

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Efecto antiproliferativo, antimigratorio y antiangiogénico del  
AG1024 y el 5-fluorouracilo para las líneas MCF-7 y  
MDA-MB-231 de cáncer de mama**

**TESIS**

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER  
EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

Q.F.B. Paloma Ríos Medina

**DIRIGIDA POR:**

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

**QUERÉTARO  
JULIO DE 2023  
MÉXICO**



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto antiproliferativo, antimigratorio y  
antiangiogénico del AG1024 y el 5-fluorouracilo para  
las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama

**por**

Paloma Ríos Medina

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-221506



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Efecto antiproliferativo, antimigratorio y antiangiogénico del  
AG1024 y el 5-fluorouracilo para las líneas MCF-7 y  
MDA-MB-231 de cáncer de mama**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

Q.F.B. Paloma Ríos Medina

**DIRIGIDA POR:**

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

COMITÉ TUTORAL

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Presidente

\_\_\_\_\_

M. en C. Alejandra Ramírez Muñoz  
Secretario

\_\_\_\_\_

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Vocal

\_\_\_\_\_

Dra. Guadalupe García Alcocer  
Suplente

\_\_\_\_\_

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo  
Suplente

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Ciencias Químicas

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

## DEDICATORIA

A mi novia

Tus palabras de aliento y tus abrazos reconfortantes me impulsaron a superar cada obstáculo que se interponía en mi camino. Desde el inicio, cuando dudaba de mis habilidades y me sentía abrumada por la carga académica, tú estuviste a mi lado, infundiéndome en mí la confianza y el coraje necesario para seguir adelante.

A mi madre

Cada vez que sentí que el peso del proyecto se volvía abrumador, tú aparecías con tu sonrisa radiante y me recordabas que los sueños se alcanzaban a través de la perseverancia. Tus palabras de aliento se intensifican en mi motor, impulsándome hacia la meta que ahora he alcanzado.

Gracias a ambas por creer en mí cuando a veces dudaba de mis propias capacidades. Su fe en mis habilidades me ha permitido descubrir fortalezas que desconocía tener. Este logro no sería posible sin su valioso respaldo, y quiero que sepan que te estaré eternamente agradecida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías CONAHCYT por el financiamiento económico para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro que me ha acogido desde mi bachillerato hasta mi maestría y por su respaldo académico.

A la dra. Jesica Escobar, por su apoyo académico y emocional durante estos años. Su guía experta, pasión y apoyo incondicional han sido invaluable para mi crecimiento.

A la maestra Alejandra Ramírez, por tu apoyo y motivación constante para continuar con este proyecto. Tu confianza en mis habilidades y tu aliento han sido fundamentales para mi perseverancia.

A la dra. Guadalupe García, por su apoyo constante y entusiasmo que han sido una fuente de inspiración y motivación para alcanzar mis metas académicas.

A la dra. Laura Berumen, por su valiosa ayuda académica durante este proyecto. Su orientación, paciencia y dedicación han sido fundamentales para mi crecimiento como investigadora.

A la dra. Irasema Mendieta, por compartir tus conocimientos y brindarme herramientas necesarias para alcanzar el éxito en este proyecto.

A mis amigas Lupita y Mireya, por todo su apoyo incondicional que me han brindado durante los momentos estresantes. Saber que siempre puedo contar con ustedes me ha dado la fuerza necesaria para seguir adelante.

A mi novia y mi madre, por su amor incondicional y su constante motivación. Gracias por ser mis pilares y recordarme que no estoy sola en esta travesía.

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Pag</b>
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ACRÓNIMOS.....	
RESUMEN.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Cáncer.....	2
2.2 Procesos involucrados en la progresión del cáncer.....	3
2.2.1 Migración.....	4
2.2.2 Metástasis.....	4
2.2.3 Angiogénesis.....	4
2.3 Cáncer de mama.....	5
2.3.1 Epidemiología del cáncer de mama.....	5
2.3.2 Anatomía de la mama.....	5
2.3.3 Etapas del cáncer de mama.....	6
2.3.4. Factores del riesgo de cáncer de mama.....	7
2.3.5 Tipos de cáncer de mama.....	7
2.3.6 Medicamentos para el tratamiento de cáncer de mama.....	8
2.3.6.1 Alternativas novedosas para el tratamiento de cáncer de mama	9
2.4 El IGF-1 y el cáncer de mama.....	9
2.5 AG1024.....	11
2.6 5-Fluorouracilo .....	12
2.7 Modelo de la Membrana Corioalantoidea (CAM) para la evaluación de la angiogénesis .....	14
2.7.1 Características del modelo CAM.....	14
2.7.2 Ventajas del modelo CAM.....	15
2.7.3 Desventajas del modelo CAM .....	15
2.7.4 Aplicaciones del modelo CAM en estudios de cáncer humano.....	15

3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	19
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 Objetivo general.....	20
6.2 Objetivos específicos.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1 Cultivo celular.....	21
7.2 Ensayo de proliferación celular.....	21
7.3 Ensayo de herida.....	22
7.4 Modelo de la Membrana Corioalantoidea (CAM).....	22
7.4.1 Incubación de huevos .....	23
7.4.2 Implantación de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 a través de un xenoimplante en la CAM.....	23
7.4.3 Modelo CAM para angiogénesis.....	24
7.5 Análisis Estadístico.....	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1 Ensayo de proliferación celular.....	24
8.2 Ensayo de migración celular.....	28
8.3 Modelo CAM para evaluación de la angiogénesis.....	33
9. DISCUSIÓN.....	38
9.1 Evaluación de la proliferación celular mediante el conteo de azul tripano.....	38
9.2 Evaluación de la migración celular mediante el ensayo de herida.....	44
9.3 Evaluación de la angiogénesis mediante el modelo CAM.....	50
10. CONCLUSIONES.....	56
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
12. ANEXOS.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1. Diagrama de la anatomía de la mama humana sana.....	6
2. Esquema del metabolismo del 5-FU .....	13
3. Curva concentración-respuesta del 5-FU en la proliferación de células MCF-7 con 24 h de tratamiento.....	25
4. Efecto del IGF-1, AG1024, 5-FU y en combinación en la proliferación de células MCF-7 con 24 h de tratamiento.....	26
5. Curva concentración-respuesta del 5-FU en la proliferación de células MCF-7 con 24 h de tratamiento.....	27
6. Efecto del IGF-1, AG1024, 5-FU y en combinación en la proliferación de células MDA-MB-231 con 24 h de tratamiento.....	27
7. Micrografías del ensayo de herida para las células MCF-7 expuestas a IGF-1, AG1024, 5-FU, y en combinación.....	29
8. Efecto del IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración celular de MCF-7.....	30
9. Efecto del IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración celular de MDA-MB-231.....	31
10. Micrografías del ensayo de herida para las células MDA-MB-231 expuestas a IGF-1, AG1024, 5-FU, y en combinación.....	32
11. Fotografías de los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo injertados con células MCF-7 tratadas con IGF-1, AG1024, y 5-FU.....	34
12. Efecto del IGF-1, AG1024, y el 5-FU sobre la angiogénesis de las células MCF-7.....	35
13. Fotografías de los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo injertados con células MDA-MB-231 tratadas con IGF-1, AG1024, y 5-FU.....	36
14. Efecto del IGF-1, AG1024, y el 5-FU sobre la angiogénesis de las	37



células MDA-MB-231.....	
15. Micrografías del ensayo herida para las células MCF-7. Se muestra el efecto de IGF-1 sobre la migración en la línea MCF-7 a las 0, 6, 12 y 24 h de exposición.....	74
16. Efecto del IGF-1 sobre la migración celular de MCF-7.....	74
17. Micrografías del ensayo herida para las células MDA-MB-231.....	75
18. Efecto del IGF-1 sobre la migración celular de MDA-MB-231.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1. Categoría de subtipos de cáncer de mama.....	8

## ACRÓNIMOS

<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina-1
<b>IGF-1R</b>	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina-1
<b>IGFBP</b>	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>AG1024</b>	Tirfostina AG 1024
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>HER2</b>	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>TN</b>	Triple negativo
<b>5-FU</b>	5-Fluorouracilo
<b>CAM</b>	Modelo de la membrana corioalantoidea de pollo

## RESUMEN

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) es una hormona liberada por el hígado, que cuando se une al receptor de IGF-1 (IGF1-R) activa diversas vías de señalización, dando como efectos importantes la proliferación celular, migración, y angiogénesis, a su vez, se ha observado que el IGF-1 se encuentra sobreexpresado en el cáncer de mama. El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en las mujeres a nivel mundial y en México, en el año 2020 se registraron alrededor de 2.2 millones de decesos por esta enfermedad. El antagonista del IGF-1, AG1024, obstruye al IGF-1R y a su vez bloquea la cascada de señalización, por lo que podría ser un objetivo para un potencial tratamiento contra el cáncer de mama. Por otro lado, el 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco ampliamente utilizado en diversos tipos de cáncer, sin embargo, su principal efecto adverso es la quimioresistencia. El objetivo de esta investigación fue observar si el AG1024 tiene un efecto antiproliferativo, antimigratorio y antiangiogénico y, además, si este efecto se ve aumentado por el uso en conjunto con el 5-FU en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 en modelos *in vitro* (conteo por azul de tripano y ensayo de herida) e *in vivo* utilizando un modelo de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM). Se obtuvo que en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, el IGF-1 tuvo efecto proliferativo, pro migratorio y pro angiogénico a concentraciones de 100 ng/mL y 150 ng/mL, respectivamente; el AG1024 tuvo un efecto antiproliferativo, antimigratorio y antiangiogénico a 10  $\mu$ M y 15  $\mu$ M, respectivamente; y el 5-FU solo presentó efecto antiproliferativo a 52.51  $\mu$ M y 299.1  $\mu$ M respectivamente y no mostró sinergismo con el AG1024 para ninguno de los efectos evaluados en este proyecto. El AG1024 tuvo la capacidad de inhibir los efectos del IGF-1R en presencia de su ligando natural, el IGF-1. Los resultados reportados en este proyecto contribuirán en la caracterización de los efectos anticancerígenos del AG1024, como molécula prometedora para desarrollar terapias innovadoras contra el cáncer de mama.

**Palabras clave:** IGF-1, IGF-1R, AG1024, 5-FU, cáncer de mama, angiogénesis, modelo CAM.

## ABSTRACT

Insulin-like growth factor (IGF-1) is a hormone released by the liver, when this molecule is bound to the IGF-1 receptor (IGF1-R) it activates various signaling pathways that promotes important effects as cell proliferation, migration angiogenesis and metastasis. It has been observed that IGF-1 is over-expressed in breast cancer. Breast cancer is the most common type of cancer worldwide and in Mexico in women. Around 2.2 million deaths were registered in 2020. The IGF-1 antagonist, AG1024, blocks IGF-1R and the signaling cascade, so it might be proposed as a target for a potential treatment against breast cancer. On the other hand, 5-fluorouracil (5-FU) is a widely used drug in various types of cancer, however, drug resistance is known as the main adverse effect. The aim of this work was to observe if AG1024 has an antiproliferative, antimigratory and antiangiogenic effect and, furthermore, if this effect is increased in combination with 5-FU in MCF-7 and MDA-7 breast cancer cells in *in vitro* (quantification by trypan blue and wounding healing assay) and *in vivo* models using a chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model. The results showed that in MCF-7 and MDA-MB-231 lines, IGF-1 has a proliferative, pro-migratory and pro-angiogenic effect at concentrations of 100 ng/mL and 150 ng/mL, respectively; AG1024 has an anti-proliferative, antimigratory and antiangiogenic effect at 10  $\mu$ M and 15  $\mu$ M, respectively; and 5-FU only presented antiproliferative effect at 52.51  $\mu$ M and 299.1  $\mu$ M respectively. In addition, it did not show synergism with AG1024 for any of the effects evaluated in this work. AG1024 had the ability to inhibit the effects of IGF-1R in the presence of its ligand, IGF-1. The results reported in this project will contribute to the characterization of the anticancer effects of AG1024, as a molecule to develop innovative therapies against breast cancer.

**Keywords:** IGF-1, IGF-1R, AG1024, 5-FU, breast cancer, angiogenesis, CAM model.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad donde un grupo de células se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos (Alberts, 2015). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo (OMS, 2020). El cáncer de mama se ubica en el quinto lugar de tipos de cáncer más mortales (IARC, 2018) y ocupa el primer lugar en mortalidad en la mujer tanto de países desarrollados como en los países en desarrollo (OMS, 2019). El cáncer de mama se desarrolla cuando se conjugan diversos factores de riesgo, como el historial familiar, factores reproductivos, la exposición al estrógeno, el estilo de vida, entre otros (Yi-Shen y col., 2017). Existen diversos medicamentos quimioterapéuticos para combatir el cáncer de mama, sin embargo, algunos de éstos no son selectivos, ocasionando una variedad de efectos secundarios que deterioran la calidad de vida de las pacientes y que en su mayoría, no logran detener la progresión del cáncer. Una nueva estrategia para combatir el cáncer de mama es la inhibición del receptor de IGF-1R. Estudios recientes en modelos animales se ha demostrado que el IGF-1 está involucrado en los procesos de angiogénesis. Esta investigación propone el uso de la tirfostina AG 1024 (AG1024), un inhibidor del receptor de IGF-1R que actúa inhibiendo la autofosforilación de los receptores tirosin cinasa, para evaluar su capacidad inhibitoria en la proliferación, migración y angiogénesis de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 en el modelo de CAM.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer

El cáncer se caracteriza por la adquisición de capacidades funcionales por parte de las células durante su transición de estados de crecimiento normales a neoplásicos, que son esenciales para el desarrollo de tumores malignos (Hanahan, 2022). El cáncer se refiere dentro de un grupo de condiciones fisiopatológicas más mortales y diagnosticadas en todo el mundo, las condiciones de la enfermedad se caracterizan comúnmente por una proliferación celular sin restricciones y vías de senescencia replicativa disfuncionales (ACS, 2019). Pese a la rigurosidad de las vías de control del ciclo celular que involucran ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, los defectos genéticos observados en estas moléculas son características comunes de las células cancerosas (Diori y Sanlier, 2021).

La principal causa de muerte en todo el mundo es el cáncer, con casi 10 millones de defunciones en población adulta (NIH, 2021). Los cánceres más importantes en 2020 de acuerdo con la OMS (2022), según el número de casos nuevos en ambos sexos y la mortalidad son:

- De mama (2.26 millones de casos, 684,996 defunciones);
- De pulmón (2.21 millones de casos, 1.8 millones de defunciones);
- Colorrectal (1.93 millones de casos, 935,173 defunciones);
- Gástrico (1.09 millones de casos, 768,793 defunciones);
- Hepático (905,677 de casos, 830,130 defunciones);

El cáncer es una enfermedad de múltiples etapas, con el desarrollo patológico de un tumor precanceroso a un tumor maligno. Los cambios ocurren debido a la interacción entre factores genéticos y factores externos (OMS, 2022):

- La radiación ultravioleta o ionizante (carcinógenos físicos).
- Las sustancias presentes en el humo del cigarro, las aflatoxinas en los alimentos, y el arsénico en el agua potable (carcinógenos químicos).
- Algunos parásitos, virus y bacterias (carcinógenos biológicos).

La acumulación de factores de riesgo para ciertos tipos de cáncer conduce a un aumento en la incidencia del cáncer a medida que las personas envejecen. Con el paso de la edad, se pierde la eficiencia en los mecanismos de reparación celular. El riesgo de cáncer y otras enfermedades no transmisibles también está influenciado por el tabaco, el consumo de alcohol, la baja actividad física, los malos hábitos alimenticios y la contaminación del ambiente (Ferlay y col., 2020).

Además, se ha establecido que ciertas infecciones crónicas están predispuestas a una mayor incidencia de cáncer en la población, particularmente en países en desarrollo y de bajos ingresos (de Martel y col., 2020). De acuerdo con la OMS (2020), la mayoría de los casos diagnosticados de cáncer en todo el mundo en 2018 fueron causado por infecciones por *Helicobacter pylori*, virus de la hepatitis B y C, virus del papiloma humano, y el virus de Epstein-Barr.

## 2.2 Procesos involucrados en la progresión del cáncer

A medida que se desarrolla la enfermedad del cáncer, las células malignas adquieren características distintivas, que son comunes en todos los tipos de cánceres. Las diez habilidades biológicas que adquiere el cáncer durante su desarrollo se enumeran a continuación (Hanahan, 2022):

- Señales de proliferación constantes.
- Mecanismo para evadir las señales de anticrecimiento.
- Evasión de la muerte celular.
- Establecimiento de la inmortalidad replicativa.
- Angiogénesis constante.
- Migración local e invasión a otros tejidos a distancia.
- Senescencia celular.
- Plasticidad fenotípica.
- Microbiomas polimórficos
- Reprogramación epigenética no mutacional.

### 2.2.1 Migración

Se entiende por migración celular al proceso por el cual las células cambian su localización de una región a otra por medio de mecanismos de adhesión propios (Trepap y col., 2012). En el organismo adulto, la migración celular es necesaria para una adecuada respuesta inmunitaria, la cicatrización de las heridas y la homeostasis tisular; sin embargo, también está implicado en el avance de células malignas y por ende, favorece la metástasis celular ocasionando una menor supervivencia en pacientes cuyo cáncer continúa en progresión (Trepap y col., 2012).

### 2.2.2 Metástasis

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer (NIH) se considera metástasis al proceso por el que las células cancerosas se diseminan a otras partes del cuerpo (NIH, 2020), por lo que este concepto difiere con la migración, pues en esta última las células cancerígenas se mantienen de manera local mientras que en la metástasis las células invaden tejidos lejanos. La transición epitelial-mesenquimal (EMT) y las células iniciadoras tumorales (CSC) son los principales factores que contribuyen a la metástasis de las células tumorales. En consecuencia, las vías de señalización implicadas en ambos procesos son dianas terapéuticas apropiadas en el tratamiento de la metástasis (Babaei y col., 2021).

### 2.2.3 Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes formados en la etapa temprana de la vasculogénesis. La angiogénesis juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, ya que permite el suministro de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento, así como la diseminación del tumor a órganos distantes (Al-Ostoot y col., 2021). En ausencia del soporte vascular, los tumores pueden volverse necróticos o incluso apoptóticos (Zhang y col., 2020). Como resultado, la angiogénesis es un factor crítico en la tumorigénesis. Además, la angiogénesis no solo es necesaria para que el cáncer se desarrolle e invada los tejidos circundantes, sino que también es necesaria para los procesos de metástasis. Las células cancerosas necesitan llevar nuevos vasos sanguíneos para mantener su



crecimiento en sus nuevas ubicaciones para poder migrar y establecer un nuevo lugar (Zhang y col., 2020).

## 2.3 Cáncer de mama

### 2.3.1. Epidemiología del cáncer de mama

Dentro del género femenino, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en México y en el mundo. En el año 2020 se registraron más de 2.2 millones de casos a nivel global y cerca de 685 mil pacientes fallecieron como consecuencia de esta enfermedad (OMS, 2021).

En México, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres. Durante los últimos años se ha presentado un aumento en el número de muertes por esta enfermedad, generalmente debido a que no se da el tratamiento inmediato después del hallazgo de un posible síntoma de cáncer de mama, o por la espera de recibir el diagnóstico definitivo (INSP, 2020). En el 2020, en nuestro país se reportaron 29 mil 929 casos nuevos y 7 mil 931 defunciones por este tipo de cáncer (Secretaría de Salud, 2020).

### 2.3.2 Anatomía de la mama

El seno está conformado por tejido adiposo y tanto la mujer como el hombre tienen senos. Los senos femeninos contienen mayor proporción de tejido glandular que los del hombre. La mama femenina abarca alrededor de 12 a 20 lóbulos que se dividen en lóbulos más pequeños llamados lobulillos. Todas estas estructuras están conectadas a través de conductos lácteos. El tejido adiposo de la mama está innervado a una serie de nervios, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, ganglios linfáticos y también está compuesto por tejido conjuntivo fibroso y ligamentos (Figura 1) (NBCF, 2019).

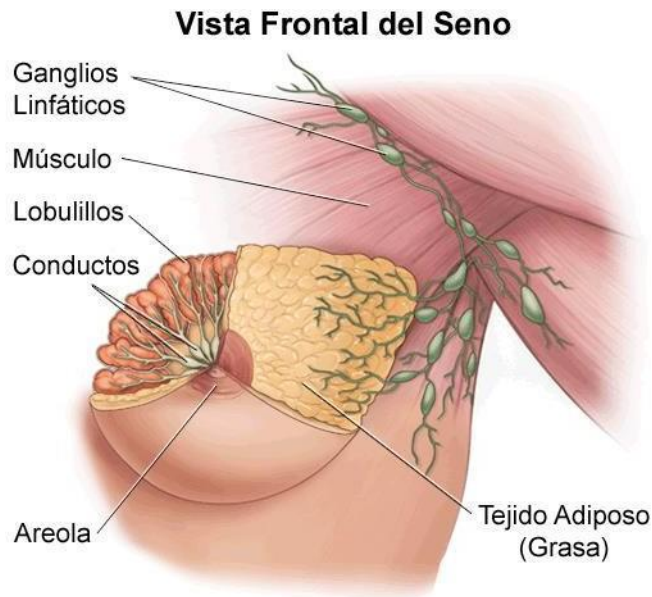


Figura 1. Diagrama de la anatomía de la mama humana sana (Stanford Children's Health, 2022).

### 2.3.3 Etapas del cáncer de mama

Las etapas del cáncer de mama dependen del tamaño, el tipo de tumor, y de la proporción de células malignas que han penetrado en el tejido mamario. En la etapa 0 no hay invasividad del tumor, es decir, las células cancerosas se mantienen localizadas en una zona dentro de los límites de la mama en la que el tumor comienza a crecer; a este estadio se le conoce como carcinoma de células ductales *in situ* (Akram y col., 2017).

La etapa 1 tiene dos categorías: la 1A donde el tumor mide hasta 2 cm y no involucra a los ganglios linfáticos y la 1B donde el cúmulo de células cancerosas no sobrepasa los 0.2 mm localizados en los ganglios linfáticos (Moran y col., 2014).

