



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFECTO DE UNA TRIPLE TERAPIA
FARMACOLÓGICA SOBRE LA ACTIVIDAD
TRANSCRIPCIONAL DE LA VÍA DE WNT EN UN
MODELO MURINO DE CÁNCER COLORRECTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

HÉCTOR HERRERA OROZCO

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ



Los Reyes Iztcala, Edo. de México
Febrero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

“It’s a dangerous business, Frodo, going out your door. You step onto the road, and if you don’t keep your feet, there’s no knowing where you might be swept off to.”

- J.R.R. Tolkien, *The Lord of the Rings*

“All we have to decide is what to do with the time that is given to us.”

- J.R.R. Tolkien, *The Lord of the Rings*

“We all make choices, but in the end our choices make us. A man chooses, a slave obeys.”

- Andrew Ryan, *BioShock*

"All men dream - but not equally. Those who dream by night, in the dusty recesses of their minds, wake in the day to find that it was vanity... But the dreamers of the day are dangerous men, for they may act their dream with open eyes, to make it possible. This I did."

- T. E. Lawrence, *Seven Pillars of Wisdom*

“Only a mind free of impediments is capable of grasping the chaotic beauty of the world.”

- Altair, *Assassin’s Creed*

“We are all our worst enemy. But also our best teacher.”

- Gouken, *Street Fighter*

“Dream, not of what you are, but what you want to be.”

- Margulis, *Warframe*

“Hatred and prejudice will never be eradicated. And the witch hunts will never be about witches. To have a scapegoat, that’s the key.”

- Geralt of Rivia, *The Witcher 3: Wild Hunt*

“Do. Or do not. There is no try.”

- Grand Jedi Master Yoda, *Star Wars: A New Hope*

“The Force is what gives a Jedi his power. It’s an energy field created by all living things. It surrounds and penetrates us. It binds the Galaxy together.”

- Obi-Wan Kenobi, *Star Wars: A New Hope*

Dedicatoria y agradecimientos

El terminar la Universidad se convierte en la meta cumplida más grande de toda mi vida (hasta ahora). Este logro no hubiera sido posible sin la ayuda de mis padres. Cuyo trabajo incansable, amor infinito y lecciones de vida me han permitido superar todos los desafíos que me ha arrojado la vida. Muchas gracias, papás. ¡Lo logramos!

De la misma manera, tengo que agradecer al resto de mi familia, a mis hermanos, Montserrat y Emiliano, por tantos buenos recuerdos y por tanto apoyo. A mis abuelos por cada consejo a lo largo del camino y por todo el amor que me han dado. A mis amigos, Brenda, Valeria y Max. Por todos los buenos momentos y las risas que compartimos a lo largo de la carrera.

Agradecer a la Dra. Gabriela por todo el aprendizaje que me brindó para el desarrollo de este proyecto. Por tanta paciencia, y sobre todo por la dedicación que mostró para llevar al mejor término posible el trabajo; así mismo, gracias por todas las pláticas que compartimos y por todas las lecciones sobre la vida académica y fuera del laboratorio. Muchas gracias por todo, Dra. Gaby.

Al Dr. Eduardo, por ser un maestro excepcional y por abrirme las puertas al mundo de la ciencia y mostrarme que la verdadera razón de un científico es admitir que no lo sabemos todo y buscar entender mejor el porqué de las cosas. Gracias por todas las enseñanzas que me impartió en el aula y en el laboratorio.

Al Dr. Carlos quiero agradecerle siempre impulsarme a ser mejor, siempre exigirme a que las cosas quedaran perfectas. Agradecerle la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, y por impulsarme a explotar mi potencial. Agradecerle a la Dra. Vero, cuyas lecciones sobre la importancia de la limpieza y el orden del laboratorio me van a acompañar siempre. Quiero agradecerle que siempre buscó la manera de ayudarme a obtener los resultados de los experimentos, siempre mostrándome la mejor manera de hacer las cosas y siempre ayudándome a ser más metódico para formarme como científico.

