

VNIVER&DAD NACIONAL AVPN°MA DE MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

SUPRESIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL POR UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO BASADO EN LA INHIBICIÓN DE mTOR Y LA GLUCÓLISIS AEROBIA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ROCÍO IZAMARY DELGADO WALDO

DIRECTORA DE TESIS: M. EN B.E. VERÓNICA GARCÍA CASTILLO LOS REYES IZTACALA. EDO. DE MÉXICO, 2016





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. La vida no se mide por el número de respiraciones que tomamos sino por los momentos que nos hacen contener la respiración

> No se puede defender lo que no se ama, Y no se ama lo que no se conoce

Drive away and try to keep smiling. Get a Little rock and roll on the radio and go towards all the life there is with all the courage you can find and all the belief you can muster. Be true, be brave, stand. All the rest is darkness. — Stephen King, IT

Dedicatoria

Amis padres

Por ser el mejor ejemplo y mi mayor

inspiración,



A mis queridos padres, no hay suficientes palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, por darme todo, su compañía, amor, esfuerzo, sacrificio, por ayudarme a crecer día con día, por enseñarme a luchar con toda el alma sin rendirme y por alentarme a que continuara mis estudios. Hoy que concluyo mis estudios profesionales, me lleno de orgullo y siento que ese mismo orgullo está dentro de ellos. Es un privilegio tenerlos como padres.

A mi "**Alma mater**" la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y a mi querida carrera de Biología, por haberme acogido durante estos años de estudio para mi formación profesional y personal, en cuyas aulas quedan recuerdos de sacrificio, esfuerzo y empeño, logrando así mi sueño de ser una profesional en las Ciencias Biológicas.

A Arely, Paulina, la "Araña" y a Mauricio, por ser los mejores amigos que he tenido, que han estado incondicionalmente conmigo en los momentos más difíciles, y sobre todo por brindarme su amistad sincera todos estos años.

A David por ser el mejor amigo que me acompañó casi toda la carrera y aunque al principio lo traté mal, hoy es una de las personas más importantes en mi vida, ya que sin él no hubiera conocido a otro de mis mejores amigos de la carrera; Marcos. A ellos dos les agradezco demasiado por aguantarme, solaparme, cuidarme, explicarme lo que no entendía, enseñarme a jugar "wears of war", alegrarme diario con sus chistes guarros, compartir tantos momentos inolvidables en las prácticas de campo y que a pesar de los chismes, fuimos los únicos que siempre contamos el uno con el otro y no nos dejamos llevar por lo que otros decían. ¡Los amo amigos!

A mis amigos del "Labo n"; particularmente a Rebeca mi "Sensei" que me enseñó muchas cosas que no entendía y por ser mi confidente en el cuarto de cultivo, a "Darks" por aguantar cada cosa que hago (bloquear su teléfono 25 años), a Joss que aunque es el que más me molesta hasta el cansancio, lo quiero y lo admiro por todo lo que he aprendido de él, a Osvaldo por ser un buen amigo, a mis amigas Alexia y Sandrita que a pesar de que me abandonaron las quiero mucho. Que más que compañeros, han llegado a ser mi familia por compartir muchas cosas con cada uno.

A mi Charly Groserío, aunque al principio le caía súper mal, después fue uno de mis mejores amigos, me ayudó en todo momento, me enseñó a hacer los 90º de la chela, el submarino, la pirámide y me invitaba cada semana al "clande". Después de todos los momentos juntos, ahora tiene un lugar muy especial en mi corazón, por escucharme, por tenerme paciencia, por preocuparse por mí, por estar conmigo, por saber que decirme, por ser mi luz cuando me apago, Te amo! 💝

A mi tutora y maestra Verónica García, que me aguantó 2 años en el Lab sin correrme a pesar de que casi diario la hacía enojar, me dio su confianza me enseñó todo lo que sabía y me tuvo paciencia para hacer de mí una persona responsable.

Al Doctor Eduardo, que más que un tutor ha sido un gran amigo, que me ayudó a mejorar en este campo de investigación, y por haber creado de mi un "monstruo" en Ilustrator.

Y un especial agradecimiento al Doctor Carlos y la Doctora Nadia, por abrirme las puertas en su grupo de investigación y por seguir apoyándome para mi ingreso al posgrado.



Fracias...

ÍNDICE

1.	Resumen					
2.	. Introducción					
2	2.1		8			
	2.1.1	1 Factores de Riesgo	10			
	2.1.2	2 Incidencia y Mortalidad	10			
	2.1.3	3 Características Distintivas del Cáncer	11			
2	2.2	CÁNCER DE MAMA	12			
	2.2.1	1 A NATOMÍA DE LA MAMA	13			
	2.2.2	2 Subtipos de Cáncer de mama	16			
	2.2.3	3 Pruebas de diagnóstico	18			
	2.2.4	4 TERAPIAS ACTUALES PARA EL CAMA TN	19			
2	2.3	BLANCOS TERAPÉUTICOS POTENCIALES PARA EL CAMA TN	20			
	2.3.1	1 Metabolismo del cáncer	20			
	2.3.2	2 mTOR	24			
	2.3.3	3 Autofagia	26			
	2.3.4	4 Apoptosis	29			
2.4 PROPUESTA DE TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS						
	2.4.1	1 Doxorrubicina	31			
	2.4.2	2 Metformina	33			
	2.4.3	3 Oxamato de sodio	34			
3.	Justi		35			



4.	Ηιρά	ÓTESIS	36		
5.	Obj	ETIVOS	36		
6.	MAI	ierial y Métodos	. 37		
6	.1	CULTIVO CELULAR	37		
6	.2	DETERMINACIÓN DE LA IC ₅₀ DE LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231	37		
6	.3		39		
6	.4	ANÁLISIS DE MUERTE CELULAR	. 40		
6	.5	ENSAYO IN VIVO	. 42		
7.	Resu	JLTADOS	44		
7	' .1	Concentración Inhibitoria 50 de los fármacos.	. 44		
7	.2	Formación de colonias	. 47		
7	.3	TIPO DE MUERTE CELULAR	49		
7	.4	ENSAYO IN VIVO	. 53		
8.	Disc	cusión	. 55		
9.	Cor	NCLUSIÓN	. 62		
10.	10. Referencias				



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Progresión del cáncer
FIGURA 2: INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER
Figura 3: "Hallmarks del cáncer" 12
FIGURA 4: MORTALIDAD DEL CÁNCER DE MAMA Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO EN MÉXICO
FIGURA 5: ESTRUCTURA BÁSICA DE LA MAMA14
Figura 6: Fenotipos del cáncer de mama17
Figura 7: Procesos de obtención de energía entre las células normales y células
TUMORALES
FIGURA 8: PROCESO DE REGULACIÓN DE AUTOFAGIA
FIGURA 9: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA DOXORRUBICINA: C27H29NO11 (SIGMA ALDRICH)
FIGURA 10: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA METFORMINA: C4H11N5 (SIGMA ALDRICH)
FIGURA 11: ESTRUCTURA QUÍMICA DEL OXAMATO DE SODIO: C2H2NNAO3 (SIGMA ALDRICH) 35
Figura 12. Concentración Inhibitoria 50
Figura 13: Concentración Inhibitoria 50 46
Figura 15: Imágenes representativas de experimentos independientes del ensayo
CLONOGÉNICO
FIGURA 14: GRÁFICA DEL ENSAYO CLONOGÉNICO EN CÉLULAS MDA-MB-231 48
Figura 16. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo en células MDA-MB-
231
Figura 17. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo en células MDA-MB-
231
FIGURA 18: GRAFICA DEL VOLUMEN DEL TUMOR DE LOS TRATAMIENTOS ESTABLECIDOS
FIGURA 19: IMÁGENES DIGITALES DEL VOLUMEN DEL TUMOR DE LOS TRATAMIENTOS ESTABLECIDOS. 54



ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla 1: Grupos experimentales, concentraciones y tiempo de exposición de los	
FÁRMACOS PARA DETERMINAR LAS IC 50	39
Tabla 2: Grupos experimentales, concentraciones y tiempo de exposición para	
DETERMINAR LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE ENSAYO CLONOGÉNICO	40
TABLA 3: GRUPOS EXPERIMENTALES, CONCENTRACIONES Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN PARA ANALIZAR	ł
EL TIPO DE MUERTE CELULAR	12
TABLA 4: GRUPOS EXPERIMENTALES Y DOSIS DE LOS TRATAMIENTOS PARA LA INOCULACIÓN DE LOS	
RATONES	43



1. RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa) es un problema de salud pública a nivel mundial, ubicándose en el primer lugar de mortalidad e incidencia, con 23 764 nuevos casos y 6 591 muertes en mujeres calculados para el 2015.

El CaMa es una enfermedad heterogénea que comprende varios subtipos entre los que se encuentran el luminal A, luminal B, HER-2+ y basal o triple negativo (CaMa TN), este último fenotipo se caracteriza por ser el más agresivo y de peor pronóstico para quien lo padece; actualmente no existe una terapia efectiva para este subtipo tumoral.

Investigaciones anteriores han demostrado que la progresión del CaMa y otros tipos de cáncer, probablemente estén asociados con el metabolismo energético alterado; ésta alteración metabólica juega un papel importante en la progresión del cáncer, ya que le permite a la célula proliferar velozmente y mantener una fuente constante de energía. Con base en lo anterior, en este trabajo se pretendió emplear una terapia farmacológica que incida sobre las vías de generación de energía de la célula tumoral: Metformina y Oxamato de sodio (Fosforilación oxidativa y glucólisis respectivamente) en combinación con la terapia actual para el CaMa TN; la Doxorrubicina.

Los resultados mostraron que la triple terapia resultó menos tóxica e inhibe la proliferación y el crecimiento celular en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los fármacos individuales y en combinación mediante el ensayo colorimétrico cristal violeta; observando que el efecto de las terapias individuales y en combinación sobre la inhibición de la proliferación celular es dependiente de la dosis y del tiempo. Para evaluar si los tratamientos inducen apoptosis en la línea celular de CaMa TN se empleó la técnica de doble marcaje Anexina V/IP; observando que la triple terapia es de toxicidad baja al inducir principalmente muerte por apoptosis a partir de las 24 horas, éste efecto se mantuvo hasta las 72 h.



Se realizaron ensayos de formación de colonias, obteniendo una reducción las mismas con el 21.15% en las células expuestas a la triple terapia en comparación de las células sin tratamiento (control).

En los ensayos *in vivo*, se inhibió de manera considerable la masa tumoral a los 9 días de tratamiento; mientras que con las terapias solas y demás combinaciones no se observó un efecto favorable sobre la inhibición del crecimiento tumoral.

Con estos resultados el presente trabajo nos muestra que el tratamiento con Metformina y Oxamato inhibidores de rutas metabólicas tuvieron un mejor efecto en combinación con Doxorrubicina tanto *in vitro* como *in vivo* reduciendo la toxicidad en células MDA-MB-231 de CaMa TN, proponiéndola como una terapia efectiva y con baja toxicidad que tiene sus efectos sobre la inhibición de las vías de generación de energía de la célula tumoral.

Palabras clave. Cáncer de Mama Triple Negativo, metabolismo tumoral (Efecto Warburg), Metformina, Oxamato de sodio y Doxorrubicina



2. INTRODUCCIÓN

2.1 CÁNCER

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la adquisición progresiva de alteraciones, eventos o características que permitan a las células tumorales adaptarse al entorno y proliferar. Estos eventos van desde la acumulación de modificaciones epigenéticas (Choi y Lee, 2013), hasta alteraciones genéticas, que provocan un cambio en genes supresores de tumores y activación de oncogenes para desencadenar el fenotipo tumoral (Wu y Morris, 2001). Sin embargo se ha demostrado que la alteración de un gen no es suficiente para la proliferación del cáncer (Knudson, 2001), por lo que es fundamental que exista una alta tasa de mutaciones (Loeb et al., 2003).

Estas alteraciones moleculares se desarrollan en tres etapas: La iniciación, promoción o establecimiento y progresión de la célula (Figura 1). La iniciación es un proceso en el que se incluye la incorporación, distribución y transporte de un agente cancerígeno a órganos y tejidos para su activación metabólica y posterior interacción con el DNA (Ácido desoxirribonucleico) generando daño genotóxico (Pan et al., 2011). Durante la iniciación y progresión del cáncer la inestabilidad genómica provocada por el agente cancerígeno juega un papel fundamental que puede manifestarse genéticamente en varios niveles que van desde cambios en la secuencia del DNA hasta cambios estructurales a nivel cromosómico (Ferguson et al., 2015).





Figura 1: Progresión del cáncer.

De izquierda a derecha, se muestra la progresión del cáncer en las etapas de iniciación, promoción, y progresión, en donde se encuentran desregulados diferentes procesos (Tomado y modificado de Min-Hsiung et al., 2011).