La etapa 2 también posee dos categorías: en el estadio 2A el tumor mide no más de 5 cm y se encuentra en los ganglios linfáticos, mientras que en el estadio 2B el tumor puede medir más de 5 cm sin ubicarse en los ganglios linfáticos (Moran y col., 2014).

La etapa 3 se divide en tres estadios: el 3A es aquél donde no se encuentra el tumor en la mama, pero sí en 4 a 9 ganglios linfáticos; en el estadio 3B el tumor puede ser de cualquier tamaño y ha causado hinchazón o úlcera en la mama, asimismo, puede situarse en hasta 9 ganglios linfáticos; en el estadio 3C el tumor puede ocasionar los síntomas anteriores y diseminarse en más de 10 ganglios linfáticos (Neuman y col., 2010).

La etapa 4 pertenece al estadio avanzado y metastásico del cáncer, donde este se propaga a otros órganos como los pulmones, el hígado, el cerebro, los huesos, entre otros (Neuman y col, 2010).

#### 2.3.4. Factores de riesgo de cáncer de mama

Al igual que otros tipos de cáncer, existen distintas causas que aumentan la posibilidad de desarrollar cáncer de mama. El daño al ADN y la alteración hereditaria que puede conducir al cáncer de mama se han asociado con la exposición a los estrógenos. Algunos pacientes heredan mutaciones en los genes supresores de tumores como P53, BRCA1 y BRCA2, entre otros. Las pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario tienen mayor posibilidad de desarrollar esta enfermedad (Akram y col., 2017). El aumento de la edad, la raza, antecedentes de menarquia, el consumo de alcohol, de tabaco, la dieta alta en grasas, y la falta de actividad física pueden ser factores clave de riesgo para desarrollar cáncer de mama (Winters y col., 2017).

#### 2.3.5 Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama se puede clasificar histológica y molecularmente en tres grupos: receptores de hormonas expresados (receptor de estrógeno (RE+) o receptor de progesterona (RP+)), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico expresado (HER2+), y el triple negativo (TN), es decir, sin ningún receptor expresado mencionado anteriormente (Tabla 1) (Barzaman y col., 2020).

**Tabla 1. Categoría de subtipos de cáncer de mama (Barzaman y col., 2020)**

Subtipo de cáncer de mama	Perfil de receptores	Prevalencia del subtipo	Subcategorías	Pronóstico
Receptores de hormonas positivo	RE+ o RP+	60%	Luminal A y B	Bueno
HER2 positivo	HER2+	20%	-	Malo
Triple negativo	RE-, PR-, y HER2-	10 - 20%	Tipo basal 1 (BL-1), tipo basal 2 (BL-2), inmunomodulatorio (IM), mesenquimal (M), células madre mesenquimales (MSL), y receptor de andrógenos luminales (LAR).	Malo (peor pronóstico)

### 2.3.6 Medicamentos para el tratamiento de cáncer de mama

La quimioterapia, o la administración de medicamentos contra el cáncer, se puede administrar por vía intravenosa o por vía oral, y la elección del medicamento está basada en las características clínico-patológicas: presencia de receptores hormonales, HER2, tamaño del tumor, y ganglios linfáticos positivos (McDonald y col., 2016).

Los pacientes con cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno (RE) o progesterona (RP) reciben terapia hormonal o endocrina, como el tamoxifeno, el cual impide que las hormonas mencionadas se unan a estos receptores, o en otros casos el uso de un inhibidor de la aromatasa, que impide la transformación a estrógeno y así no se estimule el crecimiento de las células del cáncer de seno (Rossi y col., 2019). Usualmente, la terapia endocrina puede llegar a crear resistencia, y en el caso de los inhibidores de la aromatasa pueden acelerar la osteoporosis (McDonald y col., 2016).

Otros medicamentos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama son los

taxanos, los cuales estabilizan los microtúbulos impidiendo la despolimerización y por lo tanto intervienen en el correcto funcionamiento del huso mitótico bloqueando el proceso de mitosis (Sazonova, 2021); las antraciclinas, las cuales se intercalan en el ADN evitando la replicación de las células cancerosas pero como limitante principal la producción de radicales libre causantes de la cardiotoxicidad (Narezkina y Nasim, 2019); los derivados del platino, cuyo ión platino se une al ADN provocando de igual manera la replicación celular, pero con importante daño nefrotóxico (Dasari y Tchounwou, 2014); los análogos de pirimidinas, que se incorporan al ARN y al ADN alterando su función y que pueden llegar a causar mielosupresión y síndrome palmo-plantar (Botticelli y col., 2020).

#### 2.3.6.1 Alternativas novedosas para el tratamiento de cáncer de mama

Para el cáncer de mama HER2+, es utilizado el anticuerpo monoclonal trastuzumab pues este sirve como antagonista, al unirse de manera específica al HER2 provocando la inhibición de la proliferación de las células cancerígenas. Sin embargo, el trastuzumab se usa como medicamento adyuvante, generalmente en conjunto con un taxano o antraciclina, además de revisar periódicamente la actividad cardiaca pues se ha asociado con toxicidad cardiaca (Slamon y col., 2011).

Estudios publicados anteriormente resaltaron la influencia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) en la progresión y desarrollo del cáncer de mama. Se han estudiado los anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), como el Cixutumumab, Ganitumab, Figitumumab, Dalotuzumab, MEDI-573, y también otras moléculas pequeñas que son inhibidores competitivos de los dominios tirosin cinasa en estos receptores, como el BMS-754807 y el Linsitinib, sin embargo, los resultados no han sido favorables pues dichas moléculas provocan efectos adversos como hiperglicemia, trombocitopenia, leucocitopenia y anemia, obligándolas a permanecer en fases de estudios clínicos (Karamouzis y Papavassiliou, 2012).

#### 2.4 El IGF-1 y el cáncer de mama

El factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) es una proteína de origen

principalmente hepático, cuya producción es estimulada por la hormona del crecimiento (GH), que promueve el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, etc. a través de su acción endocrina y autocrina/paracrina (Grimberg y col., 2016).

En la vía sanguínea y en los tejidos, la señalización de IGF-1 está regulada por una familia de proteínas de unión a IGF (IGFBP) de las cuales se encuentran seis distintos tipos, denominadas del 1 al 6, en los vertebrados y son capaces de unirse a IGF-1, en especial la IGFBP-3 que es la que tiene mayor afinidad a ésta. Al igual que el IGF-1, la IGFBP-3 es producida en los hepatocitos por el estímulo de la GH, de tal forma que a medida que aumenta la cantidad de IGF-1 secretado en respuesta a la estimulación con GH, habrá una mayor cantidad de IGFBP-3 para absorberlo en la circulación sanguínea (Allard y Duan, 2018).

El IGF-1 se une a su receptor, el IGF-1R, el cual pertenece a la familia de receptores tirosín cinasa. El IGF-1R activa las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR, que favorece la supervivencia celular al inhibir la muerte celular programada mediante el reclutamiento de la proteína proapoptótica BAD, y RAS/RAF/MEK cuya vía está involucrada en la proliferación celular (Ianza y col., 2021). Además, el IGF-1 está presente en la activación de la vía STAT3, que potencia la invasividad de las células de cáncer de próstata (Ma y col., 2020) y en la activación de la señalización inflamatoria de NFκB a través de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wang y col., 2020).

El IGF-1 en conjunto con sus proteínas de unión y su receptor están involucrados en el cáncer de mama puesto que datos clínicos han demostrado la sobreexpresión e hiperfosforilación del IGF-1R en varios tipos de cáncer de mama (Peiró y col., 2011; Law y col., 2008). También se han presentado niveles plasmáticos elevados tanto de IGF-1 como IGFBP-3 los cuales representan un factor de riesgo para el desarrollo y recurrencia del cáncer de mama en la población general (Key y col., 2010). Asimismo, Pasanisi y colaboradores en el 2011 demostraron la asociación entre las pacientes con mutación de BRCA y sus niveles séricos elevados de IGF-

1. En el cáncer de mama, la expresión del IGF-1R es de al menos el 50% (Ekyalongo y Yee, 2017), que es mayor al del tipo HER2+, que representa el 20- 25% de los casos con cáncer de mama (Wang y Xu, 2019).

En estudios recientes en modelos animales se ha demostrado que el IGF-1 está involucrado en los procesos de angiogénesis; en ratones transgénicos que sobreexpresaban IGF-1 se encontraron niveles altos de VEGF, un factor proangiogénico cuya expresión está mediada por el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) (Tian y col., 2012). Con respecto al cáncer de mama, la administración de IGF-1 a células MDA-MB-231 favorece la formación de lamelipodios, proyecciones de la membrana celular, que se creen que funcionan como el motor que empuja a las células hacia adelante en la migración celular (Morimura y Takahashi, 2011), y en un estudio *in vivo* con ratones se ha demostrado la progresión tumoral cuando se les inyectaron células MCF-7 que sobreexpresan IGF-1 (Pacher y col., 2007).

## 2.5 AG1024

El AG1024 es una molécula sintética inhibidora del IGF-1R pues su núcleo similar a la tirosina impide que dicho receptor se autofosforile y por lo tanto se lleve a cabo la disminución en la actividad de la vía de la AKT y MAPK (Tomita y col., 2022).

En estudios anteriores se ha demostrado que el AG1024 en conjunto con la genisteína promueven la radiosensibilidad de las células de cáncer de próstata provocando un volumen tumoral disminuido en ratones (Tang y col., 2018). También se ha demostrado que el tratamiento del AG1024 con el sorafenib ejercen citotoxicidad en células del carcinoma hepatocelular (Zhou y col., 2021) y que en solitario el AG1024 provoca citotoxicidad en el carcinoma de pulmón (Wei y col., 2015).

Wu y colaboradores en 2019 demostraron que el AG1024 realiza sinergia en conjunto con el triptolide, un extracto de la planta *Tripterygium wilfordii*, a bajas concentraciones, mejorando la apoptosis inducida por el triptolide en solitario. Además, este estudio mostró que el AG1024 mejoró la apoptosis inducida por el

cisplatino en células MDA-MB-231, por lo que se sugirió que la acción del AG1024 sensibiliza a las células RE-negativo y así aumenta la apoptosis de manera sinérgica en combinación de reactivos de daño al ADN.

Debido a que el AG1024 ha tenido resultados favorables cuando se administra en conjunto con otros quimioterapéuticos, como el paclitaxel y el cisplatino, al sensibilizar a las líneas celulares cancerosas y así promover la apoptosis con concentraciones más bajas, se propone investigar al AG1024 en combinación con la doxorubicina.

## 2.6 5-fluorouracilo

El 5-fluorouracilo (5-FU) pertenece a la familia de los análogos del uracilo y es ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer, como el del colon, páncreas, estómago, ovario, próstata, de mama, entre otros (Entezar-Almahdi y col., 2020). El 5-FU es un agente antineoplásico perteneciente a la familia de los antimetabolitos; es un análogo del uracilo que contiene un átomo de flúor en la posición 5 de la pirimidina. Se han elucidado los mecanismos de acción por los cuáles el 5-FU actúa; al ser captado por las células, el 5-FU se convierte en tres metabolitos activos: monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP), y trifosfato de fluorouridina (FUTP). Estos inhiben a la enzima sintética de nucleótidos, la timidilato sintasa, y la síntesis de ARN (Figura 2). Además, FdUTP y FUTP se incorporan al ADN y al ARN, respectivamente, alterando la síntesis de ADN y bloqueando la traducción de ARNm (Ciaffaglione y col., 2021).



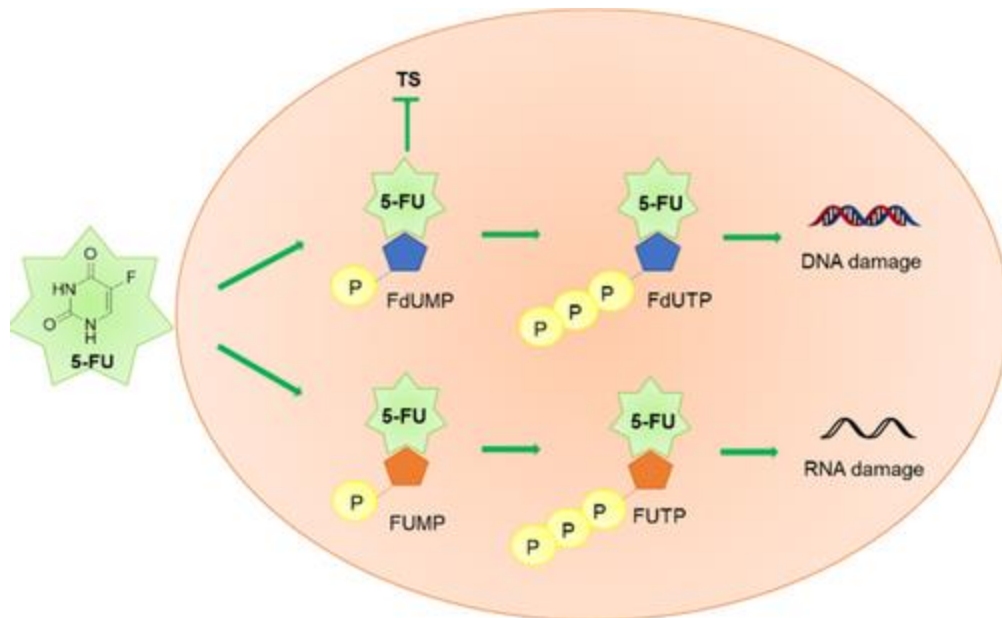


Figura 2. Esquema del metabolismo del 5-FU. El 5-FU da lugar a los metabolitos FdUMP, FdUTP y FUTP que provocan daños en el ADN y el ARN (Ciaffaglione y col., 2021).

Aunque el 5-FU es utilizado en tumores sólidos y quimioterapia adyuvante, su uso clínico tiene varias limitantes como la resistencia al medicamento, vida media corta (10-20 minutos) y acciones citotóxicas no específicas. Asimismo, los efectos adversos más frecuentes del 5-FU son la neutropenia, pirexia, trombocitopenia, leucopenia, mielosupresión, cardiotoxicidad, trastornos gastrointestinales, neurológicos y dermatológicos (Casale y Patel, 2022). Con esto en mente, se busca desarrollar nuevas alternativas para contrarrestar las limitaciones en el uso del 5-FU, principalmente con el objeto de reducir la toxicidad, la resistencia al fármaco o mejorar la citotoxicidad en el sitio de acción (Hashimoto y col., 2020).

El 5-FU se ha estudiado en líneas de cáncer de mama; en combinación con la quercetina se ha demostrado que en las células MCF-7 se potencia la quimiosensibilidad al 5-FU (Mawalzadeh y col., 2021), en combinación con la curcumina se mejora la eficacia terapéutica y reduce la toxicidad del 5-FU en células de cáncer colorrectal, de mama, esofágico, gástrico, hepático, y pancreático (Wei y col., 2018). Además, Lev y colaboradores en 2017 demostraron el efecto sinérgico

del 5-FU con el ONC201, el cual es una imipridona con actividad anticancerígena en ensayos clínicos. Dado lo anterior, se podría esperar que el AG1024 en conjunto con el 5-FU podrían tener resultados favorables en la citotoxicidad de células de cáncer de mama.

2.7 Modelo de la membrana coriolantoidea (CAM) para la evaluación de la angiogénesis.

Entre los modelos experimentales *in vivo*, la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM) se ha utilizado de forma rutinaria para implantar varias líneas celulares malignas o tejidos tumorales para estudiar su capacidad angiogénica y (Ribatti, 2021). Dado que el embrión de pollo es naturalmente inmunodeficiente, la CAM puede apoyar el injerto de células tumorales y su crecimiento en el mismo puede recapitular fielmente la mayoría de las características del proceso carcinogénico que incluyen: crecimiento, invasión, angiogénesis y colonización de tejidos distantes (Ribatti, 2021).

### 2.7.3 Características del modelo CAM

El modelo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) ha surgido como un buen sistema experimental para establecer un modelo derivado del paciente (Ribatti, 2016). Proporciona un microambiente biológico único apropiado para las células cancerosas. La CAM es una estructura que fusiona la capa del mesodermo de las membranas alantoides y corion con una rica red vascular (Ribatti, 2016). El rico plexo vascular dentro de la capa del mesodermo de la CAM, sostenido por las arterias y venas alantoideas, ofrece a las células tumorales un suplemento de nutrientes esenciales para el crecimiento (Ribatti, 2016).

Mientras tanto, las células endoteliales también experimentan cambios dinámicos durante la fase avascular. Debido a daños isquémicos, las células endoteliales en los injertos tumorales se desintegran y experimentan acumulación de lípidos, vacuolación y degeneración a las 2 h, 8 h y 2 días después de la implantación, respectivamente (Ribatti, 2021). Los injertos tumorales avasculares en CAM eventualmente sufren necrosis y autólisis durante la fase prevascular (Ribatti, 2016).

La neovascularización comienza aproximadamente 72 a 96 h después de la implantación, seguida de una fase de crecimiento rápido. La reperfusión de los vasos se produce mediante la liberación de factores angiogénicos por las células tumorales en la fase posterior y rescata la necrosis de las células tumorales posteriormente. La existencia de esta microvasculatura dentro del sistema CAM juega un papel crucial en la proliferación y supervivencia de las células tumorales para el xenoinjerto CAM (Vu y col., 2018).

#### 2.7.4 Ventajas del modelo CAM

El modelo CAM podría superar las limitaciones encontradas en los modelos murinos. La rentabilidad, la simplicidad, la alta reproducibilidad, la visibilidad y la duración experimental más corta hacen del modelo CAM una alternativa adecuada. El menor costo de los huevos embrionarios, la eliminación del forraje y la reducción de los costos de acceso a las instalaciones hacen que el modelo CAM sea más rentable en comparación con los ratones inmunodeficientes (Pawlikowska y col., 2020). La manipulación de los huevos es más sencilla que la manipulación de los ratones. El acceso a la CAM simplemente requiere la apertura de una ventana en la cáscara del huevo (Deryugina y col., 2016). El menor costo y la simplicidad de CAM hacen que sea factible escalar los experimentos en múltiples repeticiones. Por lo tanto, el modelo CAM de pollo podría ofrecer datos experimentales con mayor reproducibilidad (Deryugina y col., 2016). Como la CAM se coloca justo debajo de la cáscara de huevo y encima del embrión en desarrollo, no se requiere cirugía adicional para examinar los injertos tumorales de CAM (Lokman col., 2012). Esto permite la aplicación de varios métodos de obtención de imágenes que podrían mejorar enormemente la visualización. Como los experimentos siempre están sincronizados con el desarrollo embrionario del pollo antes de la eclosión, la duración para establecer el injerto solo requiere de 14 a 18 días, lo que es significativamente más corto de lo que normalmente se necesita para el modelo de ratón (Deryugina y col., 2016). Se ha informado que los compuestos experimentales tienen una vida media más larga en el sistema CAM incluido en comparación con otros modelos animales (Lokman col., 2012). Esta característica única podría hacer que las pruebas de drogas en el sistema CAM sean más estables en

farmacodinámica y farmacocinética (Lokman col., 2012).

El modelo CAM es relativamente simple y menos costoso, además los embriones de pollo no experimentan dolor pues los ensayos terminan antes del desarrollo del sistema nervioso (Ribatti, 2016). El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en Estados Unidos y de acuerdo con la legislación europea (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos) el modelo CAM es un ensayo seguro pues se estableció que al día 14 un embrión de pollo es incapaz de reconocer el dolor por lo que es seguro su uso para la experimentación (IACUC, 2021; Official Journal of the European Union, 2019).

#### 2.7.5 Desventajas del modelo CAM

El modelo CAM fue elegido en este proyecto para la evaluación de la angiogénesis por ser económico, no invasivo, fácil de mantener en un ambiente esterilizado, no requerir períodos prolongados de tiempo, presentar una alta tasa de sobrevivencia y ser fácilmente reproducible, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, presenta algunas limitaciones como lo es que tiene la presencia de un fenómeno inflamatorio inespecífico asociado a la manipulación y abertura de un orificio en el cascarón (cambio de presión), que produce un aumento en el número de vasos sanguíneos locales que pueden amplificar falsamente el efecto angiogénico observado (de la Fuente y col., 2016). Sin embargo, este fenómeno se da en todos los sujetos de estudio, por lo que se elimina un posible sesgo. Por otra parte, el aumento en el número de vasos sanguíneos puede deberse en realidad al reordenamiento de vasos sanguíneos ya presentes, y no a la neoformación. Nuevamente, la ocurrencia de este proceso en todos los sujetos ayuda a limitar el posible sesgo. Otra dificultad la constituía la instilación de los tratamientos sobre la membrana, dicho material debía colocarse con mucho cuidado para evitar daños mecánicos sobre la CAM (de la Fuente, 2016).

#### 2.7.6 Aplicaciones del modelo CAM en estudios de cáncer humano

Se han estudiado evaluaciones funcionales del crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis utilizando la plataforma CAM (Lokman col., 2012). Tanto las líneas de

células cancerosas inmortalizadas (CCL) como las muestras derivadas de pacientes se han inoculado con éxito en la superficie de CAM (Zabielska-Koczywas y col., 2017) o inyectado en las venas de CAM (Leong y col., 2012).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Dentro del género femenino, el cáncer de mama ocupa el primer lugar de muertes por cáncer en el mundo y en México. En vista de la relevancia que ha manifestado el cáncer de mama como patología, es de suma importancia el desarrollo de nuevos tratamientos para su control y supresión, ya que los tratamientos actuales son invasivos, inespecíficos, o producen resistencia al fármaco. Este último efecto es el más común de la administración del 5-FU, el fármaco de primera elección contra el cáncer de mama triple negativo.

La terapia específica sobre un receptor hormonal como el IGF-1R podría ser una alternativa contra el cáncer de mama, dado que se ha demostrado que el inhibidor AG1024 sobre dicho receptor es capaz de disminuir la proliferación en células cancerígenas de pulmón y de páncreas. Además, diversos estudios indican que el 5-FU como adyuvante aumenta la citotoxicidad en distintos tipos de cáncer.