A todos mis amigos de los laboratorios L-11, Carlos, Luis, David, John, Iza, Rebe, Ceci, Orco, Sam y Misael por recibirme y por todas las risas y buenos momentos que hemos compartido, así como todos sus consejos. Quiero agradecerle a Joss, porque desde el primer día me ayudó a desempeñarme mejor en el laboratorio, enseñándome todos los trucos, y por hacerme sentir bienvenido, además de un amigo, te considero un mentor.

Sobre todo, quiero agradecerle a mi novia Diana. Eres la persona que conoce realmente el sudor que me costó llegar hasta aquí. Gracias por nunca dudar de mí, y por jamás permitir que dudara sobre mí mismo. Gracias por caminar a mi lado todo el camino. Por ser mi mejor compañera y mi mejor amiga. Por apoyarme en todo y por siempre ayudarme a levantarme cuando me tropiezo. Gracias por todo lo que hemos compartido y seguiremos compartiendo juntos, Diana. Te amo mucho, flaca. Este logro también va por ti.

Abreviaturas

AKT – Protein Kinase B

AMP – Adenosín Monofosfato

AMPK - Protein Kinase AMP-Activated

AOM – Azoxymethane

APC – Adenomatous Polyposis Coli

ATP – Adenosin Trifosfato

BH3 – Borano

BMP – Bone Morphogenetic Protein

BRAF - B-Raf Proto-Oncogene

βTrCP - Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase

CCR – Cáncer Colorrectal

CD – Complejo de Destrucción

CDK – Cyclin Dependent Kinase

CK1 – Casein Kinase 1

COX - Cyclooxygenase

CP – Cultivo Primario

Dkk1 – Dickkopf

DMEM/F-12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DNA – Desoxyribonucleic Acid