En el proceso de iniciación es importante la regulación de la proliferación celular, así como la inhibición de la apoptosis puesto que de esta forma se evita la transferencia de las mutaciones y la adquisición de un fenotipo tumoral. La proliferación está mediada por la actividad de las CDK (cinasas dependientes de ciclina) que requieren subunidades reguladoras conocidas como ciclinas. Las ciclinas se sintetizan y se degradan en diferentes etapas del ciclo celular (Lim y Kaldis, 2013). Hay tres CDK's involucradas en interfase (CDK2, CDK4 y CDK6); una CDK en mitosis (CDK1, también conocida como proteína de control de la división celular) y diez ciclinas que pertenecen a cuatro clases diferentes (A, B, D y E) (Deshpande et al., 2005). Las mutaciones asociadas a cáncer, con frecuencia desregulan los complejos de CDK-ciclina, dando como resultado una continua



proliferación o una progresión del ciclo celular, inhibiendo procesos de muerte celular programada como apoptosis (Malumbres y Barbacid, 2009).

Finalmente la etapa de progresión implica la conversión gradual de las células tumorales en células invasoras; iniciando con la angiogénesis que conduce al aumento del potencial metastásico (Pan et al., 2011). La metástasis es la etapa final de una célula tumoral, la cual implica la difusión de células de un tumor primario a órganos distantes con el objetivo de formar un tumor secundario (Valastyan y Weinberg, 2011).

2.1.1 FACTORES DE RIESGO

Existen diversos factores que están implicados en la patogénesis del cáncer, tales como: mala alimentación, consumo de tabaco y/o bebidas alcohólicas (Stewart y Wild, 2014), exposición a carcinógenos y mutaciones genéticas hereditarias (de Vogel et al., 2005), entre otras.

2.1.2 INCIDENCIA Y MORTALIDAD

De acuerdo a la International Agency for Research on Cancer (IARC), a nivel mundial esta enfermedad es una de las primeras causas de muerte, ya que se ha reportado una incidencia de 14.1 millones de nuevos casos, y 8.2 millones de muertes al año en ambos sexos. Entre los tipos de cáncer que causan un mayor número de muertes en ambos sexos anuales son: pulmón, hígado, estómago, colon y mama (Ferlay et al., 2015) (Figura 2).





Figura 2: Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer. En ambos sexos a nivel mundial (Tasa por cada 100,000 personas) (Tomada y modificada de Ferlay et al, 2015)

2.1.3 CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER

En el 2000 Hanahan y Weinberg establecieron características distintivas o "hallmarks" que adquieren las células normales para la progresión a una célula tumoral (Figura 3). Entre las cuales se encuentran: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento y de apoptosis, aumento del potencial replicativo, angiogénesis y metástasis. Posteriormente se establecieron características emergentes como inestabilidad genómica, evasión de la respuesta inmune, inflamación continua y desregulación del metabolismo energético, siendo esta última una característica distintiva en la mayoría de los tipos de cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

Es por eso que hoy en día un gran número de estudios se enfocan en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento que incidan sobre las vías de



generación de energía, así como en el uso de terapias combinatorias que puedan bloquear de manera simultánea múltiples blancos involucrados en procesos biológicos importantes para la célula tumoral, ya que las terapias actuales que se utilizan en pacientes con cáncer consisten en cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, los agentes utilizados en la quimioterapia provocan efectos secundarios como, radio-resistencia y citotoxicidad (Anshushaug et al., 2015).



Figura 3: "Hallmarks del cáncer". Características distintivas adquiridas para la progresión de una célula normal a una célula tumoral (Tomado y modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2 CÁNCER DE MAMA

El CaMa es una enfermedad heterogénea que se caracteriza por la diferencia en las alteraciones moleculares, la respuesta a la terapia y la susceptibilidad de los pacientes. Hay diversos factores implicados en la patogénesis del CaMa, tales como la edad de la menarquía, y menopausia, edad del primer embarazo, y predisposición genética (Chávarri-Guerra



et al., 2012). Este tipo de cáncer, es el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres en todo el mundo con 1.67 millones de casos de incidencia cada año; (Ferlay et al., 2015) (Figura 2). Ocurriendo principalmente en mujeres de 15 a 39 años (Keegan et al., 2012).

En México desde el 2006 la mortalidad por CaMa, ha ido en aumento, desplazando en el 2005 al cáncer cervicouterino (CaCu); pasando de ocupar el segundo lugar en incidencia y mortalidad a ocupar el primer lugar respectivamente (Figura 4) (Chávarri-Guerra et al., 2012). Se previó para el 2015 un estimado de 23 764 nuevos casos y 6 591 muertes en por CaMa (Villarreal-Garza et al., 2015). Una de las probables razones de estos altos índices es el limitado acceso a servicios médicos especializados en zonas de escasos recursos como el sur de México, así como la falta de información (Farmer et al., 2010).



Figura 4: Mortalidad del CaMa y CaCu en México. Desde 1955 hasta el 2010 (Tomada y modificada de Chávarri-Guerra et al., 2012)

2.2.1 ANATOMÍA DE LA MAMA

La mama es un tejido cuya función principal es la síntesis y secreción de la leche, se encuentra más desarrollado en mujeres a partir de la pubertad y



se localiza en la fascia pectoral profunda que cubre el músculo pectoral mayor. Contiene una red ramificada de conductos y lóbulos embebidos en una matriz de soporte de tejido conectivo y grasa (Ellis y Mahadevan, 2013).

Cada mama se compone principalmente de estructuras externas e internas; las externas son el pezón y la areola, mientras que las internas se componen principalmente de tejido adiposo, tejido conectivo, conductos, y glándulas mamarias. Las glándulas mamarias contienen de 15-25 conductos lactíferos localizados en el pezón, estos se ramifican en ductos más pequeños y terminan en la unidad lobular ductal terminal (lóbulo) que constan de un ducto terminal y varios ductulos (o acinos) (Farshid, 2014). Los ductos y ductulos están revestidos por una capa interna de células epiteliales cúbicas a columnares y una capa externa de células mioepiteliales (Figura 5) (Moumen et al., 2011).



Figura 5: Estructura básica de la mama.

Se muestran la piel, pezón, areola, tejido graso, conectivo y la glándula mamaria, que contiene 15-25 conductos lactíferos localizados en el pezón. Estos se ramifican en ductos más pequeños y terminan en la unidad lobular ductal terminal (lóbulo), que está compuesta por un ducto terminal y varios pequeños ductulos (o acinos). Los ductos y ductulos están revestidos por una capa interna de células epiteliales cúbicas a columnares y una capa externa de células mioepiteliales.



El desarrollo de la mama ocurre en tres etapas distintas: embrionaria, pubertad y adulta (Gjorevski y Nelson, 2011). La primera comienza durante la gestación en la formación de placas que originan el ectodermo (placodas) que se regulan por interacciones epitelio-mesenquimal y se invaginan en el mesénquima subyacente para producir la estructura rudimentaria ductal de la glándula mamaria (Macias y Hinck, 2012). Después del nacimiento la glándula rudimentaria entra en una fase de quiescencia morfogenética (Gjorevski y Nelson, 2011).

Durante la pubertad la morfología, diferenciación y crecimiento de estas células están controladas por factores de crecimiento y hormonas ováricas de crecimiento como estrógeno (Brisken y O'Malley, 2010) para dar origen a las conductos ductales que después de su elongación, bifurcación y ramificación forman una estructura similar a un "árbol" llamada unidad del conducto lobular, compuesta de epitelio mamario (Macias y Hinck, 2012). El epitelio mamario se compone de dos capas celulares: luminales y basales mioepiteliales; (productoras y excretoras de leche durante la lactancia) (Gudjonsson et al., 2005).

Finalmente en la etapa adulta durante el embarazo el desarrollo se regula por la acción de progesterona (que inducen la proliferación y la ramificación de los conductos) y prolactina (hormonas esenciales para el desarrollo y homeostasis de la mama) generando los alveolos para la secreción de leche (Tanos et al., 2012).

Los receptores de progesterona y de estrógeno se expresan principalmente en células luminales mientras que las células basales no expresan estos receptores. Estas características dan lugar a diferentes fenotipos celulares de CaMa (Gudjonsson et al., 2005).



2.2.2 SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA

El CaMa se origina en las células epiteliales de la glándula mamaria normal. Los conductos están revestidos con células epiteliales luminales, que dan lugar a la mayoría de los tipos de cáncer de mama (Zhang et al., 2014). El CaMa comprende varios subtipos con características biológicas distintas, estas incluyen el tamaño del tumor, grado de proliferación, diseminación linfovascular, grado histológico, y principalmente el estado de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal-2 (HER-2); por lo que la terapia es dependiente del fenotipo tumoral.

Los fenotipos tumorales de CaMa se han clasificado de acuerdo a su patrón de expresión de genes y a su grado histológico. En el 2010 Perou y colaboradores clasificaron los fenotipos de CaMa en Luminal A, Luminal B, HER2 positivo (HER2+) y triple negativo (Figura 6).



	Luminal	Basoluminal		Basal	
Sutipos moleculares	Luminal A	Luminal B	HER-2	Triple Negativo	
Porcentaje de Incidencia	50-60%	20-30%	15-20%	10-20%	
Grado Molecular	Grado I Lobular invasivo	Grado III		Grado III Infiltrado ductual medular	
Expresión de Receptores	RE+, RP+	RE-/+ ,RP+ ,HER-/+	RE-, RP-, HER-2+	RE-,RP-,HER-	
Terapias	Tamoxifen Inhibidores de aromatasa	Quimioterapia Trastuzumab Lapatanib		Quimioteparia Terapia antiangiogenica	

Figura 6: Fenotipos del CaMa.

Se observa el porcentaje de incidencia para cada subtipo de CaMa, así como la expresión de los receptores, el grado histológico, pronóstico y el tipo de tratamiento

El fenotipo Luminal A, representa el subtipo más común y comprende del 50-60% de los tipos de CaMa. Se caracteriza por la presencia de RE y RP pero con ausencia de HER-2. Se encuentran con células diferenciadas y se desarrolla en los lóbulos terminales. Las pacientes con este subtipo de cáncer tienen buen pronóstico de sobrevivencia y la tasa de recurrencia es menor (10%) que en los otros subtipos (Yersal y Barutca, 2014).

El fenotipo luminal B representa del 20-30% de los subtipos de CaMa, se caracteriza por la ausencia de RP y HER-2 positivo/negativo con presencia de RE; es más agresivo y tiene una expresión mayor de KI67 que el luminal A. Presenta baja respuesta a la terapia hormonal y alta tasa proliferativa, se desarrolla en los lóbulos terminales, sin embargo el pronóstico de sobrevivencia para los pacientes que lo padecen es menor a diferencia del subtipo luminal A; presentando una tasa de recurrencia del 20% (Creighton, 2012).



El subtipo HER2 positivo, representa del 15-20% de los subtipos de CaMa, se caracteriza por una alta expresión del gen HER-2 positivo y otros genes asociados a esta vía; es altamente proliferativo, con mal pronóstico para quien lo desarrolla. Su tasa de recurrencia es más alta (60%) que los subtipos luminales A y B (Gutierrez y Schiff, 2011).

Para los subtipos de CaMa que presentan al menos un receptor, se emplean diversas terapias hormonales, como la endocrina (inhibición de hormonas): el tamoxifeno que es un inhibidor selectivo del RE y trastuzumab se dirige al dominio extracelular de HER2, disminuyendo su actividad (Dent et al., 2007).

El último subtipo, caracterizado por la ausencia de RE, RP y HER-2, se conoce como el fenotipo Basal (basal like) o Triple Negativo (TN). Este subtipo es altamente proliferativo, debido a la perdida de la función de la proteína del Retinoblastona *Rb1* (supresor de tumores que regula el ciclo celular) y mutaciones en *p53*, que se encuentra desregulado no sólo en CaMa TN, sino en otros tipos de cáncer. Así mismo, en el CaMa TN se han encontrado mutaciones en *BRCA1* (Breast Cancer 1) y un alto grado de aneuploidías, tales como cambios cromosómicos, translocaciones, y pérdidas de fragmentos de DNA (Perou, 2010). Este subtipo representa el 10-20% de los fenotipos de CaMa. Es el fenotipo más agresivo y de peor pronóstico para quien lo padece (Chen y Russo, 2009) (Figura 6).

2.2.3 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

Para lograr la detección temprana del CaMa, la OMS (Organización mundial de la Salud) promueve el diagnostico a través de diferentes programas, los cuales incluyen, autoexploración, examen clínico de los senos, y finalmente la mamografía (IARC, 2012). Además, en México, desde el año 2002, existe una norma oficial para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y seguimiento epidemiológico, del CaMa, que fue



actualizada en el 2011 (Norma Oficial Mexica NOM 041-SSA2-2011) (Ortega-Olvera et al., 2016). En donde se menciona que la promoción de pruebas de tamizaje en mama debe incluir un examen de los senos mensualmente, con el objetivo de permitir la detección de anormalidades en el tejido mamario. De acuerdo a la Fundación Nacional de Cáncer de Mama, se debe de realizar éste chequeo en mujeres mayores de 20 años cada mes, después del periodo menstrual cuando las mamas tienen mayor sensibilidad y examen clínico a partir de los 25 años. Sin embargo, esta práctica se ha asociado con un aumento en falsos positivos y por lo tanto es inespecífica (Elmore et al., 2005). La mamografía para la detección de CaMa comprende la captura de imágenes tomadas con rayos X, se recomienda hacer una cada año, a partir de los 40 años. Sin embargo, la mamografía también tiene baja sensibilidad, particularmente en mujeres con tejido denso (Nam et al., 2015) (Ortega-Olvera et al., 2016).

