



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA

**Efecto conjunto de cafeína y metformina en la
quimiosensibilidad a cisplatino de células de
cáncer de mama murino.**

T E S I S

Que para obtener el título de: Biólogo

P r e s e n t a :

Toledo Padilla David

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Christian Azucena Don López

Ciudad de México, 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme entrar y desarrollar mi vida académica que desde el Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Oriente encontré buenos amigos, compañeros y profesores durante toda mi estancia en la UNAM. Agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por estos años donde he avanzado mucho y me han enseñado tanto.

A mi directora de tesis Dra. Christian Azucena Don López por tanta paciencia que me tuvo, por apoyarme y enseñarme mucho, por aceptarme como su alumno para tesis y saber como asesorarme, por el tiempo que me dio, por estar atenta de mi avance.

Al Dr. Alberto Monroy García y a la Dra. María de Lourdes Mora García por permitirme entrar al laboratorio, ser tan buenas personas y saber enseñar, por el tiempo y los recursos que me otorgaron para la realización de esta tesis, gracias por motivarme a continuar con el trabajo en el laboratorio y seguir adelante.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por su tiempo y todo lo que me ha enseñado, la paciencia que me tuvo desde el principio y esa disposición de enseñarme y estar al tanto hasta que aprendiera a seguir con los experimentos, por su asesoría y sus consejos.

A mi comité de sinodales la M. en C. Rosalva Rangel Corona y el M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles, por sus observaciones, consejos, correcciones y el tiempo que me han otorgado para mejorar esta tesis.

A la M. en C. Monserrat Carrera Martínez por su apoyo durante mi experimento en Centro Médico, con gran paciencia y disposición de tiempo me ayudó y me enseñó a completar lo que me hacía falta.

Dedicatorias

A mis padres Emma Y José Luis (que en paz descansen) por todo el apoyo que me han dado, siempre hicieron lo posible para que terminara la carrera y son a quienes más les debo.

A mis hermanos María de la Luz, Miguel Ángel y José Francisco que al ser mis hermanos mayores me han apoyado y han visto por mí, nunca ha faltado nada en casa gracias a ellos y he podido seguir adelante gracias a eso.

A mis amigos de casi toda la vida: Memo, Leonel, Dare, Bety, Lorena y todos los de la explanada que pasamos muy buenos momentos a pesar de lo difícil de la situación para algunos, aprendí bastantes cosas junto a ellos y les agradezco por todo lo que hemos convivido.

A mis amigos y compañeros de la carrera: Karen, Stephe, Beto, Moy, Diana, Robert, Lulú, Vianey, Joaquín, Valdivia y los que me faltan, gracias por el tiempo que compartimos y todo lo que hemos hecho, gracias por apoyarme y aguantarme, no me alcanzan las palabras por la gratitud que les tengo.

A mis compañeros de laboratorio: Ángeles, Adriana, Alberto, Gaby, Katia, Luis, Ricardo, Gabriel y Alejandro por esos buenos ratos, por enseñarme y ayudarme a sentirme menos nervioso durante los seminarios.

A mis compañeras de Centro Médico: Monserrat, Rocio, Carmi y Daniela por ayudarme durante mis experimentos, por enseñarme y dar ese buen ambiente durante mi estancia en Centro Médico.

Índice

Índice de abreviaturas.....	1
1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
3. Marco Teórico.....	4
3.1. Cáncer de mama.....	4
3.2. Factores de riesgo.....	4
3.3. Clasificación del cáncer de mama.....	6
3.4. Tratamientos actuales para cáncer de mama.....	7
3.5. Cisplatino.....	8
3.6. Resistencia a múltiples drogas (MDR).....	9
3.6.1. Transportadores ABC.....	10
3.6.2. Bcrp.....	11
3.6.3. P-gp.....	11
3.6.4. Mrp.....	12
3.6.5. Inhibidores de P-gp.....	13
3.7. Metformina.....	15
3.8. Cafeína.....	17
4. Justificación y planteamiento del problema.....	19
5. Hipótesis.....	20
6. Objetivo general.....	20
7. Objetivos particulares.....	20

8. Material y Método.....	20
8.1. Cultivo celular	20
8.2. Condicionamiento de las células con metformina y cafeína.....	21
8.3. Ensayo de viabilidad y quimiosensibilidad de células JC a cisplatino	21
8.4. Expresión de mRNA para Mrp-1 y P-gp.....	22
8.5. Ensayo para analizar la resistencia a fármacos	22
8.6. Análisis estadístico	23
9. Resultados	23
9.1. Cafeína y metformina quimiosensibilizan las células de cáncer de mama murino a cisplatino	23
9.2. Cafeína y metformina reducen la viabilidad de las células de cáncer de mama murino	24
9.3. Cafeína y metformina no alteran la expresión de Mrp-1 y P-gp en células de cáncer de mama murino.....	25
9.4. Cafeína y metformina mejoran la retención de fármacos en células de cáncer de mama murino.....	26
10. Discusión de resultados	27
11. Conclusiones.....	31
12. Perspectivas	31
13. Referencias	32

Índice de abreviaturas

ABC: ATP-binding cassette

AM: Acetoximetil

AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase

ATM: Ataxia telangiectasia

ATP: Adeonsine triphosphate

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related

BCRP: Breast cancer resistance protein

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid

CREB: cAMP-responsive element binding protein

DE: Desviación estándar

DNA: Deoxyribonucleic acid

HIF-1 α : Hypoxia inducible factor-1 α

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IC₅₀: Concentración inhibitoria media máxima

ICR: Institute of Cancer Research

IGF: Insulin-like growth factor

IGFBP-3: Insulin-like growth factor-binding protein 3

MC: Medio completo

MDR: Multi drug resistance

mRNA: Messenger ribonucleic acid

MRP: Multi drug resistance protein

mTOR: Mammalian target of rapamycin

NBD: Nucleotide binding domain

NF- κ B: Nuclear factor- κ B

PCR: Polymerase chain reaction

P-gp: P-glycoprotein

PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase

PKA: Proteína kinasa A

PTX: Pentoxifilina

RE: Receptores de estrógenos

RFU: Unidades de fluorescencia relativa

RNA: Ribonucleic acid

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

TMD: Transmembrane domain

TNF: Tumor necrosis factor.

1. Resumen

El cáncer de mama es un problema de salud público a nivel mundial y en México que desde el año 2006 ha producido más muertes que el cáncer cérvico uterino. Entre los tratamientos actuales para esta enfermedad se encuentra el cisplatino el cual es un antineoplásico para tratar múltiples tipos de cáncer entre ellos el cáncer de mama. Sin embargo, a pesar de la detección y tratamiento temprano, muchas veces las pacientes tienden a recaer debido al surgimiento del fenotipo MDR (Multidrug Resistance) o resistencia a múltiples fármacos que permite la proliferación de células tumorales irresponsivas a la quimioterapia. Se ha reportado que cafeína y metformina pueden disminuir este fenotipo ayudando a sensibilizar o resensibilizar células tumorales a los antineoplásicos.

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto conjunto que tienen cafeína y metformina sobre la quimiosensibilidad a cisplatino y la repercusión de esto en la viabilidad de células de cáncer de mama murino JC. Para ello, células tumorales murinas fueron pretratadas con cafeína, metformina o cafeína/metformina durante 10, 20 o 30 días para posteriormente ser cultivadas en presencia o ausencia de diferentes dosis de cisplatino y de esta manera evaluar la quimiosensibilidad a éste.

Como resultado del presente estudio se encontró que cafeína y metformina disminuyeron la viabilidad de las células JC al aumentar la quimiosensibilidad que tienen a cisplatino, requiriendo una menor dosis del antineoplásico comparado con las células sin tratamiento previo. Sin embargo, *cafeína y metformina no mostraron tener un mejor efecto para reducir la viabilidad al ser usados en conjunto*, pero se observa tener un efecto sinérgico para reducir la actividad funcional de P-gp, encontrándose que células pretratadas con ambos fármacos retienen mayor cantidad de fármaco en su interior comparado con las células sin tratamiento, y dicha reducción funcional de P-gp parece no estar relacionada con la disminución de su expresión.

Mediante estos resultados se observó que cafeína y metformina son capaces de quimiosensibilizar a células tumorales mediante la reducción de la actividad funcional de P-gp, que puede ser relevante para futuros trabajos de investigación donde se incluya el uso de cafeína y metformina para reducir las altas concentraciones necesarias de los antineoplásicos actuales.

2. Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia en México y a nivel mundial, por lo que se considera una prioridad en salud; hasta el momento no se conoce un factor de riesgo común del cáncer de mama, aunque se ha clasificado en 4 subtipos moleculares: luminal A, luminal B, basal y triple negativo. Con base en esta clasificación, no existe una terapia eficaz en común para todos.

Aunado a la radioterapia y cirugía para tratar el cáncer de mama, la quimioterapia es el tratamiento de primera línea. El cisplatino es uno de los antineoplásicos más utilizados y es capaz de provocar distintos efectos citotóxicos como inhibición de replicación, reparación del DNA, muerte celular, etc. A pesar de ser un antineoplásico de uso comercial algunas veces se genera resistencia a cisplatino, cuya causa más frecuente es el desarrollo de un fenotipo denominado MDR.

Debido al fenotipo MDR mediado por proteínas extrusoras de fármacos se han estudiado distintos compuestos para inhibir la expresión o la actividad funcional de estas proteínas transportadoras, dentro de los que se encuentran metformina y cafeína que se ha reportado que tiene un efecto antiproliferativo en distintas líneas de cáncer de mama y puede inhibir la expresión y función de las proteínas transportadoras ABC. Tanto cafeína como metformina han mostrado tener un efecto sinérgico con otros compuestos, alterando el ciclo celular o dañando el DNA, potenciando el uso en combinación con otros fármacos disminuyendo la concentración requerida para el tratamiento.

3. Marco Teórico

3.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio en los conductos o lobulillos mamarios y tiene la capacidad de diseminarse a cualquier sitio del organismo (Amaro *et al.*, 2007). A nivel mundial, el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente y con mayor mortalidad (Márquez-Acosta, 2012), es una amenaza para la salud de la mujer por lo que se considera una prioridad en salud en los países desarrollados (Juárez *et al.*, 2015).

En años recientes se observó un incremento paulatino en su frecuencia, sobre todo en países en vías de desarrollo como México, debido a que la mayor parte de los casos se diagnostican en fases avanzadas, con bajas probabilidades de curación (Rodríguez & Capurso, 2006). Las tasas de mortalidad por cáncer de mama en México han aumentado en las últimas 5 décadas: entre 1955 y 1960, a partir de la disposición de los primeros datos confiables, la tasa era alrededor de 2 a 4 muertes por cada 100 000 mujeres, luego se elevó de manera sostenida en mujeres adultas de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por cada 100 000 y a la mitad de la década de 1990 se ha mantenido relativamente estable desde entonces (Knaul *et al.*, 2009).

El panorama epidemiológico de esta patología en la población mexicana se transformó en los últimos 50 años y el cáncer mamario ha pasado a ser un problema de salud pública (Brandan & Villaseñor, 2006). En 2006 produjo más muertes que el cáncer cervical debido entre otros factores a que la incidencia se incrementa con la edad, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia (Huicochea *et al.*, 2009). El 50% de los pacientes que fallecen están en el grupo de edad productiva (35 a 65 años) lo cual conlleva una pérdida económica agregada (Uribe, 2009).

3.2. Factores de riesgo

Hasta el momento no existe una causa específica para desarrollar cáncer de mama; sin embargo, se conocen varios factores de riesgo involucrados y relacionados directa o indirectamente con las hormonas reproductivas, en particular con la exposición prolongada a terapias hormonales, además de la menarca temprana y menopausia tardía (Cnatingius *et al.*, 2005; Torres-Arreola & Vladislavovna, 2007).

Después de la menopausia, los ovarios dejan de producir estrógenos, por lo que el tejido adiposo se convierte en la principal fuente de esta hormona; de esta manera, aquellos tejidos que, como el parénquima mamario, son muy sensibles a los estrógenos tienen un mayor riesgo de desarrollar una neoplasia (Aguilar *et al.*, 2011). La edad es uno de los factores de riesgo conocidos para padecer cáncer de mama. En México suele manifestarse a partir de los 20 años de edad y su frecuencia se incrementa hasta alcanzar los 40 y 54 años (Romero *et al.*, 2008).

Dos genes, el BRCA1 y BRCA2, han sido relacionados con una forma familiar rara de cáncer de mama. Las mujeres cuyas familias poseen mutaciones en estos genes tienen un riesgo mayor de desarrollarlo, aunque no todas las personas que heredan mutaciones en estos genes lo desarrollarán. Conjuntamente con el síndrome *Fraumeni* (mutación del p53), estas aberraciones genéticas determinarían aproximadamente el 5% de todos los casos, sugiriendo que el resto es esporádico. Recientemente se ha encontrado que un gen llamado BARD1, cuando está combinado con el gen BRCA2, incrementa el riesgo de cáncer hasta en un 80% (Lugones & Ramírez, 2009).

Entre los factores ambientales y estilos de vida, la exposición a la radiación ionizante produce lesiones en el genoma, como hidroxilación de la timina, lo que resulta en formación de dímeros de dicha base nitrogenada y rotura de una o dos cadenas de DNA. El consumo de bebidas alcohólicas se ha identificado como factor de riesgo, ya que entre sus productos se encuentra el acetaldehído, conocido como carcinógeno primario en animales. Existe controversia entre la asociación de tabaquismo y cáncer de mama, pues algunos autores señalan que sus derivados, como el benzopireno, las aminas aromáticas y nitrosaminas, están implicados en la carcinogénesis de la mama; aunque otros autores no han encontrado ninguna asociación (Romero *et al.*, 2008).

En algunos trabajos se ha comprobado que la función ovárica se verá influida por el tipo de alimentación que se tiene durante la infancia y la adolescencia, pues el consumo elevado de grasas incrementa el riesgo de cáncer de mama; y lo disminuyen los antioxidantes; esto podría interpretarse como que el sobrepeso y la obesidad aumentan el riesgo (Martínez *et al.*, 2004).

Varios estudios sugieren que el índice de masa corporal debe ser considerado al menos como un factor de riesgo menor para cáncer de mama, además se sugiere que un alto índice de masa corporal está asociado con niveles incrementados de insulina y factores de crecimiento similares a insulina, los cuales se han asociado con un incremento de riesgo de cáncer de mama (Singletary, 2003).

3.3. Clasificación del cáncer de mama

La clasificación histológica se basa en la anatomía de la glándula mamaria. La mayoría de los tumores malignos de mama, surgen en el epitelio de los conductos por lo cual se les denomina carcinomas (Arroyo *et al.*, 2017).

