



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Actividad Antitumoral de una terapia combinatoria
para el tratamiento de Cáncer Colorectal asociado a
Colitis.

TESIS

Que para obtener el título de:

Biólogo

Presenta:

Víctor Manuel Montesinos Fuentes

Director de Tesis: Dra. Gabriela Figueroa González

Tlalnepantla de Baz. Edo. De México, Octubre 2015





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.

Dedicatoria

A Josefina:

Por amarme incondicionalmente

sin esperar nada a cambio

y ser mi motivación en la vida.

Agradecimientos

A mi madre Josefina Fuentes Díaz por acompañarme en esta travesía, por estar a mi lado en todo momento y siempre creer en mí, por mostrarme el camino para ser una buena persona, y por ser madre y padre a la vez, eres mi mayor admiración.

A mi hermana Zaly Janette por apoyarme incondicionalmente, por respetarme mis decisiones, por sus consejos y por mostrarme el universo de cosas que hay afuera, aunque estas lejos sabes que te amo al igual que a mi Mayita hermosa.

A mi hermano José Manuel por mostrarme que la discapacidad de una persona no es sinónimo de ignorancia sino que la ignorancia es sinónimo de tener una gran discapacidad, eres mi mayor admiración, yo se que para ti no existen límites, gracias por ser el mejor hermano del mundo.

A Amanda por compartir su universo a mi lado durante estos 7 años, gracias por tu apoyo y amor, sin ti no hubiera logrado culminar esto, sabes perfectamente que eres el amor de mi vida, espero que pronto me des la oportunidad de dar el siguiente paso...

A mi padre por tener una peculiar forma de quererme.

A Rebe, Osvaldo, Luisa, Jossimar, Oliver a los nuevos integrantes del laboratorio y a los que se fueron, por darme la gran oportunidad de conocerlos, son personas fantásticas, gracias por las cosas que compartieron conmigo.

Al Dr. Carlos por darme esta gran oportunidad de formar parte de un grandioso equipo de trabajo, por permanecer todo este tiempo en el laboratorio y trabajar con excelentes personas.

A la Dra. Gaby por ser una gran tutora y maestra, por tener paciencia, y nunca desistir al enseñarme. Por confiar en mí y estar a mi lado en este gran proyecto de investigación, gracias por brindarme su apoyo y amistad.

A la Dra. Verónica por su gran apoyo, siempre tratando de ser lo más justa posible y esmerarse para forjar en nosotros valores que nos conviertan en excelentes estudiantes.

Al Dr. Urrutia por ser una persona increíble y por darnos el privilegio de escuchar conversaciones hipnotizadoras de una mente sin igual.

Y a la Dra. Nadia por su gran carisma, brindarme su amistad y apoyo durante toda mi estancia en el laboratorio.

ABREVIATURAS

AMPK – Proteína quinasa activada por adenosin monofosfato

APC – Adenomatous poliposis coli

ATP – Trifosfato de Adenosina

AOM – Azoximetano

CCR – Cáncer colorrectal

COX-2 – Ciclooxygenasa 2

CU – Colitis ulcerativa

DM-II – Diabetes mellitus tipo II

DSS – Dextran Sulfato de Sodio

EC – Enfermedad de Crohn

EII – Enfermedad Inflamatoria Intestinal

ENT – Enfermedades no transmisibles

FAP – Poliposis adenomatosa familiar

FDA – Administración de Medicamentos y Alimentos

HBOC – Cáncer hereditario de seno y de ovario

HNPCC – Cáncer colorrectal hereditario sin poliposis

IL – Interleucina

i.p – intra-peritoneal

H&E – Hematoxilina y Eosina

HIF 1 α – Factor Inductor de Hipoxia – 1 alpha

HK II – Hexoquinasa II

INEGI – Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática

K-Ras – Sarcoma de rata Kirsten homologo de oncogén viral

LDH – Lactato deshidrogenasa

MAM – Metilazoximetanol

MDR1 – Resistencia a Múltiples Fármacos 1

MLH1 – Homologo MutL 1

MSH2 – Proteina homologa MutS 2

mTOR – Blanco de Rapamicina de Mamíferos

NF-kB – Factor Nuclear-kappa Beta

OCT1 – Transportador de Cationes Orgánicos 1

OGG1 – 8-Oxoguanina glicosilasa

OMS – Organización Mundial de la Salud

Rheb – Ras homólogo enriquecido en cerebro

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno

SSI – Solución Salina Isotónica

TCA – Ácido Tricarboxílico

TGFβ1 – Factor de Crecimiento Transformante beta 1

TNF-α – Factor de Necrosis Tumoral - alpha

TNM – Tumor, Nódulos linfáticos y metástasis

TSC2 – Complejo de Esclerosis Tuberosa 2

UICC – Unión Internacional Contra el Cáncer

VPH – Virus del papiloma humano

4E-BP – Proteína de unión 4E

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Cáncer.....	2
2.1.1 Incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal en México.	6
2.1.2 Inflamación en el desarrollo de Cáncer Colorrectal.....	8
2.1.3 Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su papel en el CCR.....	10
2.1.4 Vía de señalización: mTOR	13
2.1.5 Efecto Warburg o Glucólisis Aeróbia.....	15
2.1.6 Modelo de estudio.....	18
2.1.7 Diagnóstico y Tratamiento de Cáncer Colorrectal.....	19
2.2 Fármacos	21
2.2.1 Metformina	21
2.2.2 Oxamato de Sodio	23
2.2.3 Doxorubicina	26
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	30
5.1 General:	30

5.2 Particulares:	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Material biológico	31
6.2 Modelo de carcinogénesis.....	31
6.3 Tratamiento farmacológico	32
6.4 Análisis macroscópico	33
6.5 Análisis histológico	34
7. Resultados	35
7.1 Desarrollo del modelo murino.....	35
7.2 Análisis macroscópico del establecimiento de la enfermedad	37
7.3 Efectividad de los fármacos.....	39
7.4 Análisis histopatológico de los ciclos a DSS	42
7.5 Análisis histopatológico de los grupos farmacológicos.....	44
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIÓN	53
10. BIBLIOGRAFÍA	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. “Características distintivas del cáncer”.....	5
Figura 2. Principales tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres en México. ..	6
Figura 3. Tasa de incidencia y mortalidad de cáncer en México.	7
Figura 4. Proceso carcinogénico intestinal.....	12
Figura 5. Vía de señalización mTOR.....	15
Figura 6. Estructura química de la metformina.....	21
Figura 7. Mecanismo de acción de la metformina.....	23
Figura 8. Estructura molecular del Oxamato de Sodio y Piruvato.	24
Figura 9. Mecanismo de acción del Oxamato de Sodio.	26
Figura 10. Estructura química de la Doxorubicina.....	27
Figura 11. Mecanismo de acción de la Doxorubicina.....	28
Figura 12. Modelo de carcinogénesis colorrectal y tratamiento farmacológico.	32
Figura 13. Peso corporal de los ratones.....	36
Figura 14. Estimación de Supervivencia por Kaplan-Meier.....	37
Figura 15. Análisis macroscópico del intestino de los ratones en las diferentes exposiciones a los ciclos de DSS.....	39
Figura 16. Número de tumores en los grupos experimentales.....	40
Figura 17. Análisis macroscópico del intestino grueso de los ratones.	41
Figura 18. Análisis histológico de los ciclos a DSS.	43

Figura 19. Análisis histológico de los grupos experimentales. 45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento farmacológico. 33

1. RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) se encuentra entre los primeros 5 lugares de cáncer a nivel mundial con una alta tasa de mortalidad (8,1/100.000 habitantes). Esto se debe a malos hábitos alimenticios, alcoholismo, tabaquismo, sedentarismo, diagnósticos tardíos, entre otros. Se ha postulado que el riesgo a desarrollar CCR, además, está asociado directamente con procesos inflamatorios crónicos como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), y que tanto el grado de inflamación como la duración de la enfermedad, incrementan considerablemente este riesgo. Las células tumorales se pueden estudiar y tratar desde el punto de vista de las alteraciones metabólicas presentes, particularmente la reprogramación del metabolismo energético, la cual influye en el mantenimiento continuo del crecimiento y proliferación celular. Se ha identificado la alteración de vías de señalización tal como la vía mTOR importante en la proliferación, metabolismo, crecimiento, supervivencia celular, síntesis de proteínas, biogénesis de lípidos, inhibición de la autofagia así como organización del citoesqueleto.

Actualmente las terapias que se utilizan en pacientes con cáncer, consisten en cirugía, quimioterapia y radioterapia. Los agentes utilizados en la quimioterapia provocan efectos adversos tales como la resistencia y citotoxicidad. Es por ello, que actualmente un gran número de estudios se concentra en la búsqueda de nuevas opciones de tratamientos dirigidos a los blancos que promueven el desarrollo del cáncer. Tal es el uso de las terapias combinatorias con capacidad de bloquear de manera simultánea diversas rutas de las vías de señalización que conllevan a la inducción de la muerte celular ya sea a través de la apoptosis o la autofagia.

Ejemplo de lo anterior es la inhibición de las vías de generación de energía de la célula tumoral, en donde se ve involucrada una enzima, que actualmente se ha destacado por jugar un papel importante como marcador pronóstico de cáncer; la LDH-A (Lactato Deshidrogenasa A). Por otro lado, diversos estudios postulan que la des-regulación de la vía mTOR (Blanco de Rapamicina de Mamíferos) también juega un papel importante en el establecimiento de diversos tipos de cáncer. Con base en lo anterior, el objetivo de éste trabajo fue la administración *in vivo* de una terapia combinatoria que incida sobre las vías de generación de energía de la célula tumoral: Metformina y Oxamato de Sodio en combinación con Doxorubicina; un intercalante de ácidos nucleicos. Recientemente en nuestro grupo de trabajo, estudios *in vitro* e *in vivo* en un modelo de cáncer de mama triple negativo (CaMaTN) demostraron que el uso de esta terapia farmacológica induce la muerte celular por autofagia además de reducir los efectos adversos (citotoxicidad) a diferencia de las terapias convencionales.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades con una alta tasa de mortalidad que más afecta a la población en el mundo, después de las enfermedades cardiovasculares (Jemal et al., 2011). Cada año se diagnostican en promedio más de 14 millones de casos nuevos de cáncer en todo el mundo y se prevé que para los próximos años el número de casos aumente a más de 32 millones (Ferlay et al, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) estimó que en el 2012 causó 8.2 millones de muertes de las cuales, más de la mitad ocurrieron en los países menos desarrollados. Se estima que para las

próximas décadas el cáncer será causante de más de 13 millones de defunciones principalmente por cáncer de pulmón, mama, estómago, colon e hígado (Coleman, 2014).

El cáncer se define como una enfermedad en la que se involucran diversos cambios en el genoma de la célula, ocasionados por factores genéticos y epigenéticos, ambientales, infecciosos, entre otros; que implican mutaciones en diversos genes provocando una ganancia en la función dominante de un par alélico (oncogenes) y una pérdida en la función recesiva (genes supresores de tumores) (Hanahan & Weinberg, 2000). El reordenamiento del genoma produce una reprogramación en los procesos de regulación celular, generando un aumento descontrolado sobre la tasa de proliferación, invasividad, angiogénesis, etc. (Hanahan, 2014). En el 2000, Hanahan y Weinberg describen 6 *Hallmarks* o características distintivas que adquiere la célula “normal” para transformarse en célula tumoral: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, angiogénesis, invasión y metástasis. Asimismo, en 2011 los mismos autores sugieren 4 características adicionales: evasión del sistema inmune, inflamación como promotor tumoral, reprogramación del metabolismo energético e inestabilidad y mutación del genoma (figura 1). Demostrando así que las contribuciones generadas por el microambiente tumoral son también importantes para el estudio de la tumorigénesis. Aunque el conocimiento de terapias para el tratamiento del cáncer va en progreso, es necesaria una mejor comprensión de la biología del cáncer para la prevención de la enfermedad así como la mejora de los tratamientos ya existentes (X. Li et al., 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que el conjunto de factores que generan el cáncer a diferencia de otras enfermedades no transmisibles (ENT), es mucho más heterogéneo; (Lim et, al; 2012), los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer probablemente sean: heredables, por ejemplo el síndrome de cáncer hereditario de seno y de ovario (HBOC, por sus siglas en inglés) y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC, por sus siglas en inglés) y no heredables como el sedentarismo, consumo de alcohol, tabaco, contaminación ambiental, agentes infecciosos ocasionados por la bacteria *Helicobacter pylori*, hepatitis B y C, el virus del papiloma humano (VPH), etc. (Vineis & Wild, 2014).



Figura 1. “Características distintivas del cáncer”. Características distintivas del cáncer adquiridas durante el proceso de desarrollo de una célula tumoral. Tomado y modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

2.1.1 Incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal en México.

En México, el cáncer es considerado una de las principales enfermedades que ocasionan un importante problema de salud pública. Se estiman más 148,000 casos nuevos de cáncer anualmente, durante el 2009 la tasa de mortalidad en el país fue de 65 por cada 100,000 habitantes (INEGI, 2013). El cáncer en nuestro país ha causado más de 78, 000 muertes en hombres y mujeres de entre 35 a 65 años de edad, siendo los principales tipos: cáncer de mama, útero, estómago, pulmón, colon e hígado en mujeres; mientras que en la población masculina: próstata, pulmón, estómago, colon e hígado (figura 2) (Sampieri & Mora, 2014).

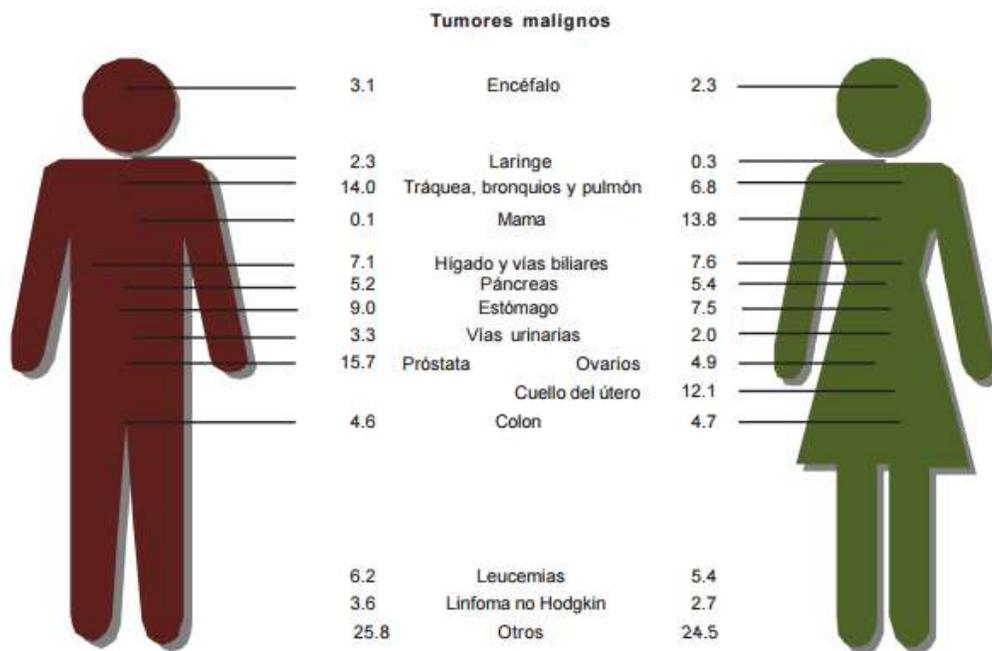


Figura 2. Principales tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres en México. La imagen muestra los diferentes tipos de cáncer que afectan a la población de entre 35 a 59 años de edad en hombres y mujeres. Tomado de INEGI, 2009

El cáncer colorrectal (CCR) se encuentra en la tercera y la segunda causa de muerte a nivel mundial en hombres y mujeres respectivamente. La incidencia es de 1.3 millones de casos nuevos de los cuales la mitad de ellos (0.6 millones) serán decesos. En México, el CCR se encuentra en el cuarto lugar respecto a los diferentes tipos de cáncer con una tasa de incidencia de 8,600 nuevos casos, y una mortalidad de 4,600 personas cada año, lo que indica que más de la mitad de la población afectada serán decesos, por ello, en nuestro país es considerado un importante problema de salud pública (Figura 3) (Ferlay et al, 2013).