2.2.4 TERAPIAS ACTUALES PARA EL CaMa TN

Actualmente no existe una terapia efectiva para el CaMa TN, sin embargo se utilizan agentes quimioterapéuticos cuando hay una alta tasa de respuesta. La Doxorrubicina (Dox) clasificado como inhibidor de la topoisomerasa 2 (TOPII), es el más utilizado en la clínica para este fenotipo tumoral, sin embargo, se utilizan otros agentes quimioterapéuticos agrupados en cinco clases y basadas en su mecanismo de acción como: agentes alquilantes, inductores de aneuplidía, inhibidores de TOPII (antraciclinas), antimetabolitos y radiomimeticos (Meirow y Nugent, 2001). Todos ellos, incluida Dox, muestran tasas de respuesta bajas (10-30% disminución del tumor, en algunos casos). Debido a la baja respuesta del empleo de los fármacos de manera individual, actualmente estos agentes quimioterapéuticos son empleados en combinación; puesto que se ha observado que independiente del fenotipo de CaMa la tasa de respuesta



mejora y en algunos casos disminuye los efectos secundarios (Brouckaert et al., 2012; Yardley, 2013).

2.3 BLANCOS TERAPÉUTICOS POTENCIALES PARA EL CAMA TN

Hasta hace poco se ha retomado el interés por el metabolismo aberrante de la célula tumoral, viendo al cáncer como una enfermedad metabólica y no genética. Estudios recientes han demostrado que la inhibición del metabolismo celular es un blanco potencial para el desarrollo de terapias anticancerígenas, debido a que el metabolismo aberrante de la célula tumoral es una característica esencial en la mayoría de las células cancerígenas, la cual se caracteriza por tener una deficiencia en la fosforilación oxidativa y altas tasas glucolíticas con el objetivo de generar ATP (adenosin trifosfato) para mantener altas tasas proliferativas; lo que conlleva a la activación de diversas vías de señalización, como la vía mTOR (mamalian Target of Rapamicin) otro blanco terapéutico potencial necesario para el desarrollo de la tumorigénesis a través de la biosíntesis de macromoléculas como proteínas y lípidos; así como también la inhibición de procesos de muerte celular como autofagia y apoptosis; permitiendo a la célula proliferar de manera indiscriminada (Demetrius et al., 2010).

2.3.1 METABOLISMO DEL CÁNCER

Es bien sabido que todas las células diferenciadas en condiciones normales, dependen de la glucólisis para la obtención de energía, la glucosa se metaboliza en condiciones aeróbicas a través de 10 reacciones enzimáticas, dando como producto piruvato, que entra en la mitocondria para oxidarlo a través de la fosforilación oxidativa (FOSOX). Ya que se requiere oxígeno como aceptor final de la cadena transportadora de electrones para oxidar completamente la glucosa y así producir en



promedio 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Sin embargo, si hay una disminución de oxígeno (hipoxia), las células mediante glucólisis anaerobia, redirigen el piruvato generado por glucólisis a la lactato deshidrogenasa (LDH), para la producción de lactato. Así, permiten que continúe la glucólisis por la conversión de NADH a NAD+ (dinucleótido de nicotinamida adenina), teniendo como resultado una producción de ATP mínima, comparada con la FOSOX (Berg et al., 2002).

En 1924, el Doctor Otto Warburg reconoció diferencias entre la regulación de la energía en células diferenciadas normales y células cancerosas. Warburg analizó la FOSOX y la glucólisis en diferentes tejidos de células normales y cancerosas, observando dos características particulares: glucólisis aerobia y sobreexpresión de Lactato deshidrogenasa A (LDH-A) que lleva a una producción de lactato elevada, la cual tiende a ser particularmente alta en tumores agresivos en comparación con los tumores benignos y tejidos normales (Demetrius et al., 2010).

Estas observaciones llevaron a Warburg a proponer la deficiencia en la FOSOX y la glucólisis elevada como una probable causa para el desarrollo del cáncer. Las células tumorales reprograman el metabolismo energético para satisfacer la concentración de nutrientes esenciales como la glucosa, la glutamina y el oxígeno para favorecer la proliferación celular (Cairns et al., 2011).

A éste proceso metabólico se le conoce como "efecto Warburg" o glucólisis aerobia, que consiste en un cambio en la obtención de ATP a través de la degradación de glucosa a lactato en presencia de oxígeno, a través de la enzima reversible LDHA, que se compone de dos subunidades: la A y B, que se organizan en las isoformas: LDH1-B4 (conocida como LDH-B), LDH2-B3A, LDH3-b2a2, LDH4-BA3 y LDH5-A4 (conocido como LDH-A) Esta enzima



convierte el piruvato en lactato y oxida la forma reducida de NADH a NAD+ (Thornburg et al., 2008; Miskimins et al., 2014b) y no por fosforilación oxidativa, incluso en concentraciones normales de oxígeno (Wu y Zhao, 2013).

Aunque la producción de ATP por la glucólisis aerobia es más rápida que la FOSOX es menos eficiente, ya que genera 4 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Figura 7). Sin embargo, este cambio metabólico crea un ambiente ácido en la célula, lo cual promueve la activación de oncogenes como HIF-1 (factor inducible por hipoxia 1 α) y c-MYC (oncogén viral de la mielocitomatosis aviar), que promueven la transcripción de genes que codifican GLUT (transportadores de glucosa) y otras enzimas glucolíticas como, HKI y II (hexocinasa I y II) PFK-1 y 2 (fosfofructucinasa 1-2), PDH (Piruvato deshidrogenasa), LDHA y GAPDH (Gliceraldehido 3fosfodeshidrogenasa), promoviendo el flujo glucolítico, disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula y evitando procesos de muerte celular. Además la activación de HIF-1 aumenta la captación de glucosa en las células cancerosas y regula positivamente a la LDH-A (Stubbs y Griffiths, 2010). Este cambio exige que las células tumorales tengan una captación mayor de glucosa para satisfacer sus necesidades de crecimiento y proliferación (Cairns et al., 2011).





Figura 7: Procesos de obtención de energía entre las células normales y células tumorales. (Tomado y modificado de Vander et al., 2009)

Existen diversos mecanismos moleculares que alteran el metabolismo celular, para la generación de ATP de manera rápida y un aumento en la biosíntesis de macromoléculas (hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos). Uno de esos mecanismos es la activación de la vía de señalización de PI3K, que activa rio abajo a AKT1 y estimula la glucólisis mediante la activación de enzimas glucolíticas clave como la HK y PFK-2 y el aumento de la expresión y translocación a la membrana de los transportadores de glucosa. Además, AKT regula la vía de señalización de la cinasa mTOR la cual a su vez, regula indirectamente la traducción del ácido ribonucleico mensajero (RNAm), la biogénesis de ribosomas y la activación de factores de transcripción como HIF-1, incluso bajo condiciones de normoxia (Cairns et al., 2011).

El efecto Warburg promueve la supervivencia celular y el crecimiento celular, donde la captación de glucosa es mayor, permitiendo que la célula promueva el crecimiento aberrante (Courtnay et al., 2015). Y puede ser un blanco terapéutico importante para el desarrollo de agentes que



interrumpan el metabolismo glucolítico y la vía de señalización mTOR de células de CaMa (Miskimins et al., 2014).

2.3.2 mTOR

mTOR es una molécula conocida como blanco de la rapamicina (por sus siglas en inglés mamalian Target of Rapamicin); mTOR es una proteína cinasa serina/treonina que pertenece a la familia de proteínas semejantes a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) e interactúa con varias proteínas para formar el complejo 1 de mTOR (mTORC1) (Laplante y Sabatini, 2012). mTOR controla positivamente procesos como la biosíntesis de proteínas, lípidos, organelos y la inhibición de procesos como la autofagia.

mTORC1 tiene cinco componentes principales: mTOR –que es la subunidad catalítica del complejo–, la proteína reguladora asociada de mTOR (Raptor regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 también conocido como GβL (G protein beta subunit-like), sustrato AKT rico en prolina de 40kDa (PRAS40) y DEPTOR (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) (Laplante y Sabatini, 2009).

mTORC1 es una vía de señalización que integra señales intra y extracelulares, funge como regulador central de la célula, ya que regula positivamente el crecimiento y la proliferación celular controlando la homeostasis celular. Se activa por factores de crecimiento y por la disponibilidad de nutrientes (Martin y Hall, 2005).

El proceso de activación sucede a través de la proteína RAG (RAS-related GTP-binding protein), de la familia de GTPasas pequeñas RAS. Un heterodímero RAG media la translocación de mTORC1 desde el citoplasma a la superficie de los lisosomas, donde se activa Rheb. Una alta relación ATP/AMP activa mTORC1 mediante la prevención de la activación de la



AMPK (proteína cinasa activada por AMP) (Laplante y Sabatini, 2012). Ésta activación promueve eventos importantes como la síntesis de proteínas, la cual se requiere para el crecimiento celular, fosforilando una amplia gama de sustratos, como el eIF4E (factor de iniciación eucariótico 4E), la 4E-BP1 (proteína de unión 1) y el S6K1 (ribosomal S6 cinasa p70 1), los cuales a su vez favorecen la biogénesis de ribosomas mediante la estimulación de la transcripción de RNA ribosomal (RNAr) (Laplante y Sabatini, 2009). Otro evento importante es la síntesis de lípidos que es fundamental para el crecimiento y la proliferación celular; a través de la regulación de SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1) y PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la homeostasis de lípidos y colesterol (Porstmann et al., 2008). Y finalmente la autofagia que es un proceso de sobrevivencia celular o modulador de muerte celular promovido por la vía mTOR. Éste evento se activa cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada y cuando hay una disminución de factores de crecimiento, a través de AMPK que fosforila a TSC2 y RAPTOR, conduciendo a la disminución de la actividad de mTORC1 y así una la promoción de la autofagia (Laplante y Sabatini, 2012) degradando los organelos y complejos protéicos para la obtención de energía (Glick et al., 2010; Jung et al., 2010).

Esta vía de señalización esta desregulada en diversas enfermedades humanas especialmente en varios tipos de cáncer, ya que promueve el desarrollo y progresión del cáncer a través de las señales de factores de crecimiento y nutrientes (Peterson et al., 2009). Por lo que podría ser un blanco terapéutico al inhibir los procesos de crecimiento, proliferación, y promoción de autofagia (Riaz et al., 2012).



2.3.3 AUTOFAGIA

Es un proceso evolutivamente conservado que juega un papel importante para el equilibrio de las fuentes de energía en condiciones críticas del desarrollo y en respuesta a estrés nutricional. La autofagia ocurre a nivel basal en la célula, inducida por la disminución de los nutrientes, así como también en la eliminación de proteínas mal plegadas o agregados celulares; de esta forma elimina organelos dañados como mitocondrias, retículo endoplasmático y peroxisomas. La autofagia además promueve la senescencia celular, evita la inestabilidad genómica y la necrosis. Por esta razón, tiene un papel clave en terapias anticancerígenas (Glick et al., 2010).

En este proceso, los constituyentes citoplasmáticos interactúan con los lisosomas, para la posterior degradación de proteínas y organelos y evitar la progresión de la célula. La autofagia se clasifica en 3 tipos principales: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia (Bhutia et al., 2013) siendo este último, el proceso más importante en la biología del cáncer y sus terapias (Janku et al., 2011)

La macroautofagia se trata de la formación de una vesícula de doble membrana –el autofagosoma– el cual envuelve a los componentes citoplasmáticos y se fusiona con los lisosomas formando el autolisosoma que contiene enzimas hidrolasas para su posterior reciclaje y degradación. Hay más de 30 genes relacionados con la autofagia, siendo los principales los ATG 12, 5, 10, 7, 16, 4, y 3 (ATG por sus siglas en inglés; autophagy-related genes). Éstos son activados por respuestas a estrés como falta de nutrientes y en diferentes fases divididas en iniciación, nucleación, elongación y cierre, fusión, degradación y reciclaje (Glick et al., 2010).



La iniciación se caracteriza por la formación del complejo de ULK, éste se compone de ATG13, FIP200 (ATG17), ATG101 y ULK1, que a su vez activa el complejo de PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) para la elongación de la membrana del autofagosoma que consta de Vps34 (Vesicular protein sorting); Beclin1 (ATG6); ATG14L y p150. Este complejo genera fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) en el sitio de formación del autofagosoma para el reclutamiento de ATG adicionales que median el alargamiento y cierre de la membrana del autofagosoma (Kenific y Debnath, 2015).