DSS – Dextran Sulfate Sodium

Dvl – Dishevelled

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

EMT – Transición Epitelio Mesénquima

FAP – Familiar Adenomatous Polyposis

FDA – Food and Drug Administration

FGF – Fibroblast Growth Factor

FZD – Frizzled

GSK3β - Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

HGF – Hepatocyte Growth Factor

HOXA – Homeobox A

I/IGF - Insulin – like Growth Factor Type

LDH – Lactato Deshidrogenasa

LEF – Lymphoid Enhancer-Binding Factor

Lgr - Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor

LRP - Low-density lipoprotein receptor-related protein

MMP – Matrix Metalloprotease

MMR – Mismatch Repair

MOD – Metformina, Oxamato de Sodio y Doxorrubicina

MSI – Microsatellite Instability

mTOR - Mechanistic Target of Rapamycin Kinase

NH₂ – Amina

PARP - Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1

PBS – Phosphate Buffered Saline

PI3K - Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase

Pro – Prolina

PTEN - Phosphatase and Tensin Homolog

PVDF - Polyvinylidene difluoride

RNA – Ribonucleic Acid

RNF43 – Ring Finger Protein 43

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno

S. Inmune – Sistema Inmune

Ser – Serina

TCF – T-Cell Factor

TGF – Transforming Growth Factor

Thr – Treonina

Tm – Melting Temperature

TNF – Tumor Necrosis Factor

TNM – Tumor, Nódulos Linfáticos y Metástasis

TSC - Tuberous Sclerosis Complex

VEGF – Vascular Endotelial Growth Factor

Wnt – Wingless-related integration site

Índice

1. Resumen	9
2. Introducción	10
2.1. Cáncer	10
2.2. Cáncer, un problema de salud pública	11
2.3. <i>Hallmarks</i> del cáncer	13
2.4. Etiología del Cáncer Colorrectal (CCR)	14
2.4.1. Factores de riesgo de CCR.....	16
2.5. Vía de Wnt/ β – catenina	17
2.5.1. Actividad de la vía de Wnt.....	20
2.5.2. Vía de Wnt/ β – catenina en cáncer.....	21
2.5.3. Vía de Wnt en CCR.....	22
2.6. Modelo para el estudio de CCR	23
2.7. Triple Terapia Farmacológica (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorrubicina; MOD).....	26
2.7.1. Metformina	26
2.7.2. Doxorrubicina	28
2.7.3. Oxamato de Sodio	30
2.8. Actividad de MOD en Wnt	31
3. Justificación.....	33
4. Hipótesis	33
5. Objetivos.....	33
6. Materiales y Métodos	34
6.1. Estudios <i>in vivo</i>	34
6.2. Cultivo Primario	36
6.3. Purificación de RNA.....	36
6.4. Purificación de Proteínas	37
6.5. Retro Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT PCR).....	38
6.6. Polymerase Chain Reaction Punto Final (PCR pf)	39
6.7. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	40
6.8. Western Blot.....	41
6.10. Microscopía de Fluorescencia	42
6.11. TOP – Flash.....	43

6.12. Análisis Estadístico	44
7. Resultados	44
8. Discusión	53
9. Conclusiones	66
10. Referencias	67
11. Anexos	91

Índice de Figuras

• Figura 1: Desarrollo Neoplásico (Modificado de Winslow, 2014).....	11
• Figura 2: Número estimado de muertes a nivel mundial 2018 (Tomado de Bray et al., 2018).....	12
• Figura 3: Número estimado de muertes por cáncer en México, 2018 (Modificado de Bray et al., 2018). Los asteriscos representan el mayor número de casos, dependiendo del color representan incidencia o mortalidad.....	13
• Figura 4: Blancos terapéuticos en los Hallmarks del Cáncer (Tomada y modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).....	14
• Figura 5: Subtipos moleculares de CCR (Tomado de Müller et al., 2016).....	16
• Figura 6: Vía de Wnt/B - Catenina. a) Apagada; b) Encendida. (Modificado de Nusse & Clevers, 2017).	18
• Figura 7: Dextran Sulfato de Sodio.....	24
• Figura 8: Metabolismo del Azoxymetano, arreglo tridimensional de CYP2E1 (Modificado de Soon Sohn et al., 2001).....	25
• Figura 9: Estructura química de la Metformina.	26
• Figura 10: Mecanismo antitumoral de la Metformina: A) Inhibición de la vía de I/IGF, B) Inhibición mediada por AMPK (Tomado de Zi et al., 2018).	28
• Figura 11: Estructura química de la Doxorrubicina.	29
• Figura 12: Mecanismo de acción de la Doxorrubicina.	30
• Figura 13: Estructura química del Oxamato de Sodio	31
• Figura 14: Mecanismo de acción del Oxamato de Sodio.....	31
• Figura 15: Modelo murino de CCR, con los grupos experimentales y la administración de MOD.	35
• Figura 16: Protocolo de amplificación de la RT	38
• Figura 17: Protocolo de amplificación PCR Punto Final.....	40
• Figura 18: Protocolo de amplificación qPCR.	40
• Figura 19: Sistema de vectores TOP/FOP - Flash, y actividad de luciferasa.....	43
• Figura 20: Seguimiento del peso (g) de los ratones.	45
• Figura 21: a) Imágenes de colon de los ratones del modelo murino; b) fotografía de CP de colon de ratón 40X.....	46
• Figura 22: Número de tumores por grupo experimental.	46
• Figura 23: Estandarización de las condiciones de PCR Punto final	47

- **Figura 24:** Expresión de genes blanco de la vía de Wnt en tejido de colon de ratón del modelo murino. No se observan diferencias significativas. 48
- **Figura 25:** Expresión relativa de genes blanco de la vía de Wnt en CP 49
- **Figura 26:** Ensayo de WB, de las proteínas de modelo murino 50
- **Figura 27:** Análisis densitométrico de los genes blanco de la vía de Wnt en modelo murino. La desviación estándar observada proviene de los triplicados de los análisis densitométricos. 50
- **Figura 28:** Ensayo de WB de los genes blanco de la vía de Wnt en CP. 51
- **Figura 29:** Análisis densitométrico de los genes blanco de la vía de Wnt en CP 51
- **Figura 30:** Transfección de células de CP con GFP, observadas en microscopio de fluorescencia (40X). 52
- **Figura 31:** Ensayo de TOP-Flash, en el que se muestra la actividad de la luciferasa. 53

