. 233(3):1836-1843.
10. Beom-Ju Hong, Jeongwoo Kim, Hoibin Jeong, Seoyeon Bok, Young-Eun Kim and G-One Ahn. 2016. Tumor Hypoxia and reoxygenation: the yin and yang for radiotherapy. *Radiation Oncology Journal*. 34(4): 239-249.
11. Bilimoria MM and Morrow M. 1995. The woman at Increased Risk for Breast Cancer: Evaluation and Management Strategies. *CA CANCER J CLIN*. 45: 263-278.
12. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrío D, Locascio A, Cano A, Palacios J and Nieto MA. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. 21, 3241 \pm 3246.
13. Blay J, White TD and Hoskin DW. (1997) The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res*.57:2602–5.
14. Blay J, White TD, and Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 57: 2602–2605, 1997.
15. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller, M and Cano, A. (2002). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of Cell Science*. 116: 499-511.
16. Breast cáncer information and support. 2013 Cancer de mama triple negativo. Recuperado el 21 de junio del 2018, de http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/triple_negativo
17. Breast Cancer. 2017. Breast Cancer Risk Factors. Recuperado el 21 de abril del 2017, de: http://www.breastcancer.org/risk/factors/race_ethnicity
18. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR and Dewhirst MW. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Research*. 56:941-3.
19. Brown JM, Wilson WR. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 4:437-47.
20. Burnstock G. (2002). Potential Therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med JRCPL*. 2: 45-53.
21. Cancer Research UK, 2017. Worldwide cáncer mortality statistics. Recuperado el 19 de abril del 2017, de: <http://www.cancerresearchuk.org/healthprofessional/cancerstatistics/worldwidecancer#heading-One>
22. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*. 2: 76-83.
23. Carola L, Hefti MM, Chen Y, Bao Y, Seier T, Li L, Woehrle T, Zhang J and Junger WG. (2016). Adenosine arrest breast cancer cell motility by A3 receptor stimulation. *Purinergic Signal*.12(4):673-685.
24. Caroline W, Sven P and Bexell D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*. 164: 152-169.
25. Cell lines by gene mutations. Obtenido de: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Cell_Lines_by_Gene_Mutation.ashx
26. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva [CNEGSR], Secretaría de Salud [SSA]. 2014. Cáncer de mama. Recuperado el 18 de abril del 2017, de: http://cnegrs.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/cancermama/introduccion_CM.html
27. Chaffer CL and Weinberg RA. 2011. A perspective on cáncer cell metástasis. *Science*. 331: 1564-1559
28. Chavez KJ, Garimella SV and Lipkowitz S. 2010. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis*. 32(1-2): 35–48.

29. Chiavarina B, Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Howell A, Tanowitz HB, Pestell RG, Sotgia F and Lisanti MP. (2012). Metabolic reprogramming and two- compartment tumor metabolism. Opposing role(s) of HIF-1 α and HIF-2 α in tumor-associated fibroblasts and human breast cancer cells. *Cell Cycle*. 11(17): 3280-3289.
30. Chou YS and Yang MH. (2015). Epithelial- mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy. *Journal of Chinese medical association*. 78: 438-445.
31. Comijin J, Bex G, Varmassen P, Verschuere K, Grunsvan L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroek D and Roy F. (2001). The Two-Handed E box binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and induces invasion. *Molecular Cell*. (7): 1267-1278.
32. Cronstein BN and Sitkovsky M. (2017). Adenosine and Adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *13* (1): 41-51.
33. Custódio-Santos T, Videira M, MA Brito. 2017. Brain metastasization of breast cancer. *1868*: 132-147.
34. De Craene B and Bex G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 13 (2) 97-110.
35. Decking UK, Schlieper G, Kroll K and Schrader J. (1997). Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ. Res*. 81: 154–164.
36. Decking UK, Schlieper G, Kroll K and Schrader J. (1997). Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res* 1997; 81: 154±164. PMID: 9242176
37. Desmet CJ, Gallen T, Prieur A, Reyat F, Visser NL, Wittner BS, Smit MA, Geiger TR, Laoukili J and Iskit S. (2013). Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(13):5139-5144.
38. Eales KL, Hollinshead KER and Tennant DA. 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Review. Oncogenesis*. 5: 1-8
39. Eckert LB, Repasky GA, Ulku AS, McFall A, Zhoy H, Sartor CL and Der CJ. (2004). Involvement of Ras activation in Human Breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Res*. 64(13):4585-4592.