El alargamiento y cierre del autofagosoma está controlado por dos vías que conjugan ATG12 a ATG5 y LC3, importante marcador de autofagia (cadena ligera asociada a los microtúbulos 3) (LC3; por sus siglas en ingles light chain 3) (homólogo de mamífero de ATG8) a la fosfatidiletanolamina (PE). Esta conjugación está regulada por ATG12 que se une a ATG7 (enzima de activación parecida a ubiquitina (E1), enseguida ATG10 (enzima de activación parecida a ubiquitina (E2) se une a ATG12, complejo que favorece la unión de ATG12-ATG5, permitiendo la conjugación de ATG16. Este complejo induce la formación de la curvatura del fagoforo; el segundo sistema semejante a la ubiquitina, que desempeña un papel fundamental en la formación de autofagosoma ayuda en el procesamiento de la LC3. La cisteína proteinasa ATG4 (también conocido como autofagina) escinde a LC3 para producir LC3BI, la cual se une a E1 (ATG7) resultando en la activación de LC3B-I. En seguida ATG3, un portador de E2 interactúa con LC3B-I y de esta manera promueve la lipidación, dando lugar a la conjugación de LC3B-II y fosfatidiletanolamina (Bhutia et al., 2013). Finalmente el autofagosoma se fusiona con compartimentos endolisosomales que conducen a la ruptura de cargas por hidrolasas ácidas (Janku et al., 2011) (Figura 8).



Actualmente es controversial si la autofagia funciona como proceso de muerte celular o como mecanismo de sobrevivencia celular (Morselli et al., 2009); existen estudios en donde es necesaria la autofagia para promover el proceso de apoptosis (Suman et al., 2014); lo que sugiere que la autofagia puede funcionar como un proceso supresor de tumores. Hacen falta diversos estudios para elucidar si ambos mecanismos (autofagia y apoptosis) se lleven a cabo de manera independiente o si uno dependa de otro.



Figura 8: Proceso de regulación de autofagia Formación del autofagosoma a través de diferentes complejos, llevando a la fusión y degradación de los componentes citoplasmáticos (Tomado y modificado de Fu et al., 2012)



2.3.4 APOPTOSIS

La apoptosis, otro proceso importante de muerte celular programada; juega un papel importante en el mantenimiento del número de células, contribuyendo a la homeostasis celular, ya que permite la eliminación de células dañadas o con mutaciones principalmente en el supresor de tumores p53. La apoptosis es un programa de muerte celular regulado por la familia de proteínas cistein-aspartato proteasas (caspasas) (de Almagro y Vucic, 2012). Las caspasas se sintetizan como proteínas o zimógenos inactivos, que se activan por escisión a través de otra caspasa y son reguladas a través de dos vías de señalización: la vía extrínseca que es mediada por receptores de muerte, estos receptores pertenecen a un subgrupo de la superfamilia TNFR (factor de necrosis tumoral), que incluye TNFR, Fas y TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor TNF). La activación de estos receptores conduce a la activación de caspasas iniciadoras, como la caspasas 8 y la activación de la caspasa efectora 3, que conlleva a la fragmentación del DNA induciendo muerte celular (Portt et al., 2011). Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial, promueve la activación de proteínas de la familia BH3, que actúan como moléculas pro-apoptóticas, interactuando con las proteínas BCL-2 (linfoma de células B-2; por sus siglas en inglés) y BAX-BAK; este complejo permite la salida de proteínas al espacio intermembranal, tales como el "citocromo c" al citosol, reclutando Apaf-1 y pro-caspasa-9; necesarios para la formación del apoptosoma, complejo que activa la caspasa 9 y que finalmente termina en la escisión de la caspasa 3, culminando en la apoptosis. Sin embargo, existen otras proteínas de la familia BCL-2 (anti-apoptóticas), las cuales secuestran a BH3, impidiendo que interactúen con el complejo BAX-BAK las cuales normalmente se encuentran sobreexpresadas en cáncer (Taylor et al., 2008).



En los últimos años ha sido ampliamente estudiada la función biológica anticancerígena de la autofagia y la apoptosis (Wang et al., 2016). Ya que se ha observado *in vitro* e *in vivo* que al desencadenar ambos procesos de muerte celular se inhibe el crecimiento de células tumorales, así como la disminución del estrés oxidativo. Probablemente a través de la eliminación de los organelos dañados principalmente la mitocondria para evitar que las mitocondrias dañadas produzcan un exceso de especies reactivas de oxígeno con efectos dañinos potenciales para el resto de la célula (Mathew et al., 2009). Es por ello que la inducción farmacológica de muerte celular por autofagia y apoptosis a través de la supresión del metabolismo celular puede servir como una nueva estrategia terapéutica antitumoral.

2.4 PROPUESTA DE TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Recientemente el metabolismo de las células tumorales ha sido un campo prometedor para el desarrollo de nuevas terapias que probablemente puedan ser efectivas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, entre ellos el CaMa TN. En este campo se pretende investigar análogos de moléculas o inhibidores específicos de las vías de generación de energía de la célula tumoral (Jang, Kim, et al., 2013)

Actualmente se busca la evaluación de fármacos ya aprobados por la FDA y el empleo de fármacos ya existentes con actividad antitumoral con distinto fin terapéutico y con menor o nula toxicidad; por lo que se ha propuesto el uso de terapias combinadas que bloqueen simultáneamente diversos blancos terapéuticos para detener la progresión tumoral (Meng et al., 2014).

En nuestro grupo de trabajo se propuso que probablemente la combinación de Metformina-Oxamato de Sodio y Doxorrubicina inciden en las vías de generación de energía de la célula tumoral (vía mTOR y la glucólisis) y la inhibición de la síntesis de ácidos nucléicos; promueven la inhibición de la



proliferación y el crecimiento celular; centrando nuestro interés en la reprogramación del metabolismo de la celular tumoral induciendo procesos de muerte celular como apoptosis y/o autofagia en un modelo *in vitro* e *in vivo* de CaMa TN.

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se demostró *in vivo* e *in vitro* en dos modelos de cáncer, con la triple terapia farmacológica la inhibición del crecimiento tumoral a través de la probable inducción de ambos mecanismos de muerte celular; apoptosis y/o autofagia. Éste proyecto se realizó con la intención de reproducir el modelo anterior *in vitro* e *in vivo*, y de igual manera se trabajó con los fármacos ya mencionados, en su forma individual y en combinación, ya que como se sabe están directamente relacionados con la inhibición de diferentes vías como glucólisis y mTOR. A continuación se describen los mecanismos de acción de cada uno de los fármacos propuestos.

2.4.1 DOXORRUBICINA

La Dox (Figura 9) también denominada adriamicina, pertenece al grupo de las antraciclinas; es el fármaco anticancerígeno comúnmente empleado y aprobado por el Food and Drug Administration –FDA- para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluido el CaMa, ovario (CaOv), próstata (CP) y colorectal (CCR) (Cekanova y Rathore, 2015). Sin embargo su aplicación clínica se ve cada día más limitada debido a su alta toxicidad. Diversos estudios han demostrado que tiene una serie de efectos adversos en tejidos no tumorales como hígado, corazón y riñón; además de generar efectos secundarios como nauseas, vómito, problemas gastrointestinales, alopecia, calvicie, problemas neurológicos y cardiotoxicidad (Carvalho et al., 2009; Thorn et al., 2011). Por otro lado se ha reportado que en el uso clínico los fenotipos tumorales han adquirido resistencia a Dox, por lo que es una de las


principales limitaciones para el tratamiento del cáncer con éxito (Minotti et al., 2004).

Existen diversos mecanismos de acción por las cuales Dox actúa induciendo muerte celular, estas incluyen: la inhibición de la TOPII, la formación de aductos al DNA y el estrés oxidativo (Kumral et al., 2015).

La inhibición de la TOPII se lleva a cabo mediante las TOP, las cuales, son enzimas altamente conservadas y regulan la replicación, transcripción y otros procesos del DNA (Burden y Osheroff, 1998). La Dox se intercala en la molécula del DNA, causando la inhibición de la TOPII durante la replicación del DNA, resultando ruptura del DNA y progresivamente la muerte celular (Yang et al., 2014)

Otro mecanismo por el que actúa Dox es la formación de aductos, es independiente de la TOPII, se lleva a cabo mediante la unión al DNA que contienen pares de bases de Guanina (G) y Citocina (C), generando daño al DNA para inducir muerte celular (Minotti et al., 2004). Finalmente el aumento de los niveles del metabolismo oxidativo, provoca la generación de radicales libres (ROS) que dañan el DNA y las proteínas celulares (Yang et al., 2014).





Figura 9: Estructura química de la Doxorrubicina: C₂₇H₂₉NO₁₁ (Sigma Aldrich). <u>http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1515?lang=es®ion=MX</u> (Consultado y modificado el 27 de Junio 2016).

2.4.2 METFORMINA

Desde los años 50's la Metformina (Met) (Figura 10) se ha empleado como fármaco hipoglucemiante para el tratamiento de Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2); actualmente se utiliza como anticancerígeno. Se ha encontrado que es un fármaco inocuo, seguro y eficaz como monoterapia y en combinación con otros fármacos para algunos tipos de cáncer por sus características antiglucemiantes (Ben et al., 2008; Tomic et al., 2011; Blandino et al., 2012; Zhang et al., 2013; Leone et al., 2014; Miskimins et al., 2014b; Nair et al., 2014; Takahashi et al., 2014).

El mecanismo de acción de Met, está mediado principalmente por el transportador catión orgánico 1 (OCT1), la mayor parte de los efectos de la Met radican en las mitocondrias, disminuyendo la respiración celular por una inhibición específica del complejo de la cadena respiratoria 1 (NADH: oxidorreductasa ubiquinona) (Ben et al., 2008).

Esta inhibición del complejo NADH de la cadena respiratoria induce a la disminución de la energía celular (ATP), activando a la AMPK, un sensor



energético que integra varias vías de señalización, entre ellas la vía LKB1-AMPK; donde LKB1 fosforila y activa AMPK en respuesta al estrés energético. De ésta forma, la inhibición del complejo NADH de la cadena respiratoria juega un papel importante en la inhibición de la proliferación tumoral, a través de cambios en la polaridad celular, el metabolismo energético, la proliferación celular e inducción de la apoptosis o autofagia (Foretz et al., 2014).



Figura 10: Estructura química de la Metformina: C4H11N5 (Sigma Aldrich). <u>http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d150959?lang=es®ion=MX</u> (Consultado y modificado el 27 de Junio 2016)

2.4.3 OXAMATO DE SODIO

El Oxamato de Sodio (Ox) (Figura 11) es un análogo estructural del piruvato y se caracteriza por ser un inhibidor competitivo del sitio activo de la LDH-A. El Ox se desarrolló como agente antipalúdico potencial, debido a que el metabolismo de algunos parásitos depende de la glucólisis anaeróbia, siendo la LDHA un blanco potencial (Penna-Coutinho et al., 2011). Sin embargo es un fármaco que aún no está aprobado por la FDA y se necesitan más estudios para demostrar que es un fármaco seguro (Granchi et al., 2013; Miskimins et al., 2014). Se caracteriza por una capacidad baja de penetración dentro de las células, debido a su estructura química altamente polar (Wong-Baeza et al., 2015).



Sin embargo, en los últimos años se ha utilizado como antitumoral *in vivo* e *in vitro* debido a su relación con el bloqueo de la glucólisis aeróbia y así evitar la conversión de piruvato a lactato en el citosol y la acidosis láctica, fenómeno común en el microambiente tumoral, como lo observado por Miskimins et al., 2014. Se sabe que el Ox suprime el flujo glucolítico y el crecimiento celular, conllevando a la supresión del crecimiento de células tumorales mediante la inhibición de la LDH-A (Thornburg et al., 2008).



Figura 11: Estructura química del Oxamato de Sodio: C₂H₂NNaO₃ (Sigma Aldrich). <u>http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o2751?lang=es®ion=MX</u> (Consultado y modificado el 27 de Junio 2016)

3. JUSTIFICACIÓN

El CaMa TN es un problema de salud pública y constituye una causa importante de mortalidad en nuestro país. En la actualidad existen terapias convencionales como quimioterapia y radioterapia, sin embargo no hay una terapia eficaz y específica para este tipo de cáncer.

Con base en éste escenario metabólico de la célula tumoral, se pueden identificar nuevos blancos terapéuticos que sean una alternativa a la quimioterapia líder. Actualmente se investigan fármacos que incidan sobre diferentes vías de señalización que estén involucrados en procesos de muerte celular como apoptosis y autofagia.



