



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
CLONOGÉNICA DE CÉLULAS D-283 BAJO  
TRATAMIENTO CON METFORMINA”**

**TESIS**

**PARA OPTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PRESENTA:  
MELISSA ENRIQUEZ FLORES**

**MÉXICO, CDMX, 2022**



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: CASTELLANOS ROMAN LUZ DEL  
CARMEN

VOCAL: PEDRAZA CHAVERRI JOSE

SECRETARIO: CAMACHO CASTILLO LUZ DEL  
CARMEN

1er. SUPLENTE: GARCIA LOZANO ALBERTO

2do. SUPLENTE: SANCHEZ POZOS KATY  
ALEJANDRA

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Laboratorio de nutrición experimental, segundo piso, Torre  
de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LUZ DEL CARMEN CAMACHO CASTILLO

SUSTENTANTE:

MELISSA ENRIQUEZ FLORES



Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Luz de Carmen Camacho Castillo en el Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación, Segundo piso, Laboratorio de Nutrición Experimental, Insurgentes Sur 3700-C, Colonia Insurgentes Cuicuilco, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04530, Ciudad de México.

Responsable del laboratorio Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera.

Se contó con el apoyo del Instituto Nacional de Pediatría para el desarrollo y financiamiento con Fondos Federales del proyecto No. 008/2015.

## Abreviaturas

ACC1- Acetil-CoA carboxilasa 1

ACC2- Acetil-CoA carboxilasa 2

ADP- Adenosín difosfato

AMP- Adenosín monofosfato

ATCC- American Type Culture Collection

ATP- Adenosín trifosfato

cAMP- Adenosín monofosfato cíclico

CK1- Caseína quinasa 1

CRTC2- Coactivador transcripcional regulado por CREB 2

CSNK2B- Gen que codifica para la subunidad beta de la caseína quinasa II

CTDNEP1- Gen que codifica para fosfatasa 1 de la envoltura nuclear CTD

CTNNB1- Gen que codifica para catenina beta-1

DAG- Diacilglicerol

DDX31- DEAD-box helicase 31

DDX3X- Dead-box Helicasa 3 X-Linked

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA- Ácido desoxirribonucleico

Dvl- Del inglés Disheveled

EMEM- Del inglés Eagle Minimun Essential Medium

EPHA7- Receptor 7 de efrina tipo A

F2,6BP- fructuosa-2,6-bisfosfato

FBPasa- Fructosa-1,6-bisfosfatasa

FBS- Suero fetal bovino

GFI1- Del inglés Growth factor independence 1/ Factor de crecimiento independiente 1

GFI1B- Proteína relacionada al factor de crecimiento independiente 1

GLI1- Homólogo 1 del oncogén asociado al glioma

GLI2- Homólogo 2 del oncogén asociado al glioma

GSK3 $\beta$ - Glucógeno sintasa quinasa-3  $\beta$

IP3- Inositol trifosfato

KBTBD4- Del inglés E3 ubiquitin ligase adaptor Kelch Repeat and BTB Domain Containing 4

KDM6A- Lisina desmetilasa 6A

KIF7- Miembro de la familia Kinesin 7, del inglés Kinesin Family Member 7

KMT2D- Lisina metiltransferasa 2D

KMT2C- Lisina metiltransferasa 2C

LRP- proteína relacionada con LDL

MB- Meduloblastoma

MET- Metformina

mTOR- Proteína blanco de rapamicina en mamíferos

MTT- Tiazolil Blue Tetrazolium Bromide

MYC- Proto-Oncogen

NF-  $\kappa$ B- Factor nuclear NF-kappa-B

NF-AT- Factor nuclear de las células T activadas

N-MYC- Proto-Oncogen

OCT- Transportador de cationes orgánicos

OTX2- Gen del inglés Orthodenticle Homeobox 2

PBS- Solución Buffer salina del inglés Phosphate Buffered Saline

PDE4B- fosfodiesterasa cíclica 3',5' específica de cAMP 4B

PFKFB1- 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 1

PI3K- Fosfoinositido 3-quinasa

PIK3CA- Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa

PKA- Proteína quinasa A

PTCH1- Del inglés Patched 1

Pyr K- Piruvato cinasa

SHH- Sonic Hedgehog

SMARCA4- SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4

SMO- Del inglés Smoothened

SUFU- Regulador negativo de la señalización de Hedgehog

TCF/LEF- Factores de transcripción en la vía WNT

TP53- Proteína tumoral 53

WNT- Del inglés Wingless

ZMYM3- Del inglés Zinc Finger MYM-Type Containing 3

$\mu$ M- Micromolar

mM- Milimolar

## Índice

1. Resumen.....	4
Abstract .....	5
2. Introducción .....	6
2.1 Cáncer.....	6
2.2 Meduloblastoma .....	7
2.3 Incidencia del meduloblastoma en el mundo y en México.....	8
2.3.1 Complicaciones .....	9
2.4 Clasificación.....	9
2.5 Vías de señalización/regulación afectadas.....	12
2.6 Clasificación de tratamiento .....	17
2.7 Descripción de tratamiento con metformina como adyuvante.....	18
2.8 Capacidad clonogénica.....	20
3. Justificación/ Definición del problema.....	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivo general .....	21
6. Material y métodos .....	21
6.1.1 Cultivo celular.....	21
6.2.1 Métodos de cultivo celular.....	22
6.2.2 Ensayo de proliferación celular .....	22
6.2.3 Ensayos de viabilidad celular: MTT .....	23
6.2.4 Ensayo de crecimiento independiente de anclaje .....	23
7. Resultados .....	24
7.1 Ensayos de viabilidad celular.....	24
7.2 Ensayo de proliferación celular .....	25
7.3 Ensayo de crecimiento independiente de anclaje .....	26
8. Discusión .....	29
9. Conclusión y perspectivas .....	32
9.1 Conclusiones.....	32



9.2 Perspectivas .....	32
9.2.2 Ventajas, desventajas y retos.....	32
Referencias.....	34

## Índice de figuras

Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad de tumores cerebrales y del sistema nervioso central, en México y en el mundo. Traducido de GLOBOCAN 2020 .	8
Figura 2. Vía de señalización HH en mamíferos. B. Vía Sonic Hedgehog activada. Imagen modificada de 12. ....	14
Figura 3. Vía WNT/ $\beta$ -catenina canónica. Vía activada. Imagen basada en 15, 16 y 17 .....	15
Figura 4. Esquemización de la vía independiente a $\beta$ -catenina, mediante la vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ . Basada en 15 y 18 .....	16
Figura 5. Esquema del mecanismo de acción de la metformina: Traducido de 25.....	20
Figura 6. Ensayo de viabilidad de línea celular D-283 incubada a diferentes concentraciones de metformina, durante 14 días. Los datos se muestran como promedio $\pm$ DE.....	25
Figura 7. Ensayo de proliferación línea celular D-283 incubada con diferentes concentraciones de metformina, durante 14 días. Los datos se muestran como promedio $\pm$ DE.....	26
Figura 8. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje independiente células MCF-7 incubadas con diferentes concentraciones de metformina. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ DE .....	27
Figura 9. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje independiente células D-283 incubadas con diferentes concentraciones de metformina. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ DE .....	28
Figura 10. Esquemización de los genes alterados: (A) línea celular D-283, (B) línea celular MCF-7, en la intersección se muestra la alteración de los genes que se presentan en ambas líneas celulares. Basado en 32 y 33 .....	31

## 1. Resumen

El meduloblastoma (MB), el tumor maligno más frecuente en la población pediátrica, consiste en una lesión en el cerebelo, frecuentemente invade el tronco encefálico y se disemina a través del líquido cefalorraquídeo, el tratamiento consiste en una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. Las complicaciones derivadas del tratamiento afectan no sólo la supervivencia de los pacientes a largo plazo, sino también el desarrollo cognitivo y la calidad de vida del paciente.

Existen diversos estudios que han revelado una relación entre la incidencia del cáncer y la diabetes tipo II. En este contexto se ha descrito la disminución en la formación de tumores y metástasis en pacientes diabéticos que son tratados con metformina a diferencia de los pacientes que no toman este medicamento. Encontrar adyuvantes que apoyen para disminuir los efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia cobra relevancia en el tratamiento del meduloblastoma, ya que por la localización del tumor y la heterogeneidad presentada en los subgrupos del meduloblastoma los tratamientos actuales son similares, sin tomar en cuenta los mecanismos de acción para la formación del tumor y desafortunadamente algunos pacientes presentan resistencia a la terapéutica convencional y efectos secundarios severos.

El presente trabajo evaluó la respuesta tumoral *in vitro* de células provenientes de tejido metastásico bajo tratamiento con metformina, el proceso mediante el cual se evaluó la viabilidad celular fue mediante ensayos como: reducción de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT), ensayo de proliferación y ensayo de crecimiento independiente de anclaje.