Los carcinomas se clasifican fundamentalmente en 2 grupos: *in situ* e infiltrantes. El carcinoma ductal infiltrante es el subtipo más frecuente (70-80%), su forma de presentación habitual es una masa palpable y se caracteriza por invadir precozmente los ganglios axilares, pese a no alcanzar un gran tamaño, en cambio el carcinoma lobulillar infiltrante tiene una incidencia del 5-10%, se origina en los pequeños conductos terminales y se presenta como una masa o engrosamiento difuso. Metastatiza con frecuencia los ganglios de la axila y se disemina por vía sanguínea a las leptomeninges, peritoneo, tracto gastrointestinal, aparato ginecológico y huesos (Arroyo *et al.*, 2017).

Debido a la heterogeneidad del cáncer de mama no todos los tumores clasificados histológicamente responden a los tratamientos convencionales con la misma eficacia por lo cual se ha propuesto su clasificación en 4 subtipos moleculares de acuerdo a su señal genética intrínseca (Cabello *et al.*, 2016). Por lo anterior encontramos los tumores hormonodependientes o luminales, que se subclasifican a su vez en luminales A y B, los tumores con amplificación del oncogén HER2 y los tumores denominados triple negativos (Martín *et al.*, 2015).

Los subtipos luminales se caracterizan por expresar el gen receptor estrogénico, genes asociados (LIV1 y ciclina D1) y queratinas de bajo peso molecular (CK7, CK18, etc.), de forma semejante al epitelio luminal de los conductos mamarios. Al expresar receptores de estrógenos (RE), estos tumores pueden tratarse con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa, pero muestran una baja respuesta a la quimioterapia adyuvante (Irigoyen *et al.*, 2011). El subtipo luminal A es el más frecuente y corresponde al 67% de los tumores, mientras que los tumores luminal B tienden a ser de más alto grado (Zepeda-Castilla *et al.*, 2008). A pesar de las dificultades de tratamiento de estos tumores, en general los tumores que expresan receptores hormonales para estrógeno y/o progesterona son tumores mejor diferenciados y con mejor pronóstico que los que sobre expresan HER2 o aquellos triple negativos (Piñero-Madrona *et al.*, 2008).

El subtipo HER2 positivo presenta el fenotipo RE negativo y se asocia con la sobreexpresión de genes relacionados con una mayor agresividad biológica. Este subtipo tiene un peor pronóstico, presentando una resistencia relativa a determinados agentes quimioterapéuticos y al tamoxifeno (Khosravi & Pérez, 2006).

La conducta biológica del subtipo triple negativo suele ser más agresiva y con una mayor tendencia a presentar metástasis, comparada con los otros subtipos de cáncer de mama, predominando las metástasis viscerales (hígado, pulmón y

sistema nervioso central). Estos tumores no responden a la terapia endócrina y no existe terapia blanco eficaz disponible, es por ello que las terapias actuales muestran resultados limitados (Zaharia & Gómez, 2013).

3.4. Tratamientos actuales para cáncer de mama

Durante las últimas décadas, la cirugía ha proporcionado a la mujer con cáncer de mama una mejora en el control locorregional de la enfermedad (Acea-Nebril, 2005), se ofrece como primera opción para aquellas mujeres que presentan tumores pequeños, sin embargo, también es una opción de tratamiento adyuvante (Martínez-Basurto *et al.*, 2014).

La radioterapia es un tratamiento esencial en el manejo actual del cáncer, usada en forma exclusiva o complementaria a la cirugía y/o a las terapias sistémicas, su impacto en el control locorregional y subsecuentemente en la supervivencia global y por causa específica en muchos tumores primarios ha sido ampliamente demostrada en múltiples estudios aleatorizados y metanálisis (Sola, 2011). La aparición de complicaciones tardías tras la radioterapia continúa siendo la principal limitación de la misma, pese al empleo creciente de estrategias que buscan mejorar el índice terapéutico (Montero *et al.*, 2005).

La radioterapia asociada a la cirugía, que es el tratamiento fundamental, pueden controlar la enfermedad en la gran mayoría de los casos. A pesar de esto, alrededor de un 30% de los pacientes finalmente fallecerá debido a la diseminación de la enfermedad (Imigo *et al.*, 2011). Como resultado, el cáncer de mama metastásico permanece como una enfermedad incurable mediante estrategias de tratamiento convencionales (Al-Hajj *et al.*, 2003).

Aunado a la cirugía y la radioterapia, la quimioterapia es el tratamiento estándar de primera línea para tratar el carcinoma, ésta implica varias combinaciones con base en algún platino (frecuentemente), que incrementan la supervivencia en comparación con la monoterapia y el mejor soporte paliativo (Castro *et al.*, 2010). La quimioterapia basada en un único fármaco proporciona una tasa de respuesta baja y ésta es generalmente de corta duración. En la enfermedad metastásica el tratamiento de primera línea para los pacientes con un estado general adecuado para tolerar el cisplatino es la quimioterapia combinada basada en este fármaco (Stenzl *et al.*, 2010).

Dentro de los agentes que se manejan para el tratamiento de cáncer de mama se encuentran los taxanos (paclitaxel y docetaxel), los alcaloides de la vinca (vinorelbine, capecitabine y gemcitabine) (Reyes *et al.*, 2011) que inducen la apoptosis en las células neoplásicas (Arroyo *et al.*, 2005), dentro de los cuales se encuentra el agente de platino *Cis*-diamino-dicloroplatino II (cisplatino).

3.5. Cisplatino

El cisplatino se hidroliza en la célula y pasa por un proceso conocido como acuación, en el cual una o dos moléculas de cloro son reemplazadas por moléculas de agua, a través de este proceso el cisplatino se vuelve altamente reactivo (Ramos & Hernández, 2008; Reily *et al.*, 2018) y el átomo de platino se une covalentemente a la posición N7 de las purinas para formar entrecruzamientos intra e intercatenarios, provocando aductos de DNA que causan varias respuestas celulares como arresto de la replicación y ciclo celular, inhibición de la transcripción, reparación del DNA y apoptosis como se muestra en la figura 1 (Nepomuceno, 2014).

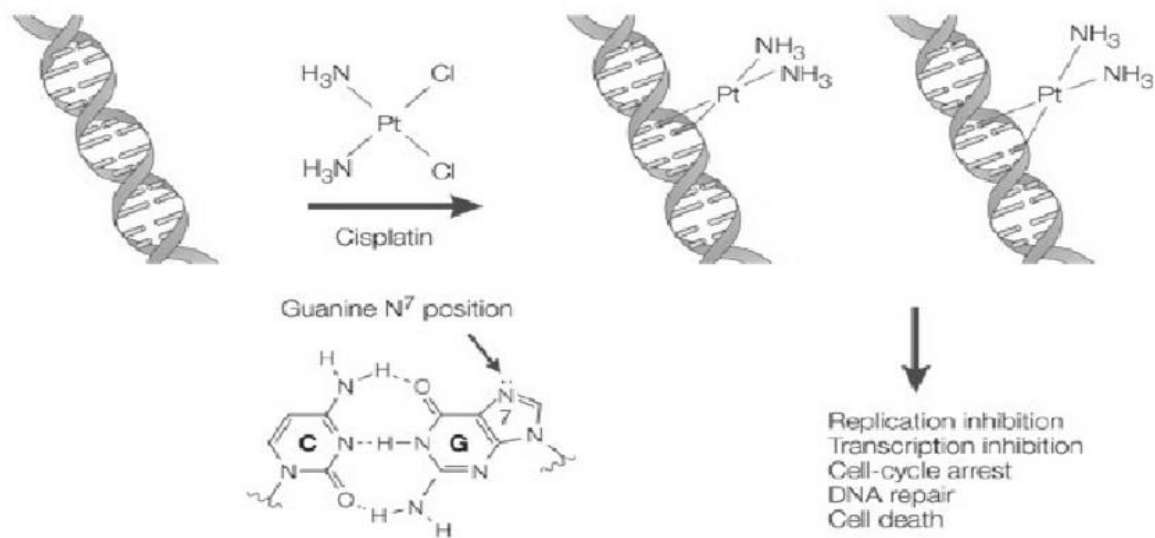


Figura 1. Mecanismo de acción del cisplatino y efectos que provoca en la célula. Tomado de Nepomuceno (2011).

Normalmente el cisplatino es efectivo contra algunos tumores, pero muchos demuestran resistencia al cisplatino por 2 razones principales: son intrínsecamente resistentes o los tumores inicialmente sensibles y la resistencia adquirida se desarrolla durante el tratamiento (Kelland, 2007; Niedner *et al.*, 2001).

Los primeros estudios *in vitro* demostraron que la resistencia al cisplatino podría ser mediada por 2 mecanismos: (I) un fallo en conseguir niveles intracelulares suficientes del fármaco para ejercer su acción en el DNA; (II) un fallo en iniciar el proceso de apoptosis una vez que el medicamento ha ejercido su acción creando los puentes en el DNA (Germà-Lluch & Piulats, 2013).

Actualmente se han puesto de manifiesto numerosos mecanismos de resistencia, incluyendo la desintoxicación por el glutatión o metalotioneínas, incremento en la reparación del DNA, una mayor tolerancia al cisplatino, aberraciones en las vías de modulación de la muerte celular programada, alteración en vías de señales anti-apoptóticas (Rodríguez, 2012) y procesos epigénéticos como la

hipermetilación del promotor de IGFBP-3, responsable de bloquear la unión de IGF a su receptor impidiendo así la activación de rutas implicadas en proliferación y control celular (López-Ayllón, 2013).

Otro de los mecanismos de resistencia descritos son las mutaciones en el gen *p53* encontradas hasta en un 40% de los pacientes con carcinoma gástrico con pronóstico desfavorable, aunque aún no es claro su papel ya que tanto la deficiencia como la expresión normal de *p53* se han asociado con multirresistencia a fármacos (Calpena *et al.*, 2003; Olaya, 2010). La causa más frecuente de dicha resistencia es el incremento de expresión de moléculas transportadoras de fármacos, lo cual se ha asociado con un fenotipo MDR (Multidrug Resistance). (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca, 2006).

3.6. Resistencia a múltiples drogas (MDR)

La mayoría de los tumores sólidos de forma innata o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes. Este fenómeno fue descrito experimentalmente y se conoce como resistencia a múltiples drogas o MDR (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca, 2006).

Distintos factores (fisiológicos y farmacológicos) pueden contribuir al desarrollo de resistencia a fármacos anticancerígenos (figura 2). Los principales factores fisiológicos son:

- Mecanismos que preceden el “punto de decisión apoptótica”: mejora de la reparación/incremento de la tolerancia al daño del DNA; y alto potencial antiapoptótico.
- Permeabilidad disminuida: los fármacos no pueden entrar a la célula debido a: angiogénesis comprometida en tumores sólidos, presión del fluido intra-tumoral incrementada y células en senescencia.
- Desactivación enzimática (por ejemplo, la conjugación de glutatión); sitios de unión alterados de agentes quimioterapéuticos o vías metabólicas alternas (que el cáncer compensa por el efecto del fármaco) (Król *et al.*, 2010).

- Incremento del eflujo de fármacos, mediado por P-glycoprotein, multidrug resistance protein (Mrp), breast cancer resistance protein (Bcrp) y otras pocas proteínas.

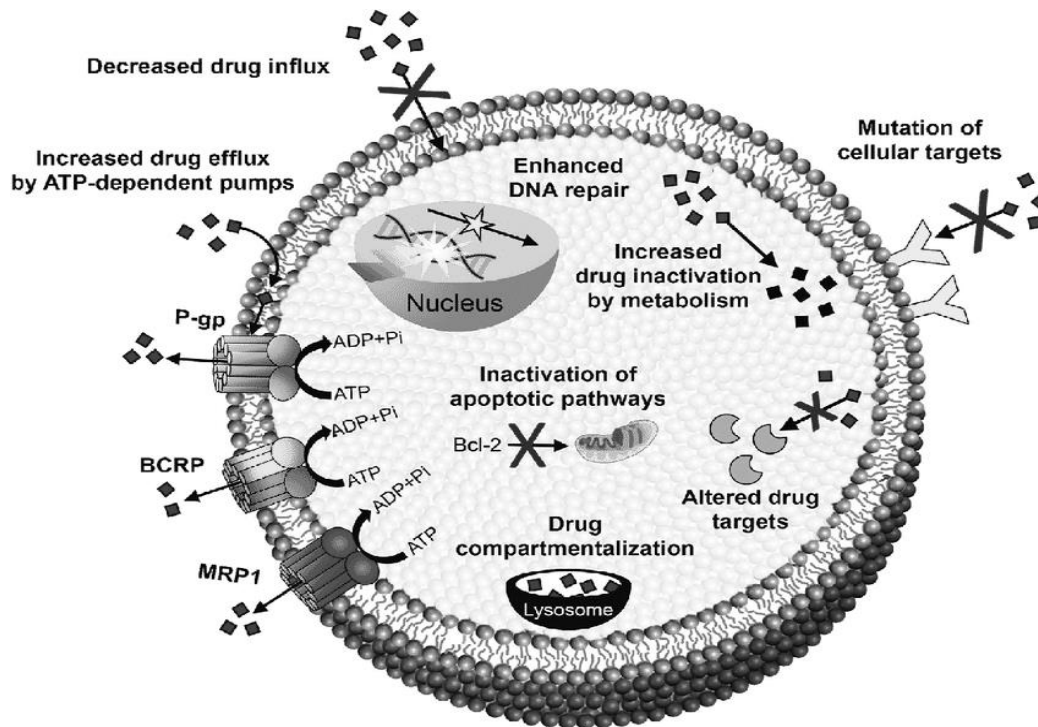


Figura 2. Mecanismo de MDR en células cancerosas. Tomado de Li *et al.*, (2018).

Una de las principales características del fenotipo MDR en células cancerosas es la aparición de bombas de extrusión, que expulsan los fármacos del interior celular impidiendo que se adquieran niveles citotóxicos para dicha célula (Cerezo, 2013). La expulsión de fármacos del interior celular, es probablemente el mecanismo de resistencia más estudiado y fundamentalmente está relacionado con la actividad de determinadas proteínas transportadoras ABC (ATP-binding cassette) (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca, 2006).

3.6.1. Transportadores ABC

En eucariontes la mayoría de las proteínas ABC mueven compuestos desde el citoplasma al exterior de la célula o a compartimentos intracelulares; así, los transportadores ABC se localizan en la membrana plasmática y en membranas de compartimentos intracelulares tales como aparato de Golgi, endosomas y mitocondrias (Alarcón, 2009).

Los transportadores ABC están constituidos por 2 dominios transmembranales (TMD) y 2 dominios de unión a ATP (NBD, por sus siglas en inglés “Nucleotide Binding Domain”). Los TMD están formados, cada uno, de 6 hélices que atraviesan varias veces la membrana; esta región es la más divergente de los transportadores ABC y es la que determina la especificidad hacia el sustrato. La unión de los 2 TMD forma un canal que permite la translocación del sustrato a través de la membrana (Cough, 2010).