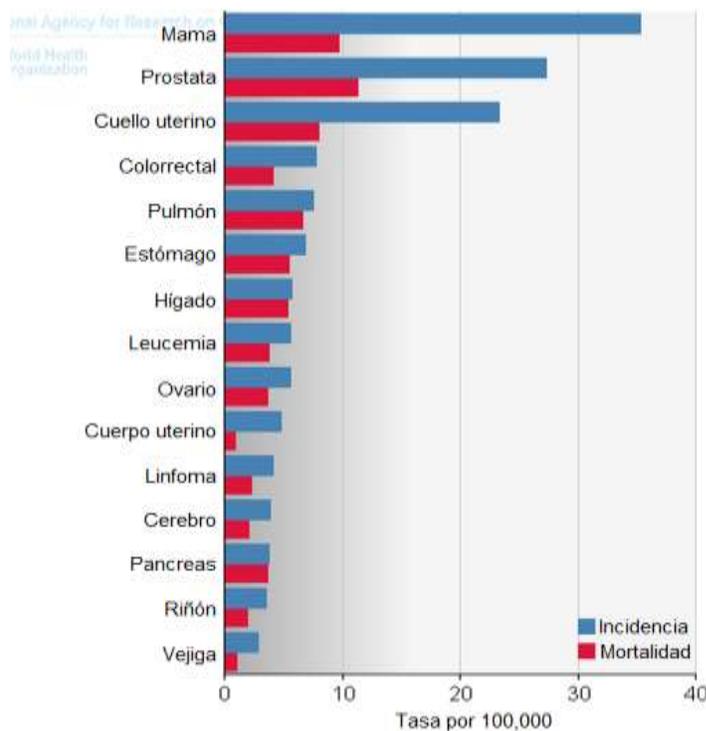


Figura 3. Tasa de incidencia y mortalidad de cáncer en México. La gráfica muestra en orden ascendente la incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres en nuestro país. El CCR se encuentra en la cuarta posición de incidencia y la séptima en mortalidad. Tomado de Ferlay 2013.

2.1.2 Inflamación en el desarrollo de Cáncer Colorrectal

El CCR se encuentra asociado a factores de riesgo como la edad, el género, mala alimentación, sedentarismo, inflamación etc. Otros factores incluyen formas hereditarias de cáncer como la poliposis familiar adenomatosa (en inglés, FAP) y cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (en inglés, HNPCC), estas formas hereditarias son causadas por mutaciones en genes como APC (en inglés, Adenomatous poliposis coli) y *MLH1* (en inglés, MutL homolog 1) o *MSH2* (en inglés, MutS protein homolog 2). En las no hereditarias destacan la enfermedad de Crohn (EC) o la colitis ulcerativa (CU), donde procesos inflamatorios en el intestino conllevan a la generación de CCR (Brenner, Kloor, & Pox, 2014). Tanto la forma heredada como la no heredada ocasionan la formación de tumores malignos dentro del intestino, sin embargo la forma de desarrollar una nueva neoplasia es distinta en cada caso, ya que involucra distintos mecanismo moleculares (Foersch & Neurath, 2014).

El CCR heredable, por ejemplo el FAP representa el 1% del total de casos de CCR, es una enfermedad autosómica dominante heredada, conlleva mutaciones iniciadoras a la formación tumoral en el gen APC, se distingue además, por la aparición de pólipos los cuales deben de ser eliminados inmediatamente debido a la inevitable progresión de adenoma a carcinoma (Campos, 2014). Diversos estudios han demostrado que la inflamación crónica juega un papel importante para el desarrollo de algún tipo de cáncer sobre todo CCR, esto depende principalmente de la extensión y duración de la enfermedad (Colotta et al., 2009). La EC y CU son ejemplos de EII que a su vez tienden a generar CCR (Popivanova et al., 2008), este tipo de desarrollo representando el 1% del total de casos de CCR; la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y

algunos radicales libres generados por el proceso inflamatorio, pueden causar mutaciones así como la hipermetilación del DNA y la sobreexpresión de genes como OGG1 (en inglés, 8-Oxoguanine glycosylase) y TGF β 1 (en inglés, Transforming growth factor beta 1) (Yashiro, 2014). Durante el desarrollo, además, hay una activación del factor nuclear–kappa β (NF- $\kappa\beta$), que genera la sobreexpresión de moléculas de adhesión y citocinas pro-inflamatorias como las Interleucinas 6, 17, 23 y mutaciones en TNF- α (en inglés, Tumor Necrosis Factor) promueven el crecimiento y la proliferación tumoral (Terzic, Grivennikov, Karin, & Karin, 2010).

En 1990 Fearon y Vogelstein describen el desarrollo del carcinoma colorrectal como un proceso secuencial ordenado de múltiples pasos (“*multi-step carcinogénesis*”) (Figura 4), con el inicio de una mutación en el gen APC, desarrollando en el epitelio intestinal la formación de pequeños pólipos que a su vez originarán adenomas y finalmente carcinoma. Favoreciendo la expresión de oncogenes como K-Ras (en inglés, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) y disminuyendo la de genes supresores de tumores como p53. Sin embargo, estas alteraciones genéticas no ocurren de la misma manera en la población afectada con EII (Terzic et al., 2010).

Por otra parte, también se ha observado que tanto mutaciones en el gen APC como en β -catenina permiten la activación aberrante de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, favoreciendo la transición de células preneoplásicas a focos de criptas aberrantes, posteriormente en adenoma y finalmente a carcinoma. Cabe resaltar que la sobreexpresión temprana de β -catenina no se debe a la inactivación de APC, ya que la inactivación de este gen es el último evento molecular (en este modelo). Por otra parte,

se ha sugerido que proteínas asociadas a procesos inflamatorios como COX-2 y PGE2 promueven y potencializan la función de β -catenina (Zhang et al., 2012).

En su conjunto, trabajos recientes han logrado identificar algunos genes relacionados directamente con los mecanismos moleculares que originan el CCR; entre ellos destacan PTEN, GSK3-B, APC, RB1, COX-2 (ciclooxigenasa-2) y citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias como IL-1, IFN γ y TNF- α . Además de la mutación o sobre-activación de vías de señalización tal como mTOR (en inglés, mammalian target of rapamycin), vía importante en la proliferación, metabolismo, crecimiento, supervivencia celular, síntesis de proteínas, entre otros procesos. (Pópulo et al., 2012).

2.1.3 Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su papel en el CCR

Hanahan y Weinberg, mencionaron en el 2011 que el proceso inflamatorio puede contribuir a la progresión de la neoplasia (Figura 4), debido a que la inflamación promueve la activación constante de moléculas, como: factores de crecimiento que mantienen señales constantes de proliferación, factores de supervivencia que limitan la muerte celular y enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan los procesos de angiogénesis, invasión y metástasis (Mattar et al., 2011); Además de la sobreexpresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- γ y TNF- α , que de igual manera estimulan la glucólisis, proliferación, reclutamiento de células del sistema inmune, favoreciendo así, el desarrollo del cáncer (Straus, 2013).

Por otra parte, las citocinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-4, IL-13 e INF- α ; comúnmente disminuida su expresión en CCR, regulan e inhiben la producción de

citocinas pro-inflamatorias, tal es el caso de la IL-10, citocina anti-inflamatoria clave producida en los monocitos, células T y células B. Esta interleucina puede bloquear la actividad de NF- κ B así como regular la vía de señalización JAK/STAT, además de inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 (Antoniou et al., 2015).

Por otro lado las citocinas pro-inflamatorias son de suma importancia, ya que se ha encontrado mediadores clave que promueven la inflamación tal es el caso de TNF- α , el cual es considerado uno de los primeros eventos que ocurren en la tumorigénesis ya que funge como regulador de una cascada de señalización de citocinas, quimiocinas, ERO's y otras moléculas que promueven el desarrollo de inflamación crónica y considerando a TNF- α como un promotor tumoral, a diferencia de una inflamación normal donde estas cascadas de señalización se limitan por la producción de citocinas anti-inflamatorias (Coussens and Werb, 2002).

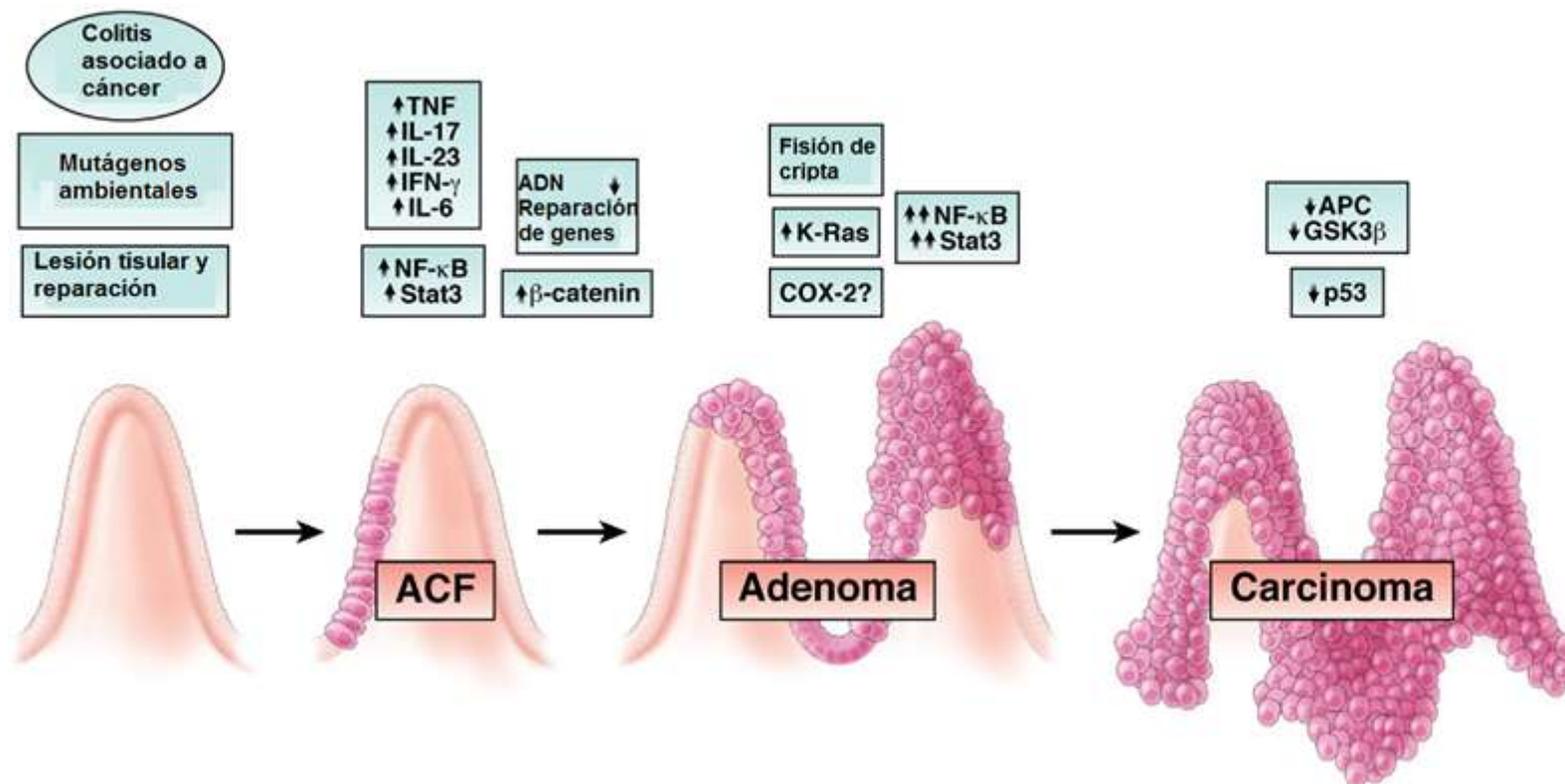


Figura 4. Proceso carcinogénico intestinal. La imagen muestra los eventos moleculares asociados al desarrollo de CCR por inflamación crónica. Se observa el aumento de citocinas pro-inflamatorias al igual de genes que promueven progresión de la enfermedad. Tomada y modificada de Terzic, 2010.

2.1.4 Vía de señalización: mTOR

TOR (en inglés, target of rapamycin) fue descubierto en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante mutantes que mostraban resistencia al crecimiento a la Rapamicina; su estructura y funcionalidad conservada en mamíferos fue después descubierta basándose en sus propiedades inhibitoras a la Rapamicina (mTOR) (Moschetta et al., 2014). mTOR es una serina/treonina de 289 kDa, esta cinasa está formada por dos complejos multi-protéicos funcionalmente distintos denominados mTOR Complejo 1 (mTORC1) que se compone de 5 subunidades: mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 y DEPTOR; y mTOR Complejo 2 (mTORC2) con 6 subunidades: mTOR, Rictor, mSIN1, Protor-1, mLST8 y DEPTOR (Laplante & Sabatini, 2009). Ambos complejos tienen funciones catabólicas y anabólicas regulando procesos celulares intra y extracelulares claves en el metabolismo, proliferación, crecimiento, supervivencia celular, síntesis de proteínas, biogénesis de lípidos, e inhibición de la autofagia por el complejo mTORC1 y organización del citoesqueleto por el complejo mTORC2 (Ricoult & Manning, 2013).

La desregulación de estos complejos por mutaciones o su sobre-activación se ha visto en distintos padecimientos como en la diabetes tipo II, obesidad, neurodegeneración y por supuesto en cáncer (Laplante & Sabatini, 2013). El complejo mTORC1 controla la expresión de diversos genes, involucrados en el crecimiento y proliferación de la célula caracterizado por la fosforilación de S6K y el factor de iniciación eucariótico a la proteína de unión 4E-BP, promoviendo la traducción de proteínas y disminución de la autofagia durante la activación de la vía (Xu et., al 2012). Simultáneamente se ha demostrado que las vías PI3K/AKT y AMPK están involucradas en la transducción de

estímulos que promueven la supervivencia celular y la proliferación por la activación río abajo del complejo mTORC1, todo esto regulado por una amplia variedad de señales celulares como de factores de crecimiento, cinasas de tirosina, aminoácidos, glucosa, niveles de energía celular y condiciones de estrés tales como hipoxia (Li, Zeng, & Shen, 2014). Dichos mecanismos tienen un rol importante en la proliferación de la célula tumoral así como en la angiogénesis por la ganancia y pérdida de función de efectores en esta vía de señalización, produciendo la generación de una nueva neoplasia (Figura 5) (H. Li et al., 2014).

Diversos estudios moleculares sustentan que la des-regulación de la glucólisis a través de la sobre-expresión de la LDH-A, también conocido como “efecto Warburg” o glucólisis aerobia así como la activación del complejo mTORC1 son características claves en CCR y otros tipos de cáncer. (Fang et al; 2011).