Este trabajo consistió en la inducción de apoptosis y/o autofagia en un modelo *in vitro* e *in vivo* con células MDA-MB-231 de CaMa TN, mediante el tratamiento farmacológico de Metformina y Oxamato de sodio en combinación con Doxorrubicina, con el objetivo de que incida simultáneamente sobre la glucólisis y la vía mTOR, vías de generación de energía importantes para la proliferación y crecimiento de la célula tumoral y así establecer una posible terapia más específica y con baja toxicidad para el tratamiento de esta neoplasia.

4. HIPÓTESIS

La combinación de Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio inducen la inhibición de la proliferación de la célula tumoral en un modelo *in vitro* e *in vivo* de CaMa TN empleando la línea celular MDA-MB-231.

5. OBJETIVOS

General

 Evaluar el efecto del tratamiento farmacológico de Metformina y Oxamato de sodio en combinación con Doxorrubicina en un modelo in vitro e in vivo de CaMa TN.

Particulares

- Determinar las IC₅₀ de los fármacos individuales y en combinación en la línea de CaMa TN MDA-MB-231.
- Determinar el efecto de las terapias individuales y en combinación sobre



la proliferación celular en la línea de CaMa TN MDA-MB-231.

- Determinar el tipo de muerte celular que las terapias individuales y en combinación inducen sobre la línea de CaMa TN MDA-MB-231.
- Evaluar la efectividad de la triple terapia y sus combinaciones farmacológicas en un modelo *in vivo* con xenotransplantes inducidos con la línea de CaMa TN MDA-MB-231.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 CULTIVO CELULAR

Se empleó la línea celular de CaMa TN MDA-MB-231 de la American Type Culture Collection (ATCC) proporcionadas por el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer. Se mantuvieron en cajas de cultivo de 100 x15 mm con medio DMEM/F-12 GIBCO® suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% de la marca CORNING y mantenidas en una incubadora (Thermo Scientific) a 37°C con 5% de CO₂. Todos los ensayos *in vitro* fueron mantenidos bajo estas condiciones.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA IC₅₀ DE LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231

Con el objetivo de determinar la IC₅₀ de los fármacos de manera individual y en combinación se empleó el ensayo colorimétrico Cristal Violeta. Se determinó la densidad celular fundamentada en la capacidad que tiene el cristal violeta de fijarse en los núcleos celulares, por lo cual se establece una relación directa entre el número de células viables y la cantidad de cristal violeta diluido. De esta manera, se obtuvo la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los fármacos en forma individual y en combinación a 4, 24, 48 y 72 horas a diferentes concentraciones, como se muestra en la tabla 1; siguiendo el protocolo descrito por Chiba et al., en 1998. Las células MDA-



MB-231 fueron sembradas en placas de 96 pozos, con una densidad de 1x10⁴ células por pozo, contenidas en 100µl de medio DMEM/F-12. Se utilizaron 5 pozos como control (sin tratamiento) y 2 placas experimentales divididas en los tratamientos ya mencionados. Todas las placas fueron incubadas durante 24 horas para su adherencia. Transcurrido ese tiempo se retiró el medio y fueron expuestas con medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 2% para evitar la competencia entre el exceso de nutrientes y los tratamientos experimentales.

Después de los tiempos establecidos, a las placas se les retiró el medio lavando cuidadosamente con PBS; las células se fijaron con glutaraldehído al 6% y teñidas con cristal violeta a una concentración de 0.5%, durante 10 minutos en agitación; posteriormente se removió cuidadosamente el colorante y la placa fue lavada con agua corriente hasta eliminar el excedente de colorante; finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se añadieron 100µl de ácido acético al 1% para disolver el cristal violeta de los núcleos teñidos.

El número de células viables es directamente proporcional a la cantidad de colorante disuelto. Por lo que se determinó la supervivencia celular a través de la densidad óptica (DO) la cual se midió en un lector de microplacas (EPOCH, Biotek) a 560 nm. La IC₅₀ se determinó a partir de una regresión lineal (R² =0.92) para obtener las gráficas dosis-respuesta gradual con el software GraphPad Prism versión 5.0. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente.



Fármacos	[] Tratamientos	Tiempo de Exposición
Doxorrubicina	0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 μM	
Metformina	10, 15, 20, 25, 30, y 40 mM	
Oxamato de Sodio	5, 10, 15, 20, 25, y 30 mM	
Doxorrubicina/Metformina	0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 µM/ 10, 15, 20, 25, 30, y 40 mM	4, 24, 48, 72 Horas
Doxorrubicina/Oxamato	0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 μM/ 5, 10, 15, 20, 25, y 30 mM	
Oxamato/Metformina	5, 10, 15, 20, 25, y 30 mM/ 10, 15, 20, 25, 30, y 40 mM	
Doxorrubicina/Oxamato/ Metformina	0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 μM/ 5, 10, 15, 20, 25, y 30 mM/ 10, 15, 20, 25, 30, y 40 mM	

Tabla 1: Grupos experimentales, concentraciones y tiempo de exposición de los fármacos para determinar las IC50. Para la línea celular de CaMa TN MDA-MB-231.

6.3 ENSAYO CLONOGÉNICO

Con el objetivo determinar la supervivencia celular *in vitro* basado en la capacidad que tiene una sola célula para crecer en una colonia (Al menos 50 células). Se realizaron pruebas clonogénicas, con base en el protocolo descrito por Franken et al., en el 2006. Para ello, se empleó la línea celular de CaMa TN: MDA-MB-231. Se mantuvieron en placas de 6 pozos con una densidad de 2x10² células en cada pozo en las condiciones ya mencionadas con 24 horas de adherencia. Una vez concluido el tiempo de adherencia, la línea celular fue expuesta a los tratamientos farmacológicos de acuerdo a la tabla 2, con concentraciones de acuerdo a las IC₅₀ obtenidas con base en el número de células expuestas, con un control negativo sin tratamiento. Después de 7 días cuando el control negativo (sin tratamiento) alcanzó aproximadamente 50 colonias, se detuvo el experimento.

Posteriormente, se retiró el medio y las colonias se fijaron con glutaraldehído al 6% y se tiñeron con cristal violeta al 0.5% durante 30 min; posteriormente



se removió cuidadosamente el colorante y la placa fue lavada con agua corriente hasta eliminarlo; finalmente se dejó secar a temperatura ambiente.

Se obtuvieron imágenes digitales de las colonias obtenidas con una cámara Olympus, las cuales fueron contadas con el software de análisis de imágenes: Image J versión 1.49. Los ensayos se realizaron por triplicado y de manera independiente.

Fármacos		Tiempo de exposición
Control (-)	2%	
Doxorrubicina	0.5 µM	
Metformina	25 mM	7 Días
Oxamato de Sodio	15 mM	
Doxorrubicina/Metformina	0.5 µM/ 25 mM	
Doxorrubicina/Oxamato	0.5 µM/ 15 mM	
Oxamato/Metformina	15 mM/ 25 mM	
Doxorrubicina/Oxamato/Metformina	0.5 µM/ 15 mM/ 25 mM	

Tabla 2: Grupos experimentales, concentraciones y tiempo de exposición para determinar la proliferación celular mediante ensayo Clonogénico.

Se establecieron 9 grupos experimentales, control negativo (2% SFB), control positivo (Dox) y los fármacos individuales y en combinación. Para la línea celular de CaMa TN MDA-MB-231.

6.4 ANÁLISIS DE MUERTE CELULAR

Con el objetivo de analizar si la terapia farmacológica induce muerte celular por apoptosis, se realizó el ensayo de citometría de flujo; el cual se fundamenta en la capacidad que tiene la Anexina V y el loduro de Propidio (IP) para unirse a las células en proceso de muerte celular. En la membrana celular interna se encuentra la fosfatidilserina (PS), un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en el interior de la membrana celular. Cuando inicia el proceso de la apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de la membrana. Este proceso puede ser detectado por Anexina V



(glucoproteína dependiente de calcio), la cual se une específicamente a la fosfatidilserina. Las moléculas de Anexina V se marcan con fluoróforos para detectar apoptosis temprana mediante citometría de flujo. Mientras que en apoptosis tardía, cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el DNA fragmentado se encuentra expuesto se emplean agentes intercalantes del DNA, como el loduro de Propidio (IP). A través del kit de Anexina V/IP (GenTex, GTX8559) se determinó el estado de apoptosis de las células expuestas a la terapia farmacológica de acuerdo a la tabla 3, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para ello, se empleó la línea celular de CaMa TN: MDA-MB-231. Se mantuvieron en placas de 6 pozos con una densidad de 5x10⁵ células en cada pozo con las condiciones ya mencionadas y con 24 horas de adherencia.

Una vez concluido el tiempo de adherencia, las líneas celulares fueron expuestas a los tratamientos farmacológicos por 24, 48 y 72 horas (tabla 3); con un control negativo sin tratamiento.

Después del tiempo de exposición de los fármacos en las líneas celulares, las células se tripsinizaron y colectaron por centrifugación, resuspendiéndolas en 250µL de buffer de unión a Anexina V (GTX85591). Se agregaron 2µL de Anexina V y 2µL de IP. Posteriormente se incubaron por 5 min a 4° C en oscuridad. Las células fueron analizadas en un citometro BD FACSCalibur. El conteo las células se determinó a traves del software Cell Pro versión 5.1. Los ensayos se realizaron por triplicado y de manera independiente.



Fármacos	[]Tratamientos	Tiempo de exposición
Control Negativo	Sin tratamiento	
Doxorrubicina	0.5 µM	
Metformina	25 mM	
Oxamato de Sodio	15 mM	24, 48 y 72 Horas
Doxorrubicina/Metformina	0.5 µM/ 25 mM	
Doxorrubicina/Oxamato	0.5 µM/ 15 mM	
Oxamato/Metformina	15 mM/ 25 mM	
Doxorrubicina/Oxamato/Metformina	0.5 μM/ 15 mM/ 25 mM	

Tabla 3: Grupos experimentales, concentraciones y tiempo de exposición para analizar el tipo de muerte celular.

Mediante el ensayo de Anexina V / IP, por medio de citometría de flujo, se establecieron 13 grupos experimentales, control negativo, control positivo, y los fármacos individuales y en combinación. Para la línea celular de CaMa TN MDA-MB-231.

6.5 ENSAYO IN VIVO

Los modelos de ratón son herramientas muy útiles para la comprensión de la biología del tumor, así como los factores implicados en el desarrollo tumoral, tales como hormonas, dieta, UV, radiación y químicos. Una aplicación importante de los modelos de ratón es probar directamente las funciones de los factores ambientales en el desarrollo de tumores, lo cual no es posible hacer en los seres humanos (Cheon, D y Orsulic, S. 2010).

Los ratones Fox1^{nu}/Fox1^{nu} representan un excelente modelo para la investigación en cáncer debido a que son inmunodeficientes. Particularmente los xenotransplantes de células humanas a ratones Fox1^{nu}/ Fox1^{nu} tienen un potencial para la evaluación de terapias y la progresión del cáncer (Morton y Houghton, 2007).

Para observar el efecto de los fármacos en un modelo *in vivo* se emplearon 18 ratones desnudos hembras de la cepa Fox1^{nu}/ Fox1^{nu} de 4 semanas de



edad, los cuales se mantuvieron en el laboratorio de Genómica Funcional (L-11) en la UBIMED (FES-Iztacala; UNAM) a una temperatura y humedad controlada, con fotoperiodos de 12/12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos experimentales tal y como se muestra en la tabla 4. Las dosis de los fármacos que se utilizaron, fueron con base en las IC₅₀'s obtenidas en los ensayos de viabilidad celular.

Para la inducción de los xenotransplantes, los animales fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho de cada ratón con 10x10⁶ células MDA-MB-231, empleando como vehículo 200µL de solución salina (SS). Los ratones inoculados fueron monitoreados y pesados diariamente hasta que la aparición de la masa tumoral alcanzara un volumen no mayor a 3 mm³. La medición de la masa tumoral se realizó con un vernier analógico diario y una vez alcanzado el volumen esperado se inició con la terapia farmacológica vía intraperitoneal (i.p) de acuerdo a los grupos experimentales de la tabla 4, durante 20 días.

Grupos	Tratamientos	Dosis
1	Doxorrubicina	lmg/Kg
2	Doxorrubicina/Oxamato	1mg/kg-15mg/kg
3	Doxorrubicina/Metformina	1mg/kg-30mg/kg
4	Dox/Met/Ox	1mg/kg-30mg/kg-15mg/kg

Tabla 4: Grupos experimentales y dosis de los tratamientos para la inoculación de los ratones

Una vez terminado el tratamiento, se realizó la eutanasia a los ratones por dislocación cervical para la obtención de la masa tumoral, las muestras fueron fijadas en p-formaldehído al 4% durante 24 horas. Cabe mencionar



que a dos ratones del grupo Dox/Met/Ox se les realizó la eutanasia a los 8 días de tratamiento, para posteriores pruebas moleculares.

7. RESULTADOS

7.1 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (IC₅₀) DE LOS FÁRMACOS.