Los transportadores se subdividen en: transportadores completos (full-transporters), si contienen los 2 dominios NBD y TMD en la misma cadena polipeptídica, o en hemitransportadores (half-transporters), si contienen únicamente un dominio NBD y TMD por cadena polipeptídica. Estos últimos requieren de la homo o heterodimerización para ensamblarse en una proteína funcional, mientras que los dominios NBD son los responsables de la unión y posterior hidrólisis de ATP, generando la fuerza motriz esencial para la función de translocación, los dominios TMD forman el canal transmembrana a través del cual será translocado el sustrato (Arcari, 2018).

El dominio NBD contiene 2 motivos peptídicos cortos, uno rico en glicina y otro hidrófobo, conocidos como motivo Walker A y Walker B. Ambos están involucrados en la unión e hidrólisis del ATP. Hay un tercer motivo altamente conservado, la secuencia ABC o motivo C es un motivo único de la superfamilia ABC, estos 3 motivos son muy importantes para la función catalítica (Canal, 2017). Hasta ahora se conocen 3 proteínas que actúan de esta manera: Bcrp (Breast cancer resistance protein), P-gp (P-glycoprotein) y Mrp (Multidrug resistance protein) (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca, 2006).

3.6.2. Bcrp

Bcrp fue aislada inicialmente en líneas celulares multirresistentes seleccionadas por exposición a la mitoxantrona, se relaciona con la elevada resistencia a las antraciclinas (mitoxantrona, daunorrubicina, doxorrubicina) y a los inhibidores de las topoisomerasas I, de hecho, es un eficiente transportador de topotecán, pero no parece afectar a los taxanos, alcaloides de la vinca ni al cisplatino (Álvarez y Pulido, 2008).

La proteína de resistencia al cáncer de mama Bcrp codificada por el gen *ABCG2*, consta de 655 aminoácidos, pero a diferencia del resto de los transportadores, solo tiene 6 dominios transmembrana con un sitio de unión para el ATP (*half-transporter*), presentando una especificidad de sustrato mucho más amplia que el resto (Álvarez y Pulido, 2008; Martínez, 2010).

3.6.3. P-gp

P-gp, el producto del gen *MDR1*, fue descubierta en células de hámster chino resistentes a colchicina, estas observaciones se ampliaron a células humanas

donde se encontró la P-gp con un peso de 170-190 kDa (Biedler, 1992), La P-gp está constituida por 1280 residuos de aminoácidos, está conformada por 2 cadenas homólogas y simétricas que constan de 6 dominios transmembranales, con una cadena N-terminal hidrofílica y una N-terminal hidrofóbica, seguidos de 2 dominios de unión a ATP. Los dominios de unión a ATP (NBD 1 y 2) son importantes para su función dado que pueden hidrolizar el ATP y la inhibición de estos sitios conlleva a la inhibición de la proteína (Villeda, 2008). Su región transmembrana presenta una conformación semejante a un bolsillo hidrofóbico que le permite adaptarse a sustratos de gran diversidad estructural y de tamaño (Cortada *et al.*, 2009),

Dicha proteína se ubica en la membrana plasmática donde funciona como una bomba de eflujo transportando sustratos desde el medio intracelular, o desde la membrana plasmática, hacia el medio extracelular obteniendo la energía de la hidrólisis de ATP (Cortada *et al.*, 2009).

P-gp se encuentra expresada en muchos tejidos normales como la superficie canalicular de hepatocitos, la superficie apical de las células tubulares proximales en riñones y en el borde de cepillo de los enterocitos, en el epitelio del plexo coroideo cerebral y en la superficie luminal de los vasos sanguíneos del cerebro, también es expresado en otros tejidos que se sabe que tienen barreras en los tejidos sanguíneos como placenta, ovarios y testículos. Más aún, P-gp ha sido detectado en células troncales hematopoyéticas, células mononucleares de sangre periférica, macrófagos maduros, células natural killer, células dendríticas presentadoras de antígenos y linfocitos B y T (Annese *et al.*, 2006). Es la transportadora ABC dominante, expresada en muchos cánceres humanos incluyendo el cáncer colorrectal, de mama y hematopoyéticos; transporta una amplia variedad de agentes citotóxicos como los vinca alcaloides, taxanos y antraciclina (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017).

3.6.4. Mrp

La Mrp fue encontrada en células multirresistentes que sobreexpresaban otra proteína de membrana diferente de P-gp con actividad ATPasa la cual tenía un peso de 190 kDa. Esta proteína al igual que la P-gp mantenía bajos los niveles intracelulares de quimioterapéuticos (Ruiz *et al.*, 2002). Fue descubierta por Cole *et al.* a partir de una línea celular de cáncer de pulmón multirresistente (H69AR) que no expresaba P-gp. Su espectro de resistencia es similar pero no idéntico al de P-gp y no puede ser revertido por la ciclosporina A (Paredes *et al.*, 2005).

Las Mrp son un grupo de proteínas transportadoras agrupadas en 6 subfamilias dentro de las Mrp humanas, éstas utilizan ATP (Adenosine triphosphate) como fuente de energía, lo que provoca que la célula tenga que dedicar buena parte de su gasto energético a esta función en detrimento de otras (Cerezo, 2013).

Mrp-1 se expresa en forma ubicua en el organismo. Los tejidos con mayor expresión de este transportador se localizan en pulmón, testículos, riñón, corazón y placenta, mientras que una expresión reducida de éste se ha detectado en el intestino delgado, colon, cerebro y células mononucleares de sangre periférica; la distribución tisular de Mrp-1 es consistente con su rol de limitar la penetración de ciertos agentes citotóxicos a través de un gran número de barreras sangre-órgano (Castronuovo, 2015).

La localización celular de Mrp-1 difiere de la P-gp, mientras que ésta se localiza en la membrana apical del epitelio, Mrp-1 lo hace en la membrana baso-lateral, por lo que se supone que expulsa sus sustratos a un compartimento diferente (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca, 2006).

Se ha reportado que en líneas celulares de carcinoma la sobreexpresión de las Mrp es inducida por el cisplatino a medida que las células adquieren resistencia (Burgués *et al.*, 2005). Recientes trabajos reportan el papel parcial que tienen las proteínas de flujo como MDR1 (también conocido como ABCB1), Mrp-1 (también conocido como ABCC1), Mrp-2 (conocido como CMOAT o ABCC2), Mrp-3 (conocido como ABCC3) y Mrp-5 (conocido como ABCC5) en el flujo de fármacos de platino (Kelland, 2007). La expresión de la proteína Mrp está asociada con altos niveles de glutatión S-transferasa y en algunos tipos celulares se expresa conjuntamente con la P-gp (Ruiz *et al.*, 2002).

Resulta imposible predecir si un determinado tumor responderá a un citostático específico; por ello, la asociación de varios fármacos aumenta las probabilidades de respuesta tumoral, retrasando la aparición de resistencias adquiridas a quimioterapéuticos. Los fármacos seleccionados deben presentar actividad individual frente al tumor específico, escasa superposición de efectos tóxicos y actividad sinérgica o aditiva, es decir, que no presenten resistencias cruzadas (Fernández-Plaza *et al.*, 2004).

3.6.5. Inhibidores de P-gp

P-gp es uno de los mecanismos mejor caracterizados, de hecho, algunos estudios han demostrado que la magnitud de la resistencia está fuertemente influenciada por la sobreexpresión de P-gp en la membrana de células cancerígenas, la cual es regulada positivamente por la misma quimioterapia. La idea de encontrar moduladores que inhiban la actividad del transportador ha crecido junto con el número de investigaciones bioquímicas y clínicas sobre el mecanismo molecular y la regulación de la expresión de P-gp (Bellusci, 2011).

Desde principios de 1980 muchos agentes han sido estudiados por su habilidad para revertir la resistencia a múltiples fármacos mediada por P-gp en pacientes con cáncer, ejemplos de estos agentes incluyen verapamil, las fenotiazinas,

quinidina, quinacrina, quinina, amiodarona, tamoxifeno, progesterona y ciclosporina A (Gottesman *et al.*, 2002).

Verapamil un bloqueador del canal de calcio es ambos, un sustrato y un inhibidor de P-gp, en bajas concentraciones verapamil funciona tan solo como un sustrato, sin embargo, a concentraciones más altas verapamil es un inhibidor competitivo de P-gp intestinal en la rata, puede inhibir la hidrólisis de ATP además de bloquear el canal de calcio inhibiendo a P-gp (Song *et al.*, 2006; Kannan *et al.*, 2009).

Además de verapamil, las xantinas como la cafeína, teofilina, teobromina, isobutilmetilxantina (IBMX) y pentoxifilina (PTX) son compuestos regularmente usados para estudios de actividad anticancerígena y se ha reportado que pueden quimiosensibilizar a las células cancerosas inhibiendo P-gp, uno de los posibles mecanismos es compitiendo con el sitio de unión en un mecanismo de defensa (Dočolomanský *et al.*, 2010).

Los estudios dirigidos a los inhibidores de P-gp se encuentran resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 1. Estudios realizados sobre los inhibidores de P-gp.

Compuesto	Mecanismo de acción	Modelo de estudio	Autores
Verapamil	Inhibe la hidrólisis de ATP	CH ^R C5	Kannan <i>et al.</i> (2009)
Xantinas	Compiten por el sitio de unión	L1210/VCR	Dočolomanský <i>et al.</i> (2010)
	Compiten con el transporte de P-gp	P388	Palmeira <i>et al.</i> (2012)
	Inhiben la actividad de la fosfodiesterasa y la síntesis de TNF	L1210/VCR	Štefankova <i>et al.</i> (1995)
Cafeína	Es un modulador bioquímico	Células de carcinoma de ratón CDF ₁	Kaddoumi <i>et al.</i> (2004)
	Inhibe las cinasas ATM/ATR	CLL	Svirnovski <i>et al.</i> (2010)

Metformina	Activa la vía AMPK inhibiendo la actividad y expresión de P-gp	Hepatocitos de ratón ICR	Shan <i>et al.</i> (2017)
	Inhibe la expresión de P-gp mediante la inhibición de NF-κB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Singhal <i>et al.</i> (2014)
	Inhibe la expresión de P-gp mediante el silenciamiento de NF-κB	HepG2/ADM	Wu <i>et al.</i> (2016)
	Suprime la expresión de P-gp mediante la inhibición de NF-κB y CREB	MCF-7/adr	Kim <i>et al.</i> (2010)
	Suprime la expresión de HIF-1α desregulando la expresión de P-gp	Bel-7402/5-FU (Bel/fu)	Ling <i>et al.</i> (2014)

3.7. Metformina

Con la finalidad de encontrar nuevos compuestos con menor efecto citotóxico y que eviten la MDR o la reduzcan, en los últimos años se han centrado una parte considerable de las investigaciones científicas en numerosos aspectos relacionados con el diagnóstico precoz y el tratamiento del cáncer de mama (Merino *et al.*, 2017). De tal manera que se ha reportado que los pacientes diabéticos tratados con metformina, tienen una disminución en la incidencia y una mejor supervivencia a distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (Liu *et al.*, 2009).

La metformina (1,1-dimetilbiguanida clorhidrato) es un fármaco biguanido oral hipoglucémico que es prescrito y comercializado ampliamente en el mundo para tratar la diabetes tipo II (El-Mir *et al.*, 2000). No se metaboliza, sino que se elimina rápidamente del plasma a través del riñón, su efecto farmacológico consiste en la

disminución de la gluconeogenia hepática y, además, potencia la acción periférica de la insulina (Olivera-González *et al.*, 2010).

Desde la década de 1970, Vladimir Dilman y Anisimov propusieron que las biguanidas tienen actividad quimiopreventiva y sinérgica con quimioterapéuticos (Villegas *et al.*, 2016) y en la actualidad estudios epidemiológicos han revelado que el uso oral de la metformina tiene efecto antitumoral, reduciendo su incidencia y mejorando la prognosis de los pacientes con cáncer (Cabello *et al.*, 2016). El uso de la metformina se ha asociado con reducción tumoral, particularmente en cáncer de páncreas, hepatocelular, en menor medida de colon, de mama (DeCensi *et al.*, 2010) y de pulmón (Salani *et al.*, 2014), dicha reducción se atribuye a su ya demostrada actividad antiproliferativa *in vivo* en modelos tumorales (Jiralerspong *et al.*, 2009) e *in vitro* contra múltiples líneas celulares de cáncer (Davies *et al.*, 2017).

En cáncer de mama se ha mostrado que la metformina inhibe la proliferación celular de manera dosis dependiente en distintas líneas celulares como MCF-7, MCF-7/713, BT-474, SKBR-3 y MDA-MB-468 (Alimova *et al.*, 2009; Hirsch *et al.*, 2009). Sin embargo, aún no está totalmente definido el mecanismo de acción mediante el cual se logra dicha inhibición; se ha reportado que en líneas celulares de leucemia la adición de metformina induce apoptosis mediante la sobrerregulación de vías de estrés celular y proteínas que interactúan en la apoptosis (Ramos-Peñafiel *et al.*, 2015a), mientras que otros estudios sugieren que la alta actividad proliferativa de las células tumorales requiere de altos niveles de nutrientes para cumplir con la demanda incrementada de consumo de energía y biosíntesis de proteínas (DeCensi *et al.*, 2010), por lo que la metformina limitaría la energía para las células al disminuir la producción de glucosa (Salani *et al.*, 2014).

Aunado al efecto antiproliferativo de la metformina, en años recientes se ha asociado el uso de metformina con la disminución de la expresión de proteínas del fenotipo MDR. Singhal *et al.* (2014) evaluaron el efecto de metformina en el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, encontrando que ésta inhibe la expresión de las glicoproteínas p (responsables de la MDR mediante la inhibición de la expresión del factor nuclear kappa B (NF-κB)). En su modelo, el crecimiento fue detenido mediante la activación de AMPK (AMP-activated protein kinase), lo que produjo especies reactivas de oxígeno, además de facilitar la fusión lisosomal. Estos hallazgos han dado las bases para adicionar metformina al tratamiento, principalmente en los casos con bacilos multirresistentes (Ramos-Peñafiel *et al.*, 2015b).

En 2010 Kim y colaboradores encontraron que la metformina activa AMPK y suprime la expresión de MDR1 en células MCF-7/adr mediante la inhibición de la activación de NF-κB y CREB (cAMP-responsive element binding protein). En el trabajo de Ling *et al.* (2014) empleando la línea celular Bel-7402/5-Fu (Bel/Fu) de

carcinoma hepatocelular, la metformina activó la vía AMPK/mTOR (mammalian target of rapamycin), suprimiendo la expresión del factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α) y desregulando transcripcionalmente la expresión de P-gp y Mrp-1. En 2016, Wu y colaboradores encontraron resultados similares en las líneas celulares HepG2 y HepG2/ADM (adrenomedullin) de carcinoma hepatocelular, en el 2017 Shan *et al.* también obtuvieron resultados parecidos en hepatocitos de ratón ICR.