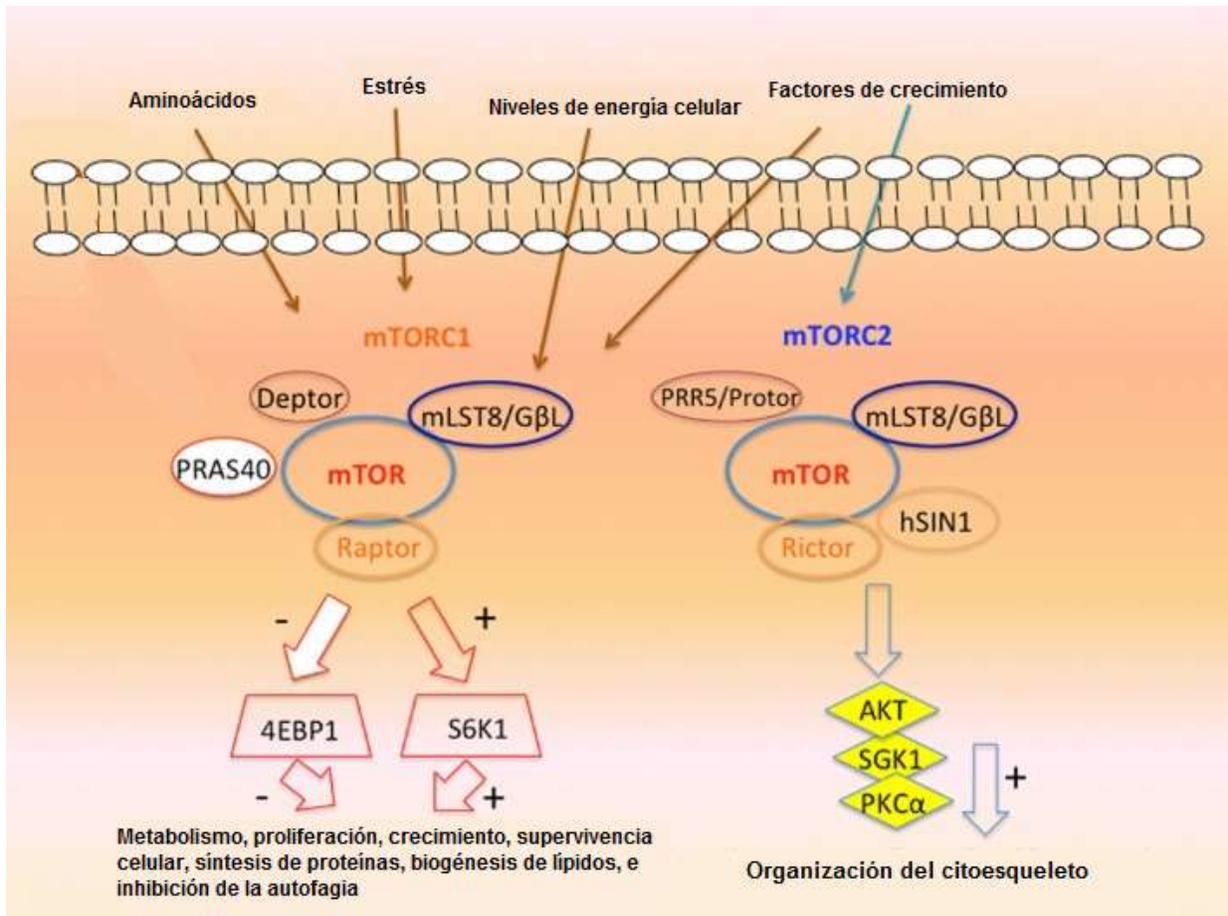


Figura 5. Vía de señalización mTOR. La activación del complejo mTORC1 desencadena una cascada de señalización río abajo que promueve funciones importantes para la biosíntesis de macromoléculas importantes para la supervivencia y proliferación de la célula tumoral. Tomado de Moschetta et al., 2014.

2.1.5 Efecto Warburg o Glucólisis Aerobia

El cáncer se ha considerado en general como una enfermedad genética, en la que se acumulan diversas mutaciones durante varios años y se heredan progresivamente en cada ciclo celular a las subsecuentes poblaciones de células hijas hasta que se presente un factor que desencadene este mecanismo. Sin embargo, el conocimiento de

la biología celular y molecular de las células tumorales ha cambiado significativamente desde hace algunas décadas (Tubiana, 2008). Por ejemplo, se ha entendido que la célula tumoral puede ser vista desde la perspectiva de las alteraciones metabólicas presentes, observación hecha por Otto Warburg en 1923, postulando que en tumores sólidos existe una actividad glucolítica mayor que en las células normales, con el fin de mantener una fuente constante de energía, conservando así una alta tasa proliferativa (Vander et al; 2009). Esta alta tasa proliferativa de la célula tumoral exige incrementar tanto la masa celular como duplicar su DNA (Hanahan y Weinberg, 2011). En ambos procesos se requiere sintetizar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, así como energía en forma de adenosin-trifosfato (ATP). De esta manera, la alta demanda energética y metabólica es cubierta en parte por un incremento en la absorción tanto de glucosa como de aminoácidos, principalmente glutamina (Svensson y Shaw, 2012).

El metabolismo de la célula tumoral depende de la glucólisis aerobia o efecto Warburg en distintas vías biosintéticas; por ejemplo, la glucólisis genera intermediarios necesarios para la síntesis de ribosa-5-fosfato y glicina, empleados en la biosíntesis de nucleótidos; además de glicerol, fundamental en el proceso biosintético de lípidos (Brown et al; 2013).

Otto Warburg explica que en la glicólisis aerobia el piruvato no es oxidado a CO_2 y H_2O obteniendo como resultado final la producción de ATP, en donde la mayor parte de la glucosa es degradada hasta lactato. Esto se debe a que la célula maligna necesita de una producción de intermediarios elevada para poder mantener su ciclo proliferativo estable y necesario para su reproducción (Matthew y Heiden, 2011). La glucolisis aerobia o efecto Warburg es considerada una característica importante en tumores y

líneas celulares, ya que se ha documentado la sobre- expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, algunos de ellos por ejemplo: glicoproteínas integrales de membrana involucradas en el transporte de glucosa (GLUTs), (Noguchi et al, 2008; Chen et al, 2008), además de otras enzimas que intervienen en el proceso de la glucólisis como la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), la glucosa-fosfato isomerasa, la aldolasa A, entre otras. Dentro de estas enzimas, se encuentra una cuyo papel es fundamental para el efecto Warburg, es la lactato deshidrogenasa (LDH-A), la cual es una isoforma de la LDH enzima tetramérica con dos subunidades (A o B). La LDH-A se clasifica en cinco isoformas (A4, A3B1, A2B2, A1B3 y B4) estas catalizan la misma reacción pero se diferencian en su eficiencia al momento de transformar el piruvato a lactato y viceversa (Altenberg y Greulich, 2004). Sin embargo la LDHA también conocida como M-LDH o LDHA4, conserva una afinidad mucho mayor que las demás enzimas por piruvato el cual será convertido a lactato en la vía anaeróbica, una vez que el lactato está en el citosol, éste es liberado al espacio extracelular alcanzando los niveles de 10-20 mM (Schmid et al; 2007). La importancia del lactato es de suma relevancia ya que su presencia ha sido relacionado con en distintos tipos de cáncer en su desarrollo. Trabajos recientes han demostrado que en la motilidad e invasión hacia otros tejidos (metástasis) por la sobreactivación de metaloproteasas, está ligado a una producción de lactato elevada (Lee et al; 2010); además la capacidad de inhibir la activación, diferenciación y expresión de antígenos de células dendríticas es demostrable con la sobreexpresión de la LDH-A (Gottfried et al; 2006) ésta sobre activación ha funcionado como un marcador pronóstico de metástasis en diferentes tipos de tumores (Brizel et al, 2001).

2.1.6 Modelo de estudio

El CCR es un problema de salud pública en nuestro país, debido a ello, es necesaria la búsqueda de modelos de estudios que asemejen las condiciones humanas en las que la enfermedad se desarrolla y así poder conocer los mecanismos por los que el padecimiento se genera, además del desarrollo de nuevas opciones terapéuticas que ayuden a prevenir y/o a tratar la enfermedad (Ijichi, 2011).

Robertis y colaboradores en 2011, mencionan que existen 3 principales categorías de modelos murinos asociados a CCR; los genéticos (con mutaciones en genes como APC, Smad3, Msh2, PTEN, etc), los xenotrasplantes (tumores que se generan a partir de una inyección subcutánea o intravenosa de células tumorales) y los químicamente inducidos, en el que sobresale el método de AOM (Azoximetano)/DSS (Dextran Sulfato de sodio), este último implementado por Tanaka y colaboradores en 2003. El AOM es un agente mutagénico que puede iniciar el proceso cancerígeno por alquilación al DNA facilitando los errores en el apareamiento de las bases; este agente es transformado en metilazoximetanol (MAM) por una hidroxilación, transfiriendo grupos metilo en la posición O6-metil-desoxiguanosina de la guanina, primera lesión pro-mutagénica ocasionada. (De Robertis et al., 2011) Por otro lado el DSS es un detergente que ocasiona una respuesta inflamatoria en el epitelio del colon; genera la infiltración de macrófagos además de formar vesículas en el citoplasma que dañan la membrana y barrera intestinal activando posteriormente vías de señalización pro-inflamatorias (Neufert et al., 2007). A partir de este tipo de modelos es posible ampliar el estudio de las terapias farmacológicas para el tratamiento de CCR asociado a inflamación crónica y así continuar con el estudio de la búsqueda de diferentes blancos en la célula tumoral

que promuevan la inhibición de la supervivencia de las células tumorales Tanaka et al., 2003).

2.1.7 Diagnóstico y Tratamiento de Cáncer Colorrectal

La detección oportuna del CCR junto con una terapia adecuada puede prevenir hasta en un 90% la mortalidad total de las personas con esta enfermedad. Existen signos clínicos previos al desarrollo de CCR que pueden ser detectados, como son: heces con sangre, dolor abdominal y rectal, cambios en la morfología de las heces, pérdida de peso, etc (Chan & Giovannucci, 2010). Además de estos signos, existen pruebas para la detección más precisa de CCR, como la colonoscopia, sigmoidoscopia, tomografía, biopsia, etc., otorgando un mejor diagnóstico (Buturovic, 2014). Sin embargo, el contar con herramientas para su detección temprana no significa tener un diagnóstico oportuno principalmente a la falta de una cultura preventiva, es por ello que la mayoría de los casos de CCR se detecta en etapas avanzadas, cuando los tumores invaden otras áreas adyacentes o inclusive han viajado hacia otros órganos, éste último proceso conocido como metástasis (Binefa et al., 2014).

Existen diferentes formas de tratamiento contra el CCR, con mayor frecuencia se utiliza cirugía, seguido de quimioterapia y radioterapia, incluso combinación de varios tratamientos para la eliminación total de las células cancerosas, sin embargo es muy importante conocer el estadio y la clase de tumor para poder tratarlo. Además es necesario tomar en cuenta que los tratamientos deben de ser personalizados para tener una mayor eficacia (Laszlo, 2010). Una de las principales causas de falla de tratamiento

es el desarrollo de resistencia a los fármacos en las células cancerosas; lo que culmina en un mal pronóstico para quien padece ésta enfermedad; aunado a lo anterior, la citotoxicidad es otro factor que limita la eficacia de las terapias, trayendo como consecuencia en algunos casos: hepatotoxicidad, cardiotoxicidad entre otros procesos (Meng et al., 2014).

La búsqueda de terapias para tratar pacientes con CCR se sigue innovando, sobre todo la quimioterapia en donde se han realizado estudios sobre terapias combinatorias; por ejemplo: FOLFOX (leucovorín, 5-FU, y oxaliplatino); FOLFIRI (leucovorín, 5-FU, e irinotecán); CapeOX (capecitabina y oxaliplatino). De estas combinaciones, en pacientes con CCR en estadio III se ha observado una respuesta sinérgica, por tiempos cortos pero sin éxito en la inhibición del crecimiento tumoral, por el estadio de la neoplasia (Kim, Spratlin, Armstrong, Ghosh, & Mulder, 2014). Recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado en modelos murinos la eficacia de terapias antitumorales que tienen como blanco el metabolismo de la célula tumoral, bloqueando vías de generación de energía importantes para la supervivencia y proliferación celular, induciendo procesos de muerte celular de suma importancia tales como: apoptosis y autofagia.

2.2 Fármacos

2.2.1 Metformina

La metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida) es una biguanida, hipoglucemiante oral empleado desde los años 50's como tratamiento para la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), su principal objetivo es la disminución hepática de glucosa, teniendo efecto sobre la captación de la misma, además de sensibilizar la producción de insulina sin afectar la producción de las células β -pancreáticas (Figura 6) (Bosi, 2009).

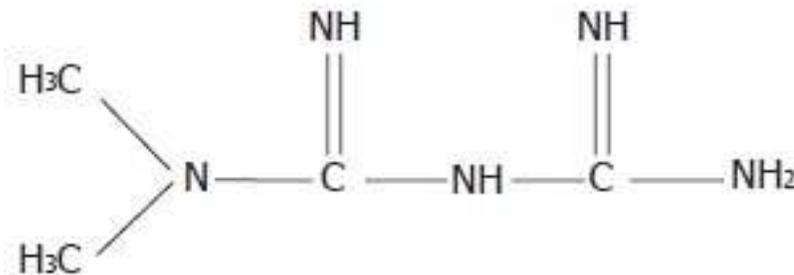


Figura 6. Estructura química de la metformina.

La metformina es una molécula hidrofílica que se transporta activamente a través de transportadores de cationes orgánicos (OCT) en el intestino, el hígado y el riñón, debido a su limitada solubilidad en lípidos, tiene una distribución pasiva a través de las membranas celulares. Su efecto a través de AMP, determina uniones a un sitio inhibidor de fosfato sobre la adenilato ciclasa, la enzima responsable de la producción de AMPc, (Todd & Florez, 2014). Se han propuesto varios mecanismos que tratan de

explicar su actividad anti-neoplásica ya sea por la reducción la fosforilación oxidativa, inhibición de la gluconeogénesis hepática y reducción de funciones biosintéticas como la síntesis de proteínas y de lípidos (Pollak, 2012). Diversos estudios han confirmado que la metformina activa la vía AMPK a través de un mecanismo dependiente de LKB1.

La proteína quinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK) es una serina/treonina, donde han confirmado el papel crucial que tiene como regulador energético y como protector de las funciones celulares en condiciones bajas de energía celular, inhibiendo la gluconeogénesis (Um et al., 2007). Además reduce la síntesis de ATP inhibiendo el complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria (Figura 7). En cáncer esta actividad antineoplásica puede ser explicada por la activación de AMPK mediante la inhibición de mTORC1, esto media e inhibe la síntesis de proteínas, además de la proliferación celular, desencadenando una fosforilación en TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), lo que lleva a la acumulación de Rheb (Ras homolog enriched in brain), importante regulador y activador de raptor, interrumpe su asociación con mTOR y finalmente lograr la inactivación de mTORC1 (Viollet et al., 2012).