El objetivo es evaluar el impacto que ejerce la metformina sobre el potencial clonogénico de esta línea celular y evidenciar su efecto como adyuvante en el

tratamiento contra el meduloblastoma, así como dar información veraz y actualizada para que otros profesionales de la salud tengan la confianza de utilizar la metformina como adyuvante en el tratamiento y así mejorar el pronóstico clínico de los pacientes implementando nuevas estrategias terapéuticas.

### Abstract

Medulloblastoma (MB), the most common malignant tumor in the pediatric population, consists of a lesion in the cerebellum, frequently invades the brainstem and spreads through the cerebrospinal fluid, treatment consists of a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy. Treatment-derived complications affect not only the long-term survival of patients, but also the patient's cognitive development and quality of life.

There are several studies that have shown a relationship between the incidence of cancer and type II diabetes, since a decrease in the formation of tumors and metastases has been reported in patients who are treated with metformin, unlike patients who do not take this drug. Finding adjuvants that help reduce the side effects of chemotherapy and radiotherapy becomes relevant in the treatment of medulloblastoma, since due to the location of the tumor and the heterogeneity presented in the subgroups of medulloblastoma, current treatments are similar without taking into account the mechanisms of action for tumor formation and unfortunately some patients show resistance to conventional therapy and severe side effects.

The present work evaluated the effect of metformin on the capacity of cells for in vitro tumor response in the D-283 cell line. The process by which cell viability will be evaluated will be through tests such as: Dimethylthiazol tetrazolium bromide (MTT), proliferation assay and soft agar colony formation assay.

The objective is to evaluate the impact of metformin on the clonogenic potential of this cell line and to show its effect as an adjuvant in the treatment of medulloblastoma, to provide truthful and up-to-date information so that other health professionals have the confidence to use metformin. as an adjuvant in treatment and thus improve the clinical prognosis of patients by implementing new therapeutic strategies.

## 2. Introducción

### 2.1 Cáncer

El cáncer es un término utilizado para englobar un gran número de enfermedades crónico-degenerativas, sus características principales son: la multiplicación rápida de las células anormales, las cuales pueden invadir partes adyacentes del cuerpo (metástasis); señalización proliferativa sostenida, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular e inducción de angiogénesis, además de reprogramar el metabolismo energético; esto es generado por división y diseminación anormal, culminando en gran número de casos en la disminución de la calidad de vida del paciente y, en el peor escenario, su muerte<sup>1, 5, 6</sup>.

Los tumores son más complejos que un grupo de células alteradas, ya que se componen de distintos tipos celulares, los cuales interactúan entre sí, dentro de estas células podemos encontrar las células normales que interactúan con las células alteradas y conforman el estroma contribuyendo al desarrollo de las características del cáncer<sup>1</sup>.

Para mantener la señal proliferativa, en las células cancerosas se desregulan los procesos involucrados con el ciclo celular y el metabolismo energético, un ejemplo de ello son las desregulaciones en señales promotoras de crecimiento, al igual que la evasión de los supresores de apoptosis como es el caso de la proteína TP53. La autofagia también representa otra barrera para

la formación de un tumor, sin embargo, induce a la célula a un estado latente reversible y se manifiesta en un rebrote, en una etapa tardía después del tratamiento<sup>1</sup>.

En cuanto a la metástasis se encontró una relación con la pérdida de E-caderina, una molécula clave en la adhesión celular, el proceso de colonización se basa en la intravasación de las células cancerosas a los vasos cercanos a través del sistema linfático y hematógeno, dichas células cancerosas traspasan a tejidos distantes formando en ellos nódulos de células cancerosas<sup>1-5</sup>.

Por otro lado, en el cáncer existe inflamación crónica lo que estimula la angiogénesis, proliferación e invasividad, además el microambiente tumoral se caracteriza principalmente por factores físicos y químicos como hipoxia, pH bajo (la concentración de protones puede ser 10 veces mayor en células cancerosas) y presión alta<sup>5, 39</sup>.

## 2.2 Meduloblastoma

El meduloblastoma (MB), el tumor maligno más frecuente en la población pediátrica, consiste en una lesión en el cerebelo, frecuentemente invade el tronco encefálico y se disemina a través del líquido cefalorraquídeo, generalmente predomina en varones (1.7 veces más en hombres que en mujeres) y se presenta mayoritariamente a la edad de 7 años, aunque existen diferentes subgrupos moleculares y la incidencia está relacionada a estos, la mayoría de los pacientes reciben el mismo tratamiento, el cual consiste en una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. Al administrar fármacos antineoplásicos la supervivencia general aumenta en un 80 %, aunque las complicaciones que el paciente pueda presentar impactan no sólo la supervivencia a largo plazo, sino también en el estilo de vida del paciente<sup>2</sup>.

26.

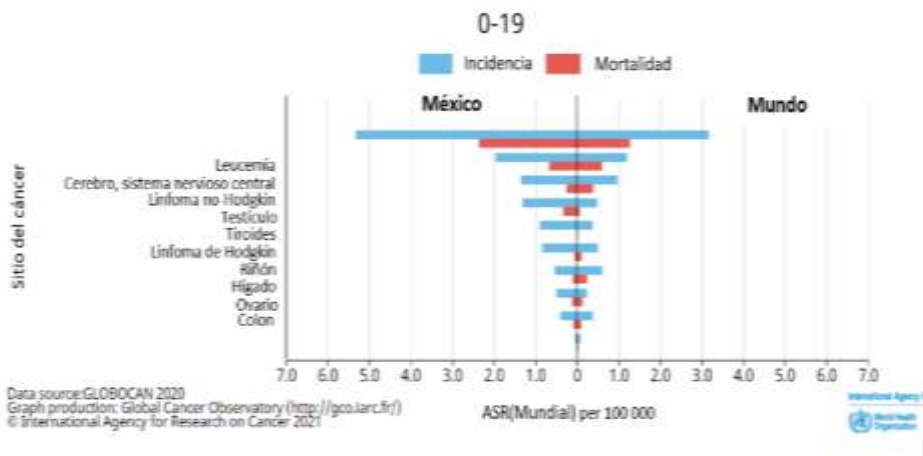
El término meduloblastoma proviene de la similitud con los meduloblastos, células madre multipotentes provenientes del tubo neural; Cushing y Bailey lo

describieron histopatológicamente como células indiferenciadas presentes en etapas embrionarias con núcleos pequeños y redondos, un citoplasma mínimo y numerosas mitosis<sup>2</sup>.

### 2.3 Incidencia del meduloblastoma en el mundo y en México

Según las estadísticas de la OMS del año 2020, los tumores cerebrales y del sistema nervioso central ocupan el segundo lugar en incidencia en pacientes de 0 a 19 años a nivel mundial, solo por debajo de la leucemia, y se presenta mayoritariamente en varones. En México, la incidencia de tasa relativa ajustada por edad (ASR del inglés age-standardized rate =) es de 2.2 y, al igual que a nivel mundial, ocupa el segundo lugar<sup>7, 34, 35</sup>.

Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad de tumores cerebrales y del sistema nervioso central, en México y en el mundo. Traducido de GLOBOCAN 2020



Aunque en México, el meduloblastoma se clasifica histológicamente en la mayoría de los casos, mejorar el diseño de los ensayos clínicos permite una estratificación más exacta de los pacientes, creando terapias dirigidas.

### 2.3.1 Complicaciones

La clasificación del riesgo propuesta recientemente, toma en cuenta los grupos y las aberraciones genéticas, asignando a los pacientes en uno de los 4 grupos de riesgo de acuerdo al porcentaje de supervivencia en: bajo riesgo (> 90 %), riesgo estándar (75-90 %), riesgo alto (50-75 %) y muy alto riesgo (<50 %). Aun cuando con el tratamiento la tasa de supervivencia global de los pacientes aumentó a un 70 %, todavía persisten daños, generados principalmente por la radioterapia y la quimioterapia, algunos de estos problemas se presentan en: la audición, la cognición, el sistema endocrino y vascular. Debido a estos efectos la tasa de supervivencia a largo plazo es baja<sup>2, 11</sup>.

Aproximadamente un tercio de los pacientes diagnosticados con meduloblastoma mueren a causa de la enfermedad y los sobrevivientes padecen de los efectos secundarios a largo plazo debido al tratamiento<sup>3,28</sup>.

## 2.4 Clasificación

### 2.4.1 Histológica

El MB se clasifica en cinco subtipos histológicos: MB clásico, hipoelástico, no reproducible, de células grandes y de nodularidad extensa. Los subtipos clásicos son los más comunes, mientras que los subtipos desmoplásicos y aquellos con nódulos anchos tienen el mejor pronóstico con tratamiento. Sin embargo, más del 70% de la respuesta de los pacientes que tienen MB clásico, varía ampliamente, lo que sugiere que la presentación del MB clásico es muy heterogénea y limita su estudio<sup>10, 27</sup>.