Los disruptores de energía (como biguanidas y 2-deoxiglucosa), evidentemente suprimen la proliferación de distintas células cancerosas, debido a que las células cancerosas MDR frecuentemente requieren más energía debido a que los transportadores ABC hidrolizan ATP para transportar sustratos. Los sustratos de transportadores ABC pueden incrementar el costo metabólico de resistencia y suprimir la proliferación de fenotipos de MDR (Xue *et al.*, 2016).

Otro de los inhibidores de bombas de extrusión reportados recientemente, son las metilxantinas como cafeína, las cuales tienen múltiples efectos farmacológicos entre ellos los reportados en un estudio realizado por Saber & Kandala (2018), en los que se muestra que la cafeína, es un inhibidor potencial de la actividad de las bombas de flujo estafilocócicas para extruir fármacos.

3.8. Cafeína

Estudios epidemiológicos prospectivos sobre los efectos del café cafeinado en la incidencia de cáncer mostraron una correlación negativa entre el consumo de café y la incidencia de tumores en humanos (Eini *et al.*, 2015). Se ha revelado que el consumo de cafeína está asociado con un menor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Sakurai *et al.*, 1999), de piel (Bode & Dong, 2007), de ovario (Tworoger *et al.*, 2008), de hígado y de páncreas (Eini *et al.*, 2015),

Debido a que está presente en numerosas fuentes de alimento, incluyendo café, té, bebidas de cacao y bebidas carbonatadas, la cafeína es la sustancia activa más ampliamente consumida de forma conductual en el mundo, la cafeína ha sido objeto de estudio intenso y varios efectos han sido reportados (Hashimoto *et al.*, 2004). La cafeína tiene un rango diverso de efectos farmacológicos, altera los niveles de calcio intracelular, incrementa los niveles de cAMP, activa la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) e inhibe la actividad de la fosfodiesterasa y de la cinasa fosfatidilinositol-3 (PI3K) (Ku *et al.*, 2011).

Desde hace muchos años se ha descrito que la cafeína incrementa el efecto de los agentes quimio/radioterapéuticos. Es generalmente admitido que esta metilxantina retarda la proliferación celular pero sus propiedades sensibilizantes han sido especialmente atribuidas a su capacidad de facilitar o acelerar el transcurso del checkpoint G₂/M (Deplanque *et al.*, 2004), dejando a las células menos tiempo para reparar el daño en el DNA al hacerlas pasar por la mitosis

disfuncional, llevándolas a apoptosis. Esta disrupción se ha reportado en líneas celulares de cáncer de pulmón LK87 (Sakurai *et al.*, 1999), de cáncer cérvico uterino (HeLa) y de mama (MCF-7) (Bode & Dong, 2007).

Lo anterior resulta de gran relevancia debido a que se ha encontrado además que la MDR en células cancerosas puede ser debida al incremento de nivel de enzimas reparadoras de DNA (Fujii *et al.*, 2008), con lo cual representa un compuesto poco tóxico candidato para romper con la MDR. En un trabajo realizado por Sadzuka *et al.* (1995), encontraron que el mecanismo responsable del efecto antitumoral que tiene la cafeína cuando se usa en conjunto de adriamicina es disminuir el eflujo de este antineoplásico disminuyendo el fenotipo MDR.

Otro estudio que refuerza su potencial uso como compuesto capaz de sensibilizar a células con MDR, es el hecho de que puede disminuir la expresión de la proteína membranar MDR ABCG2 (características del fenotipo MDR) mediante la inducción de su traslocación y la subsecuente degradación lisosomal. Como consecuencia de esta disminución, la cafeína inhibe el flujo de sustrato de ABCG2 y sensibiliza las células de cáncer de mama resistentes a los fármacos mediante la unión directa al DNA para prevenir la reparación de daño al DNA inducido por fármacos (Ding *et al.*, 2012).

La cafeína puede aumentar de manera sinérgica la inhibición del crecimiento tumoral cuando se usa en combinación con agentes que dañan al DNA, además de presentar un efecto sinérgico con agentes que alteran el ciclo celular como la metformina (Tomita & Tsuchiya, 1989; Saito *et al.*, 2003). Un estudio elaborado por Mohiuddin *et al* (2009a), demostró que en medio acuoso cafeína y metformina forman un complejo molecular estable, también en otro estudio en 2009b demostraron que cuando se usaban en conjunto en un modelo *in vivo*, las concentraciones de cafeína subían debido a una mayor afinidad de la metformina con las proteínas plasmáticas. Popović *et al* (2018), encontraron que al usar cafeína en conjunto con metformina reducían el crecimiento tumoral de sarcomas probablemente por la activación de ATM y la inhibición de la angiogénesis mediada por cafeína y metformina observada de forma separada en estudios recientes, mostrando un efecto sinérgico anticancerígeno.

El uso de dosis crónicas más bajas de cafeína es importante porque representan más fielmente las dosis alcanzables a través de la ingesta diaria de cafeína que toma una persona (Chou *et al.*, 1985), también la mayoría de los trabajos previos fueron realizados con dosis suprafarmacológicas de metformina, 10-100 veces más alto que las concentraciones terapéuticas máximas alcanzables encontradas en pacientes con diabetes tipo 2 (He & Wondisford, 2015), por lo que es importante realizar estudios donde los niveles de cafeína y metformina sean bajos como para poder ser utilizados a nivel clínico pero que aún así demuestren tener la suficiente dosis para ejercer sus efectos anticancerígenos.

4. Justificación y planteamiento del problema

El cáncer de mama, a pesar del diagnóstico temprano y los tratamientos actuales, continúa siendo un problema de salud pública dada su heterogeneidad la cual modifica la efectividad del tratamiento para cada paciente. Esto ha provocado que se desarrollen distintos tratamientos enfocados en eliminar esta enfermedad. A pesar de ello, la quimioterapia es el tratamiento estándar para tratar el cáncer, ésta implica varias combinaciones con base en algún platino lo cual incrementa la supervivencia en comparación con la monoterapia (Castro *et al.*, 2010), cuando el cáncer ha metastatizado, el cisplatino de forma combinada con otros fármacos es el tratamiento de primera línea para los pacientes con un estado general que toleran el cisplatino (Stenzl *et al.*, 2010).

Sin embargo, es común encontrar pacientes que en un inicio responden bien al tratamiento con cisplatino y posteriormente deja de ser efectivo o pacientes que estando en remisión y recaen ante una segunda ronda de tratamiento éste pierde efectividad, debido a que las células tumorales desarrollan un fenotipo de MDR. Este fenotipo es caracterizado por la insensibilidad a los antineoplásicos causado por la resistencia a la apoptosis y la aparición de bombas de extrusión, que expulsan los fármacos del interior celular hacia el exterior impidiendo que se adquieran los niveles citotóxicos necesarios para eliminar dichas células (Cerezo, 2013).

Por lo anterior, resulta necesario identificar compuestos que por sí solos o en conjunto con los tratamientos actuales puedan resensibilizar a las células tumorales reduciendo el fenotipo de MDR e impidiendo así la progresión tumoral. Es por ello, que en este trabajo se evaluó el uso conjunto de cafeína y metformina en la quimiosensibilidad a cisplatino en un modelo *in vitro* de cáncer de mama ya que se ha reportado que estos compuestos por separado disminuyen la proliferación, viabilidad y fenotipo MDR de células de cáncer de mama, cervicouterino, piel, pulmón entre otros (Sakurai *et al.*, 1999; Bode & Dong, 2007; Tworoger *et al.*, 2008; DeCensi *et al.*, 2010; Salani *et al.*, 2014; Eini *et al.*, 2015). Dicha quimiosensibilización se ha reportado al emplear estos compuestos de forma previa o posterior al uso de un antineoplásico y se ha visto que puede ser mediada por la alteración del ciclo celular, disminución de la actividad y/o de la expresión de bombas de extrusión (Deplanque *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2016).

Los resultados de este trabajo podrían ser relevantes para mejorar los tratamientos actuales de quimioterapia en pacientes no sólo con cáncer de mama dado que se ha reportado el efecto en múltiples tipos de cáncer, de esta manera se podría contar con tratamientos de gran efectividad, pero menor toxicidad traduciéndose en mayor beneficio para los pacientes.

5. Hipótesis

Se ha reportado que tanto cafeína como metformina pueden quimiosensibilizar líneas celulares cancerosas con fenotipo MDR, disminuyendo el tiempo de reparación del DNA para llevarlas a apoptosis y reduciendo la expresión de genes e incrementando la degradación de proteínas codificadas por estos como Mrp-1 o P-gp que funcionan como bombas de extrusión de fármacos. Por lo tanto, en un modelo de cultivo *in vitro* de células de cáncer de mama murino, se espera que el tratamiento conjunto de cafeína y metformina incremente la quimiosensibilidad de las células tumorales a cisplatino disminuyendo su viabilidad y decrementando la expresión de bombas de extrusión (P-gp, Mrp-1).

6. Objetivo general

Analizar el efecto conjunto de cafeína y metformina en la quimiosensibilidad de células tumorales de cáncer de mama murino a cisplatino.

7. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del tratamiento de cafeína, metformina y cafeína/metformina sobre la quimiosensibilidad a cisplatino en células de cáncer de mama murino.
- Determinar el efecto del tratamiento previo con cafeína, metformina y cafeína/metformina sobre la viabilidad de células de cáncer de mama murino expuestas a cisplatino.
- Evaluar el efecto del tratamiento de cafeína, metformina y cafeína/metformina en la expresión de Mrp-1 y P-gp en células de cáncer de mama murino.
- Evaluar el efecto del tratamiento de cafeína, metformina y cafeína/metformina en la extrusión de fármacos mediada por transportadores en células de cáncer de mama murino.

8. Material y Método

8.1. Cultivo celular

Se utilizaron células tumorales JC que provienen de un adenocarcinoma mamario primario espontáneo de ratones hembra BALB/c (Patil *et al.*, 2010). Estas células

se mantuvieron en cultivo con medio completo (MC) el cual fue compuesto por: RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies, USA) suplementado con suero fetal bovino (Biowest, USA) al 10%, 100 IU/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina (Gibco BRL Life Technologies, USA) y fueron mantenidas bajo condiciones de esterilidad en una incubadora Forma Scientific a 37°C con 5% CO₂, en un ambiente de humedad saturante.

8.2. Condicionamiento de las células con metformina y cafeína

Las células se mantuvieron en platos de cultivo Petri de 10 cm de diámetro (Corning, USA) en 4 condiciones diferentes; un control negativo (sin ningún tratamiento), tratadas con metformina (Millipore, China) 10 µM, tratadas con cafeína (J.T. Baker, México) 300 µM y tratadas con metformina 10 µM/cafeína 300 µM. En los días 10, 15, 20, 25 y 30 las células se despegaron con 3 ml de verseno, se sembraron 1x10⁵ células por tratamiento y se les añadió 7 ml de MC con la misma concentración de metformina y cafeína respectiva a cada condición.

8.3. Ensayo de viabilidad y quimiosensibilidad de células JC a cisplatino

Para evaluar la viabilidad de la línea celular JC previamente condicionada con metformina, cafeína y metformina/cafeína; se utilizó el reactivo MTS Cell Titer 96[®] AQueous (One Solution Cell Proliferation Assay) (Promega, USA) y el fármaco cisplatino. Se realizó la prueba de viabilidad a los días 10, 20 y 30 de tratamiento, con la finalidad de evaluar el efecto de cafeína y metformina durante 3 distintas etapas del tratamiento con respecto a la resistencia al fármaco cisplatino. El ensayo consistió en usar una placa de 96 pozos de fondo plano estéril (Corning, USA), se sembraron 2x10³ células por pozo para cada una de las 4 condiciones (control negativo, metformina, cafeína y metformina/cafeína), con 200 µl de MC y una dilución seriada de 5 a 0.625 µg/ml del fármaco cisplatino por cada condición, dejando incubar la placa mantenida bajo condiciones de esterilidad en una incubadora Forma Scientific a 37°C con 5% CO₂, en un ambiente de humedad saturante durante 4 días. Posteriormente se procedió a agregar 20 µl de MTS (Promega, USA), y se incubó durante 1 hora, para posteriormente realizar su lectura en un lector de microplatos a 490 nm (*Molecular Decives E max*).

Para determinar la quimiosensibilidad de las células tratadas con cafeína, metformina y cafeína/metformina a cisplatino se obtuvo la IC₅₀ mediante el programa GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Prism software, USA).

8.4. Expresión de mRNA para Mrp-1 y P-gp

Para analizar el efecto de cafeína y metformina en la expresión del mRNA de Mrp-1 y P-gp en células tumorales JC, se empleó la técnica de RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) y posteriormente una PCR de punto final. En un plato de cultivo de 5 cm de diámetro (Corning, USA) se cultivaron 1×10^6 células JC tratadas con cafeína, metformina y cafeína/metformina con un volumen de 5 ml de MC, cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia se retiró el MC de las células y se realizaron 2 lavados con 2 ml de PBS por cada lavado, después las células se lisaron y despegaron con 500 μ l de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA) para obtener el RNA, después las células fueron colocadas en un tubo eppendorf de 2 ml y se preservaron en ultracongelación a -70 °C. El cDNA se obtuvo de 500 ng de RNA con el Kit de High Capacity RNA-to-cDNA (Thermo Fisher Scientific, Lithuania), una vez obtenido el cDNA de cada muestra se procedió a realizar una PCR de punto final para amplificar el cDNA de cada muestra. Cada ensayo de PCR se llevó a cabo usando un termociclador TC1000-G (DLAB, USA). Se usaron los siguientes primers: Mrp-1 izquierdo, ccaggattacttctggtgga; Mrp-1 derecho, tgtcctccttattcaatgacca y para P-gp; P-gp izquierdo: gggcatttacttcaaactgtca; P-gp derecho: ttacaagcttcatttcttaattcaa. Los resultados se analizaron por el método de cuantificación relativa Δ CT.

8.5. Ensayo para analizar la resistencia a fármacos

Para determinar si el tratamiento de cafeína y metformina influyen en la capacidad de extrusión de fármacos en las células tumorales JC, se evaluó la actividad del transportador P-gp en las células tumorales. Para ello, se utilizó el Kit Vybrant Multidrug Resistance Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), basado en la retención de calceína AM, a través del bloqueo de P-gp por el inhibidor verapamil en las células JC después de ser tratadas 10 días con las 4 condiciones; control negativo, cafeína (300 μ M), metformina (10 μ M) y cafeína (300 μ M)/metformina (10 μ M). En una placa de 96 pozos de fondo cóncavo, a cada pozo se le agregó 40 μ l del inhibidor verapamil en 3 concentraciones (120, 30 y 0 μ g/ml) posteriormente a cada pozo con verapamil se le agregaron 400 000 células JC en 100 μ l de MC, después se incubó la placa durante 15 minutos y se le agregó 50 μ l de calceína AM (1 μ M) a cada pozo y se dejó incubar de nuevo por 15 minutos. Posteriormente se centrifugó la placa a 2000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante, se resuspendió en 200 μ l de MC (2 veces), por último, se transfirieron las células con 200 μ l de MC a una placa oscura especial para su lectura en el fluorómetro (Thermo Fisher Scientific modelo Fluoreskan ascent FL), a una absorción de 494 nm y a una emisión de 517 nm.