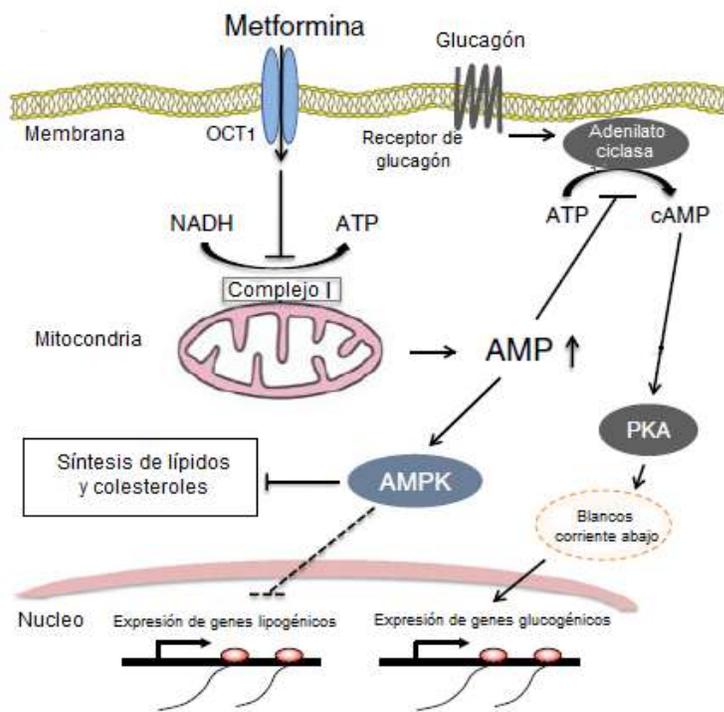
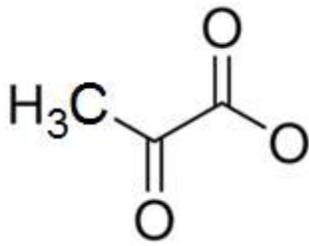


Figura 7. Mecanismo de acción de la metformina. Inhibición del complejo 1 mitocondrial por la reducción de ATP, reducción de síntesis de proteínas y lípidos por activación de AMPK. Tomado de (Rena, Pearson, & Sakamoto, 2013).

2.2.2 Oxamato de Sodio

Es conocido como un potente inhibidor de la LDH, enzima que regula el flujo glucolítico en la conversión de piruvato a lactato; específicamente, es un inhibidor competitivo de la LDH-A por tener una alta homología con el piruvato (Figura 8) (Simpson, 2012). Sin embargo, inicialmente el oxamato de sodio se empleaba en humanos como agente antiparasitario, pero se discontinuó su uso con el advenimiento de fármacos más eficaces (Fiume, 1959).

Piruvato



Oxamato de Sodio

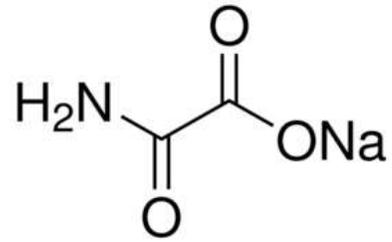


Figura 8. Estructura molecular del Oxamato de Sodio y Piruvato. Homología del Oxamato de Sodio con el piruvato lo que permite su competitividad con la LDH-A impidiendo la producción de lactato.

La LDH-A es una enzima reversible que convierte el piruvato (producto final de la glucólisis) en lactato mediante la oxidación de NADH a su forma reducida NAD^+ (Draoui y Feron, 2011). La actividad y sobreexpresión de la LDH-A es característica de diversos desordenes tales como cáncer, falla cardíaca, daño en hígado, neumonía y otros (Ward et al; 2012). La célula tumoral para satisfacer su demanda energética, depende en gran parte de la glucólisis aerobia, proceso que puede ser inhibido mediante el bloqueo de la LDH (Lee et al; 2010). La LDH constituye el principal punto de control metabólico “switch metabólico” de generación de energía de la glucólisis aerobia a glucólisis anaerobia, catalizada por la reducción de piruvato a lactato. La sobreexpresión de la LDH-A es mediada por la sobre regulación del HIF-1 α , regulador central de la respuesta metabólica a hipoxia asociado a proliferación celular. La sobre expresión de HIF-1 α conlleva a la inducción de oncogenes tales como Ras, Scr y HER-2/Neu, esto en conjunto conduce a la sobre expresión de las enzimas que participan en la glicólisis

incluyendo a la LDHA y a los transportadores GLUT-1 y GLUT-3; esta sobreexpresión se ha evidenciado en aproximadamente el 70% de los casos de cáncer en humanos sugiriendo que la mayoría de las células tumorales adquieren ventajas selectivas mediante la alteración del metabolismo produciendo una mayor cantidad de ácido láctico, incluso en condiciones de normoxia, lo que conlleva a lo que se le conoce como efecto Warburg (Fiume et al; 2011).

Se ha demostrado que el Oxamato de Sodio tiene un efecto anti-metabólico, inhibiendo la producción de intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), disminuyendo el flujo glicolítico y la actividad mitocondrial en la cadena de transporte de electrones, esto en líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (Hamilton et al; 1995). Además de inhibir la proliferación en la misma línea celular en ratones atímicos xenotransplantado (Migneco et al, 2010). En otros estudios se ha demostrado que el Oxamato de Sodio, tiende a disminuir los niveles de la LDH-A y ATP lo que produce un efecto anti-proliferativo en estudios de líneas celulares de hepatoma PLCPRF/5 (Liu et al; 2001). Así mismo en células HeLa se vio inhibido el flujo glucolítico y el crecimiento celular por la disminución en el consumo de glucosa en esta línea celular (Ward et al, 2012). El éxito de este fármaco se debe a la evidencia existente sobre su efecto anti-proliferativo de las células tumorales en diferentes estudios como la inhibición del crecimiento en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 por disminución de la LDH-A (Zhao et al; 2009). Trabajos in vivo en ratones de la cepa BALB/c, se ha demostrado que la administración del Oxamato de Sodio via intraperitoneal, dentro de las primeras 48 horas de tratamiento ha disminuido el crecimiento de la línea hepatocelular PLC/PRF/5 y HepG2 (Fiume et al; 2011).

Actualmente se han reportado estudios que sustentan la efectividad de este fármaco como tratamiento contra el cáncer bloqueando el metabolismo de la célula tumoral, por ejemplo fue demostrado en un estudio in vitro con células pancreáticas donde los resultados indicaron una disminución en la producción de lactato, menor consumo de glucosa e inhibición de la LDH-A (Lu et al., 2015).

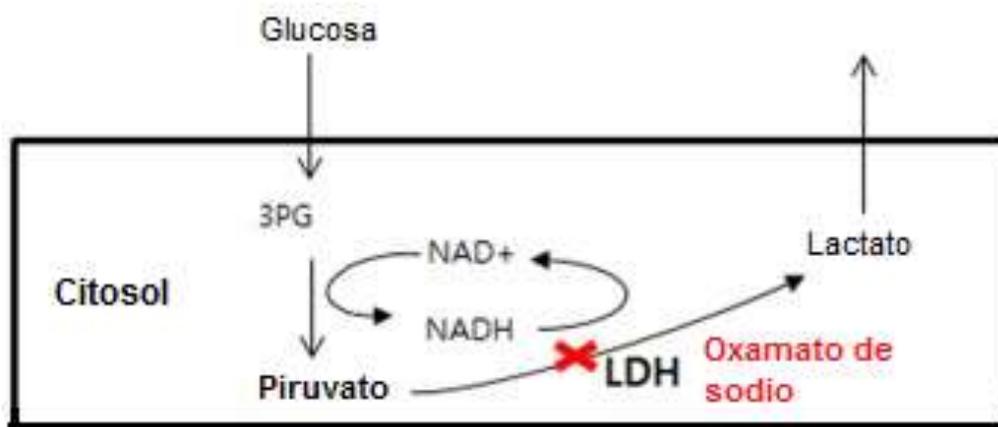


Figura 9. Mecanismo de acción del Oxamato de Sodio. Inhibición de la LDH-A, enzima participante de la glicólisis. Bloquea la conversión de piruvato a lactato. Tomado y modificado de (Miskimins et al., 2014).

2.2.3 Doxorubicina

La Doxorubicina es una antraciclina de amplio espectro, aislada de la bacteria *Streptomyces peucetius*, es utilizada como tratamiento de primera línea aprobado por la FDA (en inglés, Food and Drug Administration) para diferentes tipos de cáncer como el de mama, próstata y ovario (Meng et al., 2014).

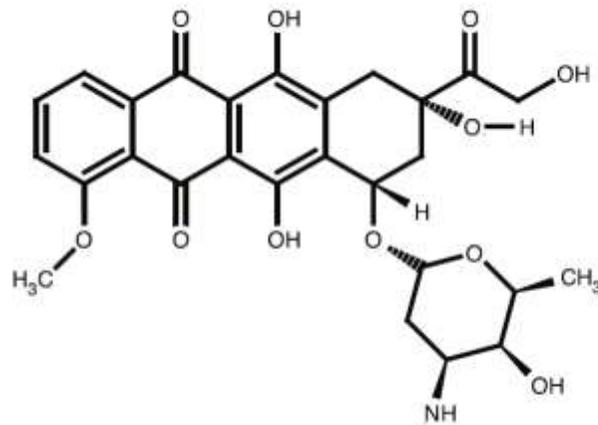


Figura 10. Estructura química de la Doxorubicina.

La Doxorubicina actúa como agente intercalante en las hebras de ADN inhibe la acción de la topoisomerasa II, produciendo rupturas y daño al ADN. La generación de radicales libres producido por estrés oxidativo y finalmente la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) genera Formaldehído, el cual estabiliza los enlaces entre la Doxorubicina y el DNA dando como resultado el frenado de procesos replicativos y transcripcionales ocasionando muerte celular (Hill et al., 2014). La intercalación de la Doxorubicina está orientada preferencialmente hacia sitios adyacentes a Citosina (C) y Guanina (G) debido a la formación de enlaces específicos entre la Doxorubicina y la G. Además, se cree que la formación de aductos por la inhibición de la topoisomerasa II en el DNA no es el único mecanismo de acción de la Doxorubicina, sino que además incluye otros como el estrés oxidativo y sobreproducción de ceramida que provocan daño al DNA y muerte celular (Figura 11) (Yang, Teves, Kemp, & Henikoff, 2014).

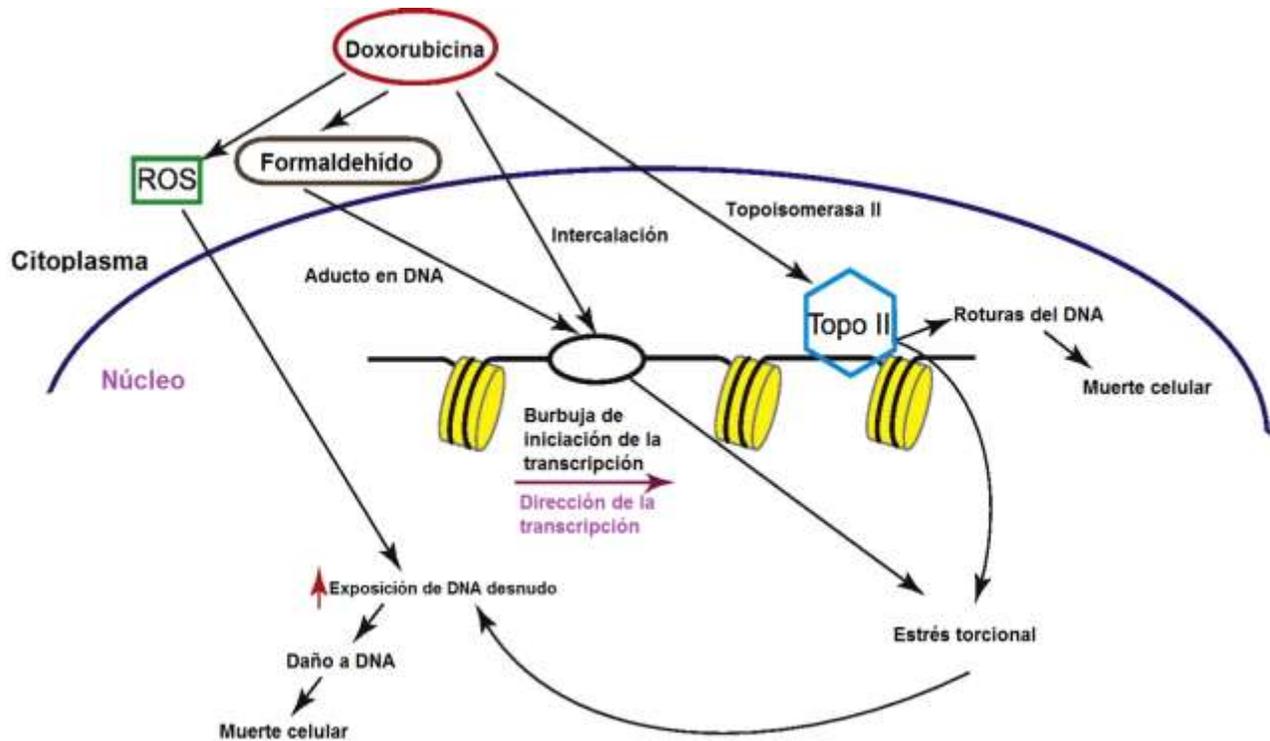


Figura 11. Mecanismo de acción de la Doxorubicina. La imagen muestra los mecanismos por los cuales la Doxorubicina actúa como agente intercalante en el DNA, además de otros mecanismos donde induce muerte celular. Tomado de Yang, 2014.

La Doxorubicina está indicada para el tratamiento de diferentes tumores sólidos como CaMa, de pulmón, carcinoma gástrico y tumores ginecológicos. Es metabolizada ampliamente en el hígado por la enzima aldoceto reductasa que origina su metabolito principal, el doxorubicinol. Es sustrato de la isoforma 3A4 del citocromo P450 y el metabolito que origina es la doxotubicina-7-desoxiaglicona; ambos considerados como los principales responsables de la toxicidad de la Doxorubicina (Tekedereli et al; 2012). Entre los efectos adversos que limitan el uso clínico de la Doxorubicina se encuentran

la toxicidad cardiaca y hematológica; también se ha documentado toxicidad gastrointestinal, dermatológica, hepática, renal y necrosis severa local. Además ocasiona una severa toxicidad miocárdica lo que conlleva a falla de cardiaca (FC), la cual puede manifestarse durante la terapia, en meses o años después de haber terminado el tratamiento (Roca-Alonso et al, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

El CCR es un problema de salud pública en México y a nivel mundial y constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en nuestro país. A pesar de la existencia de terapias para esta enfermedad, aún no se tiene un tratamiento eficaz y específico.

Recientemente se ha documentado que la monoterapia en cáncer puede desarrollar quimioresistencia en la mayoría de los pacientes. Actualmente se están desarrollando terapias empleando combinaciones de fármacos inhibidores que participan en diferentes vías de señalización que están mutadas en el cáncer e involucradas en procesos biológicos como apoptosis y autofagia. Por lo que el uso de los fármacos: metformina y el oxamato, inhibidores de la rutas metabólicas de mTOR y glicolisis aerobia, respectivamente, actuarán de manera concomitante con la Doxorrubicina, disminuyendo el tamaño de la masa tumoral en un modelo *in vivo* de CCR, probablemente activando uno o ambos procesos de muerte celular.

Resultados preliminares *in vitro* en nuestro grupo de trabajo, demostraron que el empleo de la Metformina y el Oxamato de Sodio en combinación con la Doxorrubicina disminuyen de manera considerable la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (CMTN) (Garcia, 2013).

4. HIPÓTESIS

La combinación de fármacos inhibidores de la glicólisis y de la LDH-A en combinación con Doxorubicina, causarán la disminución de la proliferación celular en los tumores generados en el modelo *in vivo* de CCR, activando mecanismos de muerte celular como: apoptosis y autofagia.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Evaluar la terapia combinatoria de Metformina, Oxamato de Sodio y Doxorubicina en un modelo *in vivo* de CCR asociado a inflamación.