### 2.4.2 Genética

Estudios genéticos recientes indican que el MB se puede clasificar en al menos cuatro grupos moleculares distintos de acuerdo a las principales vías



afectadas: Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), Grupo 3 (amplificación MYC) y Grupo 4 (genes heterogéneos)<sup>2,9</sup>.

### Wingless (WNT)

WNT-MB ocurre predominantemente en niños de 4 años hasta la edad adulta temprana (mediana de edad de 11 años) y tiene una proporción pareja entre hombres y mujeres. Los tumores WNT-MB a menudo muestran una histología clásica y rara vez presentan metástasis en el momento del diagnóstico (5 – 10 % de los casos). Los resultados para los pacientes con WNT-MB son favorables, con una tasa de supervivencia a 5 años del 95% o más<sup>9,10,18</sup>.

Las mutaciones somáticas en CTNNB1 son el evento genético característico que define este subtipo (85% de los pacientes), esta mutación hace que la vía WNT se mantenga activada y genera la expresión de genes que promueven la proliferación tumoral<sup>2,9,10</sup>.

Otros genes mutados identificados son: el gen que da origen a la proteína p53 (TP53, el cual es supresor de tumores), gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la caseína quinasa II (CSNK2B, regula las rutas metabólicas), gen que da origen a la proteína PI3K (PIK3CA, del inglés phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, cuyas mutaciones se relacionan con múltiples tipos de cáncer), gen que codifica al receptor 7 de efrina tipo A (EPHA7), gen Dead-box Helicasa 3 X-Linked (DDX3X) y el gen remodelador de cromatina dependiente de ATP (SMARCA4, del inglés SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4)<sup>10</sup>.

### Sonic Hedgehog (SHH)

SHH-MB representa el subgrupo molecular más común en bebés (menores de 3 años de edad) y adultos (mayores de 17 años de edad), con menos casos diagnosticados durante la infancia y la adolescencia. Demográficamente, SHH-

MB es más común en hombres que en mujeres (2:1, respectivamente)<sup>9, 10</sup>. Aproximadamente el 30% de los casos de meduloblastoma es de este tipo. Las mutaciones en la vía de señalización de SHH representan los eventos genéticos más comunes, incluida la inactivación de mutaciones somáticas o de línea germinal y deleciones en PTCH1 y SUFU, mutaciones activadoras en SMO y amplificaciones de GLI2<sup>31</sup>.

### Grupo 3

En los MB del grupo 3 prevalece el dominio masculino, se presenta en bebés y niños menores de 3 años, representa aproximadamente el 25 % de todos los casos de meduloblastoma, asimismo presenta una incidencia del 40-50 % de metástasis al momento del diagnóstico. Otra característica importante es que muestra resultados de supervivencia bajos pese al tratamiento (menor al 60% a los 5 años).

Probablemente provienen de una población de células madre neurales, aunque no se ha encontrado una vía que defina a este grupo, se ha encontrado la amplificación frecuente de MYC<sup>2</sup>.

Las mutaciones somáticas no se presentan con frecuencia en los tumores del grupo 3, sólo se presentan mutaciones en SMARC4, KBTBD4, DAG y KMT2D; cuatro genes mutados en más del 5% de los casos. Pequeños subconjuntos de estos tumores son impulsados por amplificaciones de N-MYC (5 %) y el factor de transcripción OTX2 (3%). La regulación positiva de GFI1 y GFI1B está presente en el 15% al 20% de los meduloblastomas del grupo 3 y también pueden ser eventos impulsores importantes en este subgrupo. El isocromosoma 17q está presente en el 40-50% de los casos, y otros eventos comunes son la pérdida de los cromosomas 8, 10q y 16q y la ganancia de 1q, 7<sup>2</sup>.

En cuanto a la subclasificación de estos grupos se han estratificado de acuerdo a la metilación, en grupo de alto y bajo riesgo, el primero se presenta en bebés

con amplificación del gen MYC; mientras que otro estudio definió tres subtipos: 3 $\alpha$  (que ocurre en bebés y con frecuencia metastásico pero asociado con un mejor pronóstico), 3 $\beta$  (que ocurre en niños mayores y presenta aumento de OTX2, pérdida de DDX31 y expresión alta de GFI1/GFI1B ), y 3 $\gamma$  (que ocurre en bebés y asociado con altas tasas de metástasis y amplificación de MYC)<sup>2</sup>.

#### Grupo 4

Los tumores del grupo 4 representan aproximadamente el 35 % de todos los MB y son el subgrupo más frecuente. En general se presentan en la niñez y adolescencia, presentando mayor incidencia en hombres (proporción 3:1, hombre:mujer). Estos tumores presentan un pronóstico intermedio, similar al del subgrupo SHH. Presentan un 40 % de metástasis al momento del diagnóstico<sup>2, 10</sup>.

Las similitudes que tienen las células del subgrupo 4 con las células en cepillo unipolares son transcripcionales, por lo que se propone que estas podrían dar origen a las del subgrupo 4<sup>2</sup>.

Las mutaciones somáticas comunes son raras en este grupo, sin embargo, destacan las mutaciones en los genes KDM6A, ZMYM3, KTM2C y KBTBD4, pero son pocos comunes<sup>2</sup>.

Recientemente se ha reconocido la heterogeneidad dentro de estos subgrupos y se ha sugerido que el meduloblastoma podría clasificarse hasta en 14 subgrupos, sin embargo, aún es común utilizar solo 4 subgrupos principales<sup>2</sup>.

### 2.5 Vías de señalización/regulación afectadas

Actualmente se considera que las vías carcinogénicas más importantes involucradas en los meduloblastomas son:

-Sonic Hedgehog (SHH)

La vía Hedgehog tiene un papel importante en la fase embrionaria, ya que participa en el mantenimiento de las células madre; se asocia al desarrollo de las extremidades y el sistema nervioso central, algunos de los cánceres en los que se ha informado la mutación de este gen son: mama, pulmón, hígado, colon, estómago, y meduloblastoma, entre otros, este hallazgo lo hace atractivo como blanco terapéutico en el tratamiento contra el cáncer <sup>12, 13, 14</sup>. Cuando la vía de señalización de Hedgehog está inactiva el receptor PATCH1 reprime la actividad de SMO manteniéndolo en una vesícula intracelular, alejado de la superficie de la célula también cuando está inactivada la vía, las proteínas GLI 2 y 3 están asociados con la proteína SUFU, las proteínas PKA, CK1 y GSK3  $\beta$  fosforilan a la proteína GLI y cuando está fosforilada es procesada por el proteosoma y se divide en dos versiones, esta es la forma represora al transcribirse, sin actividad no hay señal interna<sup>13</sup>.

En la figura 2 se muestra la activación de esta vía; inicia cuando SHH se une a PTCH1 eliminando el efecto inhibitorio de PTCH1 sobre SMO, posteriormente SMO es fosforilada por CK1, activando factores de transcripción de proteínas G, esto permite que SMO se traslade hacia la superficie de la célula, lo que genera que las proteínas GLI se asocien a KIF7, separando a la proteína GLI de la proteína SUFU, de esta forma las proteínas GLI están completas y se desplazan al núcleo, se unen al DNA e inducen la expresión de los genes implicados en la proliferación celular, angiogénesis, supervivencia, etc<sup>13</sup>.

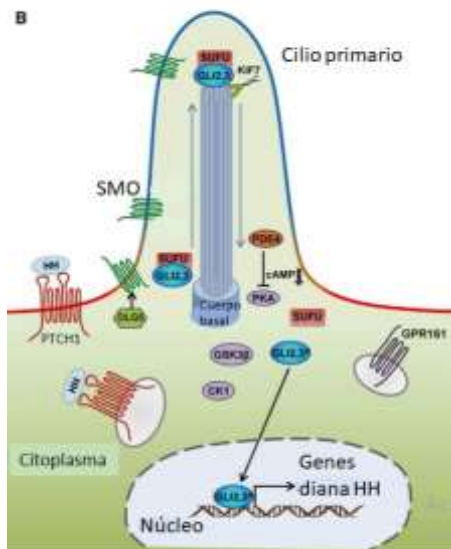


Figura 2. Vía de señalización HH en mamíferos. Vía Sonic Hedgehog activada. Imagen modificada de 12.

Las amplificaciones y mutaciones de los componentes de la vía Hedgehog (GLI1, GLI2, PTCH1, SMO y SUFU) son impulsores comunes en los casos de meduloblastoma SHH, pues juegan un papel importante en el desarrollo del cerebelo<sup>13</sup>.