40. Eltzschig HK, Kohler D, Eckle T, Kong T, Robson SC and Colgan SP. (2009). Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood*. 113: 224–232.
41. Eltzschig HK. (2009). Adenosine: An old drug newly discovered. *Anesthesiology*. 111(4):904-915.
42. Fernandez-Gallardo M, Gonzalez-Ramirez R, Sandoval A, Felix R and Monjaraz E. (2016). Adenosine stimulate proliferation and migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PlosOne*. 11(12): e0167445
43. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong S, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V and Gao D. (2015). EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*. 527(7579): 472–476
44. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN and Linden J. (2001). Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors, International. *Union of Pharmacology*. 53(4): 527–552. (ARTICULO a)
45. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Linden J and Muller CE. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacol Rev* 63(1):1–34
46. Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. (2001). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol*. 61(4):443–448. (ARTICULO b)
47. Fredholm BB. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*. 14:1315–1323.
48. Fredholm BB. (2014). Adenosine- a physiological or pathophysiological agent?. *J Mol Med*. 92(3): 201-6.
49. Garg M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition—activating transcription factors—multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*. (5):188–95
50. Gheldof A, Hulpiau P, Roy F, De Craene B and Bex G. (2012). Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cell and molecular Life Sciences*. (69): 2527- 2541.
51. Gilkes D. 2016. Implications of Hypoxia in Breast Cancer Metastasis to Bone. *Review. International Journal of Molecular Sciences*. 17.
52. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, and Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 49: 227–231, 1987.
53. Hajiahmadi S, Panjehpour M, Aghaei M and Shabani M. (2015). Activation of A2b adenosine receptor regulates ovarian cancer cell growth: involvement of Bax/Bcl-2 and caspase-3. *Biochem Cell Biol*. 93(4):321-329.
54. Hammond EM and Giaccia AJ. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 and p53: friends, acquaintances, or strangers?. *Clin Cancer Research*. 12:5007-9.
55. Hanahan D and Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):647-674.
56. Hasko G, Linden J, Cronstein B and Pacher P. (2008). Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7(9):759–770.
57. Holliday D. and Speirs V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Review. BioMed Central*. 13:215.
58. Huang LE and Bunn HF. (2003). Hypoxia-Inducible Factor and Its Biomedical Relevance. *Minireview. The Journal of Biological Chemistry*. 278(22): 19575-19578.

59. Imai T, Horiuchi, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T and Konishi I. (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol.* 163: 1437–1447.
60. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2017). Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero).
61. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2017. Recuperado el 25 de abril del 2017, de: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
62. Instituto Nacional del Cáncer. 2017. Tratamiento del Cáncer de seno. Recuperado el 11 de julio del 2017, de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>
63. Joseph JP, Harishankar MK, Pillai AA and Devi A. (2018). Hypoxia induced emt: a review of the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. 80: 23-32.
64. Kalluri R and Weinberg RA. (2009). The basics of epithelial- mesenchymal transition. *The Journal of clinical Investigation.* 119: 1420-1428
65. Keith B and Simon MC. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Review. Cell.* 129: 465–472.
66. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH and Semenza GL. (2006). Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of Ecadherin in von Hippel–Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B. *Cancer Reserch.* 66: 2725–2731.
67. Lamouille S, Xu J and Derynck R. (2014). Molecular Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(3): 178–196.
68. Layland J, Lee M and Oldroyd K. (2014). Adenosine. *Cardiovascular interventions.* 7(6): 581-91.
69. Lazarowski ER. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* 8(3):359–373.
70. Li NY, Weber CE, Mi Z, Wai PY, Cuevas BD and Kuo PC. (2013). Osteopontin Up-regulates critical Epithelial-Mesenchymal Transition Transcription Factors to Induce an Aggressive Breast Cancer Phenotype. *J Am Coll Surg.* 217(1): 17-26.
71. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN and Pusztai L. 2008. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 26(8): 1275-1281.
72. Liu TZ, Wang X, Bai YF, Liao HZ, Qiu SC and Yang YQ. (2014). The HIF-2alpha dependent induction of PAP and adenosine synthesis regulates glioblastoma stem cell function through the A2B adenosine receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 49:8-16.