Debido a lo anterior, es necesario estudiar el efecto que podría tener el antagonista del IGF-1R, el AG1024, como tratamiento individual y en conjunto con el 5-fluorouracilo en la proliferación, migración celular y angiogénesis *in vitro* e *in vivo* en el cáncer de mama.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el efecto de la administración del antagonista AG1024 en conjunto con el 5-FU sobre la proliferación, migración y angiogénesis en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231?

#### **5. HIPÓTESIS**

El antagonista del IGF-1R, AG1024, en conjunto con el 5-FU inhiben la proliferación, migración y angiogénesis de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB- 231 en un modelo *in vitro* e *in vivo* sobre la membrana coriolantoidea de embrión de pollo.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

Evaluar la inhibición de la proliferación, migración y angiogénesis por efecto del AG1024 y el 5-FU en las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 en modelos *in vitro* e *in vivo* del ensayo de angiogénesis sobre la membrana corioalantoidea (CAM).

### 6.2 Objetivos Específicos

- Evaluar *in vitro* la inhibición de la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231 expuestas a AG1024 y 5-FU mediante conteo con azul de tripano.
- Evaluar la inhibición de la migración de las células MCF-7 y MDA-MB-231 expuestas a la combinación de AG1024 y 5-FU con el modelo *in vitro* ensayo de herida.
- Estandarizar el modelo *in vivo* de inoculación/implantación de las células MCF-7 y MDA-MB-231 en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM).
- Estudiar el efecto del AG1024, el 5-FU y la mezcla de AG+5-FU sobre la angiogénesis en el ensayo *in vivo* de membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM) con las líneas celulares de cáncer de mama (MCF- 7 y MDA-MB-231), por microscopía estereoscópica.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Cultivo celular

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) al 10 % de suero fetal bovino (BIOWEST) y antibióticos al 1 % (penicilina-estreptomicina-fungizona, Gibco). Los cultivos se mantuvieron en cajas p100 (Termofisher) en incubación a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 7.2 Ensayo de proliferación celular

Con la finalidad de evaluar los efectos en la proliferación celular del IGF-1, AG1024, 5-FU y la combinación entre estas tres sustancias, se hizo uso del método de tinción con azul tripano, el cual permite distinguir las células no viables de las viables expresado en porcentaje de viabilidad celular, el fundamento de la técnica consiste en que las células vivas (viables), con membrana citoplasmática íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen, pero en las células muertas o con lesión en membrana celular, el colorante penetra tiñendo la célula de color azul, por último, el conteo se realiza utilizando una cámara de Neubauer (UASLP, 2013).

Se sembraron 50,000 células MCF-7 y MDA-MB-231 en placas de cultivo de 24 pozos durante 24 horas en medio completo, respectivamente. Posteriormente, se reemplazó el medio viejo por medio fresco y se trataron con 25, 50, 75, 100, 125 y 150  $\mu$ M de 5-FU (PiSA-Farmacéutica). Después de 24 h del tratamiento, las células fueron tripsinizadas y contadas con ayuda del hematocitómetro y azul tripano. Con respecto al conteo utilizando el hematocitómetro (cámara de Neubauer), cada lado de la cámara se cargó con 10  $\mu$ L de la muestra, se contaron el número de células en los cuatro cuadrantes extremos y se promedió el resultado; tres conteos por triplicado. El número total de células se determinó contando cada muestra por triplicado y de tres experimentos diferentes. Finalmente, se identificó la concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) para el 5-FU con el software GraphPad Prism6®.

La IC<sub>50</sub> del IGF-1, Sigma-Aldrich, (100 y 150 ng/mL para MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente) y el AG1024, Sigma-Aldrich, (11.49 y 17.18 μM para MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente) fueron obtenidas por nuestro grupo de investigación (Ríos, 2021).

Una vez evaluadas las moléculas en solitario, siguiendo la metodología descrita anteriormente, se analizaron las siguientes combinaciones respetando la IC<sub>50</sub> de cada molécula: IGF-1 + AG1024, IGF-1 + 5-FU, AG1024 + 5-FU, IGF-1 + AG1024 + 5-FU.

### **7.3 Ensayo de herida**

Se evaluó el efecto del IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración celular haciendo uso del ensayo de cierre de herida el cual se basa en la cuantificación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o “herida”. Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la “herida” (UAM-CSIC, 2013).

Se cultivaron las células MCF-7 y MDA-MB-231 en una placa de 6 pocillos hasta un 90% de confluencia. Se realizaron tres heridas por pocillo con ayuda de una punta estéril amarilla (P200) arrastrándola por la monocapa con un ángulo de inclinación de 30 grados y guiándose con una regla flameada para hacerlo lo más recto posible, sin retirar el medio. Posterior a la herida, el medio se retiró de las placas y cada pocillo se lavó suavemente con 1 mL de PBS 0.01 M para finalmente agregar el medio nuevo con tratamiento (IGF-1: 100 y 150 ng/mL, AG1024: 10 y 15 μM, y 5-FU: 52.51 y 299.1 μM para MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente, así como las combinaciones entre ellos) y sin tratamiento en el caso del grupo control. Se tomaron micrografías a tiempos 0, 6, 12 y 24 horas para observar el avance en pixeles (%) del movimiento celular en la herida, por medio del software ImagenJ®.

### **7.4 Modelo de la membrana corioalantoidea (CAM)**

El modelo de la CAM es un método *in vivo*, las sustancias a evaluar se colocan en la membrana extraembrionaria a través de una ventana abierta en la cáscara del

embrión entre los días 5 y 13 del desarrollo embrionario, de manera que dicha membrana es sellada y posterior de 13 días de incubación se realiza el estudio de la angiogénesis (Marañón y col., 2016). Dado que el embrión de pollo es naturalmente inmunodeficiente, la CAM puede apoyar el injerto de células tumorales y su crecimiento en el mismo. Además, puede recapitular fielmente la mayoría de las características del proceso carcinogénico que incluyen: crecimiento, invasión, angiogénesis y colonización de tejidos distantes, además de que la CAM permite visualizar la vascularización, pues es un órgano que *per se*, forma vasos sanguíneos visibles (Ribatti, 2021).

#### 7.4.1 Incubación de huevos

Se obtuvieron huevos fértiles (Aves Libres de Patógenos – ALPES) de 0 a 3 días, se incubaron 5 huevos por grupo experimental en una incubadora humidificadora de huevos a 37.5°C y un 50 – 55 % de humedad durante 11 días con rotación cada 1 hora y media. En el día 3 se realizó una abertura de 3 mm aproximadamente en la parte superior de cáscara, donde se encuentra la burbuja de aire. En el día 5, se agrandó la apertura anterior a 3 cm de diámetro. El agujero se cubrió con Parafilm y los embriones se mantuvieron en la incubadora.

#### 7.4.2 Implantación de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 a través de un xenoimplante en la CAM.

En el día 5 de incubación, las células de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 contenidas en cajas p100 se lavaron con PBS, fueron levantadas con tripsina una vez logrado el 90% de confluencia y se colocaron 1 millón de células, suspendidas en DMEM, en 30 µL de Matrigel™ reducido en factor de crecimiento (Corning) en conjunto con los tratamientos de IGF-1 (100 ng/mL para las células MCF-7 y 150 ng/mL para las células MDA-MB-231), AG1024 (IC<sub>50</sub> 10 µM para MCF-7 y 15 µM para MDA-MB-231) y 5-FU (IC<sub>50</sub> 52.51 µM para MCF-7 y 299.1 µM para MDA-MB-231) sobre la superficie de la CAM. Se selló el agujero nuevamente con Parafilm y se incubaron los huevos durante 6 días más hasta alcanzar el día 11 de incubación de los huevos. Por lo tanto, se manejaron 8 grupos de experimentación: grupo sano (sin líneas celulares injertadas), grupo control (con células injertadas sin

tratamiento), grupo IGF-1 (con células injertadas con su respectivo tratamiento de IGF-1), grupo AG1024 (con células tratadas con su respectiva concentración del inhibidor), grupo 5-FU (con células tratadas con la IC<sub>50</sub> de la doxorubicina) grupo IGF-1 + AG1024 (con células tratadas con ambas moléculas; IGF-1 y AG1024), grupo IGF-1 + 5-FU (con células tratadas con ambas moléculas; IGF-1 y 5-FU), grupo AG1024 + 5-FU (con células tratadas con la IC<sub>50</sub> de cada una de las moléculas), grupo combinación (con células tratadas con IGF-1, AG1024 y 5-FU).

#### 7.4.3 Modelo CAM para angiogénesis

Durante el tiempo de incubación el área superficial de la membrana fue visualizada al día 5, 7, 9, 11 y 13 donde se contaron los vasos capilares, con una n = 5, y posteriormente comparados estadísticamente con una ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* Tukey.

### 7.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de este proyecto se realizó con el programa GraphPad Prism6® utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba *post hoc* Tukey para los ensayos de proliferación y angiogénesis, mientras que para el ensayo herida se realizó una ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey. Por el análisis de varianza se determinó la diferencia significativa de los tratamientos, mientras que la significancia entre tratamientos se estableció por el método de Tukey, respectivamente ( $p < 0.05$ ).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Ensayo de proliferación celular

Se realizó la curva concentración-respuesta de con el 5-fluorouracilo sobre las células MCF-7 con el fin de determinar la IC<sub>50</sub>. Después de 24 horas de exposición al 5-FU, a partir de 25  $\mu$ M se mostró diferencia significativa con respecto al control encontrándose 52.51  $\mu$ M como IC<sub>50</sub> (figura 3).

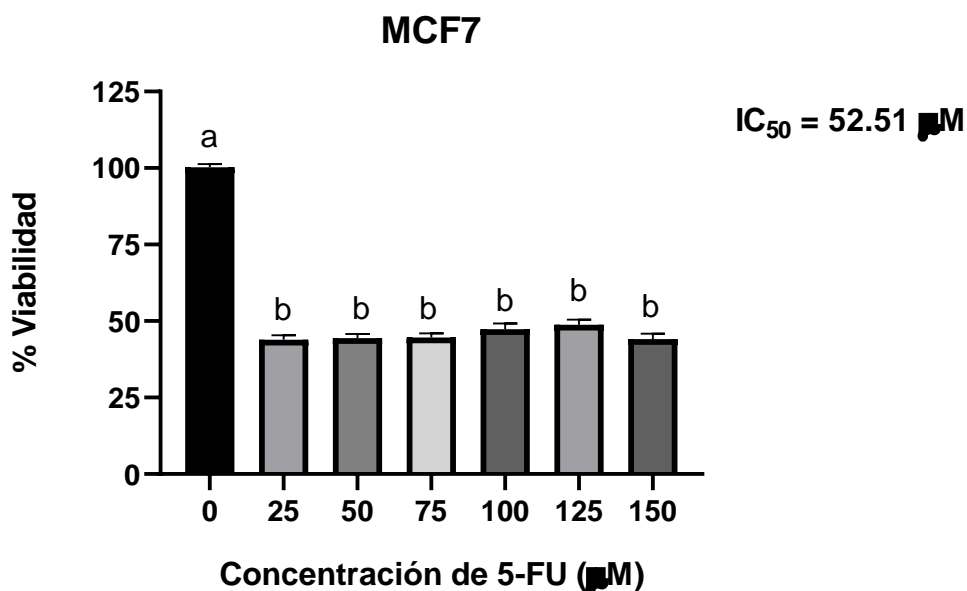


Figura 3. Curva concentración-respuesta del 5-FU en la proliferación de células MCF-7 con 24 h de tratamiento. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM, n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

Seguido de esto, se administraron 11.39  $\mu$ M de AG1024, 100 ng/mL de IGF-1 y 52.51  $\mu$ M 5-FU, pertenecientes a la IC<sub>50</sub> de cada sustancia, para evaluar sus efectos en combinación sobre las células MCF-7. Se halló diferencia estadísticamente significativa para el grupo tratado con IGF-1 debido a que aumentó la proliferación celular con respecto al control y, por otro lado, al utilizar tanto el antagonista AG1024 como el quimioterapéutico 5-FU, disminuyó la población celular (figura 4). También se empleó la combinación IGF-1 + AG1024 donde se encontró una reducción significativa de la proliferación celular de casi el 50%. De igual forma, se evaluó la

combinación IGF-1 + 5-FU la cual demostró una disminución en la viabilidad celular respecto al control, pero no mostró diferencia estadística con el grupo IGF-1 + AG1024. Además, se aplicó la combinación del antagonista AG1024 en conjunto con el 5-FU donde se mantuvo la viabilidad cerca del 50% sin mostrar diferencia significativa con respecto a los dos tratamientos anteriores. Por último, se administró IGF-1 + AG1024 + 5-FU y se encontró que permanece cerca del 50% la viabilidad celular (figura 4).

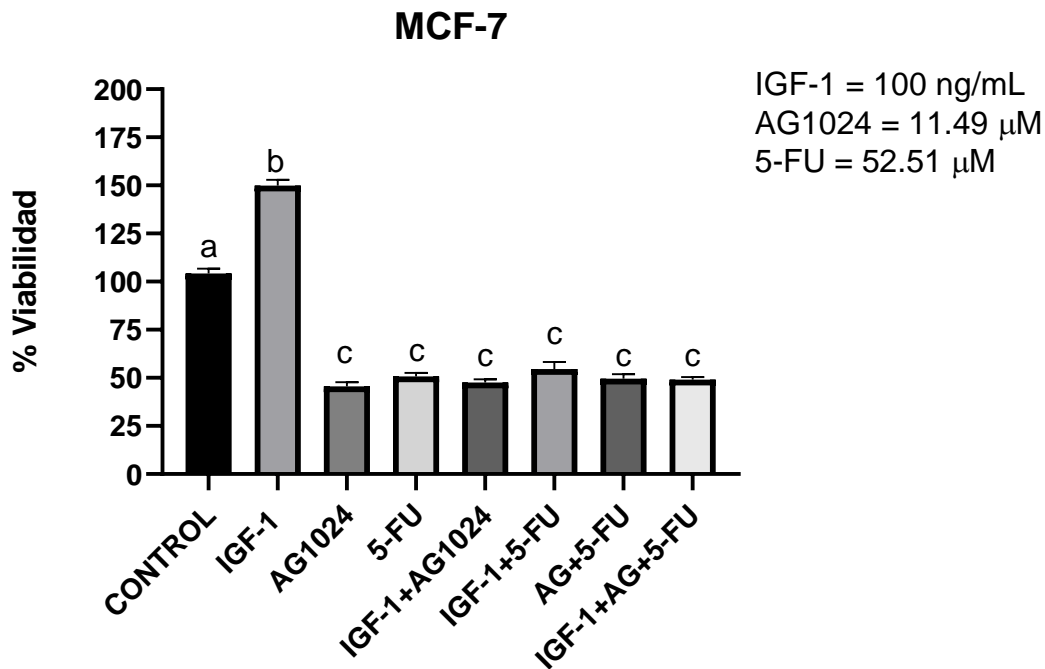


Figura 4. Efecto del IGF-1, AG1024, 5-FU y en combinación en la proliferación de células MCF-7 con 24 h de tratamiento. Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  SEM, n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, se determinó la  $IC_{50}$  del 5-FU sobre las células MDA-MB-231. Tras 24 horas de exposición, a partir de 25  $\mu$ M se observó una disminución en la proliferación celular a medida que se incrementó la concentración y se obtuvo 299.1  $\mu$ M como la  $IC_{50}$  (figura 5).

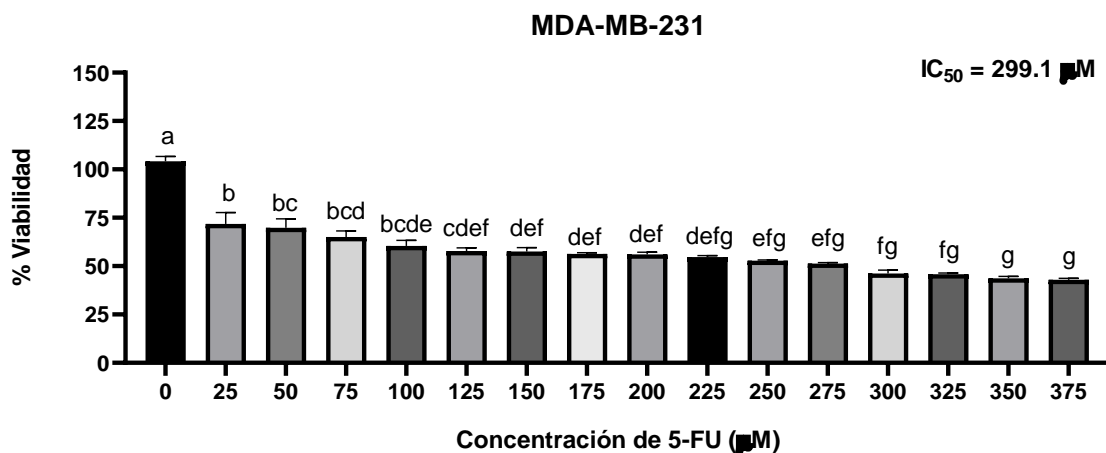


Figura 5. Curva concentración-respuesta del 5-FU en la proliferación de células MCF-7 con 24 h de tratamiento. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM, n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

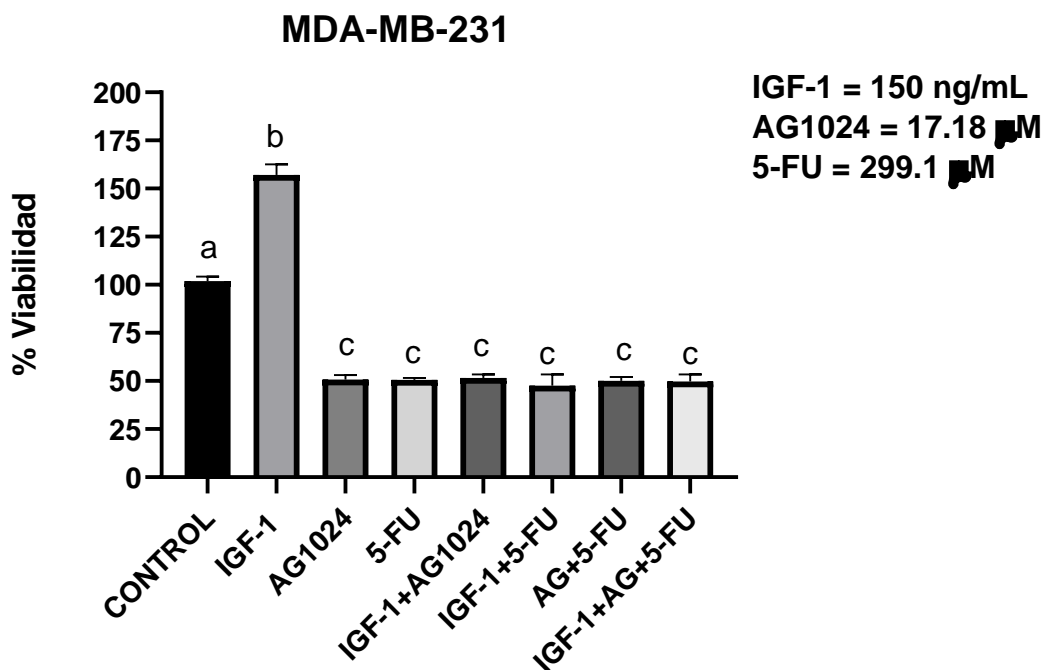


Figura 6. Efecto del IGF-1, AG1024, 5-FU y en combinación en la proliferación de células MDA-MB-231 con 24 h de tratamiento. Porcentaje relativo con respecto al control. Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  SEM, n=3 por triplicado. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente se evaluaron el IGF-1, AG1024 y 5-FU en las células MDA-MB-231 a concentraciones de 150 ng/mL, 15  $\mu$ M, 299.1  $\mu$ M, respectivamente, y las combinaciones entre ellos (figura 6). Se obtuvo que al utilizar el IGF-1 en solitario, aumentó la viabilidad celular cerca de un 150 %, mientras que con el AG1024 y el 5-FU se disminuyó la proliferación celular al 50 %. Por otra parte, la combinación IGF-1 + AG1024 mostró un efecto parecido al AG1024 en solitario, pues se vio disminuida la proliferación. Asimismo, la combinación IGF-1 + 5-FU demostró un decrecimiento en la viabilidad similar al grupo donde se administró únicamente el 5-FU. Además, al utilizar la combinación del antagonista AG1024 y el 5-FU se determinó una baja en la proliferación cerca del 50 %, similar al grupo donde se administró únicamente el AG1024. Por último, se evaluó la combinación IGF-1 + AG1024 + 5-FU donde se demostró la disminución de la viabilidad celular cerca del 50 %.