### -WNT/ $\beta$ -catenina

La familia WNT consta de glicoproteínas ricas en cisteína que actúan como receptores. Algunas de las funciones implicadas con esta vía son: regulación de las células madre, organogénesis y supervivencia celular. La activación de esta vía puede generar de dos maneras: la vía canónica o dependiente de WNT/ $\beta$ -catenina y la vía no canónica o independiente de WNT/ $\beta$ -catenina (la cual incluye la vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  y polaridad celular planar)<sup>15, 16</sup>.

Vía WNT/ $\beta$ -catenina canónica.

En la figura 3 se muestra la vía activada. Cuando el ligando WNT se une al receptor Frizzled, LRP es fosforilada lo que genera la unión de axina, GSK3 $\beta$  y Dvl (del inglés Disheveled) esto implica el bloqueo de la fosforilación de  $\beta$ -catenina por Axina, a su vez suprime la formación del complejo de destrucción (conformado por Axina, GSK3  $\beta$ , CK1 y APC), promoviendo la traslación de  $\beta$ -catenina al núcleo, donde se encuentran los factores de transcripción TCF/LEF y otras proteínas colaboradoras que promueven la expresión de genes diana<sup>16</sup>.

17.



Figura 3. Vía WNT/  $\beta$ -catenina canónica. Vía activada. Imagen basada en 15, 16 y 17

Esta vía regula varios procesos fisiológicos en el desarrollo y su alteración repercute en la embriogénesis, la polaridad, migración y diferenciación celular, un mal funcionamiento de esta vía se manifiesta en regeneración de heridas e inflamación y en casos más serios en carcinogénesis y desarrollo de enfermedades degenerativas<sup>15</sup>.

Vía independiente a  $\beta$ -catenina, vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$

La señalización de WNT a través de los receptores Frizzled también puede provocar la liberación de calcio intracelular. La unión de WNT a frizzled induce el aumento de concentración de moléculas de señalización intracelular:  $\text{Ca}^{2+}$ , IP3 (inositol trifosfato) y DAG (diacilglicerol). Se desconocen los genes exactos activados por la vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ , pero parece estar involucrado el NF-AT, un factor de transcripción regulado por la proteína fosfatasa calcineurina dependiente de calcio/calmodulina además del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). La vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  es importante para la adhesión celular y el movimiento celular durante la gastrulación<sup>15, 18</sup>.

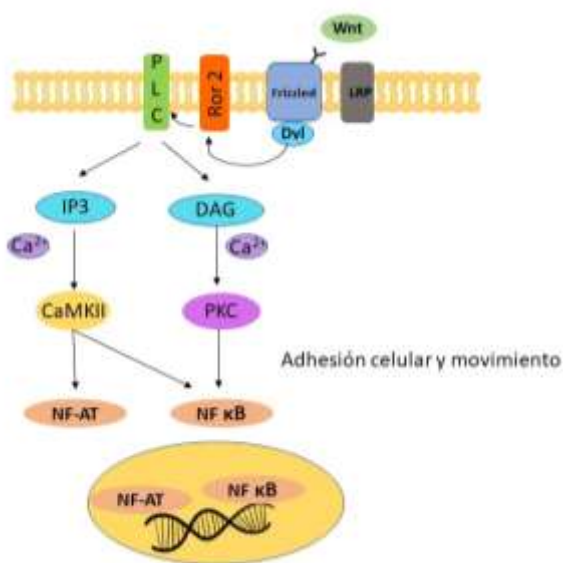


Figura 4. Esquematización de la vía independiente a  $\beta$ -catenina, mediante la vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ . Basada en 15 y 18

#### PI3K/AKT/NF- $\kappa\text{B}$

La vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) /AKT es un regulador clave en la supervivencia celular, ayudando a las células tumorales a sobrevivir en un

microambiente con limitaciones de nutrientes y oxígeno, al igual que un pH bajo. Se divide en dos subclases: IA (PI3K  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ), activada con la proteína tirosina cinasa y IB (PI3K  $\gamma$ ) la cual se activa mediante proteínas G. Dicha vía está implicada en procesos como crecimiento celular, progresión del ciclo celular y metabolismo celular, por estos motivos es un marcador de crecimiento competitivo, capacidad metastásica, angiogénesis y resistencia a la terapia. Esta vía de señalización se ha encontrado activa en cáncer de ovario, mama, gastrointestinal, glioblastoma entre otros<sup>19, 20</sup>.

## 2.6 Clasificación de tratamiento

El tratamiento de MB provoca graves consecuencias en el desarrollo del sistema nervioso central, por lo que clasificarlo involucra el riesgo de progresión, la agresividad de la enfermedad y la intensidad de la terapia. En general, los resultados en niños mayores de 3 años con meduloblastoma han mejorado significativamente en los últimos 40 años posterior a la radioterapia (RT) craneoespinal y la quimioterapia multifactorial, después de una resección mayor. Desafortunadamente, los niños que sobreviven experimentan muchos efectos debilitantes a largo plazo<sup>2, 8, 27</sup>.

La resección tumoral fue el primer procedimiento que se efectuó aumentando la supervivencia del paciente. La radioterapia craneoespinal se había practicado para tratar la recurrencia metastásica de manera espontánea hasta que en 1953 se describió que la supervivencia mejoraba en un 40%. En pacientes mayores de 5 años se aplica la radioterapia a todo el eje craneoespinal para tratar la metástasis. Los pacientes que no presentan metástasis reciben dosis de 23.4 Gy de radiación y un refuerzo de 5.0 Gy en el lecho del tumor<sup>2</sup>.

En el caso de la quimioterapia los ensayos comenzaron en la década de 1970 el tratamiento ha mejorado la supervivencia a 5 años a un 60 %. Los regímenes de terapia se determinan por la edad del paciente, la idoneidad para la



radioterapia y el riesgo; por lo general el tratamiento estándar comienza con vincristina seguido de cisplatino y ciclofosfamida o lomustina, aunque en otros ensayos también incorporan metotrexato<sup>2</sup>. Lamentablemente para los pacientes de alto riesgo no se ha definido un régimen de quimioterapia óptimo. En pacientes menores a 5 años la quimioterapia farmacológica se utiliza para retrasar la radioterapia puesto que el riesgo de deterioro neurológico impide el uso de radioterapia. El reposicionamiento de los fármacos permite acelerar las opciones de nuevas terapias de baja toxicidad, ya que actualmente el 70 % de los pacientes sobrevive hasta 5 años, pero la mayor parte de las veces tienen efectos secundarios duraderos<sup>28</sup>.

### 2.7 Descripción de tratamiento con metformina como adyuvante

La metformina (MET) es una biguanida sintética, derivada de la galegina, la cual se puede obtener de la planta *Galega officinalis*. Su uso habitual es para tratar la diabetes tipo 2, debido a que es capaz de regular mecanismos de acción de obtención de energía; reduce los niveles de glucosa en la sangre, al anular la gluconeogénesis en el hígado y aumentar la captación de glucosa en el músculo esquelético; mejora la sensibilidad a la insulina al aumentar la captación y el uso de glucosa periférica; inhibe la síntesis de proteínas, ácidos grasos y colesterol, así mismo aumenta la utilización de ácidos grasos libres<sup>4, 23, 25</sup>.

Existen evidencias que revelan su efecto anticancerígeno, pues en numerosos tipos de cáncer se encontró una mortalidad baja en pacientes que eran tratados con metformina en contraste con los tratados únicamente con los medicamentos antineoplásicos tradicionales, además se encontró una mejora en la respuesta a los cánceres tratados con quimioterapia. Este hallazgo generó curiosidad sobre el uso de la metformina, desde inicios del siglo XXI a la fecha se han realizado estudios para explicar el mecanismo mediante el cual la metformina reduce, ataca y retiene la formación de nuevos tumores en monoterapia y en terapia combinada<sup>19, 24, 25</sup>.

En la figura 5 se explica el mecanismo de acción de la metformina, iniciando con la captación de metformina a través del transportador OCT; posteriormente la metformina entra a la mitocondria e inhibe el complejo 1 de la cadena transportadora de electrones, cambiando las proporciones de ADP: ATP y AMP:ATP lo que genera la activación de AMPK; 3. AMPK se puede activar mediante un mecanismo lisosomal (el cual no está especificado en este esquema); simultáneamente el aumento de la proporción AMP:ATP inhiben la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), después AMPK fosforila ACC1 y ACC2, lo que inhibe la síntesis de grasas y promueve su oxidación, además de mejorar la resistencia a la insulina; AMPK fosforila la fosfodiesterasa cíclica 3',5' específica de cAMP 4B (PDE4B), reduciendo el cAMP<sup>25</sup>.