Índice de Tablas

- **Tabla 1:** Grupos experimentales del modelo murino. 34
- **Tabla 2:** Secuencias de oligos sintetizadas y Tm. 39

1. Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más letal a nivel mundial. Una de las vías de señalización más importantes para el desarrollo neoplásico en colon es la vía de Wnt. Se ha visto que la actividad aberrante de dicha vía ocurre en alrededor del 80% de casos esporádicos de CCR. En este trabajo, se evaluó el efecto que tiene una triple terapia farmacológica Metformina, Doxorubicina y Oxamato de Sodio (MOD) en un modelo murino y en cultivo primario de células de colon de ratón, sobre la vía de Wnt medido a través de ensayos de TOP-Flash y la actividad transcripcional de los genes blanco: c-Myc, Tcf-1, c-Jun, Axin-2, FGF-18, LEF-1, MMP-7 y SNAIL-1 y la cantidad de proteína de c-Myc y Snail-1. Se encontró que la triple terapia, inhibió el desarrollo de CCR, eliminando un mayor número de tumores y mayor resistencia a la pérdida de peso en los ratones. Además, se observó que esta triple terapia disminuye la actividad de la vía de Wnt, así como la actividad transcripcional de sus genes blanco y la cantidad de proteína de Snail-1. Lo anterior permite suponer que MOD es una propuesta de tratamiento prometedora para el tratamiento de CCR. **Palabras Clave: Wnt/B-catenina, Murino, Terapia, Cáncer Colorrectal**

2. Introducción

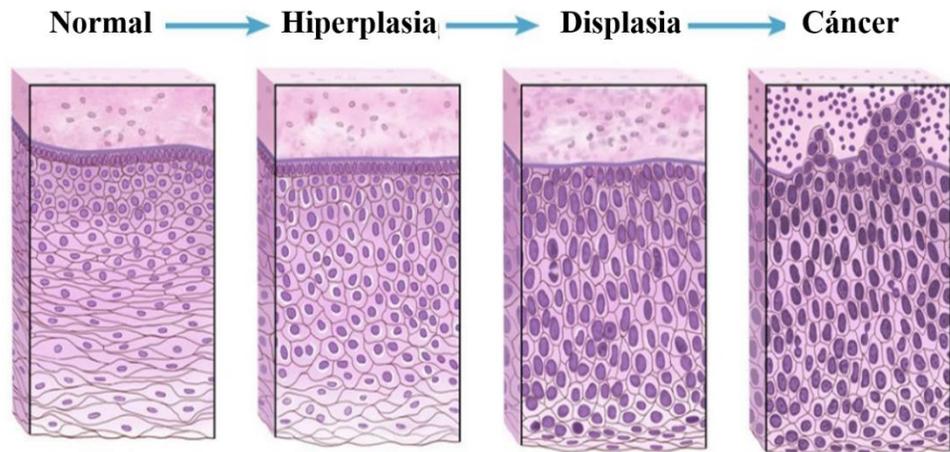
2.1. Cáncer

Todas las células del cuerpo humano existen en tejidos definidos por señales de crecimiento con una regulación muy fina que llevan a patrones celulares conservados y apropiados para las necesidades fisiológicas del organismo. Cuando existen alteraciones en esta regulación, se originan células cancerosas, las cuales comienzan a proliferar ininterrumpidamente (Weinberg, 1996). Entonces, se denomina como cáncer al conjunto de enfermedades crónico degenerativas, cuyo síntoma principal es la proliferación descontrolada y la invasión a otros tejidos (National Cancer Institute, 2015).