8.6. Análisis estadístico

Se obtuvo el promedio de los resultados por triplicado \pm desviación estándar (DE) para la retención de fármacos comparando diferencias significativas ($P < 0.05\%$) mediante la prueba de *t* de Student.

9. Resultados

9.1. Cafeína y metformina quimiosensibilizan las células de cáncer de mama murino a cisplatino

Para analizar el efecto que tienen cafeína y metformina sobre la quimiosensibilidad de las células de cáncer de mama murino a cisplatino se cultivaron células JC en ausencia y presencia de cafeína y metformina, a los días 10, 20 y 30 se les agregó cisplatino en una dilución seriada de (0.625 a 5 $\mu\text{g/ml}$) para ver si la quimiosensibilidad era dependiente de la dosis de cisplatino y posteriormente se les agregó cell titer el cual contiene un compuesto que es biorreducido por las células y al ser metabolizado este compuesto vira de color, de manera proporcional al número de células viables. En la figura 3 y en la tabla 2 se muestran las IC_{50} obtenidas para los días 10, 20 y 30, donde se observa que al día 10 metformina muestra un mayor aumento en la sensibilidad de las células hacia el cisplatino siendo requerida menor concentración del compuesto (1.203 $\mu\text{g/ml}$) con respecto a control negativo que requirió 2.521 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto para disminuir la población celular en un 50% (figura 3 y tabla 2, día 10), mientras que a los días 20 y 30 esta sensibilidad se va perdiendo y no se observa mucha diferencia de los tratamientos con respecto al control negativo (figura 3, tabla 2).

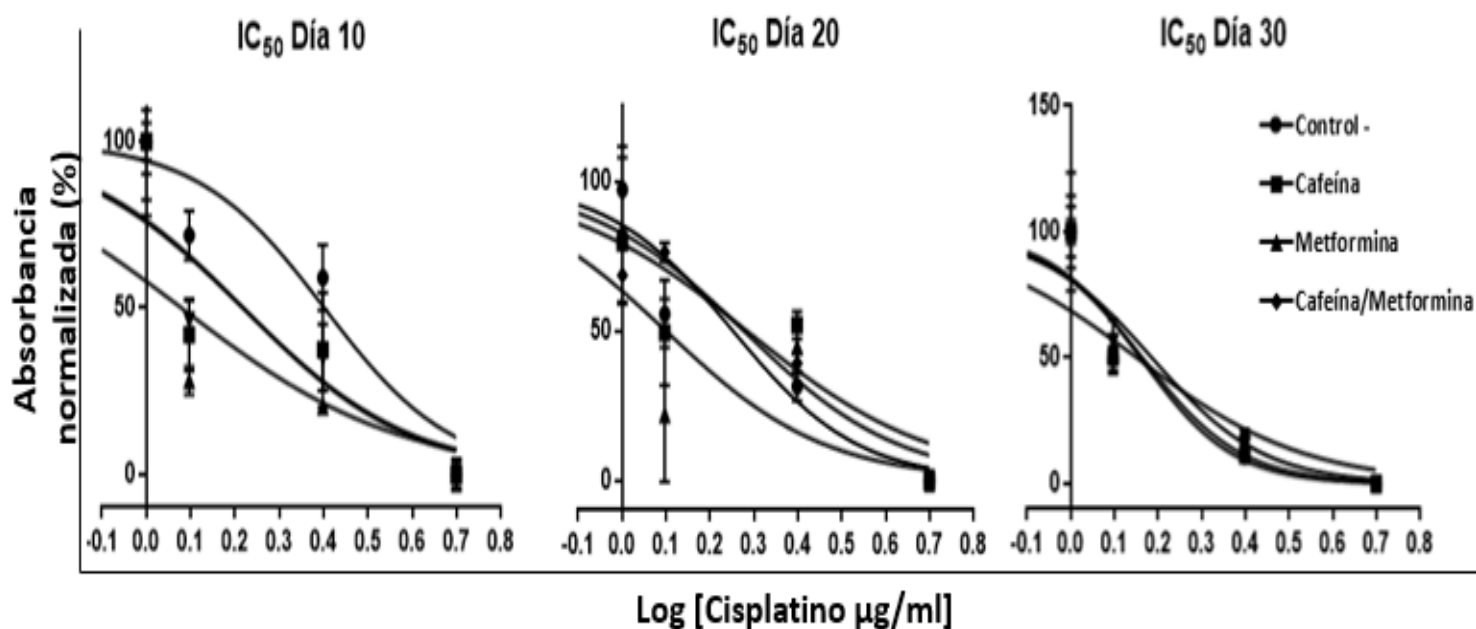


Figura 3. Cafeína y metformina aumentan la sensibilidad hacia el cisplatino en células de cáncer de mama murino. Control negativo (sin ningún tratamiento), cafeína (300 μ M), metformina (10 μ M) y cafeína (300 μ M)/metformina (10 μ M) sobre la quimiosensibilidad a cisplatino en células JC a los días 10, 20 y 30.

IC₅₀ [μg/ml] de cisplatino				
Día	Control -	Cafeína	Metformina	Cafeína/Metformina
10	2.521	1.656	1.203	1.653
20	1.787	1.922	1.257	1.891
30	1.535	1.444	1.421	1.461

Tabla 2. Cafeína y metformina reducen la concentración de cisplatino necesaria para reducir la población celular en un 50%. IC₅₀ [μ g/ml] de cisplatino, control negativo (sin ningún tratamiento, cafeína (300 μ M), metformina (10 μ M) y cafeína (300 μ M)/metformina (10 μ M) durante 10, 20 y 30 días.

Después de encontrar que cafeína y metformina promueven la sensibilidad que tienen las células de cáncer de mama murino contra el cisplatino, se procedió a verificar cómo se modificaba el porcentaje de viabilidad.

9.2. Cafeína y metformina reducen la viabilidad de las células de cáncer de mama murino

Para ver el efecto de cafeína y metformina en el porcentaje de viabilidad de las células de cáncer de mama murino, se cultivaron células JC en ausencia y presencia de cafeína y metformina, a los días 10, 20 y 30 se les agregó cisplatino en una dilución seriada de (0.625 a 5 μ g/ml) para ver si este efecto era dependiente de la dosis de cisplatino, posteriormente se les agregó cell titer. En la figura 4 se muestra que cafeína y metformina reducen la viabilidad de las células JC, aunque este efecto es más evidente cuando las células sólo son tratadas con metformina ya que reduce la viabilidad de las células JC en un 40% con respecto al control negativo cuando se usa una concentración de cisplatino de 1.25 μ g/ml, esta reducción de la viabilidad solo es notable en los primeros 10 días, a los días 20 y 30 la viabilidad de las células parece no ser afectada por cafeína y/o metformina (figura 4).

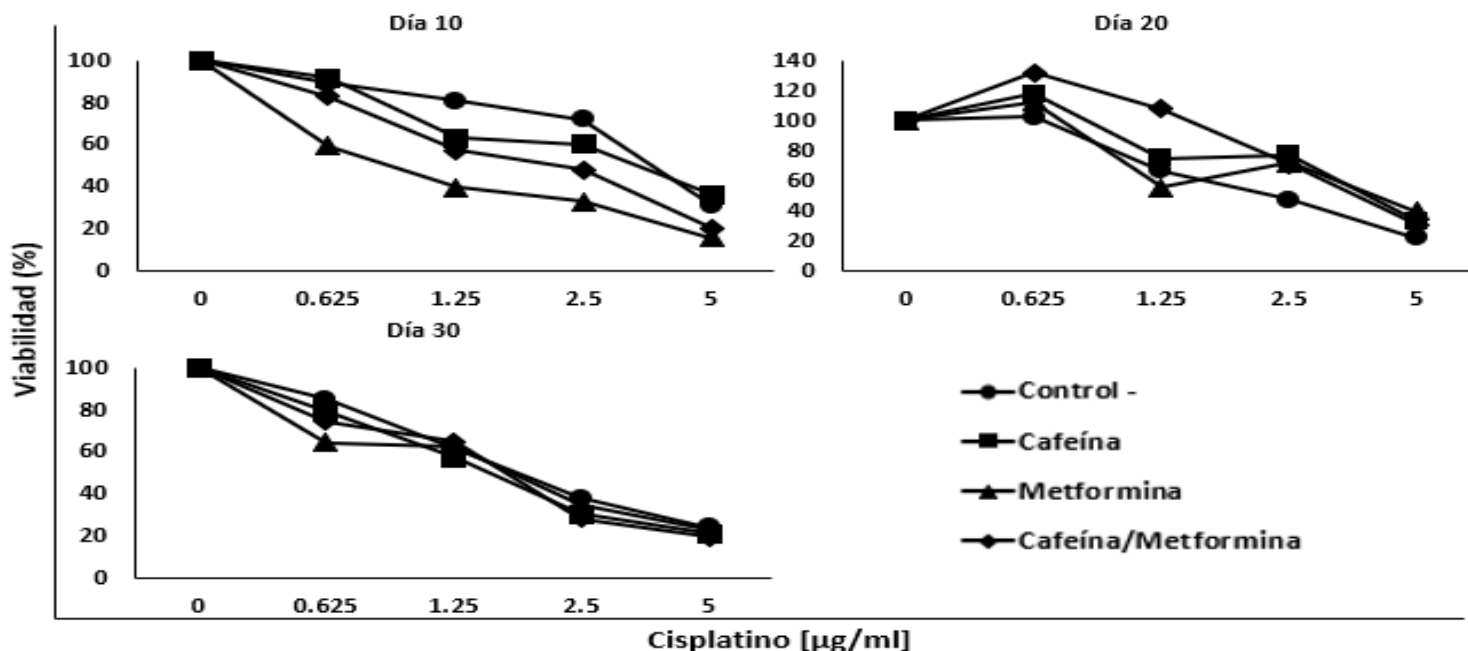


Figura 4. Cafeína y metformina reducen la viabilidad de las células JC en presencia de cisplatino. Células JC sin tratamiento (control negativo), tratadas con cafeína (300 µM), metformina (10 µM) y cafeína (300µM)/metformina (10µM) durante 10, 20 y 30 días.

Después de mostrar que cafeína y metformina reducen la viabilidad de las células de cáncer de mama murino también se ha reportado que este efecto puede ser debido a que afectan a las proteínas transportadoras de fármacos por lo que se realizó un ensayo en búsqueda de la disminución de expresión de 2 proteínas transportadoras ABC.

9.3. Cafeína y metformina no alteran la expresión de Mrp-1 y P-gp en células de cáncer de mama murino

Para analizar el efecto que tienen cafeína y metformina en la expresión de Mrp-1 y P-gp en células de cáncer de mama murino se cultivaron células JC en ausencia y presencia de cafeína y metformina durante 10 días ya que fue el tiempo en donde se encontró un efecto quimiosensibilizante más notable, se realizó una PCR punto final y una electroforesis con las muestras de las células tratadas. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos de la electroforesis donde se observa que cafeína y metformina no muestran tener efecto alguno sobre la expresión de Mrp-1 o P-gp, lo cual se comprueba con la expresión relativa donde no se encuentran diferencias distinguibles entre los grupos tratados con cafeína y metformina en comparación con el control negativo.

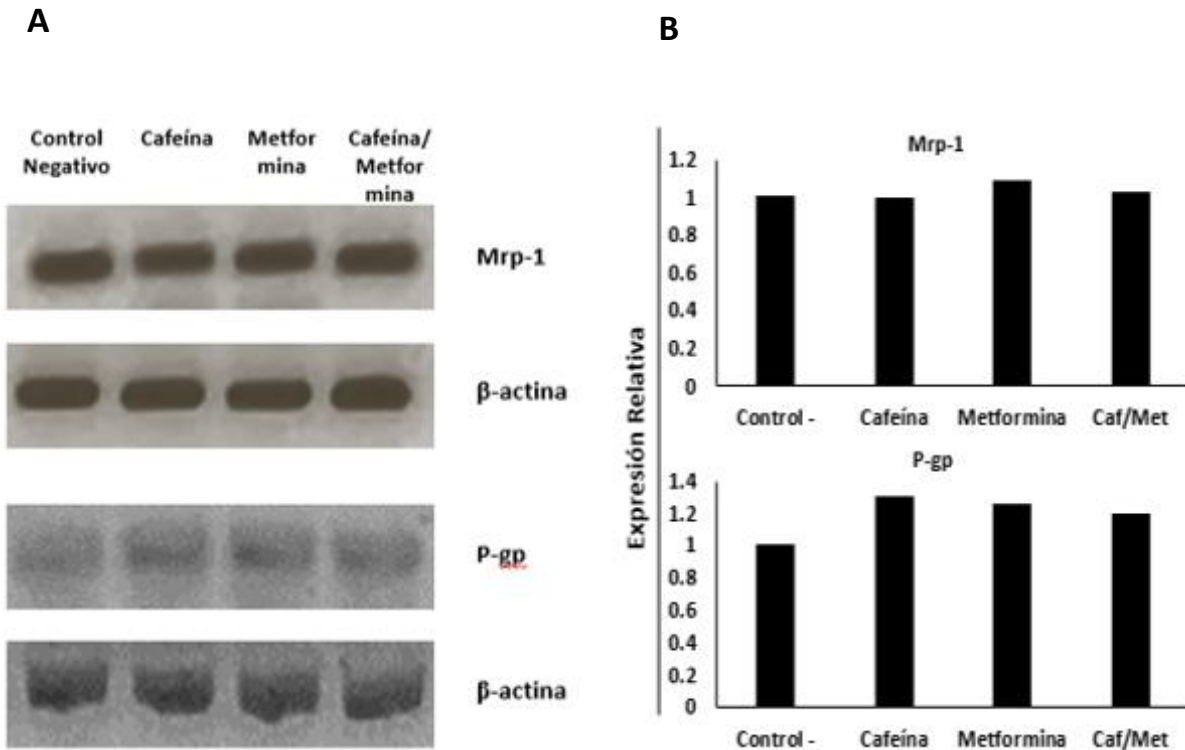


Figura 5. Cafeína y metformina no afectan la expresión de los transportadores Mrp-1 y P-gp. Las células JC fueron tratadas durante 10 días (control negativo no tuvo ningún tratamiento) en ausencia y presencia de cafeína (300 μ M) y metformina (10 μ M) y cafeína (300 μ M)/metformina (10 μ M). En la figura A se observan los resultados de la electroforesis realizada a los productos del PCR. En la figura B se muestra la expresión relativa de las proteínas Mrp-1 y P-gp. β -actina es el gen constitutivo.

Al no encontrar ninguna diferencia en la expresión de las proteínas transportadoras cuando las células son tratadas con cafeína y metformina se realizó un ensayo para buscar si esta reducción de la viabilidad era debido a la disminución de la función de las proteínas transportadoras.