El metabolismo celular cambia de gluconeogénesis a glucólisis mediante el aumento de cAMP a través de la activación de proteína quinasa A (PKA), además inactiva PFKFB1, lo que provoca la disminución de la fructuosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP), activador de PFK y e inhibidor de FBPasa; posteriormente PKA también fosforila e inactiva piruvato cinasa (Pyr K); seguido de la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP del factor de transcripción (CREB). Finalmente, la fosforilación de CRT2 por AMPK hace que CRT2 se mantenga en el citoplasma<sup>25</sup>.

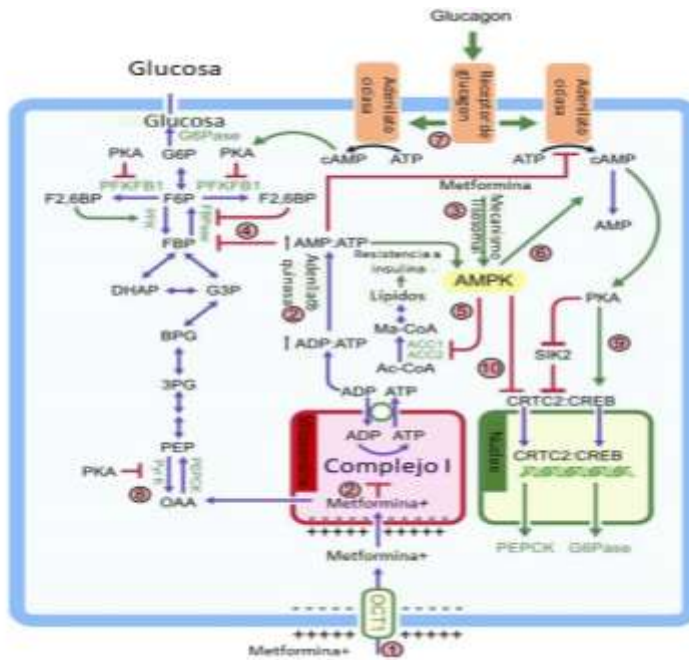


Figura 5. Esquema del mecanismo de acción de la metformina: Traducido de 25.

### 2.8 Capacidad clonogénica

La clonogenicidad es la capacidad de las células tumorales para proliferar y formar colonias; un ensayo de clonogenicidad evalúa además de estas características la capacidad de autorrenovación y diferenciación después del tratamiento con un agente citotóxico<sup>22</sup>.

### 3. Justificación/ Definición del problema

De acuerdo a la clasificación genómica podemos diferenciar al meduloblastoma en cuatro grupos: Sonic Hedgehog (SHH), WNT, grupo 3 (amplificación MYC) y grupo 4 (genes heterogéneos) dentro de estos

subgrupos el que presenta pronósticos más favorables es el grupo 2 (WNT), y el más agresivo es el tipo 3, éste último se presenta mayoritariamente en bebés y niños pequeños, además de presentar una tasa alta de metástasis al momento del diagnóstico (40-45 %), presenta un porcentaje de supervivencia menor al 60% a los 5 años. Existen diversos estudios que han mostrado una relación entre la incidencia del cáncer y la diabetes tipo II, puesto que se ha reportado la disminución en la formación de tumores y metástasis en pacientes que son tratados con metformina a diferencia de los pacientes que solo presentan cáncer al momento del diagnóstico. La línea celular D-283 es una línea amplificada con MYC (subgrupo 3) por lo que en este estudio se propone evaluar el efecto de la metformina sobre la capacidad clonogénica del subgrupo con peor pronóstico y su uso como tratamiento adyuvante en el meduloblastoma.

## 4. Hipótesis

El tratamiento con metformina disminuirá la capacidad clonogénica de la línea celular D-283.

## 5. Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento con metformina sobre la capacidad clonogénica de la línea celular de meduloblastoma D-283.

## 6. Material y métodos

### 6.1.1 Cultivo celular

Líneas celulares D-283 y MCF-7

Las líneas celulares MCF-7 y D-283 proporcionadas por el Instituto de Pediatría, México, se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). Se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con glucosa y Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) adicionado con L- glutamina respectivamente; suplementado con suero fetal bovino (FBS, del inglés fetal bovine serum) al 10 % adquirido de ATCC y 0.25 % Penicilina/Estreptomina como antibiótico, adquirido de Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5 %.

#### 6.2.1 Métodos de cultivo celular

Las células D-283 se trabajaron en un número de pase 7, mientras que las células MCF-7 a un número de pase 15. La manipulación de las líneas se realizó en un ambiente estéril en una campana de flujo laminar (Airecard, modelo No. UN-126-300), además se realizó proceso de asepsia con etanol.

#### 6.2.2 Ensayo de proliferación celular

Se preparó una suspensión de 500 células/pozo para administrar el tratamiento en 5 placas de 96 pozos de la siguiente forma: se prepararon soluciones de metformina de 20 µM, 50 µM, 100 µM y 2 mM a partir de una solución stock de 2 M.

Determinación del número de células vivas: se utilizaron triplicados por condición, se despegaron las células por tripsinización y se incubaron con azul tripán (0.4 %), para contarlas se utilizó un hemocitómetro. Las determinaciones se realizaron a las 24 h, 72 h, 6 días, 9 días y 14 días.

### 6.2.3 Ensayos de viabilidad celular: MTT

Se preparó una suspensión de 500 células/pozo, en placas de 96 pozos. Se incubaron con metformina a una concentración final de 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 2 mM a partir de una solución stock de 2 M, durante 24 h, 72 h, 6 días, 9 días y 14 días. Se preparó la solución de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT del inglés Tiazolil Blue Tetrazolium Bromide, lote MKCF0652): 5 mg/mL de PBS en la campana, se añadió 10  $\mu$ L a cada pozo y se incubó 3 h en condiciones estándar de temperatura y CO<sub>2</sub>. Se aspiró el medio y se solubilizaron los cristales de formazán con DMSO incubados 1 h a 37°C. El reactivo MTT (amarillo) atraviesa la membrana celular y mitocondrial, la enzima succinato deshidrogenasa lo reduce formando un compuesto azul violeta (formazán) insoluble, este ensayo es un indicador de viabilidad, pues la reducción se realiza en células metabólicamente activas<sup>15, 29</sup>.

### 6.2.4 Ensayo de crecimiento independiente de anclaje

Este ensayo evalúa la capacidad de las células para crecer de forma independiente sobre una superficie sólida (sello distintivo de la carcinogénesis), permite la evaluación semicuantitativa de esta capacidad bajo distintas condiciones de tratamiento, además, es sustituto *in vitro* para la formación de tumores *in vivo* en estudios de xenoinjertos, lo que ha permitido que sea de mucha utilidad en estudios para desarrollar fármacos nuevos y experimentar con los ya existentes para tratamiento contra el cáncer<sup>16, 17, 30</sup>.

Se precalentaron 30 mL del medio a 46°C en baño María, simultáneamente se calentó agarosa al 5 % en el microondas por 2 minutos, revisándolo cada 30 segundos.

Preparación de la fase A: Se mezclaron 27 mL de medio precalentado con 3 mL de agarosa líquida, en seguida se agregó 600  $\mu$ L de esta solución a cada uno

de los platos de una caja 12 pozos, se regresó la fase A al baño María de 46°C por 30 minutos, durante este tiempo se contabilizó la cantidad de células para realizar una suspensión de 40,000 células/mL requerida en el ensayo.

Preparación de la fase B: Se mezcló 5 mL de la fase A con 3 mL de la suspensión anterior, se resuspendió y se agregó 600 µL a cada pozo y esperar por 30 minutos.

Se agregar 200 µL de medio de cultivo e incubar a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> por semana y media, cambiando el medio cada 3 días.

Tinción de colonias: se preparó una solución de 5 mL de glutaraldehído al 0.5 % en PBS, se realizó una solución de cristal violeta al 0.025 % en metanol al 20 %. Se retiró el medio de la caja, en seguida se agregó 300 µL de la solución de glutaraldehído a cada pozo, se fijó por 10 minutos. Se retiró el glutaraldehído y se lavó una vez con PBS 1x. Se agregaron 400 µL de cristal violeta al 0.025 % y se tiñó por hora y media, pasado ese tiempo se realizaron lavados con PBS y se dejó toda la noche, al día siguiente se lavó, se observó la placa al microscopio y se analizó con el programa ImageJ.

## 7. Resultados

### 7.1 Ensayos de viabilidad celular

Se investigó el efecto citotóxico que ejerce la metformina sobre las células D-283 a diferentes concentraciones durante 14 días como se observa en la Figura 6. Se incubaron 5 cajas con una cantidad inicial de 500 células/pozo, se realizaron triplicados de cada condición (control, sin administración de metformina; MET 20 µM; MET 50 µM; MET 100 µM y MET 2 mM) y se realizó el ensayo de MTT a las 24 h, 72 h, 6 días, 9 días y 14 días. Finalmente se calculó el porcentaje de viabilidad con respecto al control.