## **8.2 Ensayo de migración celular**

Se evaluó el efecto del IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración a concentraciones de 100 ng/mL, 10  $\mu$ M, y 52.51  $\mu$ M, respectivamente, para la línea MCF-7, y sus combinaciones (figura 7). Primeramente, se observó que las células tratadas con IGF-1 migraron más rápido a las 12 horas con respecto al control (figura 8). Las MCF-7 tratadas con AG1024 registraron una disminución en la migración celular a partir de las 6 h de exposición con respecto al control, y esta diferencia fue estadísticamente significativa. Al exponer las células al 5-FU, no se observó un efecto antimigratorio, es decir, permaneció equiparable al grupo control. Con respecto a los grupos tratados con las combinaciones, las células MCF-7 al estar expuestas a la combinación IGF-1 + AG1024, se observó que la migración celular fue reducida con respecto al control y fue estadísticamente similar al grupo donde se evaluó únicamente el antagonista AG1024. Con la combinación IGF-1 + 5-FU no se percibió un cambio en la migración de las células MCF-7 y este grupo no tuvo diferencia significativa con respecto al control. En relación con la combinación de AG1024 + 5-FU, esta disminuyó el cierre de la herida, permaneciendo abierta a las 24 h de exposición, sin embargo, esta combinación no mostró diferencia significativa con respecto al grupo donde se utilizó únicamente el AG1024. Finalmente, con la



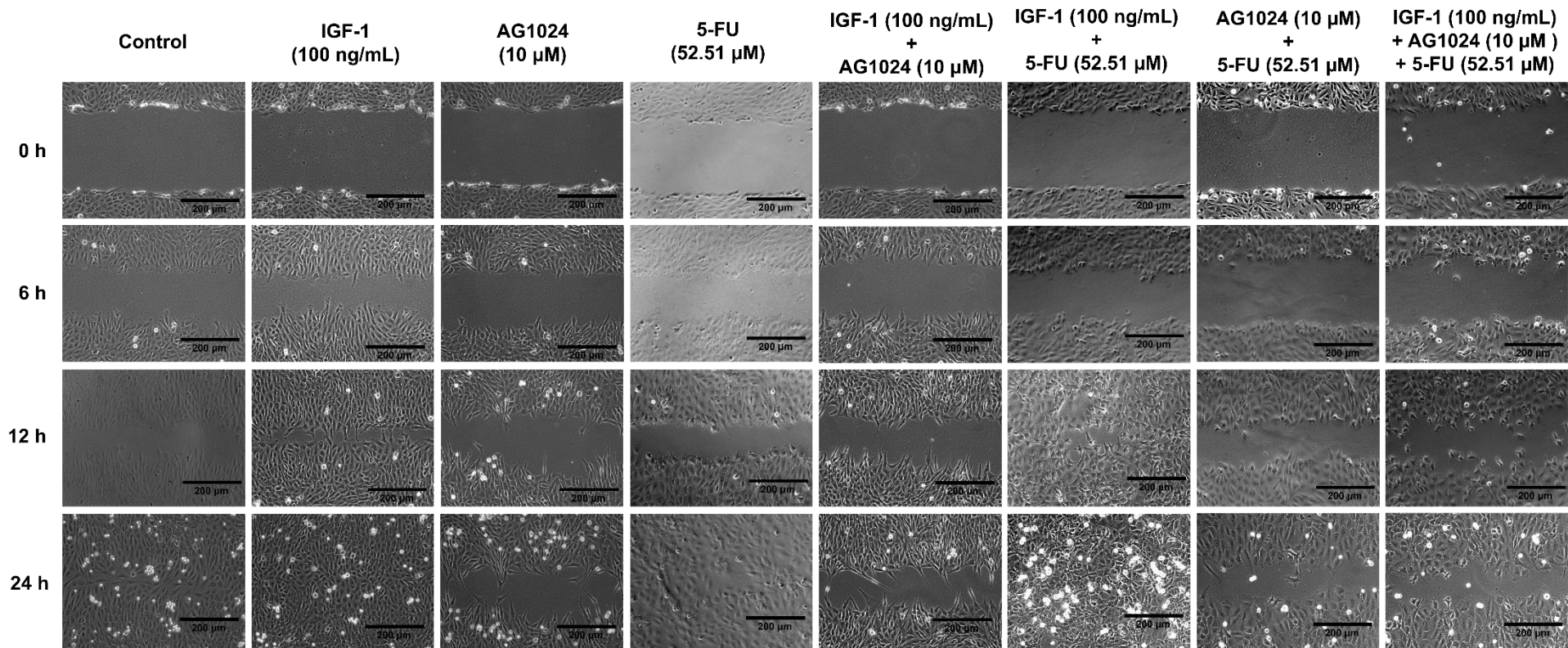


Figura 7. Micrografías del ensayo de herida para las células MCF-7 expuestas a IGF-1, AG1024, 5-FU, y en combinación. Se muestra el efecto de IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración en la línea MCF-7 a las 0, 6, 12 y 24 h de exposición.

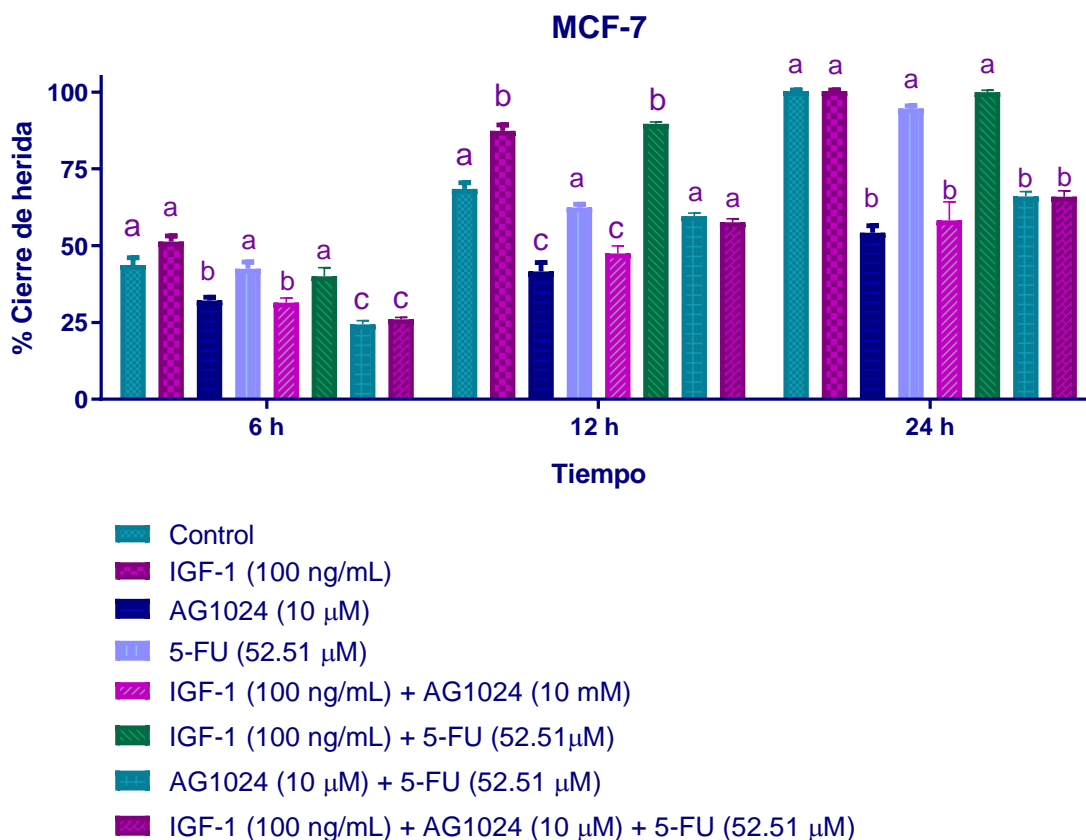


Figura 8. Efecto del IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración celular de MCF-7. Se muestra la media  $\pm$  SEM, n=3 por triplicado. ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

combinación IGF-1 + AG1024 + 5-FU, la migración celular se vio reducida a las 24 h con respecto al control, pero no hubo diferencia significativa con respecto a las células tratadas solo con AG1024.

Por otro lado, se evaluó la migración de las células MDA-MB-231 expuestas a IGF-1, AG1024 y 5-FU a 150 ng/mL, 15  $\mu$ M, y 299.1  $\mu$ M, respectivamente. Al tratar las células con IGF-1 se observó un aumento en la migración a las 6 y 12 h de exposición con respecto al control (figura 10), mientras que con el tratamiento de AG1024 se redujo el avance del cierre de la herida. Al utilizar el tratamiento del 5-FU, el cierre de la herida fue igual al grupo control transcurridas las 24 h de exposición. Tanto con las combinaciones IGF-1 +AG1024, AG1024 + 5-FU, e IGF-1+ AG1024 + 5-FU, se

observó que se disminuyó la migración celular con respecto al control y que éstas no son diferentes estadísticamente entre sí (figura 9), incluso, estos grupos son iguales al grupo donde se administró exclusivamente el AG1024. Finalmente, con el tratamiento de IGF-1 + 5-FU el cierre de la herida fue similar al grupo donde se utilizó IGF-1 en solitario, cerrándose la herida desde las 12 h.

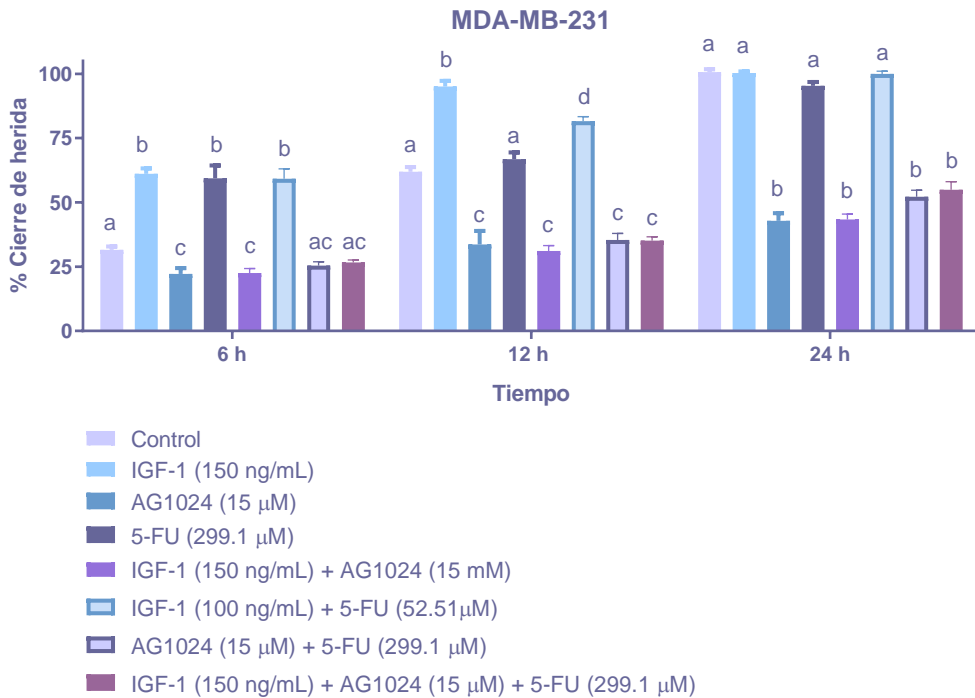


Figura 9. Efecto del IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración celular de MDA-MB-231. Se muestra la media  $\pm$  SEM, n=3 por triplicado. ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

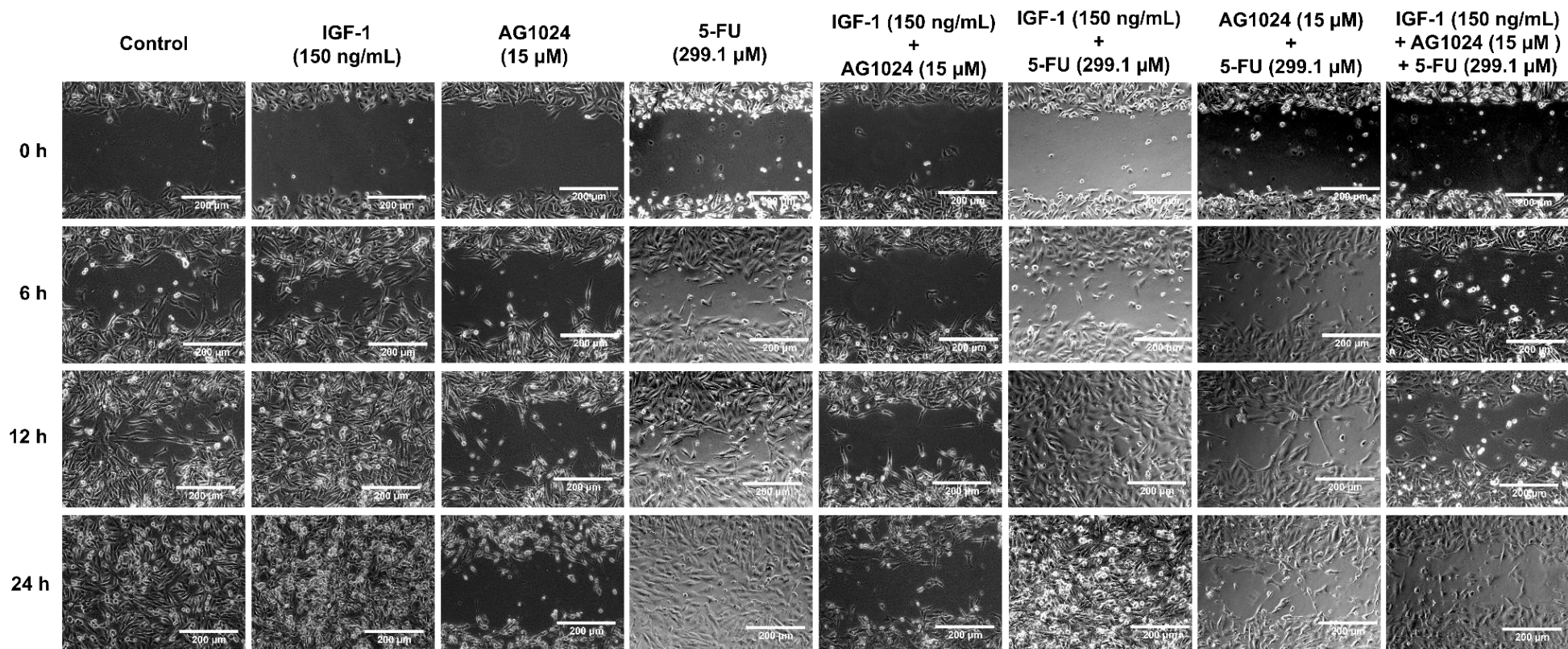


Figura 9. Micrografías del ensayo de herida para las células MDA-MB-231 expuestas a IGF-1, AG1024, 5-FU, y en combinación. Se muestra el efecto de IGF-1, AG1024 y 5-FU sobre la migración en la línea MDA-MB-231 a las 0, 6, 12 y 24 h de exposición.

### **8.3 Modelo CAM para evaluación de la angiogénesis**

Se evaluó la capacidad angiogénica del IGF-1, AG1024 y 5-FU a través de la inoculación de las células MCF-7 en la membrana corioalantoidea de pollo (control MCF-7). El primer grupo evaluado fue el control sano (sin células de cáncer), donde se observó que con el paso de los días de incubación el número de vasos sanguíneos aumentó (figura 11). Posteriormente se evaluaron los grupos con células MCF-7 tratadas con IGF-1, AG124, 5-FU y sus combinaciones. Se demostró que al injertar únicamente células de cáncer de mama MCF-7, la formación de vasos sanguíneos aumentó significativamente desde el día 7 al compararlo con el grupo sano (figura 12). Además, se encontró que las células tratadas con IGF-1 provocó un aumento en el número de vasos sanguíneos desde el día 7 hasta el 13 de evaluación de manera significativa con respecto al grupo injertado únicamente con células (control MCF-7). Por otro lado, con el AG1024 a partir del día 9 de incubación la vascularización se ve detenida, al día 13 se registra una disminución en el número de vasos sanguíneos con respecto al grupo control MCF-7.

Con la administración del 5-FU, se registró un aumento en el número de vasos sanguíneos en los días 9 y 11 de incubación, sin embargo, al día 13 de evaluación la angiogénesis generada fue similar al grupo sano (figura 12). Por otro lado, las combinaciones de IGF-1 + AG1024, AG1024 + 5-FU, e IGF-1 + AG1024 + 5-FU, siguieron un patrón parecido al grupo que se le trató con AG1024, pues a pesar de que registraron un alza en la angiogénesis al día 9, posteriormente ésta se ve detenida y se mantiene hasta el día 13. Además, estas combinaciones que contienen el AG1024 no demostraron diferencia significativa con respecto al grupo tratado con AG1024 en solitario. Por último, la combinación de IGF-1 + 5-FU aumentó el número de vasos sanguíneos similar al grupo donde solo se injertaron células MCF-7 pasados los 13 días de incubación.

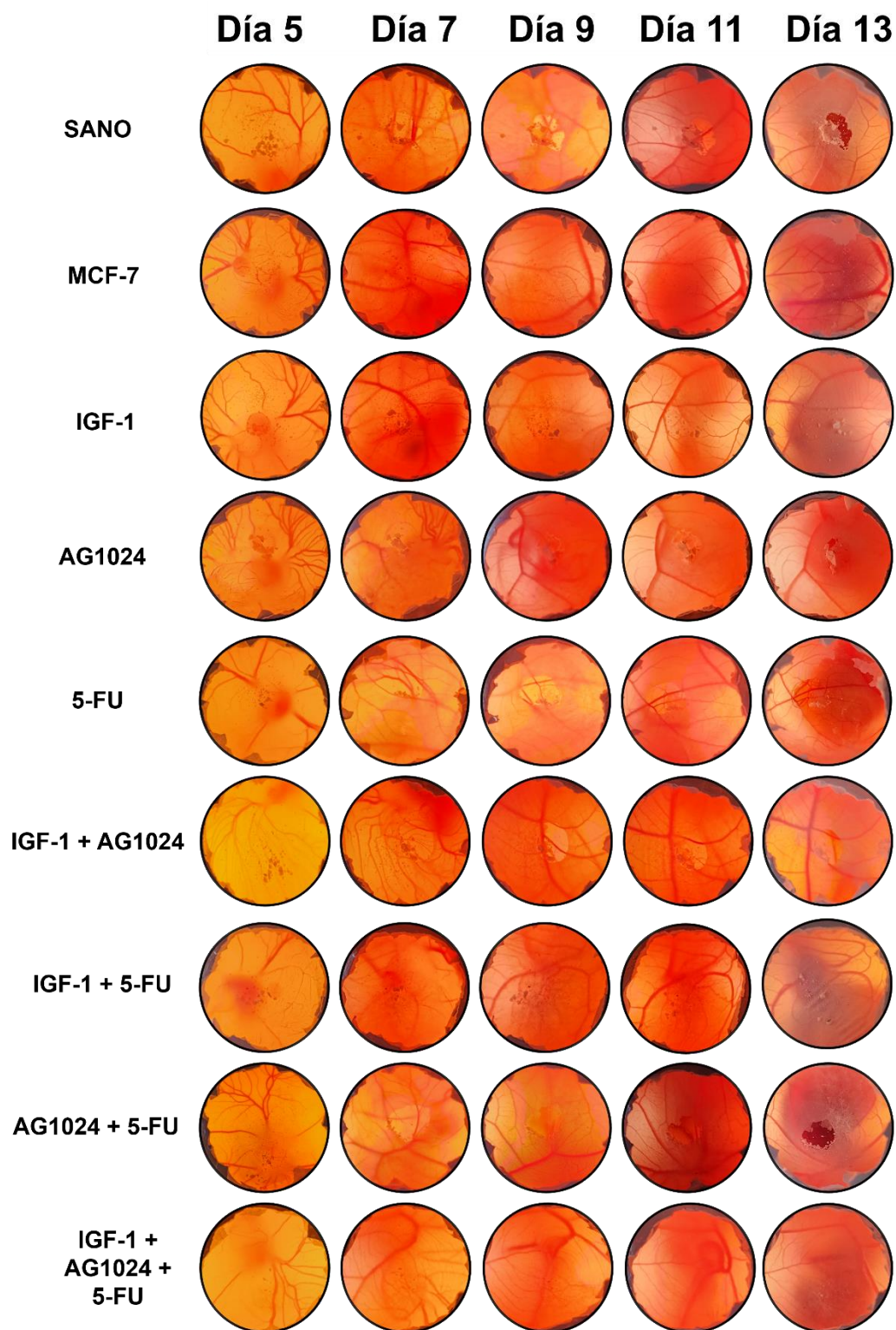


Figura 11. Fotografías de los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo injertados con células MCF-7 tratadas con IGF-1, AG1024, y 5-FU. Se muestran los días de incubación 5, 7, 9, 11 y 13, n = 5.

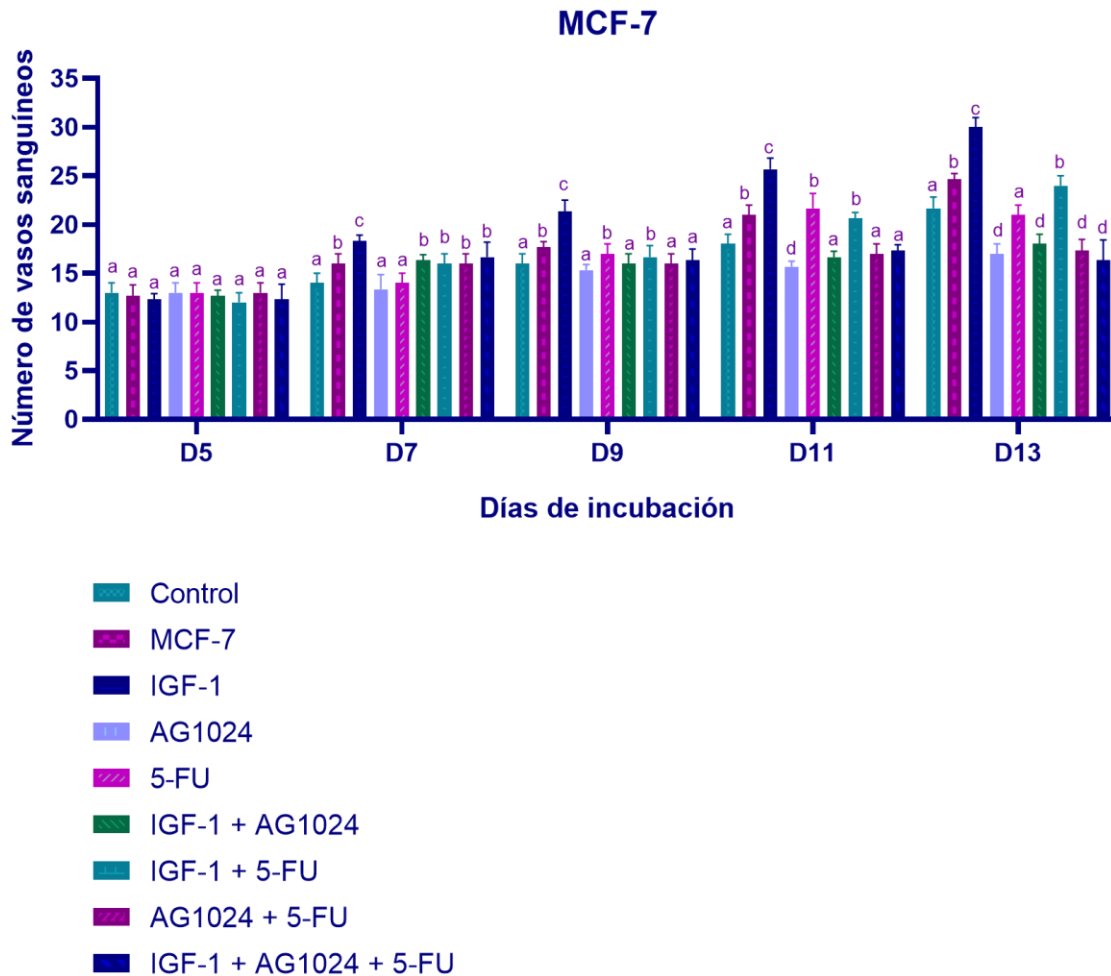


Figura 12. Efecto del IGF-1, AG1024, y el 5-FU sobre la angiogénesis de las células MCF-7. Se muestra la media  $\pm$  SEM,  $n=5$  por triplicado. ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ( $p<0.05$ ).