Se observó que los valores de absorbancia (obtenidos mediante el uso del colorante cristal violeta), disminuyeron a medida que se incrementó la concentración y el tiempo de exposición de cada fármaco individual y en combinación. Tal como se muestra en la figura 12, donde se observan los tratamientos individuales, con dosis dependiente del tiempo. Se observa además que con Dox se obtuvo su IC_{50} a una concentración más baja (1µM), 1000 veces menor que los otros tratamientos individuales y en menor tiempo de exposición (4 horas) (Figura 12a). Mientras que la IC_{50} de la Met fue de 25mM y el Ox de 20mM (Figura 12b-c).

En lo que respecta a los tratamientos en combinación, tal como se muestra en la Figura 13, en el caso de las combinaciones con Dox se observa que se potencia su efecto en tiempo de exposición menor a los fármacos (a partir de las 4 horas) dando como resultado una IC₅₀ de Dox 2µM/Met 25mM (Figura 13a) y de Dox 1µM/Ox 15mM (Figura 13b) en comparación con el tratamiento de Met/Ox que no tiene Dox, donde se observaron concentraciones más altas (Met 25mM/Ox 20mM) (Figura 13c). Finalmente en la combinación con los tres fármacos, se observa que tienen mayor eficacia, con concentraciones más bajas (Met 20mM/ Ox 15mM/ Dox 1µM) y a tiempos de exposición menores (4 horas) (Figura 13d). Demostrando que la eficacia de los tratamientos potencia de manera favorable la inhibición de la proliferación celular en tiempos y concentraciones menores con respecto a las demás terapias.







Figura 12. Concentración Inhibitoria 50 De los fármacos individuales a 4, 24 y 48 horas de exposición, en la línea celular MDA-MB-231. AJDox, BJ Met, CJ Ox.





Figura 13: Concentración Inhibitoria 50

De fármacos en combinación a 4, 24 y 48 horas de exposición, en la línea celular MDA-MB-231. A) Dox-Met, B) Dox-Ox, C) Met-Ox, D) Met-Ox-Dox



7.2 FORMACIÓN DE COLONIAS

El potencial de formación de colonias disminuyó con la triple terapia farmacológica. Como se observa en la figura 14 y 15, las células tratadas con Dox (figura 14b) muestran efecto citotóxico al inhibir la proliferación del porcentaje de colonias (2%) en comparación del control. Mientras que en tratamientos con Met (figura 14c) y Ox (Figura 14d) el porcentaje de colonias fue de 54.18% y 75.61% respectivamente, demostrando que las terapias individuales no ejercen efecto inhibitorio en la proliferación celular.

En los tratamientos en combinación se observa que el porcentaje de formación de colonias disminuyó. En lo que respecta a los tratamientos en combinación con Dox, se obtuvo un 31.72% en la combinación de Dox-Met (figura 14e) y 48.65% (figura 14f) en Dox-Ox. Contrastando con las células tratadas con Met-Ox que no presentaban Dox, no se observó disminución significativa en el porcentaje de colonias, obteniendo un 62.37% en comparación con control (sin tratamiento) (Figura 14g) Finalmente, en el tratamiento con la triple terapia (figura 14h) se observa una disminución significativa del número de colonias con 21.15%. Datos similares a los de la IC₅₀ donde se potencia el efecto de manera favorable, probablemente por una acción sinérgica entre los tres fármacos; lo que sustenta una vez más el efecto citoprotector de la terapia sobre la línea celular de CaMa TN.





Figura 14: Imágenes representativas de experimentos independientes del ensayo Clonogénico. En células MDA-MB-231, expuestas a los fármacos individuales y en sus combinaciones, durante una semana. A)2%SFB, B)Dox, C)Met, D)Ox, E)Dox/Met, F)Dox/Ox, G)Met/Ox, H)3F



MDA-231

Figura 15: Gráfica del ensayo Clonogénico en células MDA-MB-231. expuestas a los fármacos individuales y en sus combinaciones, durante una semana



7.3 TIPO DE MUERTE CELULAR

Con la finalidad de conocer si la triple terapia inducia muerte celular por apoptosis, se utilizó el método de Anexina V/IP, en citometría de flujo. Las gráficas de puntos obtenidas, muestran el porcentaje de células en muerte celular por apoptosis. En la figura 15a se observa que las células tratadas con Dox a partir de las 24h muestran apoptosis tardía en un 7.64%, y ese efecto se potencia a las 48h con 28.6% y a 72h con 98.2% de las células apoptóticas. Mientras que las células tratadas con Met (Figura 15b) y Ox (Figura 15c), tuvieron muerte celular por apoptosis temprana a partir de las 48h con 31.3% y 11.4% respectivamente y a 72h las células mostraron muerte celular por apoptosis tardía con 34.2% y 19.3% respectivamente.

Por otra parte se observa el tipo de muerte celular en las células tratadas en combinación con Dox, en donde la combinación Dox-Met se observa que a partir de las 24h hay muerte celular por apoptosis temprana con 14.9% y a partir de las 48 horas se observa un aumento de 27.4% de células en apoptosis temprana y un 28% de células en apoptosis tardía, mientras que a las 72h la mayor parte de las células se encuentran en apoptosis tardía con 98.4%. En la combinación de Dox-Ox se observa que a partir de las 48h de exposición hay un 53% de células en apoptosis temprana, y un 21.5 de células en apoptosis tardía con un 98%. De manera similar las células se encuentran en apoptosis tardías con Met-Ox a partir de las 48h muestra el 25.9% de células en apoptosis temprana y 38.3% en apoptosis tardía, mientras que a 72h el 99.4 de las células se encuentran en apoptosis tardía.

Finalmente un resultado interesante que se pudo observar fue que las células tratadas con la triple terapia farmacológica a partir de las 24h mostraron células apoptóticas en comparación con los demás tratamientos, donde no



se observaron células apoptóticas; sin embargo a partir de las 48h hay un mayor porcentaje de células en apoptosis temprana con 76.7% y 9.99% de células en apoptosis tardía, mientras que a 72h este porcentaje se mantiene con 79.7% de las células en apoptosis temprana y 18.5% de las células en apoptosis tardía, demostrando que la triple terapia generó un menor número de células en apoptosis tardía en comparación de los demás tratamientos.

Demostrando así que el efecto de las células tratadas con la triple terapia farmacológica, se mantiene en los tres tiempos. Se comprueba que la terapia farmacológica es de toxicidad baja al inducir un mayor porcentaje de células en apoptosis temprana que de células en apoptosis tardías; en comparación de los demás tratamientos y sobretodo con la terapia de línea Doxorrubicina. Estos datos sugieren que los fármacos podrían estar ejerciendo una sinergia entre ellos y que la terapia ejerce efecto citoprotector.





Figura 16. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo en células MDA-MB-231. Células expuestas en tratamientos individuales a 24, 48 y 72. A) Dox, B) Met, C) Ox.





Figura 17. Gráficas de puntos obtenidas por citometría de flujo en células MDA-MB-231. Células expuestas de tratamientos en combinación a 24, 48 y 72. A)Dox-Met, B) Dox-Ox, C) Met-Ox D) Met-Ox-Dox



7.4 ENSAYO IN VIVO

Con el objetivo de evaluar el efecto de la triple terapia farmacológica, se utilizó un modelo animal. El volumen tumoral se midió diariamente con un vernier analógico desde la aparición del tumor con 3mm³ (día 0) hasta el final del tratamiento (día 20) para establecer las curvas de inhibición del crecimiento tumoral (Figura 18 y 19). En donde se observa el crecimiento del tumor con los tratamientos establecidos, principalmente con la terapia de línea Dox en donde se observa que no fue tan eficaz alcanzando un volumen final de 4000mm³ similar a los ratones tratados con Dox-Ox con un volumen final de 3900mm³. Destacando que los tratados con Dox-Met disminuyen el volumen del tumor con un volumen final de 2000mm³. Finalmente 2 de los ratones tratados con la triple terapia fueron sacrificados a los 8 días de tratamiento, con un crecimiento tumoral de 30mm³ volumen final Esto con el objetivo de realizar futuras pruebas moleculares. Mientras que los demás ratones tratados con la triple terapia farmacológica, se indujo la remisión total de la masa tumoral a partir del día 9 de tratamiento; efecto que se mantuvo hasta el final de la fase experimental (20 Días). Sugiriendo que probablemente la triple terapia este ejerciendo un efecto sinérgico a través de las vías de generación de energía con la inhibición del complejo l de cadena transportadora de electrones que culmina en la vía de señalización mTOR; la inhibición de la LDHA (glucólisis) y con la ruptura del DNA.



Volumen del tumor



Figura 18: Grafica del volumen del tumor de los tratamientos establecidos.



Figura 19: Imágenes digitales del volumen del tumor de los tratamientos establecidos. Del día 1 al día 20 de tratamiento



8. DISCUSIÓN

En este estudio, se combinó Dox, un tratamiento de línea para el CaMa TN, con Met y Ox. Se demostró que Met y Ox en combinación con Dox disminuyen la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* en concentraciones menores a los fármacos individuales y a las demás terapias en combinación de estos fármacos.

Así mismo, los resultados obtenidos en este trabajo in vitro, mostraron que Dox induce muerte celular por apoptosis tardía, ya que en los ensayos de viabilidad celular, la IC₅₀ se alcanzaba a partir de 4 horas de exposición y a concentraciones bajas, mientras que a las 48 horas la proliferación se inhibía más del 90%. Así mismo en los ensayos de colonias se mostró que Dox inhibía la proliferación celular casi por completo. Para corroborar que Dox induce muerte celular por apoptosis tardía se realizaron ensayos de Anexina V/IP, en donde se observó que el fármaco a partir de 24 horas de exposición induce éste proceso. Esto podría ser debido a la escisión de un fragmento de 50kDa, de la proteína Poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1) que regula procesos como; reparación de daño del DNA, muerte celular, estrés oxidativo, respuestas inflamatorias; ya que como observó Gobeilb et al., en el 2001 este fragmento se produce en la apoptosis tardía y es independiente de las caspasas; desencadenando la ruptura de DNA, NAD+, disminución de ATP aumento de las especies reactivas de oxígeno dando lugar a la apoptosis tardía. Tal como lo mencionado por Witney et al en el 2010 y Shin et al en el 2015 quienes emplearon células MDA-MB-231 y HKII respectivamente; estos autores encontraron que hay una disminución de la viabilidad celular y un incremento de las células necróticas a partir de 48 horas de exposición con el fármaco (Dox), en concentraciones bajas causado por la escisión de PARP, además de un incremento de las especies reactivas de oxígeno, propio de una célula necrótica. Sin embargo en el modelo in vivo no se encontró una



disminución significativa de la masa tumoral en los ratones tratados con Dox en comparación con el control. Estos resultados son similares a lo obtenido por lliopoulos et al en el 2011 en donde observó en un modelo in vivo el crecimiento tumoral después del tratamiento con Dox, encontrando que hubo una resistencia al fármaco. Shen et al en el 2008 determinó que la resistencia a Dox en un modelo in vivo de CaMa TN se debía principalmente a cambios en la regulación de genes transportadores. Uno de ellos es el codificado por el gen ABCB1, la P-gp (P-glicoproteína), también conocida como MDR1 (multidrug resistance protein 1), que es una bomba de flujo impulsado por ATP que puede transportar cientos de compuestos anfipáticos hidrofóbicos no relacionados estructuralmente, incluyendo fármacos, péptidos y compuestos similares a lípidos. MDR1 juega un papel fisiológico fundamental en la protección de xenobióticos tóxicos y metabolitos endógenos, así como afectar la absorción y distribución de muchos fármacos clínicamente importantes ya que crea un flujo de expulsión de la célula dependiente de ATP expulsando gran cantidad de sustancias fuera de la célula (Sharom, 2011). De esta manera Shen et al en el 2008 en sus experimentos encontró una acumulación extracelular de Dox de hasta un 94% en tumores de CaMa TN causada principalmente por una disminución de la absorción de Dox mediada por la Pgp en la membrana celular.

Recientemente, ha habido un interés en los efectos antiproliferativos de Met debido a su perfil de toxicidad baja. En este trabajo, los resultados *in vitro* de Met a través de ensayos de colonias muestran que hubo una disminución de la proliferación celular hasta en un 54%. Así mismo se realizaron ensayos de muerte celular por apoptosis a través del ensayo de Anexina V/IP mostrando que las células tratadas con Met se encontraban en apoptosis temprana a partir de 48h. Así como lo reportado por Ouyang et al., en el 2011 donde mostró resultados *in vitro* de Met a través de ensayos de consumo de glucosa,



mostrando que hubo una disminución de la proliferación celular, esto se pudo deber a que Met inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones y su efecto anticancerígeno se atribuye principalmente a la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) disminuyendo la producción de ATP y la inhibición de la FOSOX, estos experimentos fueron corroborados a través de marcadores proteicos como AMPK y LKB1. Así como lo reportado por Takahashi et al en el 2014 en donde demuestra que las células de cáncer de endometrio tratadas con Met disminuyen la viabilidad celular, la capacidad de formación de colonias y entran en apoptosis temprana de manera dependiente de la concentración y del tiempo, corroborando así que la terapia es de toxicidad baja, ya que se estaban llevando a cabo procesos de muerte celular por apoptosis probablemente inducidos por la activación de la proteína AMPK.