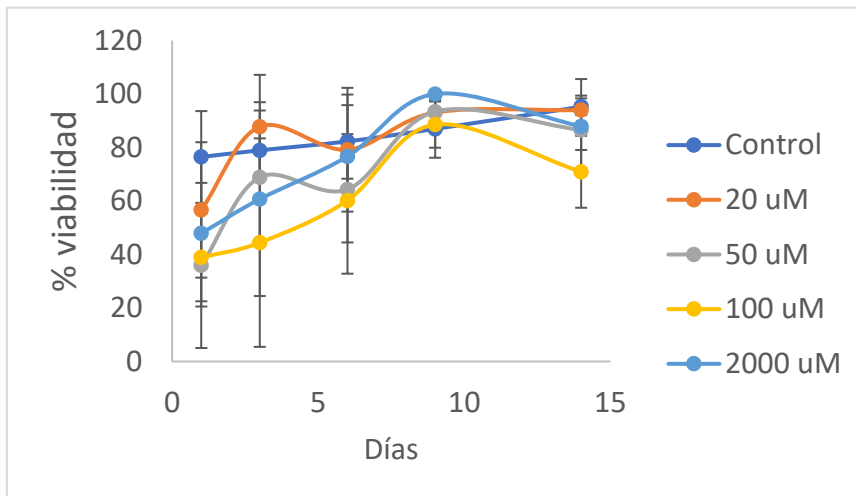


Figura 6. Ensayo de viabilidad de línea celular D-283 incubada a diferentes concentraciones de metformina, durante 14 días. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  DE n=3.

## 7.2 Ensayo de proliferación celular

Las células se incubaron con diferentes dosis de metformina, durante 24 h, 72 h, 6 días, 9 días y 14 días, al finalizar el tiempo correspondiente se contaron las células con azul tripán (0.4 %) utilizando un hemocitómetro.

El tratamiento de células con metformina durante 14 días provocó la disminución del número de células (Figura 7), sin embargo, este efecto sólo fue apreciable a altas concentraciones (MET 100  $\mu$ M y MET 2 mM). La Figura 7 indica que la cantidad de células D-283 se mantiene constante en los primeros 6 días para todas las condiciones. Sin embargo, en los días subsiguientes el control y las células tratadas con una concentración de metformina 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M aumentan significativamente, por lo que al parecer a concentraciones bajas la metformina no reduce la proliferación celular, el efecto de reducción se hace evidente a partir de 100  $\mu$ M.



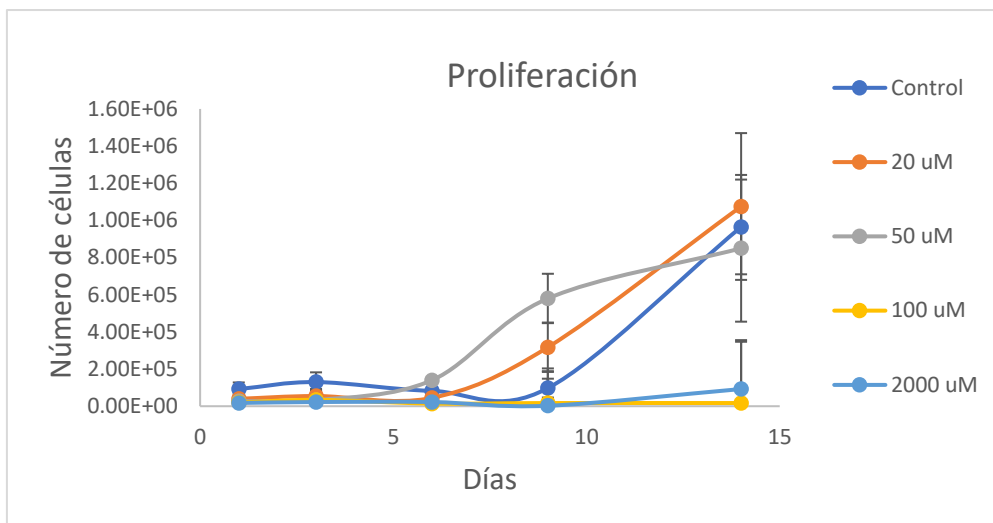


Figura 7. Ensayo de proliferación línea celular D-283 incubada con diferentes concentraciones de metformina, durante 14 días. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  DE n=3.

### 7.3 Ensayo de crecimiento independiente de anclaje

Se realizaron cuadruplicados de cada condición (control, sin administración de metformina; metformina 50  $\mu$ M y metformina 200  $\mu$ M) durante dos semanas, posteriormente se tomaron fotos y a través del software Image J se contaron el número de colonias en cada pozo. En la Figura 8 se presenta la gráfica del número de colonias, en la que se aprecia un menor número de colonias formadas de la línea celular MCF-7 en relación con el aumento de concentración de metformina; específicamente podemos estimar un promedio de colonias de 612.5 para el control, 345 para metformina 50  $\mu$ M y 252.7 para metformina 200  $\mu$ M.

En cuanto a las imágenes se aprecia una disminución en el tamaño de las colonias inversamente proporcional a la concentración de metformina.

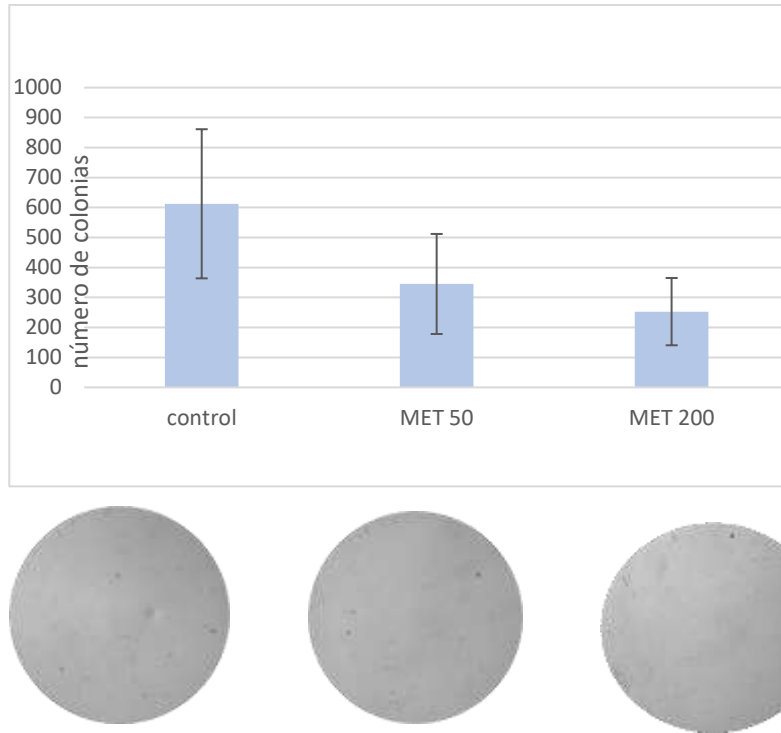


Figura 8. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje independiente células MCF-7 incubadas con diferentes concentraciones de metformina. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  DE  $n=4$ .

#### Ensayo de crecimiento independiente del anclaje en células D-283

Del mismo modo para la línea celular D-283 se realizaron cuadruplicados para cada condición, después de dos semanas se capturaron las imágenes y se cuantificaron mediante el software ImageJ, los resultados no muestran cambios significativos a baja concentración de metformina (50  $\mu$ M) sin embargo a una concentración más alta (200  $\mu$ M) si se presenta una disminución en el número de colonias, aunque no fue estadísticamente significativa.

Se observaron diferencias entre las líneas celulares MCF-7 y D-283, esta última mostró una naturaleza más resistente al tratamiento con metformina, aunque

en general los resultados fueron una disminución de colonias en ambas líneas, el efecto de la metformina en las células MCF-7 se reflejó a una concentración más baja en comparación con las células D-283 (Figura 9).