5.2 Particulares:

1. Establecer un modelo *in vivo* de carcinogénesis colorectal asociado a inflamación crónica por AOM y DSS.
2. Monitorear durante cada ciclo de DSS el establecimiento de CCR.
3. Definir el inicio al tratamiento farmacológico de acuerdo al establecimiento de la enfermedad.
4. Evaluar el efecto de los tratamientos en los grupos experimentales al final de la fase experimental.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Para el establecimiento del modelo murino, se requirieron 24 ratones hembra de la cepa BALB/c (Laboratorios Harlan, México) de 6 a 7 semanas de edad. Los ratones fueron mantenidos con ciclos de luz y oscuridad 12/12 con agua y alimento *ad libitum* en el bioterio de la FES-Iztacala UNAM de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que especifica las técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.2 Modelo de carcinogénesis

La inducción de la carcinogénesis en el intestino grueso de los ratones se realizó mediante una sola administración vía intraperitoneal (i.p.) de 12.5 mg/kg de AOM (Sigma Aldrich®). Después de 5 días los animales recibieron agua con DSS (36,000 – 50,000 de PM) al 2%. (MP biomedical®) durante 7 días. Posteriormente el DSS fue retirado por un periodo de 14 días y nuevamente recibieron agua con DSS con los mismos intervalos de tiempo por 2 ciclos más, logrando así el desarrollo de CCR. Durante el seguimiento del modelo, el crecimiento tumoral fue monitoreado por eutanasia de un ratón al final de cada ciclo de DSS, logrando así definir el inicio al tratamiento farmacológico (figura 12).

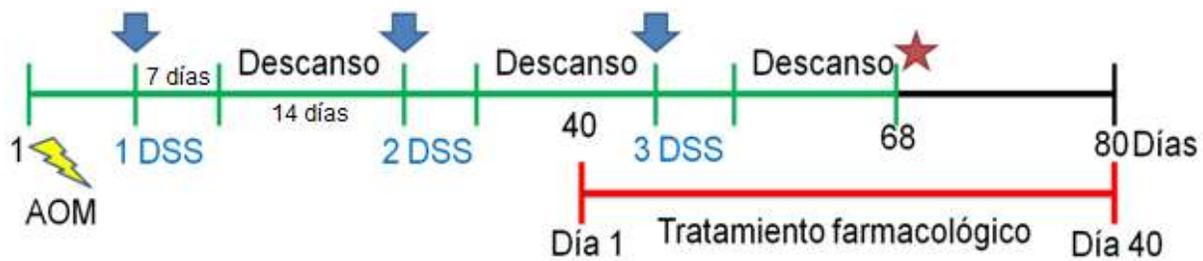


Figura 12. Modelo de carcinogénesis colorrectal y tratamiento farmacológico. En el día uno se inicia el modelo de carcinogénesis con la administración de AOM 12.5mg/kg, las flechas azules señalan las exposiciones a DSS (2%). De rojo se muestra tratamiento farmacológico con inicio en el día 40 y una duración de 40 días.

6.3 Tratamiento farmacológico

Los ratones se dividieron de manera aleatoria, 24 ratones en 4 grupos experimentales: 1) Grupo control negativo; 2) Grupo control positivo (Doxorrubicina); 3) Grupo tratamiento 1 (Metformina /Oxamato de Sodio) y 4) Grupo tratamiento 2 (Metformina/Oxamato de Sodio/Doxorrubicina) Tabla 1. Los tratamientos fueron administrados vía intra-peritoneal (i.p.) en un volumen de 200µl del tratamiento a evaluar a cada ratón. Al grupo control negativo se le administró solución salina isotónica (SSI), al grupo control positivo se administró 1mg/kg de Doxorubicina. El tratamiento 1, de Metformina y Oxamato de Sodio se administraron 200 mg/kg y 15 mg/kg respectivamente. Para el tratamiento 2, la segunda terapia combinatoria, se les administró Metformina (200mg/kg), Oxamato de Sodio (15mg/kg) y Doxorubicina (1mg/kg) para cada ratón. Las dosis de los tratamientos fueron determinadas de acuerdo a lo establecido por García en 2013. Durante esta fase del experimento los

ratones fueron monitoreados y pesados para observar algún efecto secundario que comprometiera la calidad de vida del animal y ello nos indicara la eutanasia necesaria de algún animal antes del final de la fase experimental lo que de igual manera ayudó a determinar el tiempo de tratamiento farmacológico de 40 días.

Tabla 1. Tratamiento farmacológico. Grupos experimentales del modelo (n=6) y tratamientos farmacológicos propuestos.

Grupos experimentales	Tratamiento
Control negativo	Solución Salina Isotónica
Control positivo	Doxorubicina (1mg/Kg)
Tratamiento 1	Metformina /Oxamato de Sodio (200-15)mg/kg
Tratamiento 2	Metformina/Oxamato de Sodio/Doxorrubicina 200-15-1)mg/Kg

6.4 Análisis macroscópico

Durante el modelo de carcinogénesis se observó el establecimiento de la enfermedad mediante la eutanasia de un ratón finalizando cada ciclo a DSS (cada 21 días). De acuerdo al desarrollo de la enfermedad, se determinó el inicio al tratamiento farmacológico.

Al finalizar el tratamiento farmacológico todos los ratones fueron sacrificados para el análisis macroscópico del intestino grueso, haciendo una escisión desde la unión ileocecal hasta el margen anal, se realizó un corte a lo largo del intestino para exponer la mucosa interna y observar el crecimiento o inhibición de tumores; el tejido se lavó con PBS para eliminar excesos de materia fecal.

6.5 Análisis histológico

Con el objetivo de evaluar el efecto de las terapias farmacológicas sobre la progresión de la enfermedad, los tumores se procesaron para cortes histológicos siguiendo el protocolo del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). El colon fue examinado usando cortes de 5µm de grueso y teñidos con H & E (Hematoxilina y Eosina). Se evaluó la región media del tejido, sitio donde se concentraban la mayor parte de los tumores. Una vez extraído el tumor, éste fue fijado con p-formaldehído al 4% por 24 horas. Pasado éste periodo de 24 horas, los tejidos fueron deshidratados con gradientes de Etanol (EtOH) de manera ascendente 70, 80, 90, 95 y 100% (para evitar alteraciones estructurales y moleculares), finalmente xilol (para eliminar el etanol absorbido por el tejido) al 50 y 100% cada gradiente durante 1 hora. Posteriormente se fundió parafina histológica a una temperatura de 56-58°C y se colocó el tejido en platinas de acero inoxidable de 15 x 15 x 5 mm. Finalmente se vertió la parafina líquida para formar bloques. Una vez incluidos los tejidos en la parafina, se realizaron cortes de 5µm en un micrótopo Leica® modelo RM2125RT. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos por baño de flotación desparafinado por 30min, para su posterior tinción de acuerdo al protocolo de H&E (Life Technologies). Una vez en el

portaobjetos, Los cortes fueron analizados con un microscopio óptico (Motic B5 profesional) a un aumento de 40x. La clasificación histológica se organizó con la nomenclatura recomendada para la neoplasia intestinal en modelos de ratón (Boivin et al., 2003).

7. Resultados.

7.1 Desarrollo del modelo murino

Durante todo el modelo carcinogénico incluido el tiempo al tratamiento farmacológico, se observaron diferentes características en los ratones; como caída de pelaje, encorvamiento corporal, sangrado por recto, prolapso rectal y pérdida de masa corporal. Lo anterior nos dio un indicativo del daño ocasionado durante el proceso inflamatorio del intestino grueso de los ratones. Estas características fueron muy notorias sobre todo en los tratamientos de Doxorubicina, Metformina-Oxamato de Sodio y SSI; mientras que en el tratamiento de Metformina-Oxamato de Sodio y Doxorubicina no existió la presencia de prolapso rectal, encorvamiento corporal ni caída de pelaje y las demás se observaron en una menor medida. En la figura 13, se muestra la pérdida de peso en los animales durante los diferentes ciclos de exposición con DSS. La tendencia del peso fue igual en todos los grupos experimentales durante cada ciclo a DSS (bajan de peso durante la exposición a los ciclos a DSS y recuperan su peso durante el descanso) sin embargo los grupos experimentales de SSI y el tratamiento 1 (Metformina-Oxamato de Sodio) mostraron cambios significativos en los que respecta a la pérdida y recuperación del peso corporal; la monoterapia (Doxorrubicina) y el

tratamiento 2 (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorrubicina) no se observan diferencias.

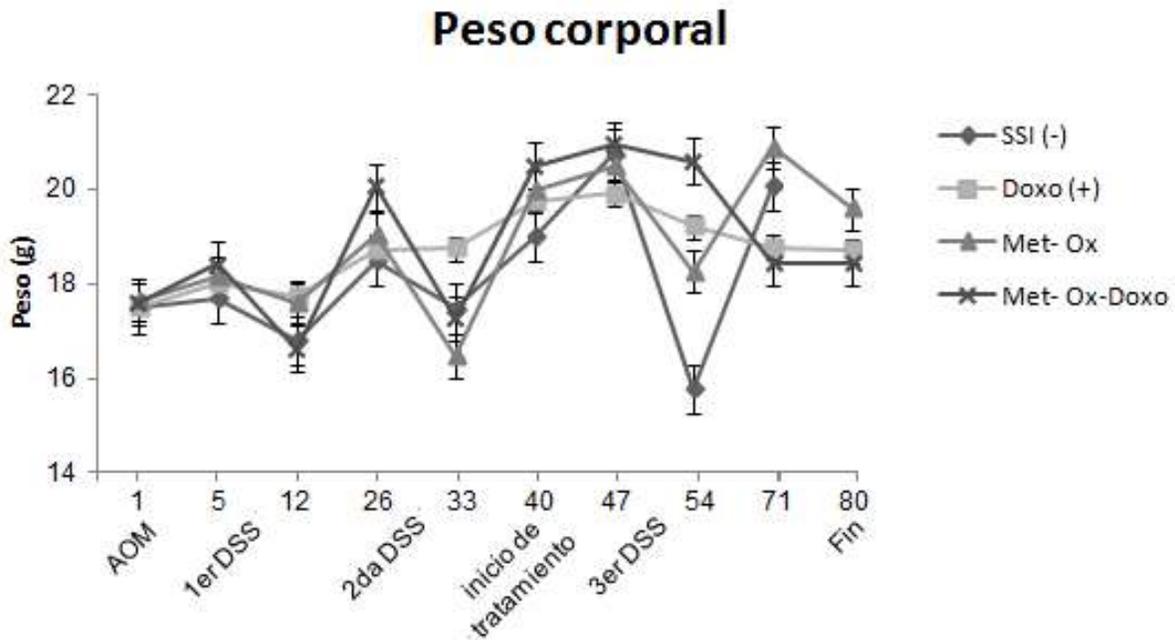


Figura 13. Peso corporal de los ratones. Monitoreo de la pérdida y recuperación de peso corporal de los grupos experimentales (N=6) durante el proceso de carcinogénesis y tratamiento farmacológico. Por cuestiones éticas los ratones del tratamiento con SSI fueron sacrificados una semana antes.

Se realizó un análisis de supervivencia mediante Kaplan-Meier, donde se midió la fracción de ratones vivos después del tratamiento farmacológico, al final del modelo murino. En la monoterapia (Doxorrubicina) se observa un 75% de supervivencia al final del tratamiento farmacológico mientras que el tratamiento 2 (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorrubicina) muestra una supervivencia del 50%; de igual manera que el

tratamiento 1 (Metformina-Oxamato de Sodio) y finalmente el grupo de SSI donde la supervivencia total fue de tan solo el 25% (figura 14).

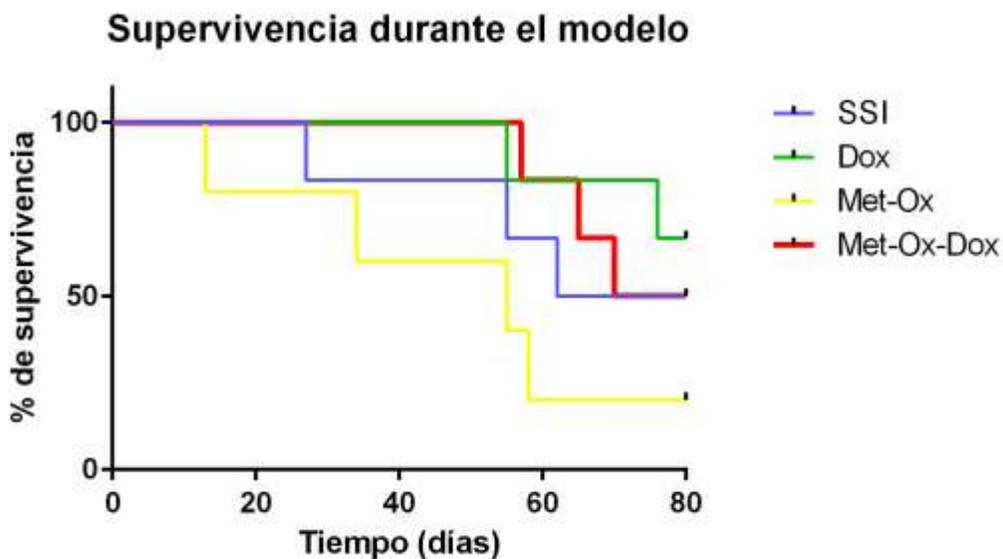


Figura 14. Estimación de Supervivencia por Kaplan-Meier. De manera cuantitativa se analizó la supervivencia de los ratones durante el modelo carcinogénico y el tratamiento farmacológico, en los diferentes grupos experimentales.

7.2 Análisis macroscópico del establecimiento de la enfermedad

La formación o remisión del tumor, fue observada y monitoreada mediante la obtención del intestino derivado de la eutanasia por dislocación cervical de un ratón de cada grupo experimental, después de cada ciclo de DSS. Como se muestra en la figura 15, en el análisis macroscópico del primer ciclo de exposición de DSS (12 días) aun no se logra observar el desarrollo de masas tumorales en el intestino, teniendo un aspecto similar a

la muestra control (sin tumores), en el segundo ciclo de DSS (33 días) la formación de masas tumorales se observaron a lo largo del intestino con un aspecto rojizo ocasionado, debido probablemente al proceso inflamatorio. Las diferencias observadas en el intestino de los ratones en ambos ciclos de DSS son significativas, comparadas con el intestino del ratón sano, en el cual se observa el epitelio normal, sin inflamación ni formación alguna de masas tumorales. En el primer ciclo se observa un engrosamiento de las paredes intestinales, cambios en el aspecto y coloración más opaca y rojiza; mientras que en el segundo ciclo de DSS se pueden observar las mismas características que en la primera exposición, pero con formaciones tumorales ya definidas. Finalmente en el tercer ciclo de DSS se observaron cambios considerablemente significativos en la morfología, tamaño y número de masas tumorales.