Por otro lado, se evaluó el efecto angiogénico del IGF-1, AG1024 y 5-FU en la línea celular MDA-MB-231, obteniéndose resultados similares a la línea MCF-7; con la presencia del IGF-1 se observó un aumento en la angiogénesis a lo largo de los días de evaluación (figura 13), con la administración del AG1024 aumentó la cantidad de vasos sanguíneos en el día 9 y posteriormente se detuvo este crecimiento hasta el día 13. Esto mismo sucedió con los grupos: IGF-1 + AG1024, AG1024 + 5-FU, e IGF-1 + AG1024 + 5-FU, donde no hubo diferencia significativa entre estos (figura 14). Finalmente, tanto con el uso del 5-FU en solitario como la combinación IGF-1 + 5-FU se registró un aumento en la angiogénesis similar al grupo sano, sin injerto de células ni tratamientos, a través de los días de evaluación.

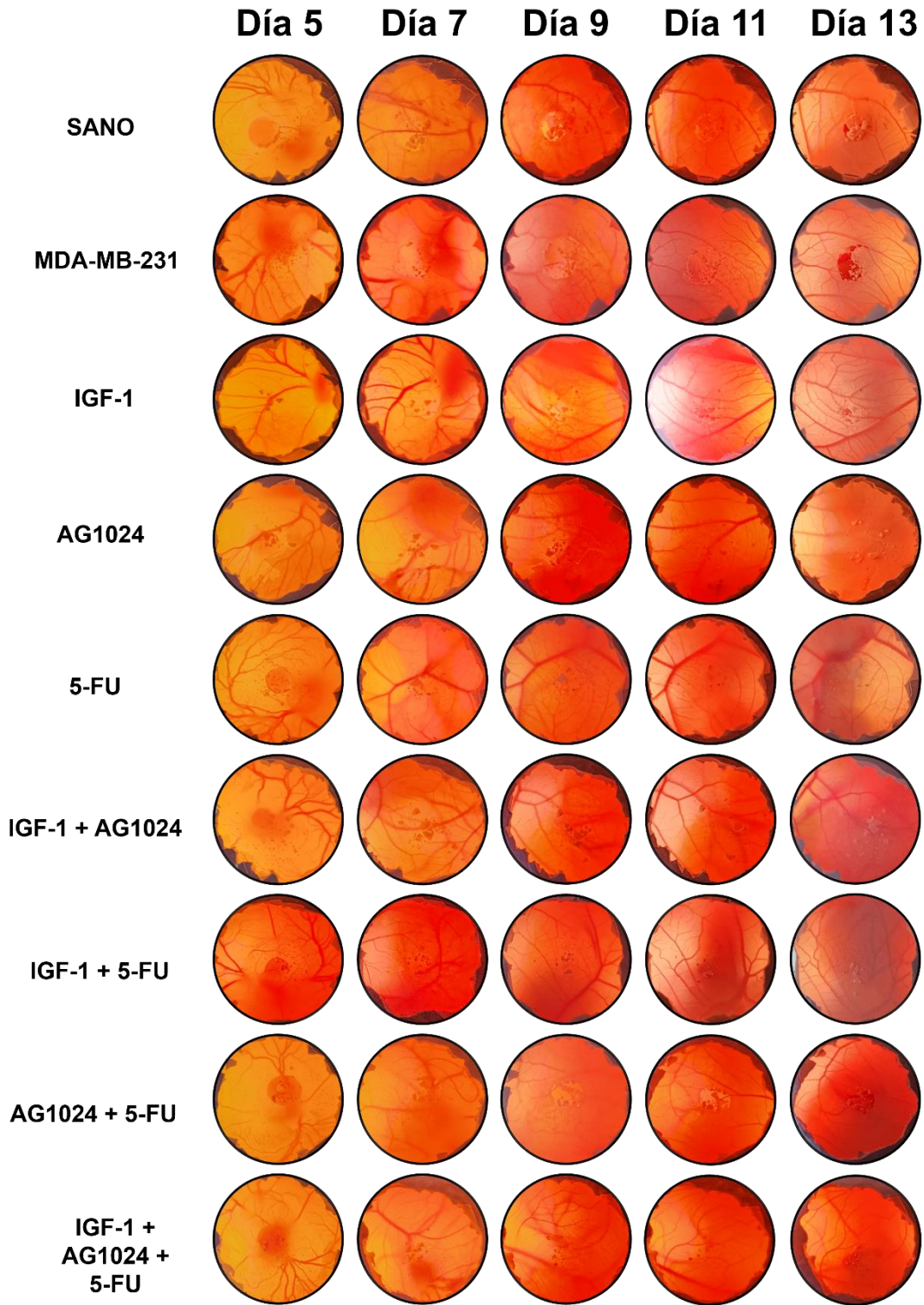
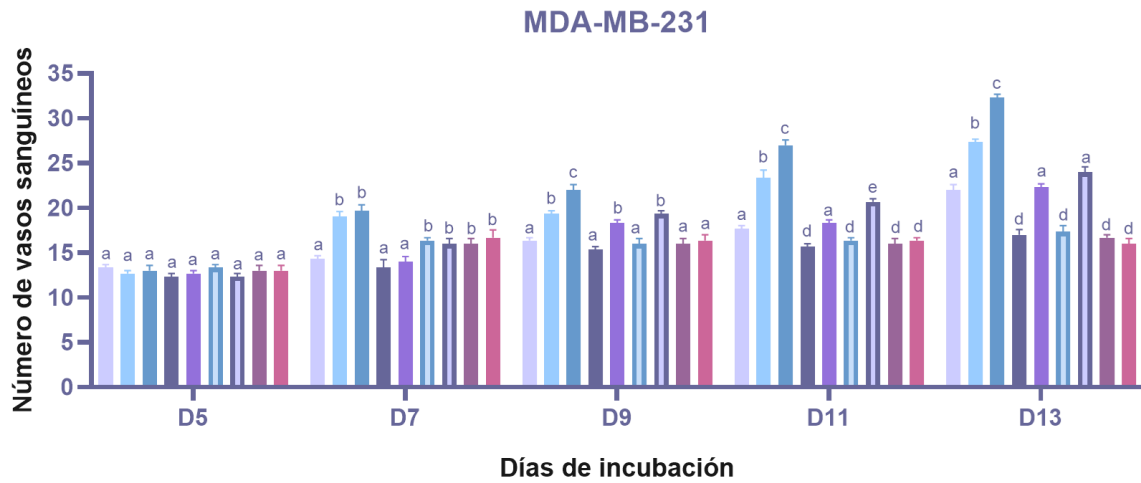


Figura 13. Fotografías de los vasos sanguíneos de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo injertados con células MDA-MB-231 tratadas con IGF-1, AG1024, y 5-FU. Se muestran los días de incubación 5, 7, 9, 11 y 13, n = 5.





- Control
- MDA-MB-231
- IGF-1
- AG1024
- 5-FU
- IGF-1 + AG1024
- IGF-1 + 5-FU
- AG1024 + 5-FU
- IGF-1 + AG1024 + 5-FU

Figura 14. Efecto del IGF-1, AG1024, y el 5-FU sobre la angiogénesis de las células MDA-MB-231. Se muestra la media  $\pm$  SEM, n=5 por triplicado. ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Evaluación de la proliferación celular mediante el conteo de azul tripano

Los resultados del efecto antiproliferativo del 5-fluorouracilo (5-FU) sobre las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-231-MB mostraron una IC50 de 52.51  $\mu\text{M}$  y 299.1  $\mu\text{M}$  después de 24 horas de exposición respectivamente (figura 3 y 5). La disminución en la población celular no representa una reducción dependiente de la dosis, ya que al incrementar las concentraciones sobre la IC50 no se observa una reducción mayor del número de células, esta tendencia se observó tanto en células MCF-7 como en células MDA-MB-231. Yuan y col. (2016) examinaron la expresión de Ki-67, una proteína nuclear asociada a la proliferación celular pues su concentración incrementa en la fase S del ciclo celular, y determinaron que en células MCF-7 existe una expresión reducida de Ki-67 (15-30 %) en contraste a la expresión de dicha proteína en las células MDA-MB-231 (30-50 %), considerándose un marcador de prognosis en la progresión del cáncer de mama. La Sociedad Europea de Oncología Clínica (ESMO) y el Congreso Internacional de Expertos en CM de St. Gallen determinaron que el valor de Ki-67 se relaciona con la tasa de proliferación celular, es decir, del total de células cancerígenas, solo cierto porcentaje de estas se encuentran en proliferación, por tanto, para las células de cáncer de mama, se reportan valores frecuentes de entre 30 a 50 % del porcentaje de células en proliferación (IECS, 2015). Con estos datos recopilados, podemos inferir que después de cierta concentración del fármaco 5-FU, las células en proliferación serán mínimas quedando solo las células en fase G0, y por ello, a concentraciones mayores a la IC50 no se percibe una reducción mayor de la población celular, pues el 5-FU no actúa sobre células en fase G0, solo en células replicativas, lo cual justifica la tendencia observada en las gráficas correspondientes a las figuras 3 y 5.

En cuanto al valor de la IC50 reportada para cada línea celular, se corroboró dicho valor con estudios reportados por otros investigadores. Se ha reportado que en células RE-Positivas (MCF-7) la IC50 del 5-FU fue de 50  $\mu\text{M}$  (Escobar, 2015) lo que coincide con nuestros resultados de este proyecto. Pero, para las células MDA-MB-231, encontramos incrementado el valor de la IC50 (299.1  $\mu\text{M}$ ) contrastando con los

resultados de Sagara y col. (2016) quienes indicaron una IC<sub>50</sub> del 5-FU en células MDA-MB-231 de 38.1  $\mu$ M. Cabe resaltar que el quimioterapéutico usado en este proyecto y el que fue usado por Escobar en 2015 corresponde a un medicamento comercial con excipiente, mientras que en otros estudios como el reportado por Hernández y col. (2006) donde indican una IC<sub>50</sub> de 10  $\mu$ M en células MCF-7 o los estudios citados anteriormente de Sagara y col. (2016) en células MDA-MB-2231, utilizan al 5-FU en su forma pura. Estas diferencias en la IC<sub>50</sub> del 5-FU se pueden explicar tomando en cuenta el efecto que puede tener el vehículo del fármaco comercial, el cual reporta las IC<sub>50</sub> más altas respecto a la bibliografía. Si bien se sabe que el excipiente no altera la funcionalidad del principio activo y que a su vez mejora características farmacocinéticas y farmacodinámicas para facilitar la acción farmacológica del medicamento, estos beneficios se prueban en modelos in vivo, pues se contempla, dependiendo de la vía de administración, el metabolismo de los fármacos que mejora su distribución y/o eliminación. En el caso de los medicamentos intravenosos, como es el caso del 5-FU, el excipiente asegura la estabilidad del medicamento en el medio polar sanguíneo, y permite que el medicamento llegue adecuadamente al primer paso pulmonar donde las cargas se neutralizan para que la molécula pueda atravesar las membranas celulares y generar su efecto anticancerígeno, pero en un modelo in vitro, estos fenómenos bioquímicos no ocurren lo que disminuye la disponibilidad del medicamento (Villafuerte, 2011). Los materiales que corresponden al excipiente del 5-FU de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos son: cloruro de sodio (8.5 mg/mL) y agua inyectable que permiten conservar el medicamento en forma de sal a un pH de 8.6 – 9.4 (mayor al pH fisiológico, que es de 7.4). Por tanto, el uso de medicamentos con vehículo en modelos in vitro no asegura que todas las moléculas del principio activo se encuentren disponibles para ejercer su acción farmacológica, lo cual justifica una IC<sub>50</sub> mayor a la reportada por otros investigadores (Villafuerte, 2011).

Por otro lado, existe una amplia diferencia entre la IC<sub>50</sub> del 5-FU en las células MCF-7 y las células MDA-MB-231 (52.51  $\mu$ M y 299.1  $\mu$ M respectivamente), el hecho de requerir mayor cantidad de fármaco para disminuir el 50 % de la proliferación celular en las células MDA-MB-231 se debe a que este tipo de células se encuentran menos

diferenciadas (representan al genotipo de cáncer de mama triple negativo), es decir, expresan menos receptores membranales lo que dificulta el tratamiento de este tipo de cánceres, siendo considerados de mal pronóstico y por lo tanto se utilizan quimioterapéuticos dirigidos al arresto del ciclo celular. Se sabe que el 5-FU genera su efecto anticancerígeno mediante dos mecanismos, el primero se refiere a la capacidad para inhibir la enzima timidilato sintasa, necesaria para la síntesis del ADN, el segundo mecanismo consiste en la incorporación del 5-FU en el ARN ocasionando alteraciones excesivas que conducen a apoptosis celular (Florez, 2014). En este contexto, la efectividad del 5-FU depende de la capacidad de las células cancerígenas para estimular el metabolismo de nucleótidos (NM) el cual se considera clásicamente como un motor de la proliferación celular (Lane y Fan, 2015). Generalmente, las células cancerosas son altamente dependientes de la síntesis de *novoo* de nucleótidos para producir suficientes precursores de ADN y ARN para apoyar su crecimiento (Gale, 2022). En un estudio realizado por Siddiqui y col. (2019) se demostró que en los tejidos cancerígenos de mama de las pacientes, los niveles de TS se encontraron significativamente más altos sobre todo en aquellos mal diferenciados y en los triple negativos, es por ello, que se relaciona con que en las células MDA-MB-231, al ser una línea celular representativa de cáncer triple negativo, existe una sobre expresión de TS y por ello es necesaria una mayor concentración de 5-FU para inhibir a dicha enzima y lograr la caída del 50 % de la población celular ( $IC_{50}$  mayor a la reportada para MCF-7).

Posteriormente se expusieron las células MCF-7 y MDA-MB-231 a IGF-1, AG1024, 5-FU en solitario y entre sus combinaciones (figura 4 y 6). El primer grupo evaluó el efecto de IGF-1 sobre ambas líneas celulares, obteniendo un incremento en la proliferación cerca del 150 % respecto al control tanto en MCF-7 como en MDA-MB-231. Este efecto proliferativo se explica por la aplicación natural del IGF-1, ya que es una hormona peptídica anabólica que tiene la función de estimular el crecimiento (Walsh y Damjanovski, 2011). Los niveles altos de IGF-1 se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer e incluso con una disminución de la esperanza de vida (Walsh y Damjanovski, 2011).

En el caso particular del cáncer de mama, se ha visto que existe un aumento en los valores de IGF-1, en consecuencia, los niveles y la actividad de IGF-1 se han examinado de cerca en tejidos proliferativos por su relación con los cambios en la morfología celular asociados con la progresión del cáncer (Walsh y Damjanovski, 2011). Por tanto, la proteína IGF-1 se ha implicado más fuertemente en la progresión del cáncer de mama debido a su efecto mitogénico y antiapoptótico en las células epiteliales mamarias (Leal y col., 2022). Es por ello, que el incremento en la proliferación celular en ambas líneas celulares se justifica y además se comprueba el efecto proliferativo del IGF-1.

Por otro lado, la concentración de IGF-1 que logra ese incremento en la proliferación difiere en las líneas celulares siendo 100 y 150 ng/ mL en MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente, en este caso, se ha informado del papel desempeñado por el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y su receptor afín IGF-1R en el desarrollo del cáncer de mama (Osher y Macaulay, 2019), en un estudio realizado por Rigracciolo y col. (2020) se registró, mediante el análisis computacional de la información genómica del cáncer en las bases de datos públicas (TCGA y METABRIC), evidencia de que los niveles altos de IGF-1 o IGF-1R se correlacionan con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama y un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, esto indica que existe una menor expresión de receptores a IGF-1 en las células menos diferenciadas, en este caso MDA-MB-231, de tal manera que se requiere una mayor concentración de su ligando para obtener la misma respuesta biológica total en contraste con las células MCF-7 que expresan más receptores, que fue lo observado en estos experimentos.

Además Rigracciolo y colaboradores, en el mismo estudio referenciado anteriormente, explicaron por primera vez la relación de una vía alterna de proliferación celular, la cual, después de cierto tiempo de exposición al ligando IGF-1 se activa, ésta vía es la FAK, que a su vez regula la acumulación nuclear de YAP, por tanto, los resultados de Rigracciolo y colaboradores sugieren que el eje IGF-1 / IGF-1R / FAK / YAP puede contribuir a la progresión del subtipo agresivo de cáncer de mama triple negativo específicamente.

El segundo grupo evaluó la actividad del AG1024 en la proliferación celular, mostrando un efecto inhibitor cerca del 50 % de la población similar tanto en MCF-7 como en MDA-MB-231. El AG1024 es un inhibidor de IGF-1R reversible, competitivo y selectivo que inhibe la fosforilación del receptor, induce apoptosis y tiene actividad anticancerígena, la inhibición de la señalización de IGF-1R por la tirfostina AG1024 se dirige indirectamente a múltiples vías clave para la proliferación celular (Riedeman y col., 2006).

En un estudio realizado por Deutsch y colaboradores en 2001, mostró que la exposición a AG1024 se asoció con una disminución en la forma fosforilada de Akt en la serina 473 (Ser 473), que es el principal componente aguas abajo de la vía PI3K/Akt, responsable de la inhibición de la apoptosis y la proliferación celular (Deutsch y col., 2001). Como se mencionó, el PI3K y Akt se han relacionado con una mayor supervivencia celular a través de la fosforilación y la posterior inhibición de la molécula pro apoptótica Bad (Neshat y col., 2000). Es por ello por lo que la tirfostina AG1024 también induce la apoptosis y mejora la radio sensibilidad al regular negativamente la vía de señalización PI3K/Akt (Wen y col., 2001). La tirfostina AG1024 es un inhibidor de tirosina quinasa (TK) que inhibe la fosforilación de IGF-1R y MEK, este compuesto también puede inducir la degradación de pRb (Baserga, 2000). Todas estas vías de señalización pueden estar involucradas para inhibir la proliferación celular. Nuestros resultados sugieren que alguna o algunas de estas vías fueron bloqueadas con el inhibidor AG1024, ya que la respuesta general observada es la disminución de la proliferación celular.

El cuarto grupo corresponde a la evaluación del IGF-1 + AG1024. Lo que se buscó fue representar las condiciones tumorales donde se encuentra sobreexpresado el receptor de IGF-1 y por ende su ligando natural (IGF-1), demostrando la capacidad del inhibidor selectivo AG1024 para preservar su actividad antiproliferativa bloqueando al receptor. Los resultados reportados en esta investigación demuestran que a la concentración de 11.49  $\mu$ M y 17.18  $\mu$ M de AG1024 en células MCF-7 y MDA-MB-231

respectivamente, se logra reducir cerca del 50 % de la población celular. Esto indica que el AG1024 tiene la capacidad de inhibir al receptor de IGF-1 deteniendo la señalización aguas abajo a su activación pese a la presencia del ligando, el cual puede unirse al receptor, pero no desencadenar su activación por el bloqueo con AG1024. Esta reducción en la proliferación es similar a lo reportado por Wei y col. (2015) donde se observa una disminución del 40 % de la población celular al colocar el IGF-1 y el AG1024 en células de cáncer de pulmón, este efecto se justifica por el bloqueo aguas abajo, que como ya se mencionó anteriormente, involucra vías de las JAK-STAT3, PI3K-AKT y MAPK's responsables de la invasividad y proliferación celular.

En el quinto grupo se evaluó el efecto del IGF-1 y el 5-FU, con la finalidad de demostrar la capacidad del 5-FU de preservar su actividad antiproliferativa pese a la presencia de IGF-1, que, como ya se mencionó anteriormente, funciona como un factor de crecimiento asociado a proliferación celular. En este caso, se observa una disminución de la proliferación celular cercana al 50 %, este resultado indica que el 5-FU es capaz de mantener su actividad anticancerígena aun y cuando se estimula la vía de IGF-1 / IGF-1R. Para comprender los mecanismos implicados en esta respuesta observada, se destaca que el IGF-1 al unirse y activar a su receptor, va a desencadenar las cascadas de señalización de las MAPK's y PI3K/AKT principalmente, esto a su vez generará factores estimulantes del ciclo celular, una vez que la célula comience a proliferar de manera descontrolada va a requerir de nucleótidos para seguir duplicando su material genético y es hasta este punto donde actúa el 5-FU pues inhibe a la TS teniendo como respuesta final, el arresto del ciclo celular y la regresión de la proliferación.

El sexto grupo corresponde a la evaluación de AG1024 + 5-FU, con esta combinación se esperaba observar un efecto sinérgico por los diferentes mecanismos implicados de las dos moléculas, pero, al igual que en los grupos anteriores, la proliferación se redujo cerca del 50 % respecto al control en ambas líneas celulares. Estos resultados se pueden justificar al analizar propiamente los mecanismos principales involucrados, ya que el 5-FU requiere que las células se encuentren en reproducción para poder ejercer su efecto, ya que, si la célula no está proliferando, no requerirá la activación

del ciclo de los folatos, de tal forma que, aunque el 5-FU inhiba a la TS, no habrá repercusiones notorias en la proliferación celular. Por tanto, al inhibir aguas arriba a la vía de proliferación IGF-1/IGF-1R, las células no se van a replicar, no se podrá generar un sinergismo entre las 2 moléculas y, por lo tanto, solo se observa el efecto inhibitorio del AG1024.