9.4. Cafeína y metformina mejoran la retención de fármacos en células de cáncer de mama murino

Para determinar el efecto que tienen cafeína y metformina sobre la función de las proteínas transportadoras de fármacos en células de cáncer de mama murino se cultivaron células JC en ausencia y presencia de cafeína y metformina durante 10 días, a las células se les agregó verapamil (0, 30 y 120 μ g/ml) para inhibir P-gp ya que es la proteína transportadora dominante, posteriormente se les adicionó calceína AM (1 μ M) y por último se leyó su fluorescencia en un fluorómetro. En la figura 6 A se observa que las células tratadas con cafeína emiten una mayor fluorescencia (9.4 RFU) cuando se usa una concentración de verapamil 120 μ g/ml a diferencia de las células tratadas con metformina que emiten 7.9 RFU sin una diferencia significativa con respecto a control negativo con 6 RFU (figura 6 A). Sin embargo, cuando se usan cafeína y metformina en conjunto demuestran una

mayor capacidad para disminuir la extrusión de fármacos, en la figura 6 B se observa que las células tratadas con cafeína y metformina en conjunto retienen más de doble la calceína (cerca del 700%) a diferencia del control negativo que a la concentración 120 $\mu\text{g/ml}$ de verapamil retiene cerca del 300% de calceína, mostrando un efecto sinérgico de estos 2 compuestos (figura 6 A y B).

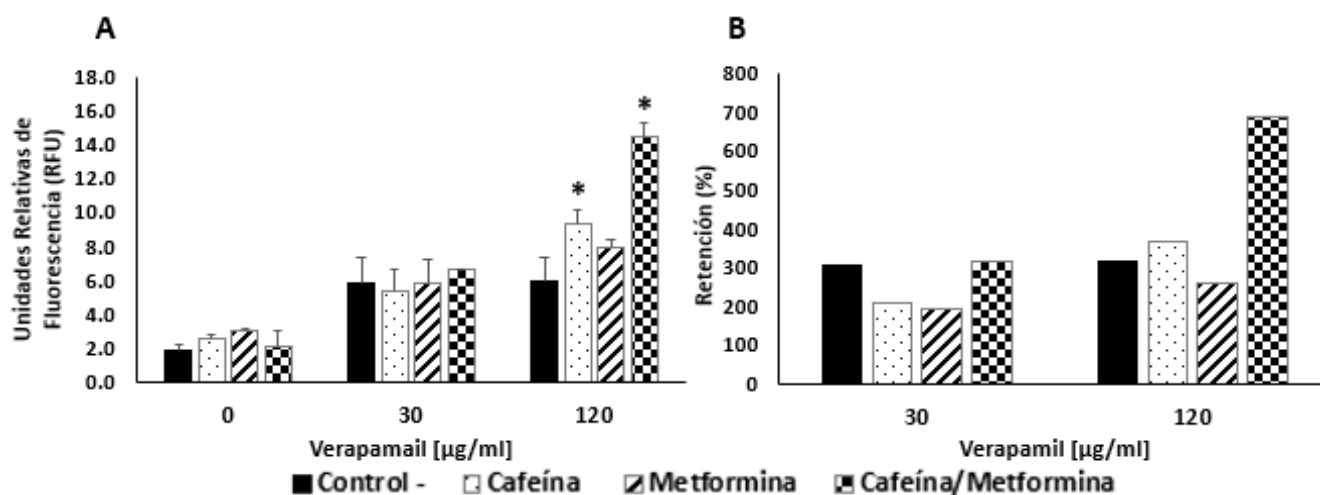


Figura 6. Cafeína y metformina afectan la función de las proteínas transportadoras al aumentar la retención de los fármacos. Células JC tratadas durante 10 días (control negativo sin tratamiento) con cafeína (300 μM), metformina (10 μM) en presencia de verapamil 0, 30 y 120 $\mu\text{g/ml}$. La gráfica A muestra la fluorescencia emitida por las células al retener la calceína. En la gráfica B se muestra la retención de calceína en porcentajes en presencia de verapamil (30 y 120 $\mu\text{g/ml}$). * Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), "t" de Student.

10. Discusión de resultados

El cáncer de mama, independientemente de ser considerado un tumor prevenible, continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer en la mujer a nivel mundial (Sánchez & Verga, 2009). En México a partir del año 2006 desplazó al cáncer cérvico uterino en el número de muertes y es la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas en el grupo de edad de 30 a 54 años (Mohar *et al.*, 2008). A pesar de que existen mejores instrumentos de diagnóstico, diversos programas de detección temprana, mejores tratamientos y mayor conocimiento de los factores de riesgo, la incidencia del cáncer de mama sigue aumentando (Batista *et al.*, 2013).

Dentro de los estándares de quimioterapias actuales para el tratamiento del cáncer de mama avanzado se emplean fármacos como el cisplatino el cual es de los que tienen mejor respuesta (Quispe-Mauricio *et al.*, 2009; Narod & Rodríguez, 2011), aunque muchas veces los tumores adquieren resistencia al cisplatino y se

ha visto que las proteínas transportadoras dependientes de ATP o bombas de extrusión de fármacos están involucradas con esta resistencia (Cortés, 2012). Existen compuestos que pueden reducir esta resistencia, dentro de los cuales se encuentran cafeína y metformina que se ha reportado que disminuyen la proliferación, viabilidad y fenotipo MDR de células de cáncer de mama, cervicouterino, piel, pulmón entre otros (Sakurai *et al.*, 1999; Bode & Dong, 2007; Tworoger *et al.*, 2008; DeCensi *et al.*, 2010; Salani *et al.*, 2014; Eini *et al.*, 2015). Dicha quimiosensibilización se ha reportado al emplear estos compuestos de forma previa o posterior al uso de un antineoplásico y se ha visto que puede ser mediada por la alteración del ciclo celular, disminución de la actividad y/o de la expresión de bombas de extrusión (Deplanque *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2016).

Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el efecto que tienen cafeína y metformina en conjunto para quimiosensibilizar células tumorales de cáncer de mama murino a cisplatino. Para ello, células tumorales de cáncer de mama murino fueron tratadas previamente con cafeína, metformina, cafeína/metformina durante 10, 20 y 30 días para posteriormente ser cultivadas en presencia o ausencia de diferentes dosis de cisplatino y de esta manera evaluar el efecto sobre la viabilidad y la expresión de bombas de extrusión.

Con respecto al efecto sobre la quimiosensibilidad de células tumorales tratadas con los fármacos y posteriormente expuestas a cisplatino, se encontró que los 3 tratamientos fueron efectivos a los 10 días de exposición, requiriendo menos cantidad de cisplatino para alcanzar la IC₅₀. Metformina fue la que mostró tener el mejor efecto seguida de cafeína/metformina y por último el menor efecto se observó al emplear solo cafeína. La diferente sensibilidad observada podría atribuirse al mecanismo de acción de cada fármaco para lograr su efecto ya que estudios anteriores reportan que metformina es capaz de inhibir mTOR por mecanismos dependientes de AMPK e independientes de AMPK en líneas celulares de cáncer de mama, logrando así que se requiera menor cantidad del antineoplásico para obtener efectos similares (Deng *et al.*, 2012). El uso conjunto de cafeína y metformina mostró también ser más efectivo que el uso de cafeína sola, lo cual se relaciona con lo reportado en estudios hechos por Ashinuma y colaboradores en el 2012 donde se encontró que metformina tiene mejor efecto si se emplea de forma sinérgica logrando alterar el ciclo celular de células de cáncer de pulmón dando como resultado mayor quimiosensibilidad al cisplatino, además de que se ha encontrado que en células de cáncer de mama y cérvico uterino, la cafeína puede tener un efecto sinérgico con cisplatino al incrementar la sensibilidad de las células tumorales llevándolas a apoptosis (Niknafs, 2011; Aliwaini *et al.*, 2017).

Además de incrementarse la quimiosensibilidad a cisplatino también se demostró que cafeína y metformina por si solas o en combinación reducen la viabilidad de las células tumorales a los 10 días de tratamiento. Se encontró que metformina

redujo hasta en 60% la viabilidad al emplear la concentración de 1.25 µg/ml de cisplatino, cafeína/metformina redujeron 43% la viabilidad y por último cafeína mostró una reducción del 37% todo esto comparado con la reducción de solo 20% en células sin tratamiento. Con estos resultados pudimos observar que metformina ya sea sola o en conjunto con cafeína resultó ser el compuesto con mejores resultados lo cual puede atribuirse a las múltiples vías de acción reportadas para ésta. En algunos estudios se ha encontrado que metformina reduce la viabilidad celular al activar la AMPK en líneas celulares de cáncer de mama (Phoenix *et al.*, 2009), mientras que otros estudios atribuyen esta inhibición de la viabilidad a la supresión de la proliferación celular y al bloqueo de ciclo celular (Vázquez-Martín *et al.*, 2010; Queiroz *et al.*, 2014; Ramos-Peñafiel *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, cabe resaltar que el efecto conjunto de cafeína y metformina es bastante bueno comparado con células sin tratamiento, esto muy probablemente debido a la capacidad de metformina de sinergizar con otros compuestos (Sahra *et al.*, 2010). De tal manera que nuestros resultados muestran la suma del efecto antiproliferativo de ambos compuestos, el daño al DNA y el impedimento de reparación de este al inducir el arresto celular en alguna fase del ciclo celular (G₀/G₁, checkpoint G) (Saito *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2015; Rosendahl *et al.*, 2015).

Por otra parte, la reducción de la viabilidad de células cancerosas puede atribuirse no solo a lo ya descrito, ya que existen autores que reportan a cafeína y metformina como compuestos capaces de modificar el fenotipo MDR provocando modificación en la expresión y/o función de bombas de extrusión de fármacos (Sadzuka *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2014; Singhal *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2017), por lo que se procedió a realizar un ensayo para analizar la expresión de 2 proteínas transportadoras de fármacos Mrp-1 y P-gp.

En este trabajo observamos que el tratamiento con cafeína y/o metformina aumentó la sensibilidad a cisplatino de las células cancerosas disminuyendo su viabilidad. Sin embargo, este efecto no se vio reflejado en la expresión de Mrp-1 y P-gp ya que ninguno de los tratamientos mostró diferencias en la expresión con respecto al control negativo lo que se relaciona con reportes previos donde no se ha detectado que cafeína afecte la expresión de Mrp-1 u otras proteínas transportadoras de la familia Mrp en líneas celulares de cáncer de colon o microvasos sanguíneos de ratón (Qosa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019). Asimismo, no se ha encontrado que cafeína modifique la expresión de P-gp en líneas celulares de hepatocarcinoma murino (Volm *et al.*, 1995). Para el caso de metformina se ha encontrado que no afecta la expresión de Bcrp en ratas diabéticas (Lui *et al.*, 2007), ni es capaz de modificar la expresión de P-gp en células de cáncer de mama. No obstante, a pesar de no modificar la expresión, se ha reportado que gracias al sinergismo de metformina con otros fármacos, esta es capaz de afectar la función de P-gp al inhibir la hidrólisis de ATP revirtiendo el

fenotipo MDR (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017; De & Kuppusamy, 2019), es por ello que nuestro siguiente objetivo fue realizar un ensayo de retención de fármacos para ver si cafeína y metformina actúan sobre la función de P-gp, que es la proteína transportadora ABC dominante.

Como resultado del ensayo de retención de fármacos se detectó que cuando los fármacos fueron empleados de forma separada cafeína mostró incrementar en aproximadamente un 13% la retención de fármaco mientras que metformina parece no tener efecto sobre la retención del mismo. El efecto más notable fue cuando se usaron en conjunto cafeína y metformina encontrándose un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad funcional de P-gp, donde la retención fue del doble de fármaco comparado con el grupo control.

De esta manera el efecto inhibitorio observado puede estar definido por la capacidad de las xantinas para inhibir la actividad funcional de proteínas transportadoras como ABCG2, promoviendo su entrada a la vía ubiquitina-proteasoma donde es degradada antes de alcanzar la membrana (Ding *et al.*, 2012) o podrían ser compartimentalizadas e inhibidas como se ha visto que sucede con P-gp en células de melanoma humano (Wojtowicz *et al.*, 2012). Entre las xantinas, a la cafeína se le ha atribuido un efecto inhibitorio similar a verapamil que cuando existe simultáneamente con un sustrato de P-gp, la cafeína actúa como inhibidor de P-gp aumentando la captación intracelular del sustrato de P-gp (Abuznait *et al.*, 2011). En este mismo contexto se ha reportado que la cafeína incrementa la concentración de doxorrubicina (antineoplásico de uso frecuente) actuando directamente en P-gp, atribuyendo el efecto inhibitorio de cafeína al eflujo de fármacos a través de la recuperación de los niveles de cAMP en las células tumorales (Tej & Nayak, 2018). Con respecto a metformina, se ha encontrado en líneas celulares de cáncer de mama y estudios clínicos o preclínicos que impide la actividad funcional de P-gp al reducir la producción de ATP disminuyendo así los niveles intracelulares de este, lo que trae como resultado la acumulación intercelular de los quimioterapéuticos causando citotoxicidad (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017; De & Kuppusamy, 2019)

Cafeína y metformina al actuar de manera diferente sobre la actividad funcional de P-gp, tienen un efecto antineoplásico que no se sobrepone por lo que al usarse en conjunto presentan un efecto sinérgico reduciendo la actividad funcional de las bombas de extrusión de fármaco de forma significativa. En este trabajo se demostró que en la línea celular JC cafeína y metformina tienen la capacidad de reducir el fenotipo MDR gracias a la inhibición de la actividad funcional de P-gp no encontrándose efecto sobre su expresión. Tanto cafeína como metformina cuando son usados como único tratamiento se ha reportado que deben usarse dosis altas para tener resultados (Chou *et al.*, 1985; He & Wondisford, 2015), las cuales podrían resultar tóxicas en pruebas clínicas, pero en este trabajo se ha demostrado que son requeridas concentraciones mínimas para producir un efecto significativo cuando son usados en conjunto, aunque aún faltan más estudios para

poder esclarecer como se da este efecto sinérgico entre cafeína y metformina y de qué manera específica reducen la actividad funcional de P-gp.

11. Conclusiones

- Cafeína y metformina quimiosensibilizan las células de cáncer de mama murino a cisplatino y reducen su viabilidad a los 10 días de tratamiento.
- El uso en conjunto de cafeína y metformina no parece tener un efecto sinérgico sobre la quimiosensibilidad y viabilidad ya que cuando se usa metformina como único tratamiento parece tener un efecto más notable.
- Cafeína y metformina disminuyen el fenotipo MDR por mecanismos distintos de la modificación de expresión de las bombas de extrusión de fármacos Mrp-1 o P-gp.
- Cafeína y metformina reducen el fenotipo MDR por su capacidad para inhibir la actividad funcional de P-gp siendo mejor el uso en conjunto que permite ver la sinergia entre ambos fármacos al provocar mayor acumulación intracelular del cisplatino.