Es sabido que las mutaciones en el genoma de las células resultan en la transformación de una célula normal a una célula cancerosa (Weinberg, 1996). Dichas alteraciones pueden ocurrir de $10^4 - 10^5$ veces, las cuales se ven reflejadas en una plétora de grandes re-arreglos estructurales, así como en ganancia o pérdida de información genética. Tales mutaciones pueden originar errores en los procesos celulares normales (e.g. replicación) o generarse por la actividad de factores externos (luz ultravioleta, componentes del humo del tabaco, etc.).

Una de las clasificaciones de las alteraciones genéticas en cáncer más utilizadas en el campo de estudio de la biomedicina es la que se otorga a partir del efecto funcional que tiene la mutación sobre la proteína codificada, es decir, “*oncogenes*” o mutaciones con ganancia dominante de función, y “*supresores tumorales*” o genes con pérdida recesiva de función. Es la combinación de ambos efectos (ganancia de función en oncogenes y pérdida de función en los genes supresores) la que dirige al desarrollo neoplásico (Santarosa & Ashworth, 2004). Se ha observado que debe ocurrir una acumulación progresiva de estas alteraciones para que prosiga la formación tumoral (Yokota, 2000).

Como ya se mencionó anteriormente, el desarrollo neoplásico es resultado de la acumulación de alteraciones genéticas en las células, pero, a su vez, se ha descrito que dicho desarrollo neoplásico puede ser clasificado en diferentes grados patológicos (**Fig.1**).



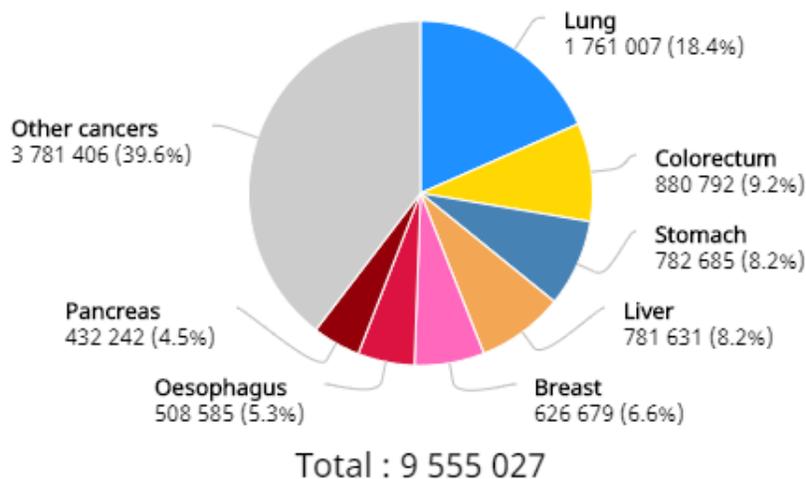
• **Figura 1:** Desarrollo Neoplásico (Modificado de Winslow, 2014).

Con el fin de evaluar el grado de extensión de la enfermedad se ha planteado una convención que categoriza cuatro estadios: se considera Estadio 0 al carcinoma *in situ*, Estadios 1 y 2 a los tumores localizados en el órgano de origen, Estadio 3 a los tumores localmente expandidos y con nódulos linfáticos afectados y, por último, a los que poseen metástasis como Estadio 4. Esta clasificación, aplicable a todos los tipos de cáncer, se subdivide dependiendo del grado de invasión anatómica que posean las células cancerosas, siguiendo una clasificación denominada TNM (T – Tumor, N – Nódulos Linfáticos y M – Metástasis; Sobin, Gospodarowicz, & Wittekind, 2011). Es importante resaltar que estos estadios se correlacionan con la prognosis del paciente, debido a que reflejan la malignidad y agresividad del tumor.