73. Liu Y, Nguyen N and Colditz GA. 2015. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Review. Women’s Health.* 11(1): 65-77.
74. Lu Y, Chu A, Turker MS and Glazer PM. (2011). Hypoxia-induced epigenetic regulation and silencing of the BRCA1 promoter. *Molecular Cell Biology.* (31): 3339–3350.
75. McPherson K, Steel CM and Dixon JM. 2000. Breast cancer- epidemiology, risk factor, and genetics, clinical review. *BJM.* 321: 624-628.
76. Meidhof S, Brabletz S, Lehmann W, Preca BT, Mock K, Ruh M, Schuler J, Berthold M, A Weber, Burk U, Lubbert M, Puhf M, Culig Z, Wellner U, Keck T, Bronsert P, Kusters P, Hopt UT, Stemmler MP and Brabletz T. (2015). ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Molecular Medicine.* 7: 831-847.
77. Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Simioni C, Leung E, MacLennan S, Baraldi PG and Borea PA. (2007). Caffeine Inhibits Adenosine-Induced Accumulation of Hypoxia-Inducible Factor-1, Vascular Endothelial Growth Factor, and Interleukin-8 Expression in Hypoxic Human Colon Cancer Cells. *Molecular Pharmacology.* 72(2): 395-406.
78. Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O and Chung DC. (2004). Hypoxia-inducible factor-1- independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res.* 64(5):1765-1772.
79. Moody SE, Perez D, Pan T, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD and Chodosh LA. (2005). The transcriptional repressor Snail Promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell.* 8: 197–209.
80. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S and Puisieux A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *Plos One.* 3(8): 2888.
81. Mouttet D, Lae M, Caly M, Gentien D, Carpentier S, Peyro-Saint-Paul H, Vincent-Salomon A, Rouzier R, Sigal-Zafrani B, Sastre-Garau X and Reyat F. 2016. Estrogen-receptor, progesterone-receptor and HER2 status determination in invasive breast cancer. *PLoS One.* 11(2).
82. National Cancer Institute[NCI]. Dictionary of Cancer Terms. Recuperado el 20 de junio del 2018, de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-metastatico>
83. National Breast and Ovarian Cancer Centre [NBOCC]. 2009. Breast cancer risk factors: a review of the evidence.
84. National Breast Cancer Foundation. 2016. Breast Anatomy. Recuperado el 6 de junio del 2017, de: <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>
85. National Cancer Institute. 2015. What is cancer?. Recuperado el 18 de abril del 2017, de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

86. National Cancer Institute. 2017. Cancer Statistics. Recuperado el 19 de abril del 2017, de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
87. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Diario Oficial de los Estados Unidos Mexicanos, 9 de junio del 2011.
88. Organización Mundial de la Salud. 2017. Cáncer. Recuperado el 18 de abril del 2017, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
89. Organización Panamericana de la Salud [OPS], Organización Mundial de la Salud [OMS]. 2017. Prevención: Breast cancer risk factors and prevention.
90. P Vupel, Kschlenger and C Knoop. (1991). Oxygenation of human Tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast caners by computerized O2 tension measurements. *Cancer Research*. 51(12):3316-22.
91. Peinado H, Olmeda D and Cano A. (2007). Snail, ZEB and bHLH factors in tumor progression: an Alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Reviews*. 7:415-428.
92. Poth JM, Brodsky K, Ehrentraut H, Grenz A and Eltzsching HK. (2013). Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic of inflammatory disease. *91 (2):183-193*.
93. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S and Ansieau S. (2006). A twist for survival and cancer progression. *British Journal of cancer*. 94(1): 13-17
94. Ruiseco K. (2015). La activación del receptor "Toll-like4" (TLR-4) por lipopolisacárido (LPS) estimula la capacidad proliferativa y migratoria en células MDA-MB 231, provenientes de cáncer de mama.
95. Saito M, Yaguchi T, Yasuda Y, Nakano T and Nishizaki T. (2009). Adenosine suppresses XW2 human colon cancer growth by inducing apoptosis via A(1) adenosine receptors. *Cancer Lett*. 290 (2): 211-215.
96. Sánchez T, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A and Postigo A. (2011). Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *American Journal of Cancer Reserch*. 1 (7):897-912.
97. Sánchez Tilló E, Liu Y, de Barrios O, Siles L, Fanlo L, Cuatrecasas M, Darling DS, Dean DC, Castells A and Postigo A. (2012) EMT- activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and molecular life sciences*.69(20): 3429-3456.