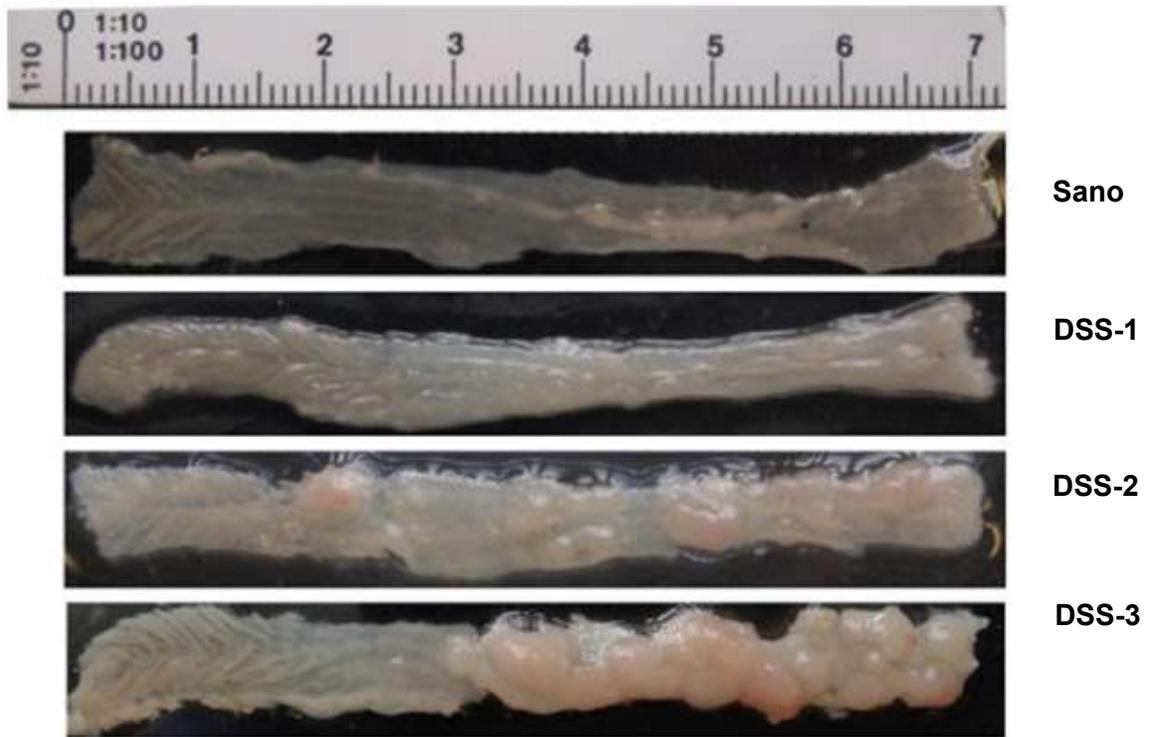


Figura 15. Análisis macroscópico del intestino de los ratones en las diferentes exposiciones a los ciclos de DSS. La imagen muestra cortes longitudinales del intestino de los ratones. Se observa el progreso de la enfermedad desde el primer ciclo de DSS hasta el tercer ciclo donde se muestra el establecimiento de CCR.

7.3 Efectividad de los fármacos.

Al final de la fase experimental de los grupos de animales con CCR tratados con las terapias farmacológicas, se realizó la eutanasia de todos los animales. De igual manera que en los animales en los que se evaluó la progresión y establecimiento del cáncer colorrectal, se extrajo el intestino grueso y realizó un análisis macroscópico.

Se realizó un conteo del número de tumores en los ciclos a DSS y a los grupos de los tratamientos farmacológicos (ver figura 16). Se observó que en el grupo experimental

del tratamiento 2 (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorubicina) el efecto de la terapia farmacológica, produjo una disminución considerablemente significativa en el número de tumores (10 tumores) con respecto a los demás grupos experimentales. La monoterapia del grupo experimental con Doxorubicina (control positivo) no se observó disminución en el número de formaciones tumorales, obteniendo un número final de 29 tumores, similar al tratamiento 1 propuesto (Metformina-Oxamato de Sodio) con solo un tumor de diferencia (28 tumores).

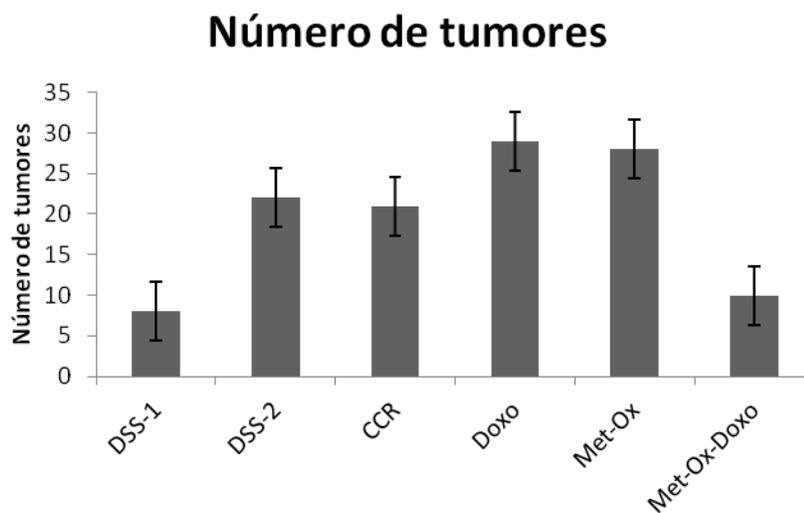


Figura 16. Número de tumores en los grupos experimentales. En la imagen se muestra en el eje de las abscisas (X) los diferentes ciclos de DSS y los grupos de los tratamientos farmacológicos. En el eje de las ordenadas (Y) el número promedio de masas tumorales que tuvo cada grupo al final del modelo. Se observa que el tratamiento 2 (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorubicina) tuvo el menor número de tumores (tumores=10) en comparación con los demás grupos, $P=0.05$.

Finalmente también se contaron los tumores de los ciclos con DSS para observar el progreso de la enfermedad y comparar con los grupos experimentales. En el primer ciclo se observan la formación de 8 tumores, en el segundo los tumores alcanzan la cantidad de 22 y por último en el tercer ciclo donde ya existe CCR, a pesar de tener 21 tumores estos son de un mayor tamaño (5 mm aproximadamente) a diferencia de los demás grupos experimentales (2 a 3 mm) ver figura 17.

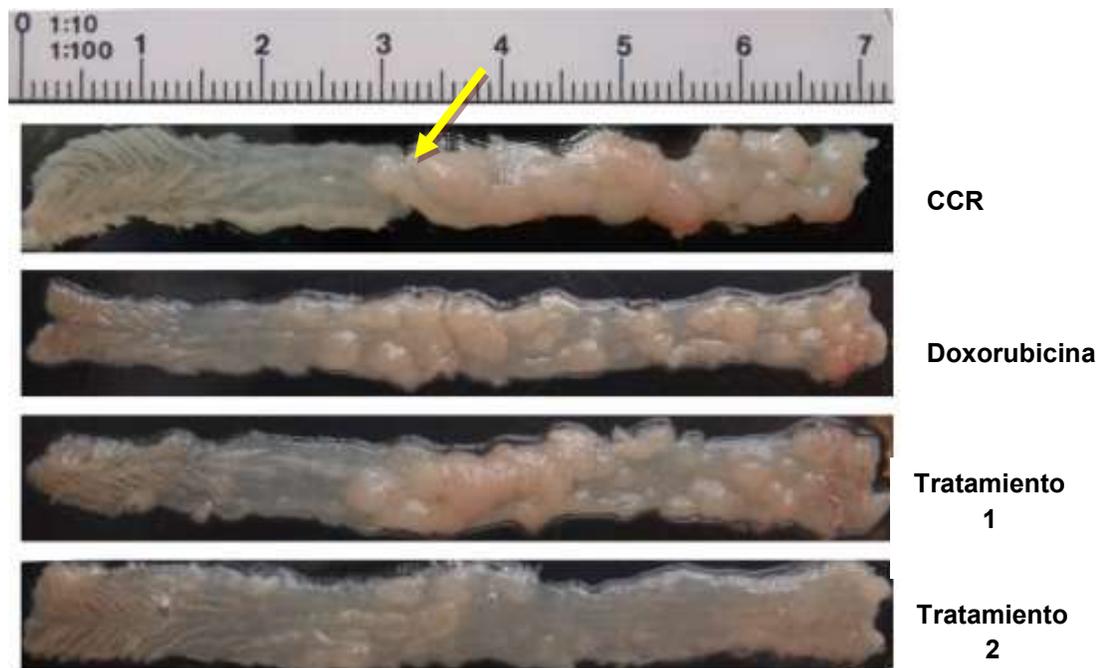


Figura 17. Análisis macroscópico del intestino grueso de los ratones. Las imágenes del tejido muestran las formaciones tumorales en cada grupo experimental; en el tratamiento 2 (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorubicina) se observan aproximadamente un total de 10 tumores; el tratamiento 1 (Metformina-Oxamato de Sodio) y la Doxorubicina muestran una cantidad semejante con 28 y 29 tumores respectivamente y en comparación con el tejido de CCR que a pesar de tener un número menor de tumores (21) estos son de mayor tamaño. La flecha señala los tumores de gran tamaño en el tejido de CCR.

7.4 Análisis histopatológico de los ciclos a DSS

Para determinar si estos crecimientos celulares eran de origen tumoral se realizaron cortes histológicos de la región media del colon (debido a que en esta zona se observó la mayor cantidad de tumores) teñidos con Hematoxilina y Eosina (HyE). Los cortes histológicos se evaluaron basándonos en el criterio descrito por Riddell *et al.* En la figura 18, en la imagen A, se logró observar mucosa normal del colon en donde la conformación estructural de las criptas son alineadas, estructura bien definida y la apertura de la cripta dirigida hacia el lumen (Grado 0); en la imagen B, el tejido corresponde a la 1ª dosis de DSS, en él se observa acortamiento de las criptas del colon con leve inflamación debido a la infiltración de células inmunes, (Grado 1), por otra parte, en la imagen C que corresponde a la 2ª dosis de DSS es evidente la pérdida de la estructura basal de las criptas con leves indicios de inflamación en la mucosa y desaparición de las criptas (Grado 2). En la imagen D se puede apreciar la pérdida completa en la morfología de las criptas. La superficie del epitelio muestra una severa inflamación en la mucosa y submucosa, también se observan lesiones con alto grado de displasia y ulceraciones en la mucosa (Grado 3).

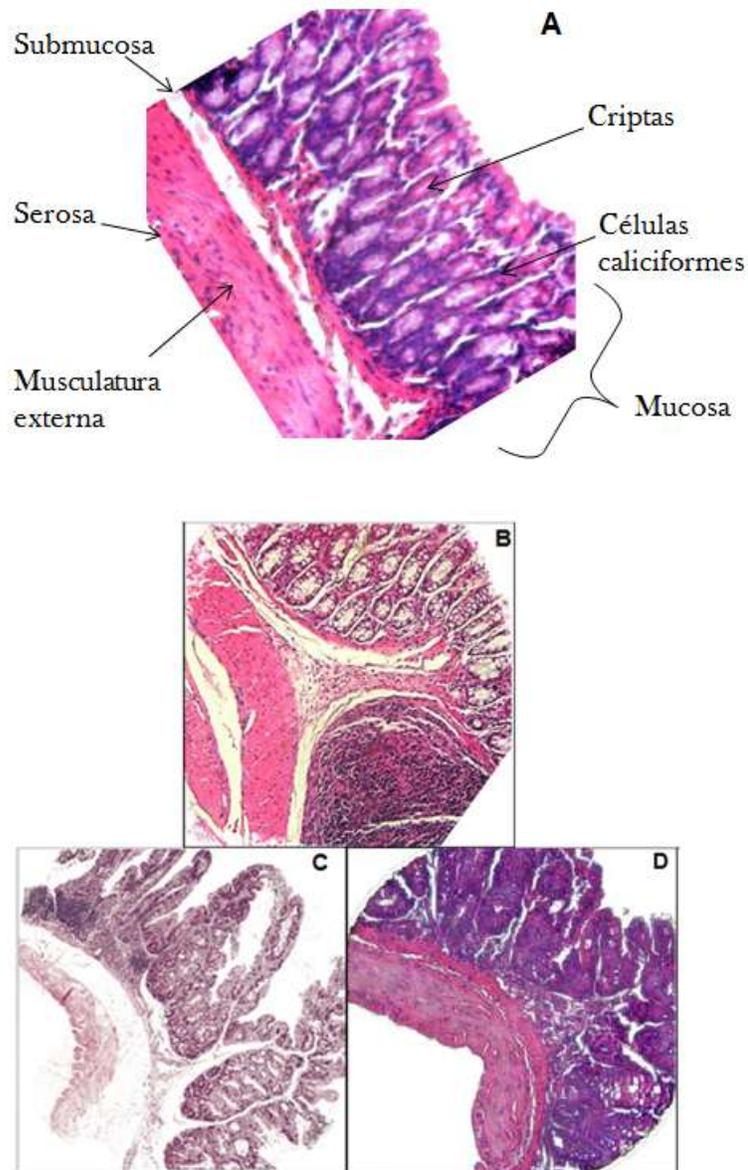


Figura 18. Análisis histológico de los ciclos a DSS. Secciones histológicas de la región media del intestino grueso Teñidas con H&E. A) Tejido de ratón sano; B) Primer ciclo de DSS; C) Segundo ciclo de DSS; D) Tercer ciclo de DSS. En todas las exposiciones de DSS se observó cambios en la morfología del intestino, infiltración en la mucosa, pérdida de la estructura de las criptas, una excesiva tinción celular y de un epitelio con un alto grado de displasia. Secciones de 5 μ m observadas en un microscopio óptico con objetivo de 40x.

7.5 Análisis histopatológico de los grupos farmacológicos

Se realizó un análisis histopatológico para observar la morfología resultante después de la administración de los tratamientos farmacológicos en los grupos experimentales. En el tejido sano (imagen 19A) se observan las estructuras sin inflamación ni cambios estructurales en la anatomía del intestino. Las criptas se observaban bien definidas con la apertura en dirección al lumen. En el tejido intestinal del ratón con CCR son evidentes los cambios en la morfología (imagen 19B) donde a pesar de que la anatomía del intestino mantiene su estructura, sin invasión hacia las demás capas externas (submucosa, musculatura y serosa), se puede observar en la mucosa una alta cantidad de núcleos de las células caliciformes teñidos por la H & E desordenando la estructura de las criptas. La histología resultante de la monoterapia con Doxorubicina (imagen 19C) muestra similitud con la histología del tratamiento 1 (Metformina-Oxamato de Sodio) (imagen 19D), donde se observa en la mucosa la estructura de las criptas sin cambios estructurales, pero con una gran cantidad de células caliciformes, se observan adenomas con un alto grado de displasia, en comparación con el tejido sano (comparar imagen 19 A y D). El efecto de la terapia combinatoria de Metformina, Oxamato de Sodio y Doxorubicina (imagen 19E), muestra su eficacia al observarse en el tejido que las capas intestinales (mucosa, submucosa, musculatura y serosa) no presentan inflamación ni cambios en la estructuración anatómica del intestino, no se observaron infiltrados y en la mucosa las células caliciformes se observan con una ligera proliferación en algunas criptas pero no cambian la morfología de éstas. Lo que sugiere que el efecto de la triple terapia farmacológica probablemente está permitiendo el restablecimiento en la mejora de procesos importantes que le permitieron a la célula reestructurar el tejido y a la vez disminuir la progresión de la enfermedad.