Otro fármaco que se ocupó en este trabajo fue el Ox; Zhao et al en el 2015 sugiere que la acción de Ox *in vitro* podría estar ejerciendo su efecto a través de la regulación de la LDH-A, ya que al evaluar la producción de lactato en células de cáncer gástrico tratadas con Ox, la LDH-A disminuía significativamente en comparación con las células no tratadas; de una manera dependiente de la concentración y del tiempo; además, estos autores evaluaron si Ox inducia muerte celular por autofagia a través de la detección por western blot de marcadores como LC3II; observando una mayor detección de LC3II con las células tratadas con Ox., también observaron la muerte celular por apoptosis en las células tratadas con Ox encontrando que hay un número reducido de células apoptóticas y necróticas, sin embargo cuando se inhibió la autofagia inducida por Ox aumentó el número de células apoptóticas. De igual manera en nuestros resultados se encontró un número reducido (11%) de células apoptóticas a partir de 48h, esto también podría deberse a una resistencia del fármaco



como lo reportado por Birsoy et al en el 2013 donde se identificaron los genes que causaban resistencia al 3-bromopiruvato (3-BrPA), un candidato a fármaco que inhibe la glucólisis por su forma análoga al piruvato. Encontrando principalmente que el gen SLC16A1 que codifica para el transportador monocarboxilado 1 (MCT1, que media el transporte bidireccional de protones monocarboxilados como lactato, piruvato, y cuerpos cetónicos a través de la membrana plasmática (Halestrap y Wilson, 2012) era el principal factor que le confería resistencia a las células MDA-MB-231 de CaMa TN tratadas con 3-BrPA; ya que al no estar presente, no hay transporte del 3-BrPA al interior de la célula. Esto se comprobó al realizar una detección de MCT1 por western blot en células MDA-MB-231 encontrado ausente este transportador; así mismo se midió el porcentaje de viabilidad celular encontrando que las células MDA-MB-231 tratadas con 3-BrPA llegaron a la IC₅₀ con concentraciones mayores a 200µM, sin embargo cuando a las células tratadas con 3-BrPA se les transfectaba el MCT1 su IC₅₀ fue de una concentración menor a 25µM, con estos resultados estos autores corroboraron que el MCT1 era el factor responsable que le confería resistencia a las células MDA-MB-231. Finalmente estos experimentos se corroboraron in vivo con células MDA-MB-231 observando una disminución significativa en el volumen de los tumores de los ratones que fueron transfectados con MCT1 y tratados con 3-BrPA en comparación con los que no tenían el transportador ni el fármaco. Estos resultados sugieren que las células pudieron adquirir resistencia a través de una posible desregulación del transportador MCT1 y por lo tanto que las células tratadas con Ox de manera individual no mostraron una inhibición de la proliferación celular significativa.

De esta manera la inhibición combinada de la vía glucolítica posiblemente podría dar lugar a un agotamiento completo de ATP celular y dar lugar a un aumento de la muerte celular. Es por eso que los fármacos se evaluaron



también de manera combinada. Xintaropoulou et al en el 2015 investigó la inhibición de cinco moléculas de la vía glucolítica entre ellas la LDH-A utilizando 9 inhibidores, entre ellos Ox en líneas celulares de cáncer de ovario y de mama. Encontrando principalmente que hubo una interacción sinérgica entre el inhibidor de GLUT1 (STF31) y Ox cuando se combinaba con Met, obteniendo un aumento de glucosa extracelular y una disminución de la producción de lactato así como el aumento de la apoptosis. De acuerdo con Miskimins et al en el 2014, el efecto sinérgico entre Ox y la biguanida Fenformina que tiene un efecto similar a Met inhibiendo el complejo 1 de la cadena transportadora de electrones, actúan en las dos vías de generación de energía (FOSOX y Glucólisis respectivamente); ellos demostraron que la biguanida y Ox inducían muerte celular por apoptosis mediante la activación del complejo inductor de apoptosis (AIF) y mediante la ruptura de PARP-1 en CCR promovida por la inhibición de la LDH-A y la disminución en la producción de lactato causada por Ox y la inhibición del complejo 1 de la cadena trasportadora de electrones causada por la Fenformina. Indicaron además que hicieron una comparación de las IC₅₀ entre Fenformina y Met obteniendo concentraciones más altas con Met (25mM) con dos días de exposición y de Ox con concentraciones superiores a 80mM, sin obtener un cambio significativo, sin embargo cuando los fármacos se utilizaban en combinación para la obtención de la IC₅₀ el efecto se potenciaba dando como resultado concentraciones menores. Por lo tanto, la combinación de dos fármacos sensibiliza las células de CCR para la inducción de apoptosis de forma sinérgica.

Actualmente Met es estudiada en varios tipos de cáncer como monoterapia o en combinación con otros fármacos, demostrando que puede aumentar la sensibilidad a la quimioterapia (Xintaropoulou et al., 2015). En otro estudio lliopoulos et al en el 2011 mostró un efecto sinérgico entre Met y Dox en un



modelo *in vivo* de xenotransplante en cáncer de próstata. Donde se observa que hubo una disminución del tumor en comparación del que solo se había tratado con Dox, indicando que la combinación de Met con diferentes quimioterapéuticos entre ellos Dox es altamente eficaz en el bloqueo del crecimiento tumoral y la prevención de la reincidencia de la enfermedad. Además, observó que con esa combinación se ocupaban concentraciones menores a la de los fármacos individuales. Con estos experimentos ellos refieren que Met es un potencial anticancerígeno además de reducir la toxicidad asociada con quimioterapéuticos. Similar a los resultados obtenidos en este trabajo, donde se observó una disminución significativa en la proliferación con esta combinación tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otra parte, con la combinación de Ox/Dox no se observó una disminución significativa de la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* en comparación con las otras terapias, no hay reportes donde se utilice esta combinación, sin embargo la ineficacia de esta terapia se pudo deber a una resistencia por parte de los dos fármacos Ox y Dox con los transportadores MCT1 y P-gp respectivamente (Shen et al., 2008; Birsoy et al., 2013).

La importancia de la sinergia de los tres fármacos se hace presente cuando se observa la diferencia entre los resultados obtenidos con esta terapia y cualquiera de los que se hallaron empleando los fármacos individualmente o en pares. La interacción sinérgica entre los fármacos Met, Ox y Dox es probablemente mediada por la inhibición simultánea del complejo I en la cadena transportadora de electrones (Met), la LDH-A (Ox) (Miskimins et al., 2014) y por el aumento de apoptosis causada por Dox (Jang, Jeong, et al., 2013). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición de las vías de generación de energía de la célula tumoral: la glucólisis; la vía de mTOR y síntesis de ácidos nucleicos. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que la terapia es más efectiva que cualquiera de las otras.



Estos resultados son consistentes con los de nuestro grupo de trabajo, donde García-Castillo en el 2013 mostró en un modelo in vitro de CaMa TN que la triple terapia farmacológica provocaba muerte celular por apoptosis, reduciendo la apoptosis tardía causada por la Doxorrubicina. Estos resultados fueron corroborados en un modelo in vivo de xenotransplante, donde se observó principalmente que los ratones que habían sido tratados con la triple terapia farmacológica inhibieron por completo el crecimiento tumoral en comparación con las demás terapias. Después de la inhibición de la masa tumoral, los ratones se monitorearon por más de tres meses sin observar recurrencia de enfermedad y sobrevivencia de los animales tratados con esta terapia. Estos resultados indican que la exposición in vitro e in vivo a la triple terapia farmacológica ocasiona la disminución del consumo de glucosa y la inhibición de señales de proliferación y crecimiento celular por el bloqueo de la vía de mTOR, induciendo finalmente muerte celular por autofagia y apoptosis. Otro resultado importante en nuestro grupo de trabajo con el empleo de esta terapia fue el reportado por Salgado-García en el 2015, donde evaluó en un modelo in vitro de CCR los microRNAs involucrados en el proceso de autofagia inducida farmacológicamente mediante la combinación de los tres fármacos; obteniendo que después de la exposición a diferentes horas de esta triple terapia farmacológica, los microRNAs miR-101, miR-183 y miR-106a involucrados en el proceso de autofagia, mostraron una sub-expresión dependiente del tiempo de exposición. Estos experimentos fueron corroborados por la detección de marcadores protéicos como ULK1, ATG4 y LC3II involucrados en el proceso de autofagia, demostrando que la triple terapia induce este tipo de muerte celular, debido principalmente a que estos genes posiblemente son blancos directos de los microRNAs mencionados anteriormente.

En este trabajo se pretendió reproducir in vitro e in vivo los resultados



anteriormente obtenidos por el grupo de trabajo, corroborando los datos obtenidos por García-Castillo en el 2013, obteniendo que los fármacos en combinación tienen mayor eficacia en comparación con los fármacos individuales. Los datos sustentados proveen información crucial para que esta terapia pueda ser eficaz en casos clínicos que presenten este fenotipo tumoral.

Dada la importancia del CaMa TN como problema de salud pública, es necesario contar con terapias adecuadas que estén dirigidas a diversas proteínas esenciales de las vías de generación de energía para inhibir la proliferación del cáncer induciendo procesos de muerte celular por apoptosis o autofagia en combinación con quimioterapéuticos para reducir su toxicidad y mejorar la eficacia.

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, Metformina y Oxamato de Sodio inhibidores del complejo I de la cadena transportadora de electrones y la LDHA respectivamente en combinación con el quimioterapéutico de línea Doxorrubicina, disminuyen la tasa de crecimiento de las células MDA-MB-231 de CaMa TN. Estos fármacos combinados disminuyen la citotoxicidad en los ensayos *in vitro* e *in vivo* proporcionando una alternativa para el tratamiento eficaz del CaMa TN. El efecto sinérgico se pudo llevar a cabo por Doxorrubicina al potenciar el efecto así como Metformina al atenuar el daño citotóxico y finalmente el Oxamato al disminuir el ambiente ácido con el objetivo de incidir sobre mecanismos de muerte por apoptosis y/o autofagia; lo que sugiere que sea una terapia prometedora para este y otros tipos de cáncer.



10. REFERENCIAS

- de Almagro, M., Vucic, D. 2012. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental Oncology* 34: 200-211.
- Anshushaug, M., Gynnild, M., Kaasa, S., Kvikstad, A., Grønberg, B. 2015. Characterization of patients receiving palliative chemo- and radiotherapy during end of life at a regional cancer center in Norway. Acta Oncologica (Stockholm, Sweden) 54: 395-402.
- Ben, S., Laurent, K., Loubat, A., Giorgetti-Peraldi, S., Colosetti, P., Auberger, P., Tanti, J. et al. 2008. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. Oncogene 27: 3576-3586.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. 2002. Biochemistry. 5th ed. W H Freeman.
- Bhutia, S., Mukhopadhyay, S., Sinha, N., Das, D.N., Panda, P.K., Patra, S., Maiti,
 T. et al. 2013. Autophagy: cancer's friend or foe? Advances in Cancer
 Research 118: 61-95.
- Birsoy, K., Wang, T., Possemato, R., Yilmaz, O., Koch, C., Chen, W., Hutchins, A. et al. 2013. MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nature genetics* 45: 104-108.
- Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., Sacconi, A. et al. 2012. Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. Nature Communications 3: 865.
- Brisken, C., O'Malley, B. 2010. Hormone Action in the Mammary Gland. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2: a003178.



- Brouckaert, O., Wildiers, H., Floris, G., Neven, P. 2012. Update on triplenegative breast cancer: prognosis and management strategies. International Journal of Women's Health 4: 511-520.
- Burden, D., Osheroff, N. 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1400: 139-154.
- Cairns, R., Harris, I., Mak, T. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews. Cancer* 11: 85-95.
- Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., Moreira, P. 2009. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry* 16: 3267-3285.
- Cekanova, M., Rathore, K. 2015. A novel derivative of doxorubicin, AD198, inhibits canine transitional cell carcinoma and osteosarcoma cells in vitro. Drug Design, Development and Therapy5323.
- Chávarri-Guerra, Y., Villarreal-Garza, C., Liedke, P., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D., Goss, P. 2012. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *The Lancet. Oncology* 13: e335-343.
- Chen, J.-Q., Russo, J. 2009. ERa-Negative and Triple Negative Breast Cancer: Molecular Features and Potential Therapeutic Approaches. Biochimica et biophysica acta 1796: 162-175.
- Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA 12: 251-258.
- Choi, J., Lee, J.-S. 2013. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. Genomics & Informatics 11: 164.