12. Perspectivas

Debido a que cafeína y metformina inhibieron la actividad funcional de P-gp se plantea llevar a cabo ensayos para evaluar los posibles mecanismos involucrados, por ejemplo, variaciones en la disponibilidad de ATP, necesario para la actividad de dicha molécula; igualmente, se plantea evaluar el efecto de cafeína y metformina sobre la expresión de la proteína P-gp, incluyendo posibles modificaciones post-traduccionales.

Por otra parte debido a que cafeína y metformina muestran un efecto significativo para reducir la viabilidad, aumentar la quimiosensibilidad y reducir el fenotipo MDR de células de cáncer de mama murino *in vitro*, se espera poder corroborar este efecto en ensayos *in vivo* que demuestren este potencial sinérgico a otro nivel para futuras pruebas.

13. Referencias

- Abuznait, A. H., Patrick, S. G., & Kaddoumi, A. (2011). Exposure of LS-180 Cells to Drugs of Diverse Physicochemical and Therapeutic Properties Up-regulates P-glycoprotein Expression and Activity. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, 14(2), 236-248.
- Acea-Nebril, B. (2005). Cirugía oncológica conservadora en el cáncer de mama. Indicaciones y límites en su aplicación quirúrgica. *Cirugía Española*, 78(1), 12-18.
- Aguilar, C. M., González-Jiménez, E., García, L. A. P., Álvarez, F. J., Padilla, L. C. A., Guisado, B. R., & Rizo, B. M. (2011). Obesidad y su implicación en el cáncer de mama. *Nutrición Hospitalaria*, 26(4), 899-903.
- Alarcón, R. S. E. (2009). *Efecto de síndrome diabético sobre la expresión y actividad de proteínas ABC en glomerulo de rata* (Tesis de licenciatura). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Al-Hajj, M., Wicha, S. M., Benito-Hernandez, A., Morrison, J. S., & Clarke, F. M. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983-3988.
- Alimova, I. N., Liu, B., Fan, Z., Edgerton, S. M., Dillon, T., Lind, S. E., & Thor, A. D. (2009). Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest *in vitro*. *Cell Cycle*, 8(6), 909-915.
- Aliwaini, S. H., Dawas, S. A., Tayem, H. E. M. A., Aljoujou, S. H., & Al-Qatati, A. S. (2017). Combined Caffeine and Cisplatin Treatment Induces Synergistic Cytotoxicity in Hela Cell Line. *IUG Journal of Natural Studies*, 25(2), 250-256
- Álvarez, F. A. I., & Pulido, D. M. M. (2008). Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(6), 296-311.
- Amaro, H. M., Bautista-Samperio, L., & Arrieta, P. R. T. (2007). Correlación de factores de riesgo y hallazgos clínicos para cáncer mamario en pre y posmenopáusicas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 50(3), 110-114.
- Annese, V., Valvano, M. R., Palmieri, O., Latiano, A., Bossa, F., & Andriulli, A. (2006). Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(23), 3636-3644.

- Arcari, R. T. (2018). *Caracterización funcional del transportador ABCI3 de Leishmania* (Tesis de doctorado). Universidad de Granada, España.
- Arroyo, A. J., Prashad, G. M., Vásquez, B. Y., Li, P. E., & Tomás, C. G. (2005). Actividad citotóxica *in vitro* de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(4), 247-253.
- Arroyo, Y. M., Martín, A. M., & Álvarez-Mon, S. M. (2017). Cáncer de mama. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(34), 2011-2023.
- Ashinuma, H., Takiguchi, Y., Kitazono, S., Kitazono-Saitoh, M., Kitamura, A., Chiba, T., Tada, Y., Kurosu, K., Sakaida, E., Sekine, I., Tanabe, N., Iwama, A., Yokosuka, O., & Tatsumi, K. (2012). Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncology Reports*, 28(1), 8-14.
- Batista, H. N. E., Alegret, R. M., & Antón, F. O. (2013). Análisis espacial de la morbimortalidad del cáncer de mama y cérvix: Villa Clara. Cuba. 2004-2009. *Revista Española de Salud Pública*, 87(1), 49-57.
- Bellusci, C. P. (2011). *Implicancias de la farmacogenética en la infección pediátrica por HIV-1* (Tesis de doctorado). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Biedler, J. L. (1992). Genetic Aspects of Multidrug Resistance. *Cancer*, 70(S4), 1799-1809.
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Letters*, 247(1), 26-39.
- Brandan, M. E., & Villaseñor, Y. (2006). Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología*, 1(3), 147-162.
- Burgués, G. J. P., Pontones, M. J. L., Vera, D. C. D., Jiménez, C. J. F., & Ozonas, M. M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*, 29(9), 846-859.
- Cabello, P., Pineda, B., Tormo, E., Lluch, A., & Eroles, P. (2016). The Antitumor Effect of Metformin Is Mediated by miR-26a in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1298-1311.
- Calpena, R., Lacueva, F. J., Oliver, I., Cansado, P., Pérez, F., Costa, D., Compañ, A. F., & Pérez, M. T. (2003). Estado actual del tratamiento multidisciplinario del cáncer gástrico avanzado. *Cirugía Española*, 74(2), 69-76.

- Canal, L. J. M. (2017). *Polimorfismos genéticos en el transporte de fármacos como causa de fracas en la respuesta terapéutica* (Tesis de licenciatura). Universidad de Sevilla, España.
- Castro, C., Cardona, A. F., Revéz, L., Serrano, S. J., Carranza, H., Vargas, C. A., Reguart, N., Campo, F., Ospina, E. G., Sánchez, O., Torres, D., & Otero, J. M. (2010). Cáncer de pulmón de célula no pequeña metastásico. Tratamiento actual basado en la evidencia*(ONCOLGroup). *Acta Médica Colombiana*, 35(2), 53-81.
- Castronuovo, C. C. (2015). *Análisis de las bases moleculares de la resistencia a la quimioterapia y estrategias para su optimización: rol de las proteínas ABC, la apoptosis y la transformación celular* (Tesis de doctorado). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Cerezo, F. D. D. (2013). *Estudio del proceso de sensibilidad colateral en células leucémicas murinas y humanas con fenotipo de Resistencia a múltiples fármacos (MDR)* (Tesis de doctorado). Universidad de Murcia, España.
- Chou, D. T., Khan, S., Forde, J., & Hirsh, K. R. (1985). Caffeine tolerance: behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. *Life Sciences*, 36(24), 2347-2358.
- Cnattingius, S., Torráng, A., Ekblom, A., Granath, F., Petersson, G., & Lambe, M. (2005). Pregnancy Characteristics and Maternal Risk of Breast Cancer. *Jama*, 294(19), 2474-2480.
- Cortada, C. M., Gil, A., Goncalves, S., Sambuelli, A., Rubio, M. C., & Carballo, M. A. (2009). P-glycoprotein functional activity in peripheral blood lymphocytes in ulcerative colitis. *Medicina*, 69(4), 437-441.
- Cortés, S. M. (2012). *Estudio de la regulación epigenética y rutas de señalización celular implicadas en respuesta a quimioterapia con cisplatino en cáncer no microcítico de pulmón* (tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Couh, U. Y. L., Canto, C. B. B., Islas, F. I. (2010). Revisión de las características de los transportadores ABC involucrados en patogénesis fúngica. *Tecnociencia Chihuahua*, 4(2), 87-96.
- Davies, G., Lobanova, L., Dawicki, W., Groot, G., Gordon, J. R., Bowen, M., Harkness, T., & Arnason, T. (2017). Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer. *PLoS ONE*, 12(12), 1-22.

- De, A., & Kuppusamy, G. (2019). Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Current Problems in Cancer*, 3(8), 1-18.
- DeCensi, A., Puntoni, M., Goodwin, P., Cazzaniga, M., Gennari, A., Bonanni, B., & Gandini, S. (2010). Metformin and Cancer Risk in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Prevention Research*, 3(11), 1451-1461.
- Deng, X. S., Wang, S., Deng, A., Liu, B., Edgerton, S. M., Lind, S. E., Wahdan-Alaswad, R., & Thor, A. D. (2012). Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*, 11(2), 367-376.
- Deplanque, G., Céraline, J., Lapouge, G., Dufour, P., Bergerat, J. P., & Klein-Soyer, C. (2004). Conflicting effects of caffeine on apoptosis and clonogenic survival of human K1 thyroid carcinoma cell lines with different p53 status after exposure to cisplatin or UVc irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(4), 1100-1106.
- Ding, R., Shi, J., Pabon, K., & Scotto, K. W. (2012). Xanthines Down-Regulate the Drug Transporter ABCG2 and Reverse Multidrug Resistance. *Molecular Pharmacology*, 81(3), 328-337.
- Dočolomanský, P., Boháčová, V., Barančík, M., & Breier, A. (2010). Why the xanthine derivatives are used to study of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in L1210/VCR line cells. *General Physiology and Biophysics*, 29(3), 215-221.
- Eini, H., Frishman, V., Yulzari, R., Kachko, L., Lewis, C. E., Chaimovitz, C., & Douvdevani, A. (2015). Caffeine promotes anti-tumor immune response during tumor initiation: Involvement of the adenosine A_{2A} receptor. *Biochemical Pharmacology*, 98(1), 110-118.
- El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., & Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 223-228.
- Fernández-Plaza, S., Sevilla, J., & Madero, L. (2004). Tratamiento del cáncer en pediatría: estado actual y expectativas futuras. *Pediatría Integral*, 8(6), 501-510.
- Fujii, H., Honoki, K., Tsujiuchi, T., Kido, A., Yoshitani, K., & Takakura, Y. (2009). Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 34(5), 1381-1386.

- Germà-Lluch, J. R., & Piulats, J. M. (2013). Bases moleculares de la resistencia a cisplatino en cáncer de testículo. *Archivos Españoles de Urología*, 66(5), 524-535.
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48.
- Hashimoto, T., He, Z., Ma, W. Y., Schmid, P. C., Bode, A. M., Yang, C. S., & Dong, Z. (2004). Caffeine Inhibits Cell Proliferation by G₀/G₁ Phase Arrest in JB6 Cells. *Cancer Research*, 64(9), 3344-3349.
- He, L., & Wondisford, F. E. (2015). Metformin Action: Concentrations Matter. *Cell Metabolism*, 21(2), 159-162.
- Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tsihchlis, P. N., & Struhl, K. (2009). Metformin Selectively Targets Cancer Stem Cells, and Acts Together with Chemotherapy to Block Tumor Growth and Prolong Remission. *Cancer Research*, 69(19), 7507-7511.
- Huicochea, C. S., González, B. P., Tovar, C. I. L., Olarte, C. M. A., & Vázquez, L. J. (2009). Cáncer de mama. *Anales de Radiología México*, 8(1), 117-126.
- Imigo, G. F., Mansilla, S. E., Delama, G. I., Poblete, S. M. T., & Fonfach, Z. C. (2011). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuadernos de Cirugía*, 25(1), 67-74.
- Irigoyen, A. M. A., García, F. V., Córdoba, A. I., Ibáñez, B. B., Martínez, M. S., & Guillén, G. F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 34(2), 219-233.
- Jiang, J., Lan, Y. Q., Zhang, T., Yu, M., Liu, X. Y., Li, L. H., & Chen, X. P. (2015). The *in vitro* effects of caffeine on viability, cycle cycle profiles, proliferation, and apoptosis of glioblastomas. *European Review Medical Pharmacological Sciences*, 19(17), 3201-3207.
- Jiralerspong, S., Palla, L. S., Giordano, H. S., Meric-Bernstam, F., Liedtke, C., Barnett, M. C., Hsu, L., Hung, M. C., Hortobaygi, N. G., & Gonzalez-Angulo, M. A. (2009). Metformin and Pathologic Complete Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Diabetic Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(20), 3297-3302.
- Juárez, G. M. D., Landero, H. R., González, R. M. T., Jaime, B. L., & Téllez, L. A. (2015). Variables asociadas a fatiga en mujeres con cáncer de mama. *Anuario de Psicología*, 45(1), 101-113.

- Kaddoumi, A., Nakashima, M. N., Wada, M., & Nakashima, K. (2004). Pharmacokinetic interactions between phenylpropanolamine, caffeine and chlorpheniramine in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(2-3), 209-216.
- Kannan, P., John, C., Zoghbi, S. S., Halldin, C., Gottesman, M. M., Innis, R. B., & Hall, M. D. (2009). Imaging the Function of P-Glycoprotein With Radiotracers: Pharmacokinetics and *In Vivo* Applications. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 86(4), 368-377.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584.
- Khosravi, S. P., & Pérez, M. G. (2006). La relevancia clínica de la sobreexpresión de HER-2 en el cáncer de mama. *Anales de Medicina Interna*, 23(3), 103-104.
- Kim, H. G., Hien, T. T., Han, E. H., Hwang, Y. P., Choi, J. H., Kang, K. W., Kwon, K. Kim, B. H., Kim, S. K., Song, G. Y., Jeong, T. C., & Jeong, H. G. (2010). Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *British Journal of Pharmacology*, 162(5), 1096-1108.
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*, 51(2), 335-344.
- Król, M., Pawłowski, K. M., Majchrzak, K., Szyszko, K., & Motyl, T. (2010). Why chemotherapy can fail?. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(2), 399-406.
- Ku, B. M., Lee, Y. K., Jeong, J. Y., Ryu, J., Choi, J., Kim, J. S., Cho, Y. W., Roh, G. S., Kim, H. J., Cho, G. J., Choi, W. S., & Kang, S. S. (2011). Caffeine inhibits cell proliferation and regulates PKA/GSK3 β pathways in U87MG human glioma cells. *Molecules and Cells*, 31(3), 275-279.
- Li, J., Liang, H., Liu, J., & Wang, Z. (2018). Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer mediated delivery of drug and pDNA/siRNA for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 546(1-2), 215-225.
- Ling, S., Tian, Y., Zhang, H., Jia, K., Feng, T., Sun, D., Gao, Z., Xu, F., Hou, Z., Li, Y., & Wang, L. (2014). Metformin reverses multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma Bel-7402/5-fluorouracil cells. *Molecular Medicine Reports*, 10(6), 2891-2897.
- Liu, B., Fan, Z., Edgerton, S. M., Deng, X. S., Alimova, I. N., Lind, S. E., & Thor, A. D. (2009). Metformin induces unique biological and molecular

responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle*, 8(13), 2031-2040.