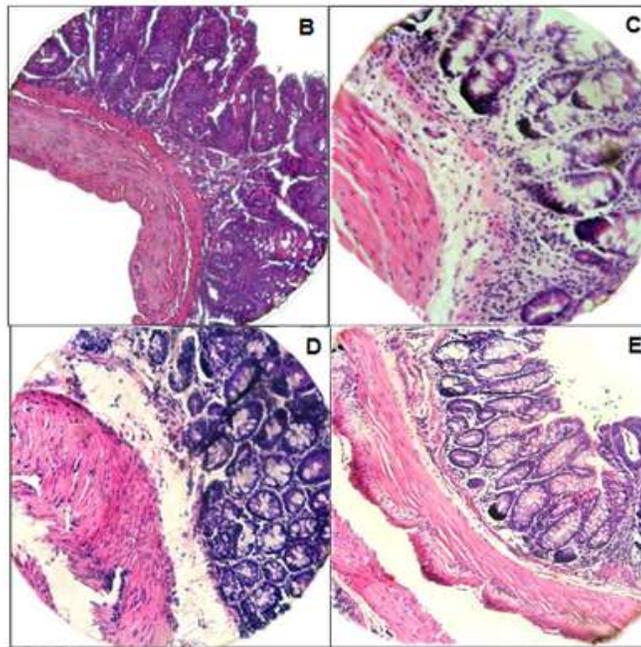
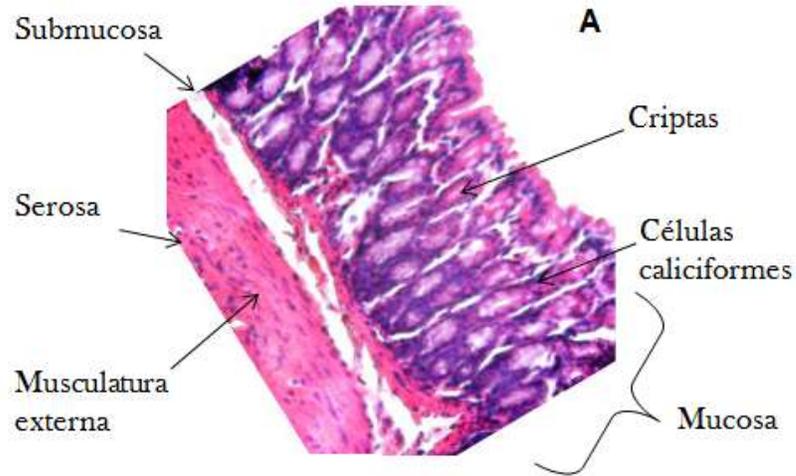


Figura 19. Análisis histológico de los grupos experimentales. Secciones histológicas de la región media del intestino de los grupos experimentales. Tinción con H&E. A) Sano; B) Cáncer; C) Doxorubicina; D) Metformina-Oxamato de Sodio E) Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorubicina. La imagen muestra los cambios morfológicos ocurridos en cada tratamiento. Nuestro tratamiento tuvo un efecto de regresión importante restaurando la estructura del tejido epitelial. Secciones de 5 μm observadas en un microscopio óptico con objetivo de 40x.

8. DISCUSIÓN

El CCR es considerado como un gran problema de salud pública, pues es la cuarta causa más común de muerte a nivel mundial, y puede desarrollarse de manera espontánea o por complicaciones procedentes de la inflamación crónica ocasionada por desregulación en el sistema inmune. Robertis y colaboradores en 2011, mencionan que existen 3 principales categorías de modelos murinos asociados a CCR; los genéticos (con mutaciones en genes como APC, Smad3, Msh2, PTEN, etc), los xenotrasplantes (tumores que se generan a partir de una inyección subcutánea o intravenosa de células tumorales) y los químicamente inducidos, en el que sobresale el método de AOM/DSS el cual fue implementado por Tanaka y colaboradores en 2003. El AOM es un agente químico que puede iniciar el proceso cancerígeno por alquilación al DNA facilitando los errores en el apareamiento de las bases mientras que el DSS es un reactivo que ocasiona inflamación en el epitelio del colon debido a la infiltración de macrófagos y además en el citoplasma forma vesículas que dañan la membrana y barrera intestinal y activa vías de señalización pro-inflamatorias. El cáncer colorrectal establecido químicamente por un proceso inflamatorio intestinal crónico en modelos murinos, es una buena plataforma para la simulación y estudio de este tipo de cáncer (Wen et al., 2014). Esta inflamación es promovida principalmente por NF- κ B, COX-2 y citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-17, IFN- γ y TGF- β que propician un microambiente tumoral adecuado e importante en la carcinogénesis colorrectal.

Suzuki y colaboradores en 2007 realizaron un estudio de susceptibilidad en 4 cepas murinas para observar si existían diferencias en el protocolo de AOM/DSS en cada cepa; en este estudio se administró una sola dosis de AOM (10mg/kg respecto al peso

del ratón) vía i.p. seguido de una sola dosis de DSS al 1 % en el agua por 4 días. Encontró que la única cepa en la que había presencia de tumores era en la cepa BALB/c. Basándose en este estudio Hyun y colaboradores en 2012, modificó el protocolo y en la misma cepa administró una dosis de AOM con la misma concentración, seguido de tres dosis de DSS al 1.7 % con un intervalo de descanso de 14 días entre cada administración de DSS; de lo anterior, observó que los ratones generaban en promedio siete tumores con un tamaño de 3 mm y una incidencia del 90%. En nuestro trabajo se utilizó el AOM en una concentración de 12.5mg/Kg, según lo reportado por Tanaka en 2003 donde las modificaciones al modelo, permiten una mejor apreciación de los tumores formados, así como mayor número de tumores en menor tiempo. En cuanto al DSS, la concentración utilizada fue del 2% durante 15 días. Esta adaptación, entonces, generó un promedio de 15 a 20 tumores por ratón con un tamaño promedio de 4 mm y una incidencia del 100% con presencia de adenoma tubular, displasia y colitis con ulceración en la mucosa al día 80 del tratamiento. El hecho de que se hayan generado un mayor número de tumores con estas modificaciones puede deberse al incremento en la concentración del AOM, así como las dosis repetidas de DSS con ciertos intervalos de tiempo ya que Thaker y colaboradores en 2012, trabajaron con concentraciones de AOM al 10% y de DSS superiores al 2.5% y en su modelo no se observan más de 8 tumores por ratón. Con los resultados obtenidos, podemos establecer que el proceso inflamatorio favorece la formación del tumor. Diversos experimentos muestran que la sobreexpresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α y IL - 17 estimulan la glucólisis y la producción de factores de crecimiento en la células de CCR (Straus, 2013).

En este estudio se demostró una vez más la efectividad de la triple terapia, es decir, el tratamiento 2 (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorubicina), fue la más eficaz, disminuyendo la formación tumoral en el intestino grueso de los ratones tratados con ella. Las estrategias experimentales empleadas en éste trabajo, no nos pueden dar datos precisos de lo que está ocurriendo a nivel molecular, pero la reducción en el número de tumores, el restablecimiento o regeneración del tejido en los ensayos de H&E y los estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en nuestro grupo de trabajo, nos permiten inferir que posiblemente, la disminución en el número de tumores ocurrió por un efecto sinérgico entre los fármacos y el mecanismo de acción de cada uno sobre las vías de generación de energía importantes para la sobrevivencia de la célula tumoral, tal y como lo postula Otto Warburg en los años 50's, al establecer al cáncer como una enfermedad metabólica debido a su alta tasa glucolítica en relación a las células normales. Estudios previos han demostrado que esta actividad glucolítica elevada se debe a la conversión de piruvato a lactato por la sobreexpresión de genes como LDH-A y la alteración en las vías de señalización tales como mTOR/Akt (Zhang et al., 2014)

Otros estudios reportan la participación de HIF-1 α involucrado en la adaptación metabólica de las células tumorales a la hipoxia, esto ocurre a través de la inhibición de transporte de electrones en el complejo 1 mitocondrial y la reducción de ROS impidiendo la activación hipoxica (Pryde et al., 2011) lo que podríamos dilucidar como un posible medio de acción en el cual la metformina actuó para inhibir el crecimiento del tumor. Por otro lado Kim y colaboradores en 2015 mencionan que en un estudio *in vivo* la metformina disminuyó la proliferación de células epiteliales y el número de criptas por inhabilitación del ciclo celular mediante la inhibición de la vía mTOR, a través de la

activación de AMPK-LKB1, inhibiendo la síntesis de proteínas y la división celular (Karnevi et al., 2013) indicativo de que la inhibición de la proliferación es generada por la vía mTOR además de una posible muerte por autofagia. Existe una diversidad de publicaciones relevantes de estudios en animales y humanos que demuestran el efecto antineoplásico de la Metformina, incluyendo la inhibición de la proliferación e inducción de muerte celular (Lee et al., 2010). Se ha documentado ampliamente que los pacientes diabéticos son susceptibles de padecer cáncer debido a las altas concentraciones de glucosa sistémica que presenta; sin embargo, se ha demostrado que los pacientes diabéticos tratados con metformina, tienen incidencia reducida y menores probabilidades de padecer cáncer a diferencia de los que no son tratados con ella (Hirsch et al; 2009). La inhibición de la proliferación y crecimiento celular por parte de la metformina, se debe a su capacidad de inhibición de la vía mTOR. La privación de nutrientes inducida por la metformina, provoca una disminución de los niveles de ATP, lo que conduce a la activación del sensor energético AMPK; esta cinasa al detectar esta baja energética activa río abajo la cascada de señalización para inhibir la actividad de mTOR, particularmente el complejo mTORC1. De manera directa, esta cascada promueve a la inhibición del complejo eIF4E, el cual es requerido para la eficiente transcripción de los RNA's de genes que sintetizan las proteínas que participan en la glicólisis y otros tipos de proteínas (Dowling et al; 2011). Por tanto la bioenergética de la célula tumoral se ve comprometida, inhibiendo los procesos de biogénesis que ésta requiere para obtener la biomasa necesaria y, así cumplir con funciones como: proliferación constante y el mantenimiento de una fuente de energía disponible para su crecimiento; al ser inhibidos estos procesos de vital importancia en la célula tumoral inevitablemente la célula muere.

Por otro lado, de acuerdo al mecanismo de acción y a participación del Oxamato de Sodio en éste modelo probablemente indujo muerte por apoptosis debido a la inhibición de la producción de piruvato a lactato al bloquear la LDH-A en la vía de la glucólisis. De acuerdo a Ward en el 2012, esto evita la acidosis láctica, fenómeno común en el microambiente tumoral que conlleva a la proliferación celular, metástasis, y la inhibición de la respuesta inmune contra las células cancerosas; este mecanismo podría darnos una explicación acerca del papel fundamental del Oxamato de Sodio que juega en la terapia combinatoria (Walenta et al., 2004). Actualmente, diversos estudios in vivo han documentado que la disminución de la síntesis de la LDH-A retrasa el desarrollo del tumor, indicando que la LDH-A es importante para la iniciación del tumor, tal es el caso del trabajo realizado por Lee y colaboradores en 2010, en donde se determinó mediante siRNAs el mecanismo de muerte celular por la reducción en la expresión de la LDH-A en células cancerígenas linfocíticas empleando Oxamato de Sodio. Así mismo observaron un aumento en el consumo de oxígeno, por lo que concluyeron que éste fármaco promueve la entrada de piruvato a la mitocondria mediante fosforilación oxidativa, lo que conlleva a una disminución de la LDH-A y la posterior muerte de las células cancerígenas.

Con base en la literatura y en los resultados obtenidos, la inhibición de la LDH-A con el Oxamato de Sodio es una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de cáncer.

Por otra parte el efecto de la Doxorubicina de manera adyuvante en éste modelo de CCR fue baja al igual que la combinación del Tratamiento 1 (Metformina-Oxamato de

Sodio). Sin embargo Doxorubicina en combinación con Metformina y Oxamato de Sodio su efecto se ve potenciado, lo anterior se observó en el restablecimiento del tejido con los ensayos de H&E a diferencia de los demás grupos experimentales. Estudios *in vitro* e *in vivo* en nuestro grupo de trabajo han demostrado que Doxorubicina en combinación con Metformina y Oxamato de Sodio inhibió la proliferación celular a las 4 horas de exposición de la terapia en la lineal celular de CaMaTN, además de inducir la remisión total de la masa tumoral en ratones atímicos a los 8 días de tratamiento con la triple terapia.

Otros trabajos, demuestran que Doxorubicina también puede inducir muerte por autofagia debido al estrés genotóxico que ocasiona, ya que promueve la hiperactivación de (poli-ADP- ribosa) polimerasa-1, (Sishi et al., 2013) (por sus siglas en inglés, PARP) una importante enzima nuclear que promueve la inducción de otro tipo de muerte celular como la autofagia lo que a su vez agota los niveles de NAD^+ y ATP que conlleva a la célula a experimentar irreversiblemente un fallo de energía resultando en la muerte celular. Lo anterior se encuentra referenciado en estudios realizados en células deficientes de PARP-1 aun en concentraciones altas de Doxorubicina fueron incapaces de inducir muerte celular (Boussageon et al., 2012).

La forma específica de muerte celular que Doxorubicina induzca sobre el sistema biológico (apoptosis, autofagia o necrosis) varía dependiendo de las concentraciones del fármaco. Lo anterior sustenta que a pesar de la eficacia que se observó en nuestros resultados *in vitro*; *in vivo* no se obtuvo una respuesta eficiente de Doxorubicina, probablemente a que *in vivo* se requiera emplear dosis más altas para demostrar su

efectividad en la disminución de la masa tumoral, a pesar de la toxicidad que este fármaco pueda ejercer en los animales.

De acuerdo a lo anterior, podemos inferir que la triple terapia, participó en el bloqueo de vías importantes de generación de energía de la célula tumoral, inhibiendo su metabolismo, proliferación, crecimiento, síntesis de proteínas (a través de la acción de Doxorubicina) y biogénesis de lípidos. Lo que condujo a muerte por autofagia debido a la inhibición del complejo mTORC1 y a la posible inhibición de la síntesis de la LDH-A en la glucólisis. (Walenta., 2004).

Hasta la fecha no existe bibliografía sobre el efecto a nivel molecular que nos permitan dilucidar de manera más precisa los mecanismos que induce nuestra triple terapia farmacológica, sin embargo, los diversos estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en nuestro grupo de trabajo nos permiten deducir que la combinación de los tres fármacos (Metformina, Oxamato de sodio y Doxorubicina) muestran su efecto sobre la inhibición de la proliferación celular, a través de apoptosis y/o autofagia, esto probablemente debido a que cada uno de estos fármacos actúan en diferentes vías de señalización involucradas en el metabolismo de la célula tumoral.

Dada la importancia del CCR, es necesario llevar a cabo técnicas moleculares de vanguardia que nos permitan conocer de manera más precisa la efectividad de nuestra terapia farmacológica y así poder identificar marcadores moleculares determinantes e identificar los blancos terapéuticos aplicados al metabolismo de la célula tumoral no solo para CCR sino para otros tipos de cáncer.