- Courtnay, R., Ngo, D., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S., Karagiannis, T. 2015. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biology Reports* 42: 841-851.
- Creighton, C. 2012. The molecular profile of luminal B breast cancer. Biologics: Targets & Therapy 6: 289-297.
- Demetrius, L., Coy, J., Tuszynski, J. 2010. Cancer proliferation and therapy: the Warburg effect and quantum metabolism. *Theoretical Biology & Medical Modelling* 7: 2.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K., Hanna, W., Kahn, H., Sawka, C., Lickley, L. et al. 2007. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13: 4429-4434.
- Deshpande, A., Sicinski, P., Hinds, P. 2005. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24: 2909-2915.
- Ellis, H., Mahadevan, V. 2013. Anatomy and physiology of the breast. Surgery - Oxford International Edition 31: 11-14.
- Elmore, J., Armstrong, K., Lehman, C., Fletcher, S. 2005. Screening for breast cancer. JAMA 293: 1245-1256.
- Farmer, P., Frenk, J., Knaul, F., Shulman, L., Alleyne, G., Armstrong, L., Atun, R. et al. 2010. Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action. *The Lancet* 376: 1186-1193.
- Farshid, G. 2014. The Normal Breast and Risk Factors for Breast Cancer A2 -McManus, Linda M. En Mitchell, R. (ed.), Pathobiology of Human Disease, pp. 899-919. Academic Press, San Diego.
- Ferguson, L., Chen, H., Collins, A., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., Malhotra, M. et al. 2015. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. Seminars in Cancer Biology 35 Suppl: S5-24.



- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M. et al. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer 136: E359-386.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B. 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metabolism* 20: 953-966.
- Franken, N., Rodermond, H., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 1: 2315-2319.
- Gjorevski, N., Nelson, C. 2011. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 581-593.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology* 221: 3-12.
- Gobeilb, S., Boucherb, C., Nadeau, D., Poirier, G. 2001. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. , *Published online: 01 June 2001;* | doi:10.1038/sj.cdd.4400851 8: .
- Granchi, C., Paterni, I., Rani, R., Minutolo, F. 2013. Small-molecule inhibitors of human LDH5. Future Medicinal Chemistry 5: 1967-1991.
- Gudjonsson, T., Adriance, M., Sternlicht, M., Petersen, O., Bissell, M. 2005. Myoepithelial Cells: Their Origin and Function in Breast Morphogenesis and Neoplasia. Journal of mammary gland biology and neoplasia 10: 261-272.
- Gutierrez, C., Schiff, R. 2011. HER2: biology, detection, and clinical implications. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 135: 55-62.
- Halestrap, A., Wilson, M. 2012. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB life* 64: 109-119.
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144: 646-674.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. Cell 100: 57-70.



- Iliopoulos, D., Hirsch, H., Struhl, K. 2011. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer research* 71: 3196-3201.
- Jang, J., Jeong, S.-J., Kwon, H.-Y., Jung, J., Sohn, E., Lee, H.-J., Kim, J. et al. 2013. Decursin and Doxorubicin Are in Synergy for the Induction of Apoptosis via STAT3 and/or mTOR Pathways in Human Multiple Myeloma Cells, Decursin and Doxorubicin Are in Synergy for the Induction of Apoptosis via STAT3 and/or mTOR Pathways in Human Multiple Myeloma Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013, 2013: e506324.
- Jang, M., Kim, S., Lee, J. 2013. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine* 45: e45.
- Janku, F., McConkey, D., Hong, D., Kurzrock, R. 2011. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature Reviews*. *Clinical Oncology* 8: 528-539.
- Jung, C., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N., Kim, D.-H. 2010. mTOR regulation of autophagy. FEBS letters 584: 1287-1295.
- Keegan, T., DeRouen, M., Press, D., Kurian, A., Clarke, C. 2012. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast cancer research: BCR* 14: R55.
- Kenific, C., Debnath, J. 2015. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends in Cell Biology* 25: 37-45.
- Knudson, A. 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. Nature Reviews. Cancer 1: 157-162.
- Kumral, A., Giriş, M., Soluk-Tekkeşin, M., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., Türkoğlu, Ü., Uysal, M. 2015. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP 22: 117-123.


- Laplante, M., Sabatini, D. 2012. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149: 274-293.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell* Science 122: 3589-3594.
- Leone, A., Di Gennaro, E., Bruzzese, F., Avallone, A., Budillon, A. 2014. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Cancer Treatment and Research* 159: 355-376.
- Lim, S., Kaldis, P. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140: 3079-3093.
- Loeb, L., Loeb, K., Anderson, J. 2003. Multiple mutations and cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 776-781.
- Macias, H., Hinck, L. 2012. Mammary Gland Development. Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology 1: 533-557.
- Malumbres, M., Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer* 9: 153-166.
- Martin, D., Hall, M. 2005. The expanding TOR signaling network. Current Opinion in Cell Biology 17: 158-166.
- Mathew, R., Karp, C., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K. et al. 2009. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137: 1062-1075.
- Meirow, D., Nugent, D. 2001. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human Reproduction Update* 7: 535-543.
- 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. Oncology Letters 7: 2053-2058.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic



developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacological Reviews 56: 185-229.

- Miskimins, W., Ahn, H., Kim, J., Ryu, S., Jung, Y.-S., Choi, J. 2014a. Synergistic Anti-Cancer Effect of Phenformin and Oxamate. *PLoS ONE* 9: .
- Miskimins, W.K., Ahn, H.J., Kim, J.Y., Ryu, S., Jung, Y.-S., Choi, J.Y. 2014b. Synergistic Anti-Cancer Effect of Phenformin and Oxamate. *PLOS ONE* 9: e85576.
- Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J.-M., Criollo, A., Maiuri, M.C., Kroemer, G. 2009. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1793: 1524-1532.
- Morton, C., Houghton, P. 2007. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature Protocols* 2: 247-250.
- Moumen, M., Chiche, A., Cagnet, S., Petit, V., Raymond, K., Faraldo, M., Deugnier, M.-A., Glukhova, M. 2011. The mammary myoepithelial cell. The International Journal of Developmental Biology 55: 763-771.
- Nair, V., Sreevalsan, S., Basha, R., Abdelrahim, M., Abudayyeh, A., Rodrigues Hoffman, A., Safe, S. 2014. Mechanism of metformin-dependent inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) and Ras activity in pancreatic cancer: role of specificity protein (Sp) transcription factors. The Journal of Biological Chemistry 289: 27692-27701.
- Nam, K., Han, B.-K., Ko, E., Choi, J., Ko, E., Jeong, D., Choo, K. 2015. Comparison of full-field digital mammography and digital breast tomosynthesis in ultrasonography-detected breast cancers. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 24: 649-655.
- Ortega-Olvera, C., Torres-Mejía, G., Sánchez-Zamorano, L., Ángeles-Llerenas, A., Martínez-Matsushita, L., Rojas-Martínez, R., Montemayor-Varela, E. et al. 2016. Knowledge and recommendations regarding breast cancer early screening in an upper middle income country: Primary



and secondary health care professionals. *Preventive Medicine* 86: 147-152.

- Ouyang, J., Parakhia, R., Ochs, R. 2011. Metformin Activates AMP Kinase through Inhibition of AMP Deaminase. *Journal of Biological Chemistry* 286: 1-11.
- Pan, M.-H., Chiou, Y.-S., Wang, Y.-J., Ho, C.-T., Lin, J.-K. 2011. Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. *Food & Function* 2: 101-110.
- Penna-Coutinho, J., Cortopassi, W., Oliveira, A., França, T., Krettli, A. 2011. Antimalarial Activity of Potential Inhibitors of Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase Enzyme Selected by Docking Studies. *PLOS ONE* 6: e21237.
- Perou, C. 2010. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. The Oncologist 15 Suppl 5: 39-48.
- Peterson, T., Laplante, M., Thoreen, C., Sancak, Y., Kang, S., Kuehl, W., Gray, N., Sabatini, D. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137: 873-886.
- Porstmann, T., Santos, C., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leevers, S., Griffiths, J. et al. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism* 8: 224-236.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M. 2011. Antiapoptosis and cell survival: a review. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813: 238-259.
- Riaz, H., Riaz, T., Hussain, S. 2012. mTOR inhibitors: A novel class of anti-cancer agents. Infectious Agents and Cancer 7: 1.
- Sharom, F. 2011. The P-glycoprotein multidrug transporter. Essays in Biochemistry 50: 161-178.



- Shen, F., Chu, S., Bence, A., Bailey, B., Xue, X., Erickson, P., Montrose, M. et al. 2008. Quantitation of Doxorubicin Uptake, Efflux, and Modulation of Multidrug Resistance (MDR) in MDR Human Cancer Cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 324: 95-102.
- Shin, H.-J., Kwon, H.-K., Lee, J.-H., Gui, X., Achek, A., Kim, J.-H., Choi, S. 2015. Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. Scientific Reports 5: 15798.
- Stewart, B., Wild, C. 2014. World Cancer Report 2014. Disponible en: http://www.thehealthwell.info/node/725845 [Accedido 12 de junio de 2016].
- Stubbs, M., Griffiths, J. 2010. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. Advances in Enzyme Regulation 50: 44-55.
- Suman, S., Das, T., Reddy, R., Nyakeriga, A., Luevano, J., Konwar, D., Pahari, P., Damodaran, C. 2014. The pro-apoptotic role of autophagy in breast cancer. British Journal of Cancer 111: 309-317.
- Takahashi, A., Kimura, F., Yamanaka, A., Takebayashi, A., Kita, N., Takahashi, K., Murakami, T. 2014. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. Cancer Cell International 14: 53.
- Tanos, T., Rojo, L., Echeverria, P., Brisken, C. 2012. ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast cancer research: BCR* 14: 210.
- Taylor, R., Cullen, S., Martin, S. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews*. *Molecular Cell Biology* 9: 231-241.
- Thornburg, J., Nelson, K., Clem, B., Lane, A., Arumugam, S., Simmons, A., Eaton, J. et al. 2008. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. Breast cancer research: BCR 10: R84.



- Thorn, C., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T., Altman, R. 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics* 21: 440-446.
- Tomic, T., Botton, T., Cerezo, M., Robert, G., Luciano, F., Puissant, A., Gounon,
 P. et al. 2011. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death & Disease* 2: e199.
- Valastyan, S., Weinberg, R. 2011. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147: 275-292.
- Villarreal-Garza, C., Weitzel, J., Llacuachaqui, M., Sifuentes, E., Magallanes-Hoyos, M., Gallardo, L., Alvarez-Gómez, R. et al. 2015. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. Breast cancer research and treatment 150: 389-394.
- de Vogel, J., Jonker-Termont, D., van Lieshout, E., Katan, M., van der Meer, R. 2005. Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. *Carcinogenesis* 26: 387-393.
- Wang, C., Hu, Q., Shen, H.-M. 2016. Pharmacological inhibitors of autophagy as novel cancer therapeutic agents. *Pharmacological Research* 105: 164-175.
- Witney, T., Kettunen, M., Hu, D., Gallagher, F., Bohndiek, S., Napolitano, R., Brindle, K. 2010. Detecting treatment response in a model of human breast adenocarcinoma using hyperpolarised [1-13C]pyruvate and [1,4-13C2]fumarate. British Journal of Cancer 103: 1400-1406.
- Wong-Baeza, C., Nogueda-Torres, B., Serna, M., Meza-Toledo, S., Baeza, I., Wong, C. 2015. Trypanocidal effect of the benzyl ester of N-propyl oxamate: a bi-potential prodrug for the treatment of experimental Chagas disease. BMC Pharmacology & Toxicology 16:.



- Wu, C., Morris, J. 2001. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. Science 293: 1103-1105.
- Wu, W., Zhao, S. 2013. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica 45: 18-26.
- Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Marston, H., Turnbull, A., Langdon, S. 2015. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. *Oncotarget* 6:25677-25695.
- Yang, F., Teves, S., Kemp, C., Henikoff, S. 2014. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1845: 84-89.
- Yardley, D. 2013. Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes, Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes. International Journal of Breast Cancer, International Journal of Breast Cancer 2013, 2013: e137414.
- Yersal, O., Barutca, S. 2014. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. World Journal of Clinical Oncology 5: 412-424.
- Zhang, M., Man, H., Zhao, X., Dong, N., Ma, S. 2014. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomedical Reports* 2: 41-52.
- Zhang, T., Guo, P., Zhang, Y., Xiong, H., Yu, X., Xu, S., Wang, X. et al. 2013. The Antidiabetic Drug Metformin Inhibits the Proliferation of Bladder Cancer Cells in Vitro and in Vivo. International Journal of Molecular Sciences 14: 24603-24618.
- Zhao, Z., Han, F., Yang, S., Wu, J., Zhan, W. 2015. Oxamate-mediated inhibition of lactate dehydrogenase induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of the Akt-mTOR signaling pathway. *Cancer Letters* 358: 17-26.



Esta historia continuará...