98. Seitz HK, Pelucchi C, Bagnardi V and La Vecchia C. 2012. Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer. *Alcohol and Alcoholism*. 47(3): 204-212.
99. Semenza GL. 2010. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Review. Oncogene*. 29:625-634.
100. Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 359: 843-845.
101. Siebzehnubl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnubl D, Sarkisian MR, Devers KG, Yachnis AT, Kupper MD, Neal D, Nabils NH, Kladde MP, Suslov O, Brabletz S, Brabletz T, Reynolds BA and Steindler DA. (2013). The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Molecular Medicine*. 5: 1196-1212.
102. Sigma-Aldrich. 2017. MDA-MB 231 Cell line human. Recuperado el 9 de junio del 2017, de: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/92020424?lang=es®ion=MX>
103. Singh M, Yelle N, Venugopal C and Singh SK. (2017). EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacology and Therapeutics*. (17): 30219-X.
104. Span PN and Bussink J. 2015. Biology of Hypoxia. *Seminars in nuclear medicine*. 45: 101-109.
105. Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A and Mitchell BS. (2004) Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'- nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(2):708-717.
106. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, et al. (2002). Ecto-50-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest*. 110:993-1002.
107. Thiery JP and Sleeman JP (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 131-142.
108. Thiery JP, Acloque H, Huang RY and Nieto M. (2009). Epithelial- mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139: 871-890.
109. Tran DD, Corsa CA, Biswas H, Aft RL and Longmore GD. (2011). Temporal and Spatial Cooperation of Snail1 and Twist1 during Epithelial-Mesenchymal Transition Predicts for Human Breast Cancer Recurrence. *Angiogenesis, Metastasis, and the Cellular Microenvironment*. *Mol Can Res*. 9(12):1644-1657.
110. Tsai PC, Fu YS, Chang LS and Lin SR. (2016). Taiwan cobra cardiotoxin III suppresses EGF/EGFR-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of human breast cancer MDA-MB 231 cells. *Toxicon*. 111:108-120.
111. Van Wylen DG, Willis J, Sodhi J, Weiss RJ, Lasley RD, and Mentzer RM Jr. Cardiac microdialysis to estimate interstitial adenosine and coronary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 258: H1642-H1649, 1990.
112. Vaupel P and Mayer A. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Review. Cancer Metástasis*. 26: 225-239.
113. Vaupel P, Hockel M and Mayer A. 2007. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO2 histography. *Antioxidants and Redox Signal* 1221-1235.

114. Vicent S, Luis-Ravelo D, Antón I, Hernández I, Martínez S, de las Rivas J, Gúrpide A and Lecanda F. 2006. Las metástasis oseas del cáncer. *An. Sist. Sanit. Navar.* 29 (2): 177-188.
115. Walsh J, Lebedev A, Aten E, Madsen K, Marciano L and Kolb HC. 2014. The clinical importance of assessing Tumor Hypoxia: Relationship of Tumor Hypoxia to Prognosis and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants and Redox Signal.* 21(10).
116. Wang L, Zhou X, (2008) Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:365–372.
117. Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao ZG and Jacobson KA. (2013). A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Purinergic Signal.* 9(2):271-280.
118. WEIGELT B, PETERSE JL and VAN 'T VEER LJ.2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 5: 591-602.
119. Weissmuller T, Campbell EL, Rosenberger P, Scully M, Beck PL, Furuta GT and Colgan SP. (2008). PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis *via* epithelial cell-expressed ecto-NTPDases. *J Clin Invest.* 118:3682–3692.
120. Wu Y, Sarkissyan M and Vadgama JV. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer, Review. *Clinical Medicine.* 5: 1-18.
121. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang, SY, Liu CJ and Wu KJ. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature Cell Biology.* 10: 295–305.
122. Yang Q, Huang J, Wu Q, Cai, Y, Zhu L, Lu X, Chen S, Chen C and Wang Z. (2014). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition is associated with Skp2 expression in paclitaxel-resistant breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* 110: 1958–1967.
123. Zhang W, Feng M, Zheng G, Chen Y, Wang X, Pen B, Yin J, Yu Y and He Z. (2012) Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 679–685.
124. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS and Kalluri R. (2015). Epithelial to mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 527: 525-530.