9. CONCLUSIÓN

1. Se comprobó que la triple terapia farmacológica de Doxorrubicina-Metformina-Oxamato de Sodio redujo el crecimiento y/o desarrollo de la masa tumoral, probablemente a través de la activación de mecanismos de muerte celular como la autofagia en éste modelo de CCR.
2. En éste modelo de tumorigénesis, el uso y la combinación de estos fármacos (Doxorrubicina-Metformina-Oxamato de Sodio) fue efectivo, observando un menor desarrollo en el número de tumores en los animales tratados con ésta terapia a diferencia de Doxorrubicina sola y el tratamiento con (Metformina-Oxamato de Sodio).
3. Una vez más se demostró el potencial terapéutico de esta combinación de fármacos (Doxorrubicina-Metformina-Oxamato de Sodio), en un modelo *in vivo* de CCR, observando una mejor eficacia sobre las terapias existentes (Doxorrubicina).
4. Con base en los resultados obtenidos, nuevamente demostramos que el metabolismo energético tumoral representa una buena estrategia para la búsqueda de alternativas terapéuticas no solo para CCR sino probablemente para otros tipos de cáncer.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Altenberg B. and Greulich K. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*.;84(6):1014-20.
2. Antoniou, E., Margonis, G. A., Angelou, A., Zografos, G. C., & Pikoulis, E. (2015). Cytokine Networks in Animal Models of Colitis-associated Cancer. *Anticancer research*, 35(1), 19-24.
3. Binefa, G., Rodríguez-Moranta, F., Teule, À., & Medina-Hayas, M. (2014). Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*: *WJG*, 20(22), 6786–6808. doi:10.3748/wjg.v20.i22.6786
4. Bosi, E. (2009). Metformin--the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us? *Diabetes Obes Metab*, 11 Suppl 2, 3-8. doi: 10.1111/j.1463-1326.2008.01031.x
5. Brizel D. M., Schroeder T., Scher R. L., Walenta S., Clough R. W., Dewhirst M. W. and Mueller-Klieser W. (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*.;51(2):349-53.
6. Brown NJ, Higham S.E., Perunovic B., Arafa M., Balasubramanian S. and Rehman I., (2013). Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter methylation in a high frequency of human breast cancers. *PloS One*.;8(2):e57697-e57697.
7. Boussageon, R., Supper, I., Bejan-Angoulvant, T., Kellou, N., Cucherat, M., Boissel, J.-P., ... Cornu, C. (2012). Reappraisal of Metformin Efficacy in the Treatment of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *PLoS Medicine*, 9(4), e1001204. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001204>

8. Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490-1502. doi: 10.1016/s0140-6736(13)61649-9
9. Buturovic, S. (2014). Colonoscopy as a method of choice in the diagnosis of colorectal cancer. *Acta Inform Med*, 22(3), 164-166. doi: 10.5455/aim.2014.22.164-166
10. Campos, F.G. (2014). Surgical treatment of familial adenomatous polyposis: Dilemmas and current recommendations. *World Journal Gastroenterology*,
11. Coleman, M. P. (2014). Cancer survival: global surveillance will stimulate health policy and improve equity. *Lancet*, 383(9916), 564-573. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62225-4
12. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Carcinogenesis. 2009 Jul;30(7):1073-81. doi: 10.1093/carcin/bgp127.
13. Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <http://doi.org/10.1038/nature01322>
14. Chan, A. T., & Giovannucci, E. L. (2010). Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2029–2043.e10. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.057
15. Chen JL, Lucas J. E., Schroeder T., Mori S., Wu J., Nevins J., Dewhirst M., West M. and Chi J. T. (2008). The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS One Genetic.*;4(12):100-13.
16. Dowling RJ, Goodwin PJ and Stambolic V. (2011). Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Medicine.*;9(33):2-6.

17. Draoui N and Feron O. (2011). Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Disease Models & Mechanisms*.;12(4):727-32.
18. Fang L, Barekati Z, Zhang B, Liu Z and Zhong X. Targeted therapy in breast cancer: what's new? *Swiss Medical Weekly*. 2011;12(141):1-9.
19. Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
20. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr> acceso: 28/abril/2015.
21. Fiume L., Vettraino M., Manerba M., Di and Stefano G. (2011). Inhibition of lactic dehydrogenase as a way to increase the anti-proliferative effect of multi-targeted kinase inhibitors. *Pharmacological Research*. doi: 63(4):328-34.
22. Fiume L. (1959). Effect of inhibition of lactic dehydrogenase by the action of oxamic acid on the development of Yoshida's ascites hepatoma. *Bolletino Societta Italiana Biologia Sperimentale*.;35(5):236-40.
23. Foersch, S., & Neurath, M. F. (2014). Colitis-associated neoplasia: molecular basis and clinical translation. *Cell Mol Life Sci*. doi: 10.1007/s00018-014-1636-x
24. García, V. (2013). Evaluación de la metformina y el f3 como posible terapia coadyuvante en un modelo in vivo de cáncer de mama. (tesis de maestría). Universidad Autónoma de México, México.

25. Gottfried E, Kunz-Schughart L. A., Ebner S., Mueller-Klieser W., Hoves S., Andreesen R., Mackensen A. and Kreutz M. (2006). Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.*;107(5):1-17.
26. Hanahan, D. (2014). Rethinking the war on cancer. *Lancet*, 383(9916), 558-563. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62226-6
27. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
28. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
29. Hill, J., Lawrence, J., Saba, C., Turek, M., Feldhaeusser, B., Coutermarsh-Ott, S., . . . Goyal, R., Jr. (2014). In vitro efficacy of doxorubicin and etoposide against a feline injection site sarcoma cell line. *Res Vet Sci*. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.07.006
30. Hirsch H. A., Iliopoulos D., Tsiichlis P. N. and Struhl K. (2009). Metformin Selectively Targets Cancer Stem Cells, and Acts Together with Chemotherapy to Block Tumor Growth and Prolong Remission. *Cancer Research.*;19(69):7507-11.
31. Hyun, Y. S., Han, D. S., Lee, A. R., Eun, C. S., Youn, J. H., & Kim, H. Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*, bgs106.
32. Ijichi, H. (2011). Genetically-engineered mouse models for pancreatic cancer: Advances and current limitations. *World J Clin Oncol*, 2(5), 195-202. doi: 10.5306/wjco.v2.i5.195
33. INEGI. *Mujeres y hombres en México 2009 [en línea]*. Mexico. 13^a ed. 2009 [Consulta: 8 mayo 2015]. Disponible en:

http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/mujeresyhombres/2009/MyH_2009_1.pdf.

34. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2), 69-90. doi: 10.3322/caac.20107
35. Karnevi, E., Said, K., Andersson, R., & Rosendahl, A. H. (2013). Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*, 13, 235. doi:10.1186/1471-2407-13-235
36. Kim, C. A., Spratlin, J. L., Armstrong, D. E., Ghosh, S., & Mulder, K. E. (2014). Efficacy and Safety of Single Agent or Combination Adjuvant Chemotherapy in Elderly Patients With Colon Cancer: A Canadian Cancer Institute Experience. *Clin Colorectal Cancer*. doi: 10.1016/j.clcc.2014.06.002
37. Kim, Y. H., Noh, R., Cho, S. Y., Park, S. J., Jeon, S. M., Shin, H. D., ... Shin, J. E. (2015). Inhibitory Effect of Metformin Therapy on the Incidence of Colorectal Advanced Adenomas in Patients With Diabetes. *Intestinal Research*, 13(2), 145–152. doi:10.5217/ir.2015.13.2.145
38. Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122(20), 3589-3594. doi: Doi 10.1242/Jcs.051011
39. Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci*, 126(Pt 8), 1713-1719. doi: 10.1242/jcs.125773
40. Laszlo, L. (2010). Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer. *Magy Onkol*, 54(4), 383-394. doi: 10.1556/MOnkol.54.2010.4.13

41. Lee G. H., Yan C., Shin S. J., Hong S. C., Ahn T., Moon A., Park S. J., Lee Y. C., Yoo W. H., Kim H. T., Kim D. S., Chae S. W., Kim H. R. and Chae H. J. (2010). BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function. *Oncogene*;29(14):2130-41. 96. Lehmann BD, Bauer JA, Chen C, Sander
42. Li, H., Zeng, J., & Shen, K. (2014). PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. doi: 10.1007/s00404-014-3377-3
43. Li, X., Gao, Y., Yang, M., Zhao, Q., Wang, G., Yang, Y. M., . . . Zhang, Y. (2014). Identification of gene expression changes from colitis to CRC in the mouse CAC model. *PLoS One*, 9(4), e95347. doi: 10.1371/journal.pone.0095347
44. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012; 380(9859):2224-2260. consultada el 20 de octubre de 2014.
45. Lu, Q.-Y., Zhang, L., Yee, J. K., Go, V.-L. W., & Lee, W.-N. (2015). Metabolic Consequences of LDHA inhibition by Epigallocatechin Gallate and Oxamate in MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cells. *Metabolomics*: Official Journal of the Metabolomic Society, 11(1), 71–80. <http://doi.org/10.1007/s11306-014-0672-8>
46. Marlier, J.F., Cleland, W.W., Zeczycki, T.N. (2013). Oxamate is an alternative substrate for pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*. *Biochemistry*, 52(17):2888-94. doi: 10.1021/bi400075t.

47. Mattar, M. C., Lough, D., Pishvaian, M. J., & Charabaty, A. (2011). Current Management of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*: GCR, 4(2), 53–61.
48. Matthew G. and Heiden V. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews: Drug Discovery*.;9(10):671-84.
49. Meng, X., Zhang, Q., Zheng, G., Pang, R., Hua, T., Yang, S., & Li, J. (2014). Doxorubicin combined with celecoxib inhibits tumor growth of medullary thyroid carcinoma in xenografted mice. *Oncol Lett*, 7(6), 2053-2058. doi: 10.3892/ol.2014.2050
50. Miskimins, W. K., Ahn, H. J., Kim, J. Y., Ryu, S., Jung, Y. S., & Choi, J. Y. (2014). Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One*, 9(1), e85576. doi: 10.1371/journal.pone.0085576
51. Moschetta, M., Reale, A., Marasco, C., Vacca, A., & Carratù, M. R. (2014). Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. *British Journal of Pharmacology*, 171(16), 3801–3813. doi:10.1111/bph.12749
52. Neufert, C., Becker, C., & Neurath, M. F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols*, 2(8), 1998-2004.
53. Noguchi Y., Okamoto T., Marat D., Yoshikawa T., Saitoh A., Doi C., Fukuzawa K., Tsuburaya A., Satoh S. and Ito T. (2008). Expression of facilitative glucose transporter 1 mRNA in colon cancer was not regulated by k-ras. *Cancer Letters*. 138;154(2):137-42.

- 54.OMS. 2012. (18 abril de 2015). Cáncer. Datos y cifras. Recuperado de:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 55.Pollak, M. (2012). Metformin and pancreatic cancer: a clue requiring investigation. *Clin Cancer Res*, 18(10), 2723-2725. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0694
- 56.Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):560-70. doi: 10.1172/JCI32453.
- 57.Pópulo, H.; Lopes, J.M.; Soares, P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2012, 13, 1886-1918.
- 58.Pryde, K. R., & Hirst, J. (2011). Superoxide Is Produced by the Reduced Flavin in Mitochondrial Complex I: A SINGLE, UNIFIED MECHANISM THAT APPLIES DURING BOTH FORWARD AND REVERSE ELECTRON TRANSFER. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 18056–18065.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M110.186841>
- 59.Rena, G., Pearson, E. R., & Sakamoto, K. (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*, 56(9), 1898-1906. doi: 10.1007/s00125-013-2991-0
- 60.Ricoult, S. J., & Manning, B. D. (2013). The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep*, 14(3), 242-251. doi: 10.1038/embor.2013.5
- 61.Robertis, M. D., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., ... Fazio, V. M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon

- carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis*, 10, 9. <http://doi.org/10.4103/1477-3163.78279>
62. Roca-Alonso L., Pellegrino L., Castellano L. and Stebbing. (2012). Treatment and Adverse Cardiac Events: What Are the Molecular Mechanisms? *Journal Breast Cancer*.;16(122):253–59.
63. Sampieri, C. L., & Mora, M. (2014). Gastric cancer research in Mexico: a public health priority. *World J Gastroenterol*, 20(16), 4491-4502. doi: 10.3748/wjg.v20.i16.4491
64. Schmid S. A., Gaumann A., Wondrak M., Eckermann C., Schulte S., Mueller-Klieser W., Wheatley D. N. and Kunz-Schughart L. A. (2007). Lactate adversely affects the *in vitro* formation of endothelial cell tubular structures through the action of TGF-beta1. *Experimental Cell Research*.;313(12):2531-49.
65. Simpson N. E., Tryndyak V. P., Beland F. A. and Pogribny I. P. (2012). An *in vitro* investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. *Breast Cancer Research and Treatment*.;133(3):959-68.
66. Sishi BJ, Loos B, van Rooyen and Engelbrecht AM. Autophagy upregulation promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 2013;85(1):124-34.
67. 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. doi:10.3748/wjg.v12.i25.4064
68. Straus, D. S. (2013). TNF α and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Molecular Cancer*, 12, 78. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-12-78>

69. Suzuki, R., Miyamoto, S., Yasui, Y., Sugie, S., & Tanaka, T. (2007). Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer*, 7, 84. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-7-84>
70. Svensson R. U., and Shaw R. J., (2012). Tumour friend or foe. *Nature Cancer*;4(85):590-59.
71. Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, 94(11), 965-973.
72. Tekedereli I, Alpay S. N., Tavares C. D. J., Cobanoglu Z. E., Kaoud T. S., Sahin I., Sood A. K., Lopez-Berestein G., Dalby K. N. and Ozpolat B. (2012). Targeted Silencing of Elongation Factor 2 Kinase Suppresses Growth and Sensitizes Tumors to Doxorubicin in an Orthotopic Model of Breast Cancer. *PLoS One*;41(117):1-12.
73. Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114 e2105. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.058
74. Thaker, A. I., Shaker, A., Rao, M. S., & Ciorba, M. A. (2012). Modeling Colitis-Associated Cancer with Azoxymethane (AOM) and Dextran Sulfate Sodium (DSS). *Journal of Visualized Experiments* □: JoVE, (67), 4100. doi:10.3791/4100
75. Todd, J. N., & Florez, J. C. (2014). An update on the pharmacogenomics of metformin: progress, problems and potential. *Pharmacogenomics*, 15(4), 529-539. doi: 10.2217/pgs.14.21

76. Tubiana, M. (2008). Generalities about carcinogenesis. *Comptes Rendus Biologies*. 2(331):114-25.
77. Um, J. H., Yang, S., Yamazaki, S., Kang, H., Viollet, B., Foretz, M., & Chung, J. H. (2007). Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iε (CKIε)-dependent degradation of clock protein mPer2. *J Biol Chem*, 282(29), 20794-20798. doi: 10.1074/jbc.C700070200.
78. Vander M. G., Cantley L.C. and Thompson C.B., (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*.;324(5930):1029–33.
79. Vineis, P., & Wild, C. P. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *The Lancet*, 383(9916), 549-557. doi: 10.1016/s0140-6736(13)62224-2
80. Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, 122(6), 253-270. doi: 10.1042/CS20110386
81. Walenta, S., & Mueller-Klieser, W. F. (2004). Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol*, 14(3), 267-274. doi: 10.1016/j.semradonc.2004.04.004
82. Ward R. A., Brassington C., Breeze A. L., Caputo A., Critchlow S., Davies G., Goodwin L., Hassall G., Greenwood R., Holdgate G. A., Mrosek M., Norman R. A., Pearson S., Tart J., Tucker J. A., Vogtherr M., Whittaker D., Wingfield J., Winter J. and Hudson K. (2012). Design and synthesis of novel lactate dehydrogenase A inhibitors by fragment-based lead generation. *Journal of Medicinal Chemistry*.;55(7):3285-306.

83. Wen, X.-D., Wang, C.-Z., Yu, C., Zhao, L., Zhang, Z., Matin, A., ... Yuan, C.-S. (2014). *Panax notoginseng* attenuates experimental colitis in AOM/DSS mouse model. *Phytotherapy Research*: PTR, 28(6), 892–898. <http://doi.org/10.1002/ptr.5066>
84. Xu, X., Ye, L., Araki, K., & Ahmed, R. (2012). mTOR, linking metabolism and immunity. *Seminars in Immunology*, 24(6), 429–435. doi:10.1016/j.smim.2012.12.005
85. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1845(1), 84-89. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.002
86. Yashiro M. (2014) Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. Nov 28;20(44):16389-97. doi: 10.3748/wjg.v20.i44.16389.
87. Zhang, H., Lei, Y., Yuan, P., Li, L., Luo, C., Gao, R., ... Sun, J. (2014). ROS-Mediated Autophagy Induced by Dysregulation of Lipid Metabolism Plays a Protective Role in Colorectal Cancer Cells Treated with Gambogic Acid. *PLoS ONE*, 9(5), e96418. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0096418>
88. Zhang, J., Han, C., & Wu, T. (2012). MicroRNA-26a Promotes Cholangiocarcinoma Growth by Activating β -catenin. *Gastroenterology*, 143(1), 246–56.e8. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.045>