2.2. Cáncer, un problema de salud pública

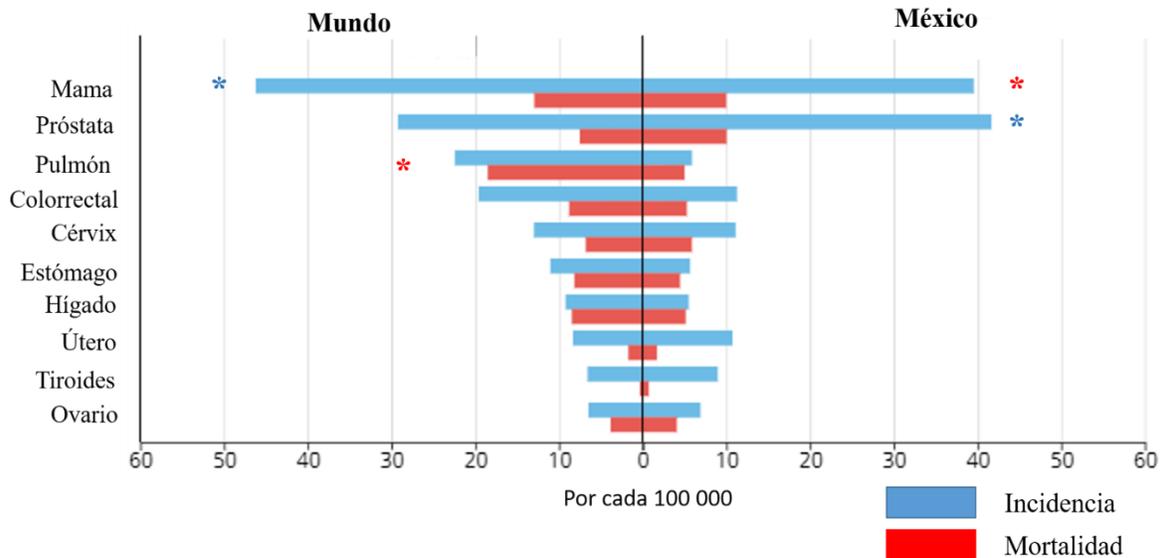
En el año 2018, se registraron un total de 18,078,957 casos nuevos de cáncer a nivel mundial, agregados a los 43,841,302 casos prevalentes a cinco años; números que van en aumento cada año. Es importante recalcar que, para el mismo año, ocurrieron un total de 9,555,027 fallecimientos alrededor del mundo (**Fig.2**), tomando en cuenta todos los tipos de cáncer. De esta manera, el cáncer se convierte en un problema severo cuyas repercusiones tanto en la salud, como económicas a nivel mundial van en aumento (Bray et al., 2018). Cabe mencionar que los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial, tomando en consideración

ambos sexos, son el cáncer de pulmón seguido por el cáncer colorrectal (CCR) y, en tercer lugar, el cáncer gástrico.



- **Figura 2:** Número estimado de muertes por tipo de cáncer a nivel mundial 2018 (Tomado de Bray et al., 2018).

Para México, el cáncer más frecuente es el de pulmón; en cuanto a mortalidad se ha registrado que el tipo de cáncer más letal es el de mama (Bray et al., 2018). El CCR ocupa el tercer lugar en incidencia y el cuarto lugar en mortalidad debido a su dificultad de detección y de tratamiento (**Fig.3**), por lo que el estudio del mismo se convierte en una prioridad para la investigación biomédica nacional. Aun cuando el costo de la quimioterapia para CCR no está dentro de los más caros, comparándolo con otros tipos de cáncer, por ejemplo la leucemia (Burns, 2017); el CCR representa una pérdida económica para los pacientes, así como para los sistemas de salud pública a nivel nacional e internacional (Orangio, 2018).