- Liu, Y. C., Liu, H. Y., Yang, H. W., Wen, T., Shang, Y., Liu, X. D., Xie, L., & Wang, G. J. (2007). Impaired expression and function of breast cancer resistance protein (Bcrp) in brain cortex of streptozocin-induced diabetic rats. *Biochemical Pharmacology*, 74(12), 1766-1772.
- López-Ayllón, B. D. (2013). *Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de cancer stem cells (CSC) derivadas de cancer no microcítico de pulmón (CNMP)* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Lugones, B. M., & Ramírez, B. M. (2009). Aspectos históricos y culturales sobre el cáncer de mama. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 25(3), 160-166.
- Márquez-Acosta, G. (2012). Cáncer de mama. *Perinatología y Reproducción Humana*, 26(2), 81-82.
- Martín, M., Herrero, A., & Echavarría, I. (2015). El cáncer de mama. *Arbor*, 191(773), 234-240.
- Martínez, A. G., Cano, R. P., González, H. S., Rosales, H. F. J. (2004). Factores predisponentes al cáncer de mama en la Región Lagunera. *Ginecología y Obstetricia de México*, 72(10), 525-530.
- Martínez, B. P. (2010). *Estudios funcionales y de expresión de proteínas transportadoras hepáticas. Implicación en la etiología de la colestasis y la resistencia a la quimioterapia antitumoral* (Tesis de doctorado). Universidad de Salamanca, España.
- Martínez-Basurto, A. E., Lozano-Arrazola, A., Rodríguez-Velázquez, A., Galindo-Vázquez, O., & Alvarado-Aguilar, S. (2014). Impacto psicológico del cáncer de mama y la mastectomía. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(1), 53-58.
- Merino, B. J. A., Torres, T. M., & Ros, M. L. H. (2017). El cancer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. *Radiología*, 59(5), 368-379.
- Mohar, A., Bargalló, E., Ramírez, M., Lara, F., & Beltrán-Ortega, A. (2009). Recursos disponibles para el tratamiento del cáncer de mama en México. *Salud pública de México*, 51(2), 263-269.
- Mohiuddin, M., Azam, Z. A. T. M., Amran, M. S., & Hossain, M. A. (2009a). *In vitro* Study on the Interaction of Caffeine with Gliclazide and Metformin in the Aqueous Media. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4, 194-204.

- Mohiuddin, M., Azam, Z. A. T. M., Amran, M. S., & Hossain, M. A. (2009b). *In vivo* Effects of Gliclazide and Metformin on the Plasma Concentration of Caffeine in Healthy Rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(9), 734-737.
- Montero, A., Hervás, A., Morera, R., Sancho, S., Córdoba, S., Corona, J. A., Rodríguez, I., Chajón, E. & Ramos, A. (2005). Control de síntomas crónicos: Efectos secundarios del tratamiento con Radioterapia y Quimioterapia. *Oncología (Barcelona)*, 28(3), 41-50.
- Narod, S. A., & Rodríguez, A. A. (2011). Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud Pública de México*, 53(5), 420-429.
- Nepomuceno, J. C. (2011). Antioxidants in Cancer Treatment. *Current Cancer Treatment-Novel Beyond Conventional Approaches*, (27), 623-650.
- Niedner, H., Christen, R., Lin, X., Kondo, A., & Howell, S. B. (2001). Identification of Genes That Mediate Sensitivity to Cisplatin. *Molecular Pharmacology*, 60(6), 1153-1160.
- Niknafs, B. (2011). Induction of apoptosis and non-apoptosis in human breast cancer cell line (MCF-7) by cisplatin and caffeine. *Iranian Biomedical Journal*, 15(4), 130-133.
- Olaya, G. E. J. (2010). Cáncer de mama triple negativo, estado actual. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 15(4), 228-236.
- Olivera-González, S., Escalante-Yanguela, B. de, Velilla-Soriano, C., Amores-Arriaga, B., Martín-Forteza, P., & Navarro-Aguilar, M. E. (2010). Hepatotoxicidad por metformina. *Medicina Intensiva*, 34(7), 483-487.
- Palmeira, A., Sousa, E., H Vasconcelos, M., & M Pinto, M. (2012). Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds. *Current Medicinal Chemistry*, 19(13), 1946-2025.
- Paredes, L. A., Blanco, G. J. L., Echenique-Elizondo, M., & Lobo, C. (2005). Expresión de Proteínas Relacionadas con Resistencia a Múltiples Drogas (MDR-Proteínas) en tumores sólidos. *Oncología (Barcelona)*, 28(8), 26-41.
- Patil, Y. B., Swaminathan, S. K., Sadhukha, T., Ma, L., & Panyam, J. (2010). The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance. *Biomaterials*, 31(2), 358-365.
- Phoenix, K. N., Vumbaca, F., & Claffey, K. P. (2009). Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ER α negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113(1), 101-111.

- Piñero-Madrona, A., Polo-García, L., Alonso-Romero, J. L., Salinas-Ramos, J., Canteras-Jordana, M., Sola-Pérez, J., Galindo-Fernández, P. J., Illiana-Moreno, J., Bermejo-López, J., Navarrete-Montoya, A., & Parrilla-Paricio, P. (2008). Características inmunohistoquímicas del cáncer de mama: ¿hacia una nueva clasificación?. *Cirugía Española*, 84(3), 138-145.
- Popović, D. J., Lalošević, D., Miljković, D., Popović, K. J., Čapo, I., & Popović, J. K. (2018). Caffeine induces metformin anticancer effect on fibrosarcoma in hamsters. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22, 2461-2467.
- Qosa, H., Abuznait, A. H., Hill, R. A., & Kaddoumi, A. (2012). Enhanced Brain Amyloid- β Clearance by Rifampicin and Caffeine as a Possible Protective Mechanism Against Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 31(1), 151-165.
- Queiroz, E. A., Puukila, S., Eichler, R., Sampaio, S. C., Forsyth, H. L., Lees, S. J., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Fortes, Z. B., & Khaper, N. (2014). Metformin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Mediated by Oxidative Stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Plos One*, 9(5), e98207.
- Quispe-Mauricio, A., Callacondo, R. D., Rojas-Camayo, J., Zavala, C. D., Posso, R. M. C., & Vaisberg, W. A. J. (2009). Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. *Acta Médica Peruana*, 26(3), 156-161.
- Ramos, R. Y., & Hernández, C. C. (2009). Avances recientes en la determinación analítica del cisplatino y sus productos de hidrólisis. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 40(1), 3-10.
- Ramos-Peñafiel, C. O., Santoyo-Sánchez, A., Olarte-Carrillo, I., Queipo-García, G. E., Garfias-Becerra, Y., & Martínez-Tovar, A. (2015a). Estado del arte: metformina, cáncer y leucemia. *Revista de Hematología*, 16(2), 168-178.
- Ramos-Peñafiel, C. O., Santoyo-Sánchez, A., Olarte-Carrillo, I., Queipo-García, G. E., Garfias-Becerra, Y., & Martínez-Tovar, A. (2015). Metformina: un arma noble para tiempos más civilizados. *Medicina Interna de México*, 31(6), 719-732.
- Reily, R. C. R., Molina, S. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., Martins, M. C. F. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 73(1), 1-10.

- Reyes, C. D., González, O. J. C., Mohar, B. A., & Meneses, G. A. (2011). Epidemiología del dolor por cáncer. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 18(2), 118-134.
- Rodríguez, C. S. A., & Capurso, G. M. (2006). Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecología y Obstetricia de México*, 74(11), 585-593.
- Rodríguez, L. S. (2012). *Caracterización funcional de SKY1 y su papel en la Resistencia de las levaduras a cisplatino* (Tesis de doctorado). Universidad de La Coruña, España.
- Romero, F. M. S., Santillán, A. L., Olvera, H. P. C., Morales, S. M. A., & Ramírez, M. V. L. (2008). Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecología y Obstetricia de México*, 76(11), 667-672.
- Rosendahl, A. H., Perks, C. M., Zeng, L., Markkula, A., Simonsson, M., Rose, C., Ingvar, C., Holly, J. M. P., & Jernström, H. (2015). Caffeine and Caffeic Acid Inhibit Growth and Modify Estrogen Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor Levels in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(8), 1877-1887.
- Ruiz, G. M. J., Souviron, R. A., & Martínez, M. M. (2002). La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *Anales de Medicina Interna*, 19(9), 49-57.
- Saber, N., & Kandala, N. J. (2018). The inhibitory effect of fluphenazine decanoate and caffeine on *Staphylococcus aureus* efflux pumps. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 6(2), 1530-1535.
- Sadzuka, Y., Mochizuki, E., & Takino, Y. (1995). Mechanism of caffeine modulation of the antitumor activity of adriamycin. *Toxicology Letters*, 75(1-3), 39-49.
- Sahra, I. B., Laurent, K., Giuliano, S., Larbret, F., Ponzio, G., Gounon, P., Marchand-Brustel, Y. L., Giorgetti-Peraldi, S., Cormont, M., Bertolotto, C., Deckert, M., Auberger, P., Tanti, J. F., & Bost, F. (2010). Targeting Cancer Cell Metabolism: The Combination of Metformin and 2-Deoxyglucose Induces p53-Dependent Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 70(6), 2465-2475.
- Saito, Y., Gopalan, B., Mhashilkar, A. M., Roth, J. A., Chada, S., Zumstein, L., & Ramesh, R. (2003). Adenovirus-mediated *PTEN* treatment combined with caffeine produces a synergistic therapeutic effect in colorectal cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 10(11), 803-813.
- Sakurai, H., Mitsuhashi, N., Tamaki, Y., Akimoto, T., Murata, O., Kitamoto, Y., Maebayashi, K., Ishikawa, H., Hayakawa, K., & Niibe, H. (1999).

Interaction between low dose-rate irradiation, mild hyperthermia and low-dose caffeine in a human lung cancer cell line. *International Journal of Radiation Biology*, 75(6), 739-745.

- Salani, B., Del Rio, A., Marini, C., Sambuceti, G., Cordera, R., & Maggi, D. C. (2014). Metformin, cancer and glucose metabolism. *Endocrine Related Cancer*, 21(6), 461-471.
- Sánchez, P. J. R., & Verga, T. B. (2011). Cáncer de mama: ¿Es posible prevenirlo?. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 15(1), 14-28.
- Sánchez-Suárez, P., & Benítez-Bribiesca, L. (2006). Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología*, 1, 187-199.
- Shafiei-Irannejad, V., Samadi, N., Yousefi, B., Salehi, R., Velaei, K., & Zarghami, N. (2017). Metformin enhances doxorubicin sensitivity via inhibition of doxorubicin efflux in P-gp-overexpressing MCF-7 cells. *Chemical Biology & Drug Design*, 91(1), 269-276.
- Shan, E., Zhu, Z., He, S., Chu, D., Ge, D., Zhan, Y., Liu, W., Yang, J., & Xiong, J. (2017). Involvement of pregnane X receptor in the suppression of carboxylesterases by metformin in vivo and in vitro, mediated by the activation of AMPK and JNK signaling pathway. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, 14-23.
- Singletary, S. E. (2003). Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Annals of Surgery*, 237(4), 474-482.
- Sola, A. (2011). Radioterapia de intensidad modulada (IMRT). *Revista Médica Clínica Las Condes*, 22(6), 834-843.
- Song, N. N., Li, Q. S., & Liu, C. X. (2006). Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(25), 4064-4070.
- Štefankova, Z., Barančík, M., & Breier, A. (1996). Overcoming of P-glycoprotein mediated vincristine resistance of L1210/VCR mouse leukemic cells could be induced by pentoxifylline but not by theophylline and caffeine. *Neoplasma*, 43(1), 11-16.
- Stenzl, A., Cowan, N. C., Santis, M. D., Jakse, G., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Ribal, M. J., Sherif, A., & Witjes, J. A. (2010). Actualización de las Guías Clínicas de la Asociación Europea de Urología sobre el carcinoma vesical músculo-invasivo y metastásico. *Actas Urológicas Españolas*, 34(1), 51-62.
- Svirnovski, A. I., Serhiyenka, T. F., Kustanovich, A. M., Khlebko, P. V., Fedosenko, V. V., Taras, I. B., & Bakun, A. V. (2010). DNA-PK, ATM and

MDR proteins inhibitors in overcoming fludarabine resistance in CLL cells. *Experimental oncology*, 32(4), 258-262.

- Tej, G. N. V. C., & Nayak, P. K. (2018). Mechanistic considerations in chemotherapeutic activity of caffeine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 312-319.
- Tomita, K., & Tsuchiya, H. (1989). Caffeine Enhancement of the Effect of Anticancer Agents on Human Sarcoma Cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 80(1), 83-88.
- Torres-Arreola, L. D. P., & Vladislavovna, D. S. (2007). Cáncer de mama. Detección oportuna en el primer nivel de atención. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 45(2), 157-166.
- Tworoger, S. S., Gertig, D. M., Gates, M. A., Hecht, J. L., & Hankinson, S. E. (2008). Caffeine, alcohol, smoking, and the Risk of Incident Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer*, 112(5), 1169-1177.
- Uribe, O. A. (2009). Cáncer de mama. *Obstetricia y Ginecología*, 4(3), 223-232.
- Villeda, R. M. A. (2008). *Expresión del Gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1) en Mucosa de Pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI)* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Villegas, V. C. A., Frontela, N. M., & García, F. I. (2016). Nuevas evidencias del uso de la metformina en el tratamiento del cáncer. *Revista Cubana de Endocrinología*, 27(3), 80-90.
- Volm, M., Efferth, T., Grabner, P., & Pommerenke, E. W. (1995). Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase- π , catalase, C-fos and C-erbB1 in rodent cell-lines after exposure to Doxorubicin, ethanol and caffeine. *International Journal of Oncology*, 6(1), 87-92.
- Wang, Y., Zuo, Y., Deng, S., Zhu, F., Liu, Q., Wang, R., Li, T., Cai, H., Wan, X., Xie, Z., Xie, Z., & Li, D., (2019). Using Caffeine and Free Amino Acids to Enhance the Transepithelial Transport of Catechins in Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(19), 5477-5485.
- Wojtowicz, K., Szaflarski, W., Januchowski, R., Zawierucha, P., Nowicki, M., & Zabel, M. (2012). Inhibitors of N-glycosylation as a potential tool for analysis of the mechanism of action and cellular localisation of glycoprotein P. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 445-450.
- Wu, W., Yang, J. L., Wang, Y. L., Wang, H., Yao, M., Wang, L., Gu, J. J., Cai, Y., Shi, Y., & Yao, D. F. (2016). Reversal of multidrug resistance of

hepatocellular carcinoma cells by metformin through inhibiting *NF-κB* gene transcription. *World Journal of Hepatology*, 8(23), 985-993.

- Xue, C., Wang, C., Sun, Y., Meng, Q., Liu, Z., Huo, X., Sun, P., Sun, H., Ma, X., Peng, J., & Liu, K. (2017). Targeting P-glycoprotein function, p53 and energy metabolism: Combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of MCF-7/Dox cells to doxorubicin. *Oncotarget*, 8(5), 8622-8632.
- Zaharia, M., & Gómez, H. (2013). Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(4), 649-656.
- Zepeda-Castilla, E. J., Recinos-Money, E., Cuéllar-Hubbe, M., Robles-Vidal, C. D., & Maafs-Molina, E. (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cirugía y Cirujanos*, 76(1), 87-93.