Por último, en el séptimo grupo se evaluó el efecto del IGF-1 +AG1024 + 5-FU, observando una reducción en la proliferación cercana al 50 % en ambas líneas celulares, en este caso, el principal efecto que determina este bloqueo en la proliferación celular, es la inhibición del receptor IGF-1 R por AG1024, ya que al impedir su fosforilación, las vías de señalización aguas abajo se verán bloqueadas pese a la presencia del ligando IGF-1 como se explicó anteriormente, y por consecuencia, menos células se encontraran en reproducción, siendo menor el impacto del 5-FU, que de igual manera como se mencionó con anterioridad, requiere que las células proliferen para generar el arresto del ciclo celular, es por ello que se sugiere que en proliferación celular, el AG1024 es el principal causante de dicha actividad, predominando sobre el IGF-1 como estimulante y el 5-FU como anticancerígeno.

## **9.2 Evaluación de la migración celular mediante el ensayo de herida**

Seguido de los ensayos de proliferación se realizaron los ensayos herida con la finalidad de conocer el efecto de cada sustancia y sus combinaciones en la migración celular en MCF-7 y MDA-MB-231, cabe resaltar que se usaron las mismas concentraciones que en los ensayos de proliferación de cada sustancia respectivamente.

El primer grupo evaluado corresponde al efecto del IGF-1 sobre la migración en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. En ambas líneas celulares se observa una diferencia significativa en el porcentaje del cierre de herida respecto al control, ya que a partir de las 12 horas se observa el cierre de la herida, siendo en las células MDA-MB-231 más rápido que en las células MCF-7.



Es importante resaltar que durante el proceso de transición epitelio-mesénquimal (EMT) existe una disminución de E-cadherina y  $\beta$ -catenina, desmoplacina, citoqueratina-8 y citoqueratina-18 y aumenta la concentración de N-cadherina, vimentina, fibronectina, actina de músculo liso y secreción de metaloproteinasas de matriz (MMP) (Huang y Li., 2015). Recientemente, se ha sugerido que IGF-1 regula la actividad de la metaloproteinasa de matriz (MMP) a través de las vías PI3K y MAPK, y que la vía de señalización de IGF-1 interactúa con la vía de TGF- $\beta$  (Lorenc, 2014). Estas vías pueden estar estimulándose tanto en MCF-7 como en MDA-MB-231. De acuerdo con lo reportado por Chen y col. (2013), se ha encontrado que cuando se administra IGF-I, el IGF-IR puede inducir la fosforilación de tirosina del sustrato del receptor de insulina I (IRS-1), y luego activar respectivamente dos vías de señalización: las vías Ras-MAPK y la vía PI3K-Akt/PKB cuya respuesta final es el aumento de la migración e invasividad celular (Chen y col., 2013). En otro estudio realizado por Kumar y col. (2006), se mostró que la vía PI3K-Akt/PKB juega un papel principal cuando es inducida por IGF-I en las células de cáncer de mama pues promueve la migración celular. De tal forma que la activación de estas vías en ambas líneas celulares, logran la respuesta migratoria positiva observada en nuestros resultados.

Además de observar el efecto promigratorio del IGF-1 en ambas líneas celulares, en las células MDA-MB-231 se cerró la herida más rápido que en las células MCF-7, este comportamiento diferencial en la velocidad de migración entre cada línea celular se explica por dos diferentes mecanismos, el primero, se sugiere que sea por la cantidad de receptores IGF-1R expresados en MDA-MB-231 en contraste con los expresados en MCF-7, pues las células MDA tienen mayor cantidad de receptores, por lo cual, al estar presente el IGF-1, que es ligando natural, puede activarlos todos y así generar la migración y posterior cierre de la herida en un tiempo más corto que las células MCF-7 que tienen más receptores, esto también justifica el uso de una mayor cantidad de IGF-1 en las células MDA-MB-231 (Rigiracciolo y col. 2020). El segundo mecanismo se explica retomando los resultados reportados por Leal y col. (2022), donde introduce un nuevo concepto en migración celular, y es la capacidad de las

células de cáncer de mama MDA-MB-231 de generar vesículas por la estimulación con IGF-1 (EV) a 10 nM, dichos resultados concluyen que hay una inducción previa en la transición epitelio-mesenquimal (EMT), y sugieren fuertemente que IGF-1 juega un papel importante en el proceso de invasión y metástasis en el cáncer de mama a través de la liberación de EV de las células de cáncer de mama ya que en el modelo de células sanas, al colocar las vesículas liberadas por IGF-1, que contienen factores activadores, les otorga la capacidad de migrar a estas células no cancerígenas (MCF-10A) (Leal y col., 2022).

El segundo grupo evaluó el efecto sobre la migración celular del AG1024, observando que tanto en células MCF-7 como en células MDA-MB-231, existe inhibición de la migración celular respecto al control evitando el cierre de herida, donde solo se logró el cierre del 25 % a las 24 horas (figuras 7 - 10). Estos resultados se esperaban pues se sabe que el AG1024 impide la fosforilación del IGF-1R causando el bloqueo de las vías aguas abajo que incluye la vía de Raf, MEK1/2 y ERK ½ que regulan la supervivencia e invasividad tumoral, la vía de PI3K-AKT que incrementa la producción de metaloproteasas y otras proteínas que favorecen la migración celular (Heinrich y col., 2000) y la cascada de JAK-STAT3 que promueve la proliferación y migración celular, pues en un estudio realizado por Ma y col. (2020), se indicó que la activación de la vía IGF-1/STAT3 disminuye la producción KLF5 e incrementa la MMP9 (metaloproteasa 9 de matriz) en cáncer de próstata.

Debido a que no hay información sobre la capacidad antimigratoria del AG1024 en células de cáncer de mama, nuestros resultados demuestran dicha capacidad anti-invasiva en dos líneas de cáncer de mama con características genóticas distintas, representativas de un modelo responsivo a estrógeno (MCF-7) y otro más diferenciado (MDA-MB-231). Esta capacidad antimigratoria del AG1024 ha sido demostrada en otras líneas celulares de cáncer, por ejemplo, en un estudio realizado por Jones y col. (2004) observaron que a una concentración de 10  $\mu$ M, el inhibidor de IGF-1R, AG1024 redujo significativamente (45%,  $P \leq 0,05$ ) la capacidad migratoria de las células DU145/TKI-R (células metastásicas de origen prostático en el sistema nervioso central), en comparación con los valores de control. Estos antecedentes demuestran

el efecto antimigratorio del AG1024 y respaldan los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo evaluando su actividad sobre líneas de cáncer de mama.

El tercer grupo determinó el efecto del 5-FU sobre la migración celular en células MCF-7 y MDA-MB-231, donde se observó un efecto similar al control en las células MCF-7 y en las células MDA-MB-231 en un tiempo de 24 horas donde la herida se cerró completamente, es decir, el 5-FU no presentó un efecto antimigratorio a la concentración y tiempos de tratamiento evaluados.

Primeramente, el 5-FU actúa sobre las células que se encuentran en proliferación por la adición del mismo en el ARN y la inhibición de la TS, que detiene el ciclo de los folatos, es decir, no tiene efecto en células en fase G0, por tanto, no se espera un efecto sobre la migración, ya que, en principio, las células solo se “mueven” para cerrar la herida pero no se multiplican. Sin embargo, la intención de evaluar su efecto sobre la migración es para corroborar si existe o no, inhibición o activación de alguna vía alterna que pudiera generar el efecto antimigratorio, pues este es un medicamento que se usa de primera línea para tratar al cáncer y es de los primeros en recetarse para tratar el cáncer de mama triple negativo. Este tratamiento es el más recomendado y este tipo de cáncer es altamente invasivo, pero al observar los resultados obtenidos, no existe un efecto antimigratorio del 5-FU, por el contrario, en las células MDA-MB-231, se observa un cierre más rápido de la herida respecto al control, por tanto, estos resultados remarcan la importancia de investigar moléculas que puedan convertirse en medicamentos que en conjunto o en solitario, no solo actúen como antiproliferativos o proapoptóticos, sino que también disminuyan la migración celular sobre todo en cánceres altamente invasivos.

No existen estudios que evalúen el efecto del 5-FU sobre la migración celular, pero, de acuerdo con los antecedentes, existen estudios donde el 5-FU se administra en conjunto con otras moléculas que inhiben la invasividad de las células cancerígenas para que después el 5-FU pueda ejercer su efecto antiproliferativo mediante el arresto del ciclo celular, ambos mecanismos en conjunto logran contrarrestar la progresión

del cáncer. Uno de estos estudios es el realizado por Proietti y col. (2021) donde indicaron que los extractos de embrión de pez cebra (SL) tienen propiedades antimigratorias y anti-invasivas por la presencia de factores morfogenéticos extraídos que en asociación con 5-fluorouracilo (5-FU) logran inhibir la migración y proliferación en células de cáncer de mama metastásico (MDA-MB-231) logrando una mejora en la reducción de la progresión del cáncer. Otro estudio realizado en líneas de cáncer (ZLDI-8) de cáncer colorrectal, Li y col., (2018) demostraron que se mejora la terapia con 5-FU al revertir la transición de Notch relacionado a la transición epitelio-mesenquimal utilizando un inhibidor de ADAM17, el cual funge como antimigratorio. Con estos antecedentes, más lo reportado por nuestro grupo de investigación, ha sido demostrada la necesidad de moléculas con actividad antimigratoria, que disminuyan la invasividad celular y que, a su vez, puedan potenciar el efecto de otros medicamentos como el 5-FU que actúan en la proliferación celular, para que en conjunto se mejore el pronóstico del cáncer.

El cuarto grupo corresponde al efecto de IGF-1 + AG1024 con la finalidad de probar el efecto del inhibidor del AG1024 en condiciones donde el ligando IGF-1 se encuentra expresado y disponible para las células cancerígenas, en representación de lo que puede pasar a nivel tumor. En este caso, se obtuvo un efecto similar al grupo donde solo se encontraba el AG1024, es decir, se evita el cierre de la herida en un 35 % aproximadamente tanto en células MCF-7 y MDA-MB-231. Con estos resultados podemos inferir que, pese a la estimulación del ligando IGF-1, el inhibidor AG1024 logra ocasionar una disminución en la migración celular, confirmando su efectividad y la afinidad que tiene al bloquear el receptor aun con la unión de su ligando natural. El AG1024 al bloquear al receptor de IGF1 impide que se desencadenen las cascadas aguas abajo, es decir, no importa si el ligando (IGF-1) está circulando en el medio, puede incluso llegar y unirse a su receptor, pero al estar presente el inhibidor, podemos demostrar con estos experimentos, que bloquea la señal efectivamente e impide la migración celular.

No existe información sobre la combinación del IGF-1 (estimulante) y AG1024 (inhibidor) en la migración celular, por tanto, estos resultados aportan conocimiento

sobre la prevalencia de la inhibición del AG1024 sobre el receptor de IGF-1R aun cuando el IGF-1 se una. Estos resultados sugieren entonces, al AG1024 como un inhibidor importante de la migración celular que se use en conjunto de algún otro anticancerígeno para mejorar la respuesta anticancerígena.

El quinto grupo evalúa el efecto en la migración celular de IGF-1 + 5-FU, donde se obtiene que en las células MCF-7, a las 12 horas se logra el cierre de la herida, teniendo además un comportamiento similar al grupo con solo IGF-1, y para el caso de las células MDA-MB-231, existe un comportamiento similar al grupo que tenía solo IGF-1. Además, se puede inferir una mayor velocidad de migración de las células MDA-MB-231 sobre las células MCF-7. Este comportamiento se puede explicar por el número de receptores de IGF-1R presentes, que, como ya se mencionó anteriormente, se expresan más en las células MDA-MB-231 que en las células MCF-7, logrando la activación de más receptores que promuevan la migración más rápidamente en contraste a las células MCF-7. Por otro lado, se comprueba, en ambas líneas celulares, que no existe un efecto inhibitor del 5-FU en la migración celular, ya que no existe una diferencia significativa al grupo control, al contrario, las células de ambas líneas celulares migran más rápido, esto se explica por el mecanismo de acción del 5-FU que actúa en células en reproducción y no involucra acción en células en G0.

El sexto grupo corresponde al efecto del AG1024 +5-FU, donde se observó que en ambas líneas celulares existe una diferencia respecto al control a las 24 horas, es decir, se evita el cierre de la herida tanto en células MCF-7 y células MDA-MB-231, además de observar un efecto similar al reportado por el grupo del AG1024 en solitario. Con esta combinación de buscaba un sinergismo entre el inhibidor AG1024 y el 5-FU, sin embargo, no se observa dicha sinergia, solo se observa el predominante efecto del AG1024, el cual inhibe las vías aguas abajo implicadas en la migración celular, como ya se explicó anteriormente, y se puede inferir que el 5-FU no interfiere en el efecto antimigratorio ya que en combinación como en solitario no presenta dicho efecto, pues como ya se mencionó, actúa en células de reproducción rápida y no en células en fase G0.

El séptimo grupo fue la evaluación de la combinación de las tres sustancias, IGF-1 + AG1024 + 5-FU, donde se observó que en ambas líneas celulares existe una diferencia respecto al control a las 24 horas, es decir, se evita el cierre de la herida tanto en células MCF-7 y células MDA-MB-231, además de presentar un comportamiento similar al grupo que usó solo el AG1024. De igual forma, predomina el efecto inhibitor del AG1024, ya que de manera individual y en combinación solo con el IGF-1 logró inhibir la migración celular, esto por el bloqueo de vías de señalización aguas abajo, como se explica con anterioridad, evitando la activación del IGF-1R pese a la presencia de IGF-1. También se infiere que el 5-FU no participa dado que las células están en fase G0.

### **9.3 Evaluación de la angiogénesis mediante el modelo CAM**

Se evaluó el impacto de las células MCF-7 y MDA-MB-231 en la angiogénesis del embrión de pollo, así como del IGF-1, AG1024 y del 5-FU, y sus combinaciones de estas tres sustancias, utilizando el modelo de la CAM (figuras 11 – 14). Con nuestros resultados demostramos que el 5-FU no actúa modulando vías angiogénicas, mientras que el IGF-1 es un agente proangiogénico y el AG1024 actúa como inhibidor de la angiogénesis, estos resultados se presentan a continuación.

En MCF-7 existe un aumento en la formación de vasos sanguíneos estadísticamente significativo con respecto al control, a partir del día 7. De igual forma, en las células MDA-MB-231. Este aumento en la angiogénesis se entiende porque es un proceso vital para el crecimiento y diseminación de cánceres sólidos, como lo es el cáncer de mama (Ayoub y col., 2022). Dentro de los factores pro angiogénicos más importantes en el cáncer de mama, se encuentra el VEGF (Ribatti y col., 2016). La sobreexpresión de VEGF ocurre con frecuencia antes de la invasión de células de cáncer de mama, es decir, los niveles séricos de VEGF se correlacionaron con una etapa avanzada del cáncer de mama (Ribatti y col., 2016). También se ha encontrado que la angiogénesis en el carcinoma de mama está regulada por VEGFR-2, VEGFR-3, VEGF-D y VEGF-C (Eroğlu y col., 2017). La expresión de VEGF-D se asoció con metástasis en los

ganglios linfáticos en tejidos de cáncer de mama (Eroğlu y col., 2017). Además de VEGF, el cáncer de mama humano invasivo expresa múltiples factores pro angiogénicos, incluidos TGF- $\beta$ 1, pleiotrofina, FGF ácido y básico, factor de crecimiento placentario y PDGF (Ayoub y col., 2022). Debido a la naturaleza de las células cancerígenas se espera un incremento en la angiogénesis como se demostró estadísticamente con nuestros resultados.

En ambas líneas celulares se observa un aumento cerca del 25% en la formación de nuevos vasos sanguíneos estadísticamente diferente respecto al control, y en una mayor cantidad (cerca del 50%) que las células sin tratamiento. Esta diferencia se da a partir del día 7 en ambas líneas celulares al tratarse con IGF-1. Como ya se mencionó anteriormente, las células de cáncer de mama propiamente secretan factores que producen angiogénesis, sin embargo, al adicionar el IGF-1, este aumento en la formación de vasos es mayor, este efecto se explica retomando la actividad estimulante del IGF-1 al actuar como un factor de crecimiento. Propiamente, el eje IGF-1/IGF-1R y RAGE está relacionado directamente con un aumento en la angiogénesis (Emberley y col., 2004). De acuerdo con estudios realizados por Muoio y col. (2021), la proteína de unión al calcio S100 A7 (S100A7), que pertenece a la familia de proteínas S100, se expresa en diversos tumores, incluido el cáncer de mama y, aunque generalmente no se expresa en el epitelio mamario normal, los niveles de S100A7 aumentan en las primeras etapas de progresión. En otro estudio realizado por estos mismos autores, se elucidó el mecanismo de S100A7, demostraron que actúa como una molécula similar a la citocina que se une a su receptor RAGE (Receptor para productos finales de glicación avanzada), una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Muoio y col., 2021). Previamente, se ha demostrado que una vía S100A7/RAGE activada promueve los efectos angiogénicos y facilita la diseminación de la metástasis mamaria (Nasser y col., 2015). En una investigación elaborado por Lapeire y col. (2014) demostraron por primera vez, que el eje IGF-1/IGF-1R desencadena la activación transcripcional dependiente de STAT3 de S100A7, que actúa como un mediador paracrino en el microambiente del tumor de mama, es decir, la activación dependiente de IGF1 de la señalización S100A7/RAGE induce la proliferación de células endoteliales vasculares

humanas y su ensamblaje en estructuras similares a vasos sanguíneos.

Por otro lado, se ha demostrado que, mecánicamente, otros factores como el lncRNA-NR2F1-AS1 puede aumentar la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) a través de un efecto “esponja” donde se forma el miRNA-338-3p en células de cáncer de mama y luego, este compuesto activó al receptor de IGF-1 (IGF-1R) ocasionando una regulación de señal extracelular, por tanto, estos resultados indicaron que lncRNA-NR2F1-AS1 podría promover la angiogénesis del cáncer de mama a través de la vía IGF-1/IGF-1R/ERK (Zhang y col., 2020).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se puede explicar el aumento en la angiogénesis mediado por IGF-1 en ambas líneas celulares como se reporta en este proyecto de investigación.

El AG1024 logra disminuir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del día 11 en células MCF-7 y MDA-MB-231. Si bien no existen reportes del efecto de AG1024 sobre la angiogénesis, se puede inferir que, dado que inhibe al receptor de IGF-1R, las vías aguas abajo se ven reguladas negativamente, es por ello que, en caso de angiogénesis, como se explicó anteriormente, el IGF-1 puede incrementar la formación de vasos sanguíneos por la activación de la vía IGF-1/IGF-1R/ERK o por el eje de IGF-1/IGF-1R/STAT3/S100A7/RAGE, si se bloquea el receptor estas vías se inhiben por consecuencia, generando un efecto de “*stand by*”, disminuyendo la angiogénesis.

El 5-FU no muestra diferencia respecto al control, es decir no favorece la angiogénesis, pero tampoco la inhibe, este comportamiento se observa en ambas líneas celulares. Como se ha mencionado a lo largo de esta discusión, el 5-FU ejerce su acción citotóxica sobre las células en proliferación mediante la inhibición de la timidilato sintasa (TS) y la incorporación de sus metabolitos en el ARN y el ADN (Longley y col., 2003). Adicional a estos mecanismos del 5-FU, se desconoce si alguno se relaciona directamente sobre la angiogénesis. Sin embargo, se han sumado



esfuerzos para desarrollar análogos del 5-FU con actividad antiangiogénica, en estudio elaborado por Ooyama y col. (2008), examinaron la actividad antitumoral y antiangiogénica de los fármacos a base de 5-fluorouracilo (5-FU) S-1 (tegafur, 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y oxonato de potasio) y capecitabina en xenoinjerto de cáncer colorrectal, donde encontraron que ambos fármacos mostraron actividades antitumorales significativas contra los xenoinjertos de COL-1 a una dosis submáxima tolerada (sub-MTD), que fue inferior a la dosis máxima tolerada (MTD). En el sub-MTD, observaron una reducción significativa en el número de microvasos y la mejora de la apoptosis de células endoteliales de microvasos asociada a tumores en xenoinjertos tratados con S-1. Además, encontraron que la expresión de trombospondina-1 (TSP-1), que se sabe que es un mediador de los efectos antiangiogénicos de la quimioterapia metronómica, estaba significativamente regulada al alza en tejidos tumorales de xenoinjertos y plasma en animales tratados con S-1 en un sub-MTD. La capecitabina también mostró una tendencia hacia la inducción de TSP-1. Estos resultados sugieren que los fármacos basados en 5-FU inhiben la progresión tumoral a través de diferentes mecanismos de acción, incluida la actividad citotóxica derivada del 5-FU y la inhibición de la angiogénesis a través de la inducción de TSP-1 por sus análogos. En la actualidad no existen reportes suficientes que demuestren la participación del 5-FU en la angiogénesis, y en nuestro grupo de estudio no hubo una diferencia significativa respecto al control en el número de vasos formados.

En el grupo IGF-1 + AG1024 se observó una disminución en la formación de vasos sanguíneos a partir del día 13 en células MCF-7, en las células MDA-MB-231 se observó esta disminución a partir del día 11. Retomando el mecanismo de acción del AG1024, indicamos el bloqueo del receptor de IGF-1R, impidiendo la activación de las vías de señalización aguas abajo que tienen efectos angiogénicos como la vía IGF-1/IGF-1R/ERK o por el eje de IGF-1/IGF-1R/STAT3/S100A7RAGE, lo importante a resaltar, es que, pese a que se encuentra el ligando natural del receptor (IGF-1), prevalece la acción inhibitoria del AG1024., lo cual la convierte en una molécula prometedora, pues en este grupo se busca simular las condiciones reales del cáncer, donde hay presencia de IGF-1 y dicha concentración, respecto al estadio del cáncer,

va en aumento.