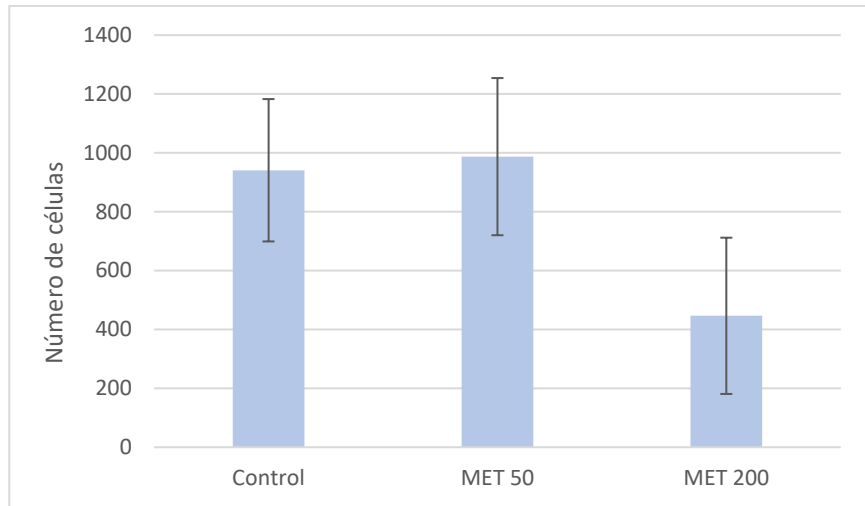


Figura 9. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje independiente células D-283 incubadas con diferentes concentraciones de metformina. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  DE n=4.

## 8. Discusión

Varios tipos de cáncer, incluido el meduloblastoma, se caracterizan por la activación de la proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR). La metformina, un fármaco comúnmente utilizado para reducir los niveles de insulina en la sangre y revertir la resistencia a la insulina modula AMPK, por lo que puede ser útil para el tratamiento del meduloblastoma<sup>21</sup>.

Dentro de los mecanismos de acción de la metformina se encuentra la activación de la enzima AMPK y como consecuencia la supresión de la actividad de mTOR mediante la vía PI3K/AKT/mTOR, la cual es importante en procesos fisiológicos como proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como metabolismo y angiogénesis<sup>1, 19, 20, 21</sup>.

Se ha demostrado que el tratamiento con metformina es selectivo para las células madre cancerosas en comparación a las no cancerosas, la metformina erradica las células de adenocarcinoma mamario humano en células radorresistentes mediante la activación de AMPK.<sup>19</sup> En diversos estudios se ha demostrado que el tratamiento con metformina en pacientes diabéticos tipo 2 suprimió el cáncer de mama, además disminuyó la mortalidad relacionada al cáncer. Adicionalmente en la coadministración con quimioterapia los resultados fueron más favorables<sup>9, 33, 36</sup>.

Con base en lo anterior se eligieron las células MCF-7, derivadas de cáncer de mama, como control para estandarizar las técnicas adecuadamente.

Para el modelo *in vitro* de meduloblastoma se utilizó la línea celular D-283, la cual representa el grupo 3 de meduloblastoma, asociado a una tasa alta de metástasis al momento del diagnóstico (40–45%), por lo general se manifiesta en niños pequeños y bebés y la supervivencia a los 5 años es menor de 60 %<sup>10</sup>.

En los resultados obtenidos se observa que el tratamiento con metformina no tiene efecto sobre la viabilidad de las células D-283 a las concentraciones utilizadas. Al ser la metformina un inhibidor del complejo I mitocondrial, lo cual puede afectar los resultados del ensayo MTT<sup>37</sup>, se decidió realizar el ensayo de proliferación contando las células con un hemocitómetro y utilizando azul tripán. Con esta segunda metodología se pudo observar la disminución en la proliferación de las células D-283 tratadas con 100  $\mu$ M y 2 mM de metformina.

La disminución de la capacidad clonogénica se observó en ambas líneas celulares, sin embargo, en las células MCF-7 se presentaron cambios a dosis bajas de metformina, mientras que en las células D-283 solo se aprecia el efecto en las concentraciones más altas. La diferencia en la respuesta de las células D-283 y MCF-7 a la metformina, es más evidente en la capacidad citotóxica y antiproliferativa de la metformina. De acuerdo a trabajos previos para las líneas celulares de cáncer de mama, la metformina sí produce muerte celular en este tipo de líneas tumorales<sup>37</sup>.

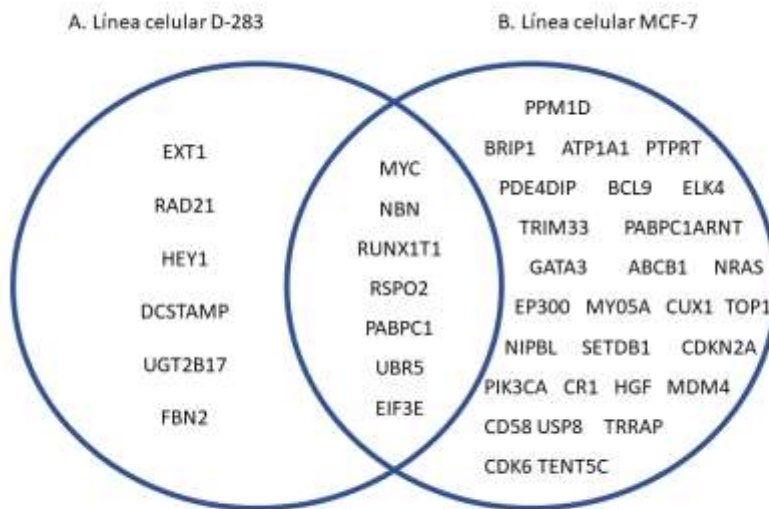


Figura 10. Esquematización de los genes alterados: (A) línea celular D-283, (B) línea celular MCF-7, en la intersección se muestra la alteración de los genes que se presentan en ambas líneas celulares. Basado en 32 y 33.

Como se aprecia en la Figura 10 y de acuerdo con la base de datos Cell Model Passports, dentro de la expresión de los genes alterados presentes en la línea celular MCF-7 y ausentes en la línea celular D-283 destaca el gen PIK3CA.

En la línea celular MCF-7 se encuentra sobre-expresado el gen PIK3CA, esto genera mayor cantidad de la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), esta enzima se encuentra relacionada con la vía AKT/mTOR. La proteína mTOR es un modulador del crecimiento, su inhibición farmacológica se asocia a efectos anti-proliferativos<sup>1</sup>.

En estudios preclínicos la metformina reduce la proliferación de células cancerosas e induce la muerte clonogénica; se demostró que la metformina suprime la proliferación de las células cancerosas de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7), a través de la activación de AMPK y la supresión

de mTOR. Tanto AMPK como mTOR controlan el estado energético de la célula mediante la proporción ATP:AMP regulando al unísono procesos del crecimiento celular. La vía PI3K/AKT/mTOR muy frecuentemente está mutada en células cancerosas lo que conduce a una desregulación del ciclo celular y por consiguiente genera una proliferación desmedida, diferenciación y supervivencia celular. Esta diferencia en uno de los blancos indirectos de la metformina podría explicar la diferencia entre la respuesta de las células MCF-7 y las D-283 en las cuales esta vía no se encuentra alterada.

Algunos autores sugieren que el potencial también se debe a la disminución de hiperinsulinemia, limitando la expresión de diversos factores de crecimiento semejantes a la insulina, además el bloqueo de vías de señalización dependientes de AMP, la principal la vía mTOR<sup>20, 21, 24, 27, 38</sup>.

## 9. Conclusión y perspectivas

### 9.1 Conclusiones

El tratamiento con metformina a dosis altas disminuye la proliferación celular y la capacidad clonogénica de las células D-283.

### 9.2 Perspectivas

De acuerdo a los resultados sería interesante analizar la participación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR en la capacidad clonogénica y la respuesta a metformina en las células D-283.

#### 9.2.2 Ventajas, desventajas y retos

Uno de los problemas que enfrentan los profesionales de la salud en cuanto al tratamiento oncológico es que los fármacos quimioterapéuticos son

altamente tóxicos para los pacientes, esto se manifiesta a través de vómito, fatiga, pérdida de apetito, etcétera; sin embargo, a dosis bajas los fármacos no tienen el efecto deseado, coadministrar fármacos que puedan combinarse y disminuir los efectos secundarios es de gran relevancia pues mejora el pronóstico del paciente. Se ha demostrado un efecto favorable de la metformina en diversos tipos de cánceres, a pesar de que en el meduloblastoma tipo 3 no sería de mucha utilidad, en otros subgrupos en donde la vía AKT/mTOR (como en el caso del subgrupo SHH) puede colaborar a un pronóstico más favorable.



## Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
2. Juraschka K, Taylor MD. *Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review*. *J Neurosurg Pediatr*. 2019 Oct 1;24(4):353-363. doi: 10.3171/2019.5.PEDS18381. PMID: 31574483.
3. Gampala S, Zhang G, Chang CJ, Yang JY. *Activation of AMPK sensitizes medulloblastoma to Vismodegib and overcomes Vismodegib-resistance*. *FASEB Bioadv*. 2021 Mar 17;3(6):459-469. doi: 10.1096/fba.2020-00032. PMID: 34124601; PMCID: PMC8171304.
4. Payne K. et al. *Metformin treatment inhibits proliferation and induces apoptosis in medulloblastoma cells*. *Cancer Res*. (2018); 78 doi: [10.1158/1538-7445.AM2018-889](https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-889)
5. Scheid AD, Beadnell TC, Welch DR. *Roles of mitochondria in the hallmarks of metastasis*. *Br J Cancer*. 2021 Jan;124(1):124-135. doi: 10.1038/s41416-020-01125-8. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33144695; PMCID: PMC7782743.
6. Organización Mundial de la salud (2022) Definición de cáncer. Recuperado de: [https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1) el 12 de julio del 2022
7. Organización Mundial de la Salud 2020. *Estimated number of new cases in 2020, worldwide, all cancers, both sexes, ages 0-14*. GLOBOCAN 2021 Recuperado de: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=2&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmcs=1&include\\_nmcs\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=2&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmcs=1&include_nmcs_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D)
8. Pollack, I. F., Agnihotri, S., & Broniscer, A. 2019. *Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions*, *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* PED, 23(3), 261-273
9. Hovestadt V, Ayrault O, Swartling FJ, Robinson GW, Pfister SM, Nortcott PA. *Medulloblastoma revisited: biological and clinical insights from thousands of patients*. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20(1):42-56. Doi:10.1038/s41568-019-0223-8. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31819232; PMCID: PMC9113832.
10. Kijima N, Kanemura Y. *Molecular Classification of Medulloblastoma*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2016 15;56(11):687-697. doi: 10.2176/nmc.ra.2016-0016. Epub 2016 May 26. PMID: 27238212; PMCID: PMC5221779.

11. McSwain LF, Parwani KK, Shahab SW, Hambardzumyan D, MacDonald TJ, Spangle JM, Kenney AM. *Medulloblastoma and the DNA Damage Response*. *Front Oncol*. 2022 Jun 7;12:903830. doi: 10.3389/fonc.2022.903830. PMID: 35747808; PMCID: PMC9209741.
12. Gong W, Zhao W, Liu G, Shi L, Zhao X. *Curcumin analogue BDDD-721 exhibits more potent anticancer effects than curcumin on medulloblastoma by targeting Shh/Gli1 signaling pathway*. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jul 6;14(13):5464-5477. doi: 10.18632/aging.204161. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35802536; PMCID: PMC9320555.
13. Wu F, Zhang Y, Sun B, McMahan AP, Wang Y. *Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy*. *Cell Chem Biol*. 2017 Mar 16;24(3):252-280. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.02.010. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28286127; PMCID: PMC7442121.
14. Azatyan A, Zhang S, Darabi A, Siesjö P, Wang T, Zaphiropoulos PG. *Circular RNAs in Hedgehog Signaling Activation and Hedgehog-Mediated Medulloblastoma Tumors*. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 13;13(20):5138. doi: 10.3390/cancers13205138. PMID: 34680287; PMCID: PMC8533754.
15. Ramos-Solano M et al. *Vía de señalización Wnt y cáncer cervicouterino*. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, (S.I.)*, v. 53, p. s218-s224, 2015 nov. ISSN 2448-5667
16. He S, Tang S. *WNT/ $\beta$ -catenin signaling in the development of liver cancers*. *Biomed Pharmacother*. 2020 Dec;132:110851. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110851. Epub 2020 Oct 17. PMID: 33080466.
17. Krishnamurthy N, Kurzrock R. *Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors*. *Cancer Treat Rev*. 2018 Jan;62:50-60. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.002. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29169144; PMCID: PMC5745276.
18. Kohn AD, Moon RT. *Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways*. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct;38(3-4):439-46. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.022. PMID: 16099039.
19. Porta C, Paglino C, Mosca A. *Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer*. *Front Oncol*. 2014 Apr 14;4:64. doi: 10.3389/fonc.2014.00064. PMID: 24782981; PMCID: PMC3995050.
20. Xia P, Xu XY. *PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application*. *Am J Cancer Res*. 2015 Apr 15;5(5):1602-9. PMID: 26175931; PMCID: PMC4497429.
21. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. *PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects*. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 26;22(1):173. doi: 10.3390/ijms22010173. PMID: 33375317; PMCID: PMC7796017.
22. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. *Emerging functions of the EGFR in cancer*. *Mol Oncol*. 2018 Jan;12(1):3-20. doi: 10.1002/1878-0261.12155. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29124875; PMCID: PMC5748484.

23. Beck B, Blanpain C. *Unravelling cancer stem cell potencial*. Nat Rev Cancer. 2013 Oct; 13(10): 727-38. doi :10.1038/nrc3597. PMID: 24060864
24. Jung J, Bollag WB. *Phenformin: AMP(K)ed for Potential Repurposing*. J Invest Dermatol. 2021 Jan;141(1):11-14. doi: 10.1016/j.jid.2020.06.008. PMID: 33342506.
25. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. *The mechanisms of action of metformin*. Diabetologia. 2017 Sep;60(9):1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28776086; PMCID: PMC5552828.
26. Rossi M, Talbot J, Piris P, Grand ML, Montero MP, Matteudi M, Agavnian-Couquiaud E, Appay R, Keime C, Williamson D, Buric D, Bourgarel V, Padovani L, Clifford SC, Ayrault O, Pasquier E, André N, Carré M. *Beta-blockers disrupt mitochondrial bioenergetics and increase radiotherapy efficacy independently of beta-adrenergic receptors in medulloblastoma*. EBioMedicine. 2022 Aug;82:104149. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104149. Epub 2022 Jul 8. PMID: 35816899; PMCID: PMC9283511.
27. Borowska A, Józwiak J. *Medulloblastoma: molecular pathways and histopathological classification*. Arch Med Sci. 2016 Jun 1;12(3):659-66. doi: 10.5114/aoms.2016.59939. Epub 2016 May 18. PMID: 27279861; PMCID: PMC4889700.
28. Rusert JM, Juarez EF, Brabetz S, Jensen J, Garancher A, Chau LQ, Tacheva-Grigorova SK, Wahab S, Udaka YT, Finlay D, Seker-Cin H, Reardon B, Gröbner S, Serrano J, Ecker J, Qi L, Kogiso M, Du Y, Baxter PA, Henderson JJ, Berens ME, Vuori K, Milde T, Cho YJ, Li XN, Olson JM, Reyes I, Snuderl M, Wong TC, Dimmock DP, Nahas SA, Malicki D, Crawford JR, Levy ML, Van Allen EM, Pfister SM, Tamayo P, Kool M, Mesirov JP, Wechsler-Reya RJ. *Functional Precision Medicine Identifies New Therapeutic Candidates for Medulloblastoma*. Cancer Res. 2020 Dec 1;80(23):5393-5407. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1655. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33046443; PMCID: PMC7718387.
29. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. *The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis*. Int J Mol Sci. 2021 Nov 26;22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827. PMID: 34884632; PMCID: PMC8657538.
30. Du F, Zhao X, Fan D. *Soft Agar Colony Formation Assay as a Hallmark of Carcinogenesis*. Bio Protoc. 2017 Jun 20;7(12):e2351. doi: 10.21769/BioProtoc.2351. PMID: 34541100; PMCID: PMC8410321.
31. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, Winn RA. *The soft agar colony formation assay*. J Vis Exp. 2014 Oct 27;(92):e51998. doi: 10.3791/51998. PMID: 25408172; PMCID: PMC4353381.
32. Cell Model Passports. A Hub for Preclinical Cancer Models. Model information MCF7 recuperado de

- <https://cellmodelpassports.sanger.ac.uk/passports/SIDM00148> el 12 de agosto del 2022.
33. Cell Model Passports. A Hub for Preclinical Cancer Models. Model information D-283MED recuperado de <https://cellmodelpassports.sanger.ac.uk/passports/SIDM00888> el 12 de agosto del 2022.
  34. Cáncer de mama. Datos y cifras. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> el 16 de agosto del 2022.
  35. Número de casos de cáncer en 2020. México. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf> el 16 de agosto del 2022
  36. Collado M., Serrano M., *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*. Nature Rev. Cancer, 2010 10:51-57
  37. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. *Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability*. Gene. 2015 Dec 15;574(2):193-203.
  38. Al-Zaidan L, El Ruz RA, Malki AM. *Screening Novel Molecular Targets of Metformin in Breast Cancer by Proteomic Approach*. Front Public Health. 2017
  39. Pethő Z, Najder K, Carvalho T, McMorrow R, Todesca LM, Rugi M, Bulk E, Chan A, Löwik CWGM, Reshkin SJ, Schwab A. *pH-Channeling in Cancer: How pH-Dependence of Cation Channels Shapes Cancer Pathophysiology*. Cancers (Basel). 2020 Sep 2;12(9):2484. doi: 10.3390/cancers12092484. PMID: 32887220; PMCID: PMC7565548.