Para el grupo IGF-1 + 5-FU no existe una disminución en la formación de vasos sanguíneos, en células MCF-7 hay un incremento estadísticamente significativo respecto al control a partir del día 7, presentando un comportamiento similar al grupo con IGF-1 en solitario, por otro lado, en los días 7 y 9 incluso incrementa la formación de vasos sanguíneos respecto al control en células MDA-MB-231, presentando un comportamiento similar al grupo donde solo se había colocado el IGF-1, para el día 11 esta formación de vasos seguía siendo mayor que el control pero menor al grupo de IGF-1 en solitario, y ya para el día 13, no hubo diferencia significativa con respecto al control. Como se explicó anteriormente, el IGF-1 es un ligando pro angiogénico por ende se espera un aumento en la formación de vasos sanguíneos, el cual se esperaba mitigar con la presencia del 5-FU, sin embargo, no genera un efecto antiangiogénico, ya que en solitario tampoco mostró actividad, los mecanismos de éste quimioterapéutico no van enfocados a disminuir la formación de vasos sanguíneos, si no que ejerce su acción citotóxica en células en proliferación, y justo por esta acción en el día 13 se “detiene” la formación de vasos, pero se sugiere que es debido al efecto antiproliferativo que compite y reduce el número de células, mas no por una acción directamente en la angiogénesis, ya que además este comportamiento no es menor al reportado por el grupo control.

El siguiente grupo evaluó el efecto sobre la angiogénesis del AG1024 + 5-FU, donde se observa una disminución estadísticamente menor con respecto al control en el día 13 en células MCF-7, y en células MDA-MB-231, esta disminución se nota a partir del día 11. Dicha disminución o arresto de la angiogénesis, se le atribuye al AG1024 únicamente (se propone el bloqueo de las vías angiogénicas descritas con anterioridad mediadas por IGF-1/IGF-1R), ya que no existe sinergismo con el 5-FU, que, como se reportó en los 2 grupos anteriores, no generó un cambio significativo en la formación de vasos sanguíneos en ambas líneas celulares.

El último grupo evaluó el efecto de IGF-1 + AG1024 + 5-FU donde en células MCF-7,

se mostró una disminución en la formación de vasos sanguíneos a partir del día 13, mientras que en las células MDA-MB-231, esta disminución se presentó desde el día 11. Este arresto de la angiogénesis, se le atribuye al AG1024 únicamente (se propone el bloqueo de las vías angiogénicas descritas con anterioridad mediadas por IGF-1/IGF-1R), ya que no existe sinergismo con el 5-FU, y anteriormente en el grupo de IGF-1 + AG1024, la acción inhibitoria predominó pese a la presencia del ligando natural.

## 10. CONCLUSIONES

1. El IGF-1 incrementa la proliferación con respecto al control tanto en MCF-7 (100 ng/mL) como en MDA-MB-231 (150 ng/mL).
2. El AG1024 mostró un efecto inhibitor en la proliferación celular tanto en MCF-7 (11.49  $\mu$ M) como en MDA-MB-231 (17.18  $\mu$ M). Además, el AG1024 es capaz de inhibir la proliferación celular con la adición del IGF-1.
3. El 5-FU disminuye la proliferación celular en las líneas MCF-7 (52.52  $\mu$ M) y MDA-MB-231 (299.1  $\mu$ M). El 5-FU logra mantener su actividad antiproliferativa aun en presencia del IGF-1.
4. En cuanto a la migración celular, el IGF-1 actúa como un agente pro migratorio en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.
5. Nuestros resultados son el primer antecedente que demuestra la capacidad antimigratoria del AG1024. El AG1024 inhibe la migración celular en la línea F-7 y la línea MDA-MB-231, como en adición con IGF-1.
6. El 5-FU no presentó un efecto antimigratorio en las células MCF-7 (52.51  $\mu$ M) y las MDA-MB-231 (299.1  $\mu$ M), y tampoco redujo el efecto pro migratorio del IGF-1.
7. El IGF-1 induce la formación de vasos sanguíneos en el modelo CAM generado con ambas líneas celulares.
8. El AG1024 inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos en el modelo CAM con el injerto de células MCF-7 (10  $\mu$ M) y MDA-MB-231 (15  $\mu$ M).
9. El 5-FU no inhibe la angiogénesis, pero tampoco la favorece.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ACS**, American Cancer Society. ¿Qué es el cáncer? [monografía en internet] Estados Unidos: **2019** [consultado 2022 junio 16] Disponible en: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/que-es-el-cancer.html>

**Akram M**, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res* [serie en internet] **2017** [consultado 2022 junio 16]; 50(1):33. Disponible en: <https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-017-0140-9>

**Alberts B**, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, y col. *Molecular Biology of the Cell*. 6a. edición. Estados Unidos: Garland Science. **2015**: 1091-1092.

**Allard JB**, Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol (Lausanne)* [serie en internet] **2018** [consultado 2022 junio 16]; 9:117. Disponible: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00117/full>

**Al-Ostoot FH**, Salah S, Khamees HA, Khanum SA. Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities. *Cancer Treat Res Commun* [serie en internet] 2021 [consultado 2021 octubre 18]; 28:100422. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34147821/>

**Ayoub NM**, Jaradat SK, Al-Shami KM, Alkhalifa AE. Targeting Angiogenesis in Breast Cancer: Current Evidence and Future Perspectives of Novel Anti-Angiogenic Approaches. *Front Pharmacol* [serie en internet] **2022** [consultado 2023 junio 6]; 13: 838133. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35281942/>

**Babaei G**, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother* [serie en internet] **2021** [consultado 2021 octubre 18]; 133:110909. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33227701/>

**Baserga R**. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* [serie en internet] **2000** [consultado 2021 octubre 9];19(49):5574-81.

Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11114737/>

**Barzaman** K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, Farahmand L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol* [serie en internet] **2020** [consultado 2022 junio 16]; 84:106535. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576920304768?via%3Dihub>

**Batzer** MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* [serie en internet] **2002** [consultado 2020 noviembre 4]; 3: 370-379. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11988762/>

**Botticelli** A, Scagnoli S, Roberto M, Lionetto L, Cerbelli B, Simmaco M, Marchetti P. 5-Fluorouracil degradation rate as a predictive biomarker of toxicity in breast cancer patients treated with capecitabine. *J Oncol Pharm Pract* [serie en internet] **2020** [consultado 2021 octubre 18]; 26(8):1836-1842. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32131682/>.

**Casale** J, Patel P. Fluorouracil. *StatPearls* [serie en internet] **2022** [consultado 2023 marzo 25]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549808/>

**Chen** T, Liu X, Yi S, Zhang J, Ge J, Liu Z. EphB4 is overexpressed in gliomas and promotes the growth of glioma cells. *Tumour Biol* [serie en internet] **2013** [consultado 2023 junio 5]; 34(1): 379-385. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23138393/>

**Ciaffaglione** V, Modica MN, Pittalà V, Romeo G, Salerno L, Intagliata S. Mutual Prodrugs of 5-Fluorouracil: From a Classic Chemotherapeutic Agent to Novel Potential Anticancer Drugs. *ChemMedChem* [serie en internet] **2021** [consultado 2023 marzo 25];16(23):3496-3512. doi: 10.1002/cmdc.202100473. Epub 2021 Sep 7. PMID: 34415107; PMCID: PMC9290623.

**Dasari** S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* [serie en internet] **2014** [consultado 2021 octubre 18]; 5; 740:364-78. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25058905/>

**De Martel** C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health* [serie en internet] 2020 [consultado 2022 junio 16];8(2):e180-e190.

Disponible en:

[https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(19\)30488-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(19)30488-7/fulltext)

**Deininger** PL, Moran JV, Batzer M, Kazaian HH. Mobile elements and genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* [serie en internet] **2003** [consultado 2020 noviembre 4]; 136: 651-658. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14638329/>

**de la Fuente** E, Rosas C, Fuenzalida M, Rodríguez H, Roa I, Lemus A. Efecto del Aliskireno sobre la Angiogénesis en Modelo de Membrana Alantocoriónica (MAC) de Pollo. *Int J Morphol* [serie en internet] **2016** [consultado 2023 junio 22]; 34(4): 1191-1196. Disponible en: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022016000400002](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022016000400002)

**Deryugina** EI. Chorioallantoic Membrane Microtumor Model to Study the Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation. *Methods Mol Biol* [serie en internet] **2016** [consultado 2021 octubre 18]; 1430:283–98. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27172961/>

**Deutsch** E, Dugray A, AbdulKarim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, M'Kacher R, Rasy SD, Eschwege F, Vainchenker W, Turhan AG, Bourhis J. BCR- ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* [serie en internet] **2001** [consultado 2023 junio 5];97(7):2084-90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11264175/>

**Diori** I, Sanlier SH. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *J Egypt Natl Canc Inst* [serie en internet] **2021** [consultado 2022 junio 16];33(1):32. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34719756/>

**Ekyalongo** RC y Yee D. Revisiting the IGF-1R as a breast cancer target. *NPJ Precis Oncol* [serie en internet] **2017** [consultado 2022 junio 16]; 1: 14. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41698-017-0017-y>

**Emberley** ED, Murphy LC, Watson PH. S100A7 and the progression of breast cancer. *Breast Cancer Res* [serie en internet] **2004** [consultado 2023 junio 6]; 6(4): 153-159. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15217486/>

**Entezar-Almahdi** E, Mohammadi-Samani S, Tayebi L, Farjadian F. Recent

Advances in Designing 5-Fluorouracil Delivery Systems: A Stepping Stone in the Safe Treatment of Colorectal Cancer. *Int J Nanomedicine* [serie en internet] **2020** [consultado 2023 marzo 25];15:5445-5458. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32801699/>

**Eroğlu A**, Ersöz C, Karasoy D, Sak S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, VEGF-D, VEGFR-3 and D2-40 expressions in primary breast cancer: Association with lymph node metastasis. *Adv Clin Exp Med* [serie en internet] 2017 [consultado 2023 junio 6]; 26(2): 245-249. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28791841/>

**Escobar JE**, García-Alcocer G, García-Gasca MT, Berumen-Segura LC, Rodríguez-Méndez AJ, Anaya-Loyola MA. Efecto de fármacos antineoplásicos sobre el factor de transcripción twist en células de cáncer [tesis en línea] **2015** [consultado 2023 junio 5] Disponible en: <https://ring.uaq.mx/handle/123456789/998>

**Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)** 10 ed. México, **2011**. Secretaría de Salud. Disponible en: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/farmacopea-de-los-estados-unidos-mexicanos>

**Florez J**, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 6a edición. Editorial Elsevier. **2014**.

**Ferlay J**, Colombet M, Soerjomataram I, Parki DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* [serie en internet] **2021** [consultado 2022 junio 16]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33588>

**Gale RP**. Generalidades sobre el cáncer [monografía en internet] **2022** [consultado 2023 junio 5]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/generalidades-sobre-el-c%C3%A1ncer/generalidades-sobre-el-c%C3%A1ncer>

**Grimberg A**, DiVall SA, Polychronakos C, Allen DB, Cohen LE, Quintos JB, y col. Guidelines for Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Treatment in Children and Adolescents: Growth Hormone Deficiency, Idiopathic Short Stature, and Primary Insulin-Like Growth Factor-I Deficiency. *Horm Res Paediatr* [serie en internet] **2016** [consultado 2022 junio 16]; 86(6):361-397. Disponible



en: <https://www.karger.com/Article/FullText/452150>

**Hanahan** D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [serie en internet] **2022** [consultado 2022 junio 16]; 12(1): 31-46. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>

**Harper** K, Yatsyna A, Charbonneau M, Brochu-Gaudreau K, Perreault A, Jeldres C, McDonald PP, Dubois CM. The Chicken Chorioallantoic Membrane Tumor Assay as a Relevant *In Vivo* Model to Study the Impact of Hypoxia on Tumor Progression and Metastasis. *Cancers (Basel)* [serie en internet] **2021** [consultado 2022 noviembre 9];13(5):1093. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7961795/>

**Hashimoto** Y, Yoshida Y, Yamada T, Aisu N, Yoshimatsu G, Yoshimura F, Hasegawa S. Current Status of Therapeutic Drug Monitoring of 5-Fluorouracil Prodrugs. *Anticancer Res* [serie en internet] **2020** [consultado 2023 marzo 25];40(8):4655-4661. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32727789/>

**Heinrich** MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* [serie en internet] **2000** [consultado 2021 octubre 10];96(3):925-32. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10910906/>

**Hernández** H, Ballestar E, Carmona-Saez P, von Kobbe C, Bañón I, Esteller M. Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5-Fluorouracil: Relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53. *International Journal of Cancer* [serie en internet] **2006** [consultado 2023 junio 5]; 119(5):1164-1175. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.21938>

**Huang** G, Li M. The role of EphB4 and IGF-IR expression in breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* [serie en internet] **2015** [consultado 2023 junio 5]; 8(5): 5997-6004. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26191333/>

**IACUC**, Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Policy on Protocol Approval for Use of Chicken Embryos and Eggs [monografía en internet]. Estados Unidos: **2021** [consultado 2022 septiembre 13].

**Ianza A**, Sirico M, Bernocchi O, Generali D. Role of the IGF-1 Axis in Overcoming Resistance in Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol* [serie en internet] **2021** [consultado 2022 junio 16]; 9: 641449. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.641449/full#B5>

**IARC**, Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018 [monografía en internet]. Ginebra: **2018** [consultado 2020 agosto 9] Disponible en: [https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf)

**IECS**, Instituto de efectividad clínica y sanitaria. Determinación del índice de proliferación Ki-67 en pacientes con cáncer de mama temprano. 2015. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/03/986350/iecs-irr-419.pdf>

**INSP**, Instituto Nacional de Salud Pública. Cáncer de mama, una prioridad para la salud de las mexicanas [monografía en internet] 2020 [consultado 2021 octubre 20] Disponible en: <https://www.insp.mx/avisos/5090-octubre-cancer-mama-19.html#sup2>

**Jones HE**, Goddard L, Gee JM, Hiscox S, Rubini M, Barrow D, Knowlden JM, Williams S, Wakeling AE, Nicholson RI. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* [serie en internet] **2004** [consultado 2023 junio 5]; 11(4): 793-814. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15613453/>

**Karamouzis MV**, Papavassiliou AG. Targeting insulin-like growth factor in breast cancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* [serie en internet] **2012** [consultado 2022 noviembre 9]; 84(1). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1040842812000492>

**Key TJ**, Appleby, PN, Reeves GK, Roddam AW. Insuline-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: Pooles individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol* [serie en internet] **2010** [consultado 2022 junio 16]; 11: 530-542. Disponible en; [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(10\)70095-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(10)70095-4/fulltext)

**Kumar** SR, Singh J, Xia G, Krasnoperov V, Hassanieh L, Ley EJ, Scehnet J, Kumar NG, Hawes D, Press MF, Weaver FA, Gill PS. Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am J Pathol* [serie en internet] **2006** [consultado 2023 junio 6];169(1):279-293. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16816380/>

**Lander** ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Bladwin J, y col. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [serie en internet] **2001** [consultado 2020 noviembre 4]; 409: 860-921. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11237011/>

**Lane** AN, Fan TW. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res* [serie en internet] **2015** [consultado 2023 junio 4]; 43(4): 2466-2485. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25628363/>

**Lapeire** L, Hendrix A, Lambein K, Van Bockstal M, Braems G, Van Den Broecke R, y col. Cancer-associated adipose tissue promotes breast cancer progression by paracrine oncostatin M and Jak/STAT3 signaling. *Cancer Res* [serie en internet] **2014** [consultado 2023 junio 6]; 74(23): 6806-19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25252914/>

**Law** JH, Habibi G, Hu K, Masoudi H, Wang MY, Stratford AL, y col. Phosphorylated insulin-like growth factor-*i*/insulin receptor is present in all breast cancer subtypes and is related to poor survival. *Cancer Res* [serie en internet] **2008** [consultado 2022 junio 16]; 68(24):10238-46. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/24/10238/542074/Phosphorylated-Insulin-Like-Growth-Factor-I>

**Leal** E, Ramirez-Ricardo J, Garcia-Hernandez A, Cortes-Reynosa P, Salazar EP. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with insulin-like growth factor 1 mediate an epithelial-mesenchymal transition process in MCF10A mammary epithelial cells. *J Cell Commun Signal* [serie en internet] **2022** [consultado 2023 junio 4];16(4): 531-546. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34309795/>

**Leong** HS, Chambers AF, Lewis JD. Assessing cancer cell migration and metastatic growth *in vivo* in the chick embryo using fluorescence intravital imaging. *Methods Mol Biol* [serie en internet] 2012 [consultado 2021 octubre 17]; 872:1–14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22700400/>

**Lev A**, Lulla AR, Wagner J, Ralff MD, Kiehl JB, Zhou Y, Benes CH, Prabhu VV, Oster W, Astsaturov I, Dicker DT, El-Deiry WS. Anti-pancreatic cancer activity of ONC212 involves the unfolded protein response (UPR) and is reduced by IGF1-R and GRP78/BIP. *Oncotarget* [serie en internet] **2017** [consultado 2023 marzo 25];8(47):81776-81793. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29137221/>

**Li DD**, Zhao CH, Ding HW, Wu Q, Ren TS, Wang J, Chen CQ, Zhao QC. A novel inhibitor of ADAM17 sensitizes colorectal cancer cells to 5-Fluorouracil by reversing Notch and epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo. *Cell Prolif* [serie en internet] **2018** [consultado 2023 junio 6]; 51(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30069943/>

**Lokman NA**, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci* [serie en internet] **2012** [consultado 2021 octubre 18]; 13(8):9959–70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22949841/>

**Longley DB**, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* [serie en internet] **2003** [consultado 2023 junio 6]; 3(5): 330-338. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12724731/>

**Lorenc VE**, Sánchez MC, Quiroga S, Bregonzio C, Contin MA. Estudios Celulares y Moleculares de la Neovascularización Retinal en Mamíferos. Participación del Sistema IGF-1/IGF-1R [tesis en línea] **2014** [consultado 2023 junio 5]. Disponible en: <https://1library.co/document/yne5kv1y-estudios-celulares-moleculares-neovascularizacion-retinal-mamiferos-participacion-sistema.html>

**Ma JB**, Bai JY, Zhang HB, Jia J, Shi Q, Yang C, y col. KLF5 inhibits STAT3 activity and tumor metastasis in prostate cancer by suppressing IGF1 transcription cooperatively with HDAC1. *Cell Death Dis* [serie en internet] **2020** [consultado 2022 junio 16]; 11: 466. Disponible en <https://www.nature.com/articles/s41419-020-2671-1>

**Marañón C**, Pérez L, Font O. Modelos y ensayos para el estudio de la angiogénesis. *MEDISAN* [serie en internet] **2016** [consultado 2023 junio 5];

20(1): 100-108. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30192016000100015&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192016000100015&lng=es&tlng=es)

**Mawalizadeh** F, Mohammadzadeh G, Khedri A, Rashidi M. Quercetin potentiates the chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Mol Biol Rep [serie en internet]* **2021** [consultado 2023 marzo 25];48(12):7733-7742. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34637097/>

**McDonald** McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med [serie en internet]* 2016 [consultado 2021 octubre 18];57 Suppl 1:9S-16S. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26834110/>

**Moran** M, Schnitt S, Giuliano A, Harris J, Khan S, Horton J. Society of surgical oncology–American society for radiation oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *Int J Rad Oncol Biol Phys [serie en internet]* **2014** [consultado 2022 junio 16]; 88:553–64. Disponible en: [https://www.redjournal.org/article/S0360-3016\(13\)03315-4/fulltext](https://www.redjournal.org/article/S0360-3016(13)03315-4/fulltext)

**Morimura** S, Takahashi K. Rac1 and Stathmin but not EB1 are required for invasion of breast cancer cells in response to IGF-I. *Int J Cell Biol [serie en internet]* 2011 [consultado 2020 septiembre 16]; **2011**: 1-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21961005/>

**Muoio** MG, Talia M, Lappano R, Sims AH, Vella V, Cirillo F, Manzella L, Giuliano M, Maggiolini M, Belfiore A, De Francesco EM. Activation of the S100A7/RAGE Pathway by IGF-1 Contributes to Angiogenesis in Breast Cancer. *Cancers [serie en internet]* **2021** [consultado 2023 junio 6]; 13(4):621. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7915817/>

**Narezkina** A, Nasim K. Anthracycline Cardiotoxicity. *Circ Heart Fail [serie en internet]* **2019** [consultado 2021 octubre 18];12(3):e005910. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30871350/>

**Nasser** MW, Wani NA, Ahirwar DK, Powell CA, Ravi J, Elbaz M, Zhao H, Padilla L, Zhang X, Shilo K, Ostrowski M, Shapiro C, Carson WE 3rd, Ganju RK. RAGE mediates S100A7-induced breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment. *Cancer Res [serie en internet]* **2015** [consultado

2023 junio 6]; 75(6): 975-985. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25572331/>

**NBCF**, National Breast Cancer Foundation. Breast Anatomy. [monografía en internet] Estados Unidos: **2019** [consultado 2019 octubre 1] Disponible en:  
<https://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>

**Neshat** MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. Mol Cell Biol [serie en internet] **2000** [consultado 2023 junio 5];20(4):1179-86. Disponible en:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10648603/>

**Neuman** HB, Morrogh M, Gonen M, Van Zee KJ, Morrow M, King TA. Stage IV breast cancer in the era of targeted therapy: does surgery of the primary tumor matter? Cancer [serie en internet] **2010** [consultado 2022 junio 16]; 116(5):1226-33. Disponible en:  
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.24873>

**NIH**, Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es el cáncer? [monografía en internet] **2021** [consultado 2022 junio 16] Disponible en:  
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.

**NIH**, Instituto Nacional del Cáncer. Cáncer Metastásico [monografía en internet] **2020** [consultado 2021 octubre 18] Disponible en:  
<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-metastatico>.

**Official Journal of the European Union**. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 september 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [monografía en internet] **2019** [consultado 2022 noviembre 9] Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>

**Offor**, O. Exploring a therapeutic role for IGF1R inhibitors in triple-negative breast cancer. Yale Medicine Thesis Digital Library [serie en internet] **2010** [consultado 2022 noviembre 9]. Disponible en:  
<https://elischolar.library.yale.edu/ymtdl/120>

**OMS**, Organización Mundial de la Salud. Cáncer [monografía en internet] **2022** [consultado 2022 junio 16] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

**OMS**, Organización Mundial de la Salud. Cáncer de mama [monografía en internet] **2021** [consultado 2021 octubre 20] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

**OMS**, Organización Mundial de la Salud. Cáncer de mama: prevención y control [monografía en internet] **2019** [consultado 2019 octubre 1] Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>

**OMS**, Organización Mundial de la Salud. Evaluación de la capacidad nacional para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles: informe de la encuesta mundial de 2019 [monografía en internet] **2020** [consultado 2022 junio 16] Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240002319>

**Ooyama A**, Oka T, Zhao HY, Yamamoto M, Akiyama S, Fukushima M. Anti-angiogenic effect of 5-Fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts. *Cancer Lett* [serie en internet] **2008** [consultado 2023 junio 6]; 267(1): 26-36. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18420342/>

**Osher E**, Macaulay VM. Therapeutic Targeting of the IGF Axis. *Cells* [serie en internet] **2019** [consultado 2023 junio 4]; 8(8): 895. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31416218/>

**Pacher M**, Seewald M, Mikula M, Oehler S, Mogg M, Vinatzer U, y col. Impact of constitutive IGF1/IGF2 stimulation on the transcriptional program of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* [serie en internet] **2007** [consultado 2020 septiembre 16]; 28(1): 49-59. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16774935/>

**Palmer TD**, Lewis J, Zijlstra A. Quantitative Analysis of Cancer Metastasis using an Avian Embryo Model. *J Vis Exp* [serie en internet] **2011** [consultado 2022 noviembre 9]; (51). Disponible en: <https://www.jove.com/t/2815?language=Spanish>

**Pasanisi P**, Bruno E, Venturelli E, Manoukian S, Barile M, Peissel B, y col. Serum levels of IGF-I and BRCA penetrance: a case control study in breast cancer families. *Fam Cancer* [serie en internet] **2011** [consultado 2022 junio 16]; 10(3):521-8. Disponible:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10689-011-9437-y>

**Pawlikowska P**, Tayoun T, Oulhen M, Faugeroux V, Rouffiac V, Aberlenc A, y

col. Exploitation of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) as a platform for anti-metastatic drug testing. *Sci Rep* [serie en internet] 2020 [consultado 2022 noviembre 9]; 10, 16876. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-73632-w#citeas>

**Peiró N**, Adrover E, Sánchez-Tejada L, Lerma E, Planelles M, Sánchez-Payá J, Aranda F, y col. Increased insulin-like growth factor-1 receptor mRNA expression predicts poor survival in immunophenotypes of early breast carcinoma. *Mod Pathol* [serie en internet] 2011 [consultado 2020 agosto 18]; 24: 201-208. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/modpathol2010191.pdf>

**Proietti S**, Cucina A, Catizone A, Ricci G, Pensotti A, Bizzarri M. Zebrafish embryo extracts enhance 5-FU anti-cancer effects upon breast cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [serie en internet] 2021 [consultado 2023 junio]; 25(8): 3235-3245. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33928609/>

**Ribatti D**. The CAM assay in the study of the metastatic process. *Exp Cell Res* [serie en internet] 2021 [consultado 2021 octubre 18]; 400(2):112510. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33524363/>

**Ribatti D**. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev* [serie en internet] 2016 [consultado 2021 octubre 18]; 141:70–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27178379/>

**Riedemann J**, Macaulay VM. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer* [serie en internet] 2006 [consultado 2023 junio 5];13 Suppl 1:S33-43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17259557/>

**Rigiracciolo DC**, Nohata N, Lappano R, Cirillo F, Talia M, Scordamaglia D, Gutkind JS, Maggiolini M. Correction: IGF-1/IGF-1R/FAK/YAP Transduction Signaling Prompts Growth Effects in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Cells. *Cells* [serie en internet] 2020 [consultado 2023 junio 4];9(12):2619. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33291355/>

**Rossi L**, Mazzara C, Pagani O. Diagnosis and Treatment of Breast Cancer in Young Women. *Curr Treat Options Oncol* [serie en internet] 2019 [consultado 2021 octubre 18];20(12):86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31776799/>



**Sagara A**, Igarashi K, Otsuka M, Karasawa T, Gotoh N, Narita M, Kuzumaki N, Narita M, Kato Y. Intrinsic Resistance to 5-Fluorouracil in a Brain Metastatic Variant of Human Breast Cancer Cell Line, MDA-MB-231BR. PLoS One [serie en internet] **2016** [consultado 2023 junio 4]; 11(10). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27723829/>

**Sazonova EV**, Kopeina GS, Imyanitov EN, Zhivotovsky B. Platinum drugs and taxanes: can we overcome resistance?. Cell Death Discov [serie en internet] **2021** [consultado 2022 noviembre 9]; 155. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41420-021-00554-5#citeas>

**Secretaría de Salud**. [monografía en internet] México: **2020** [consultado 2021 octubre 20]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/419-salud-llama-a-la-accion-para-prevenir-y-detectar-a-tiempo-el-cancer-de-mama>

**Shen M**, Batzer M, Deininger P. Evolution of the master Alu gene(s). J Mol Evol [serie en internet ] **1991** [consultado 2020 noviembre 4]; 33:311-320. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1774786/>

**Siddiqui A**, Gollavilli PN, Schwab A. Thymidylate synthase maintains the de-differentiated state of triple negative breast cancers. Cell Death Differ [serie en internet] **2019** [consultado 2023 junio 4]; 26: 2223-2236. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41418-019-0289-6#citeas>

**Slamon D**, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J; Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med [serie en internet] 2011 [consultado 2021 octubre 18]; 365(14):1273-83. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21991949/>

**Stanford Children's Health**. Anatomy of the Breasts [monografía en internet] **2022** [consultado 2022 noviembre 9] Disponible en: <https://www.stanfordchildrens.org/en/topic/default?id=anatomy-of-the-breasts-85-P00132>

**Tang Q**, Ma J, Sun J, Yang L, Yang F, Zhang W, y col. Genistein and AG1024 synergistically increase the radiosensitivity of prostate cancer cells. Oncol Rep

[serie en internet] **2018** [consultado 2022 junio 16]; 40(2):579-588. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/or/40/2/579>

**Tian J**, Lambertz I, Berton TR, Rundhaug JE, Kiguchi K, Shirley SH, y col. Transgenic insulin-like growth factor-1 stimulates activation of COX-2 signaling in mammary glands. *Mol Carcinog*. **2012**; 51:973–83

**Tomita S**, Inaba K, Sekimoto M. Tyrphostin AG1024 downregulates aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression in an IGF1R and IR-independent manner. *Toxicol Lett* [serie en internet] **2022** [consultado 2022 junio 16]; 360: 62-70. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427422000418>

**Trepat, X.**, Chen, Z., & Jacobson, K. Cell migration. *Comprehensive Physiology* [serie en internet] 2012 [consultado 2021 octubre 18]; 2(4), 2369– 2392.

Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c110012>

**UAM**, Universidad Autónoma de Madrid. Protocolo de Ensayo de herida [monografía en internet] **2013** [consultado 2023 junio 5] Disponible en: <https://www.iib.uam.es/portal/documents/75233/75263/rev+Lucia+Ensayo+herida+final+4+formato.pdf/003270e1-8139-4a58-b77f-bd29b967cf77>

**UASLP**, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Conteo celular y evaluación de viabilidad [monografía en internet] **2013** [consultado 2023 junio 5] Disponible en: [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_counts\\_SPA.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf)

**Villafuerte L**. Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos. *Rev mex cienc farm* [serie en internet] **2011** [consultado 2023 junio 4]; 42(1): 18-36. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952011000100003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000100003)

**Vu BT**, Shahin SA, Croissant J, Fatieiev Y, Matsumoto K, Le-Hoang Doan T, Yik T, Simargi S, Conteras A, Ratliff L, Jimenez CM, Raehm L, Khashab N, Durand JO, Glackin C, Tamanoi F. Chick chorioallantoic membrane assay as an *in vivo* model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. *Sci Rep* [serie en internet] 2018 [consultado 2021 octubre 18]; 8(1):8524. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29867159/>

**Walsh** LA, Damjanovski S. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF- $\beta$ 1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell Commun Signal* [serie en internet] **2011** [consultado 2023 junio 4]; 9(1):10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104381/>

**Wang** C, An Y, Wang Y, Shen K, Wang X, Luan W, y col. Insulin-like growth factor-I activates NF $\kappa$ B and NLRP3 inflammatory signalling via ROS in cancer cells. *Mol Cell Probes* [serie en internet] **2020** [consultado 2022 junio 16]; 52:101583. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890850820301407?via%3Dihub>

**Wang** J y Xu B. Targeted therapeutic options and future perspectives for her2-positive breast cancer. *Signal Transduct Target Ther* [serie en internet] **2019** [consultado 2022 junio 16]; 4: 34. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-019-0069-2>

**Wei** Y, Yang P, Cao S, Zhao L. The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Arch Pharm Res* [serie en internet] **2018** [consultado 2023 marzo 25];41(1):1-13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29230689/>

**Wei** YH, Tang HX, Liao YD, Fu SL, Xu LQ, Chen G, y col. Effects of insulin-like growth factor 1 receptor and its inhibitor AG1024 on the progress of lung cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* [serie en internet] **2015** [consultado 2020 enero 28]; 35(6): 834-841. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11596-015-1515-1>

**Wen** B, Deutsch E, Marangoni E, Frasca V, Maggiorella L, Abdulkarim B, y col. Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. *Br J Cancer* [serie en internet] **2001** [consultado 2020 enero 28]; 85(12): 2017-2021. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/6692171>

**Winters** S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci* [serie en internet] **2017** [consultado 2022 junio 16]; 151:1-32. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1877117317301126?>

via%3Dihub

**Wu H**, Sun T, Bi R. Inhibition of insulin-like growth factor 1 signaling synergistically enhances the tumor suppressive role of triptolide in triple-negative breast cancer cells. *Onco Lett* [serie en internet] **2019** [consultado 2020 enero 29]; 18(1): 822-829. Disponible: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10356>

**Yi-Shen S**, Zhao Z, Zhang-Nv Y, Fang X, Hang-Jing L, Zhi-Yong Z, y col. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci* [serie en internet] **2017** [consultado 2019 octubre 12]; 13(11): 1387-1397. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715522/>

**Yuan P**, Xu B, Wang C, Zhang C, Sun M, Yuan L. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. *Oncol Lett* [serie en internet] **2016** [consultado 2023 julio 1]; 11(3): 2101-2105. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26998129/>

**Zabielska-Koczywas K**, Dolka I, Krol M, Zbikowski A, Lewandowski W, Mieczkowski J, et al. Doxorubicin Conjugated to Glutathione Stabilized Gold Nanoparticles (Au-GSH-Dox) as an Effective Therapeutic Agent for Feline Injection-Site Sarcomas-Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Study. *Molecules* [serie en internet] **2017** [consultado 2021 octubre 18]; 22(2):253. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28208720/>

**Zhang Q**, Li T, Wang Z, Kuang X, Shao N, Lin Y. lncRNA NR2F1-AS1 promotes breast cancer angiogenesis through activating IGF-1/IGF-1R/ERK pathway. *J Cell Mol Med* [serie en internet] **2020** [consultado 2023 junio 6]; 24(14): 8236-8247. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32548873/>

**Zhang, S.**, Kim, B., Zhu, X. et al. Glial type specific regulation of CNS angiogenesis by HIF $\alpha$ -activated different signaling pathways. *Nat Commun* [serie en internet] **2020** [consultado 2021 octubre 18]; 11. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-15656-4#citeas>

**Zhou W**, Lou W, Chen J, Ding B, Chen B, Xie H, y col. AG-1024 Sensitizes Sorafenib-Resistant Hepatocellular Carcinoma Cells to Sorafenib via Enhancing G1/S Arrest. *Onco Targets Ther.* [serie en internet] **2021** [consultado 2022 junio 16]; 14:1049-1059. Disponible en:

<https://www.dovepress.com/ag-1024-sensitizes-sorafenib-resistant-hepatocellular-carcinoma-cells-peer-reviewed-fulltext-article-OTT>

## ANEXOS

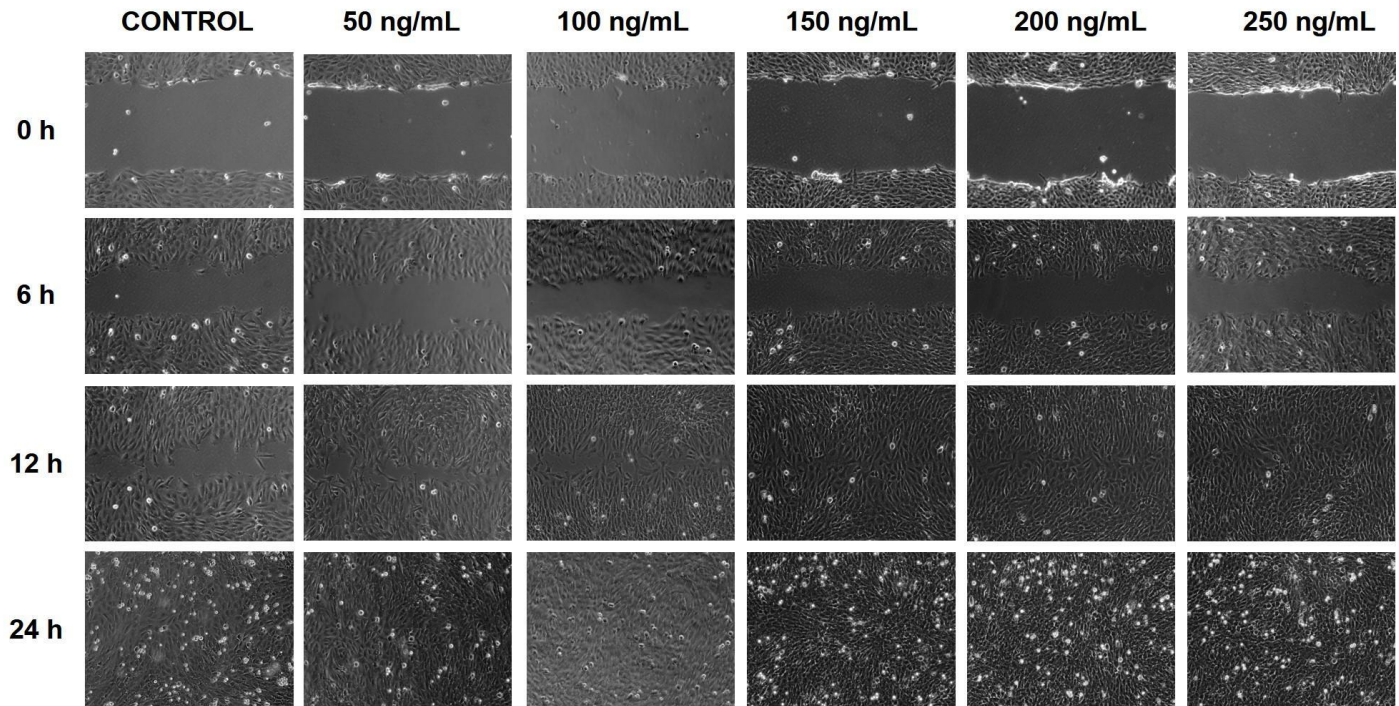


Figura 15. Micrografías del ensayo herida para las células MCF-7. Se muestra el efecto de IGF-1 sobre la migración en la línea MCF-7 a las 0, 6, 12 y 24 h de exposición.

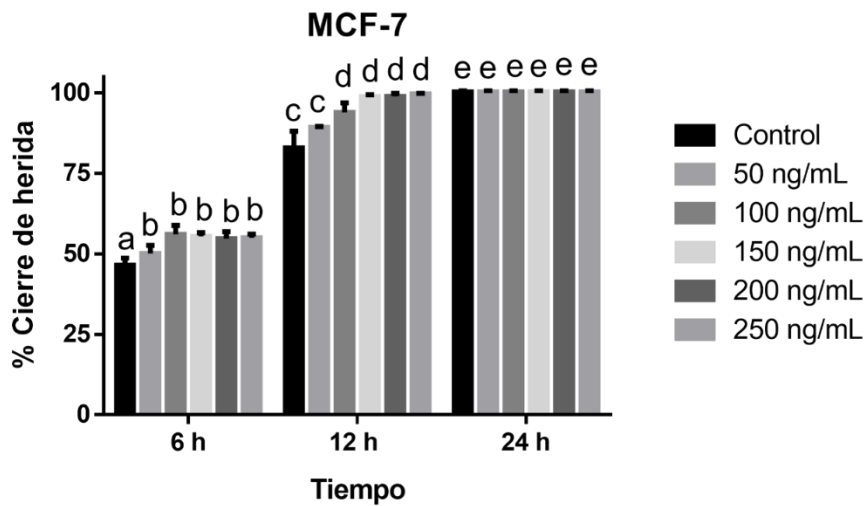


Figura 16. Efecto del IGF-1 sobre la migración celular de MCF-7. Se muestra la media  $\pm$  SEM. ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

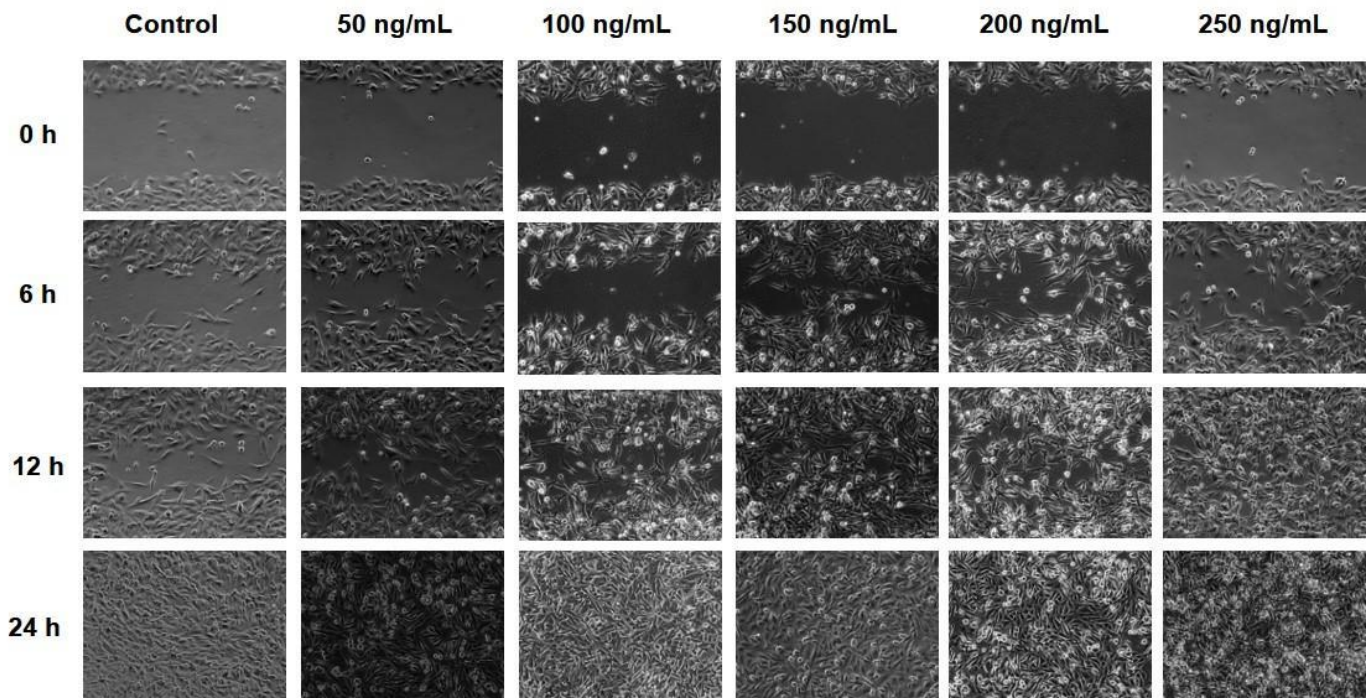


Figura 17. Micrografías del ensayo herida para las células MDA-MB-231. Se muestra el efecto de IGF-1 sobre la migración en la línea MCF-7 a las 0, 6, 12 y 24 h de exposición.

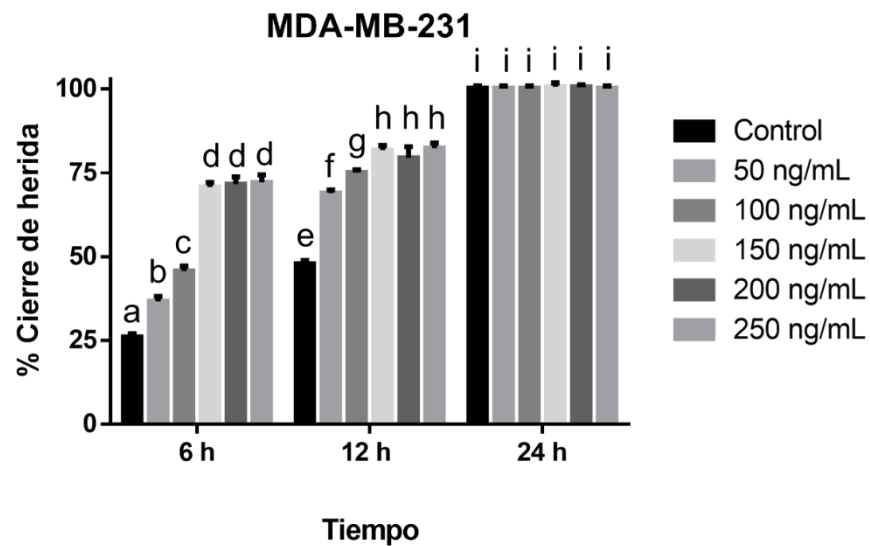


Figura 18. Efecto del IGF-1 sobre la migración celular de MDA-MB-231. Se muestra la media  $\pm$  SEM. ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).