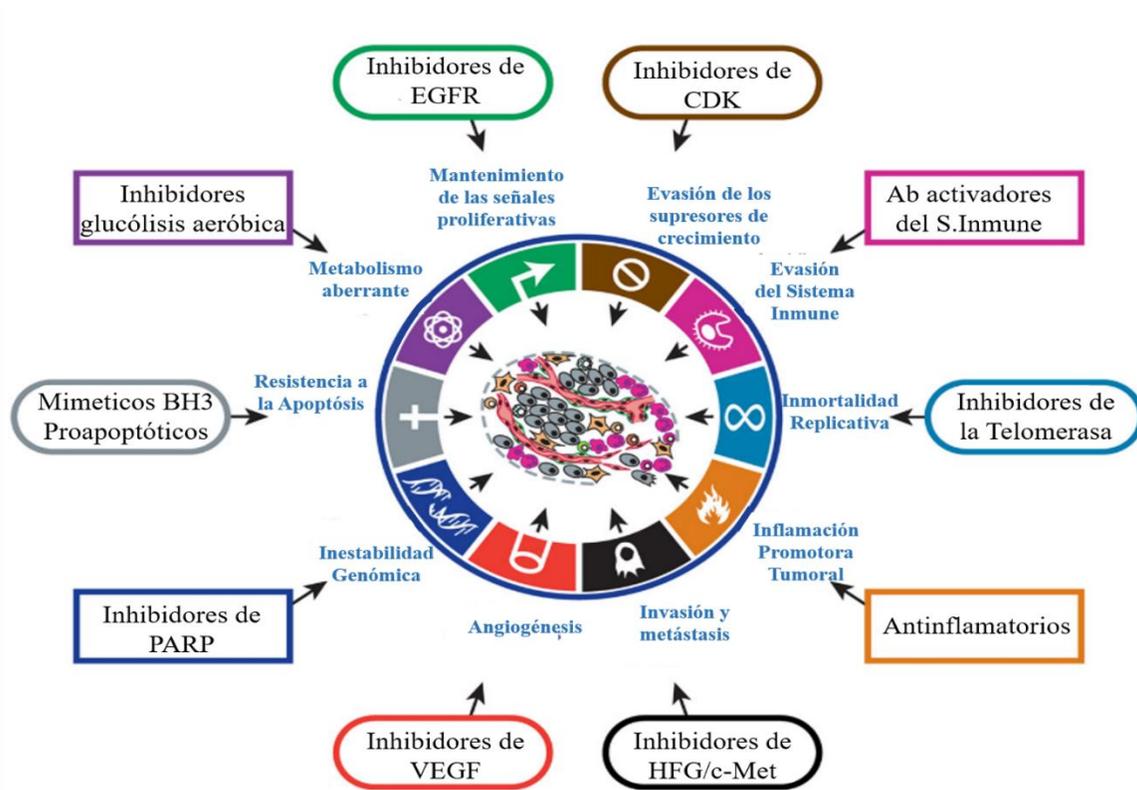


- Figura 3:** Número estimado de muertes por cáncer en México, 2018 (Modificado de Bray et al., 2018). Los asteriscos representan el mayor número de casos, dependiendo del color representan incidencia o mortalidad.

2.3. *Hallmarks* del cáncer

Uno de los grandes problemas que existe para tratar el cáncer, es la heterogeneidad que en sí mismo representa, debido a factores como la diferencia en el tipo celular que origina el tumor, las interacciones heterotípicas entre las células cancerosas y su microambiente, y, la plasticidad de las *stem cells* (Células tallo) que originan el tumor, de esta manera se genera una exacerbada heterogeneidad fenotípica *intra* e *inter* tumoral que dificulta la aplicación de terapias universales para todos los tipos de cáncer (Ashworth, Lord, & Reis-Filho, 2011).

Para unificar el conocimiento que se tiene sobre el cáncer; Hanahan & Weinberg (2000, 2011) proponen que existen características compartidas por todos los tipos de cáncer; las cuales recibieron el nombre de *Hallmarks* (Sellos Distintivos), entre las cuales se encuentra: la resistencia a la apoptosis, la evasión de señales anti-crecimiento, la angiogénesis, entre otros (**Fig.4**).



• **Figura 4:** Blancos terapéuticos en los Hallmarks del Cáncer (Tomada y modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).

Estas características distintivas, facilitan el estudio del desarrollo del tumor a través de todas sus etapas. Así mismo, gracias a que se han caracterizado dichos Hallmarks, se pueden desarrollar terapias novedosas que tengan como objetivo modificar una o varias de tales características (Fig.4).

2.4. Etiología del Cáncer Colorrectal (CCR)

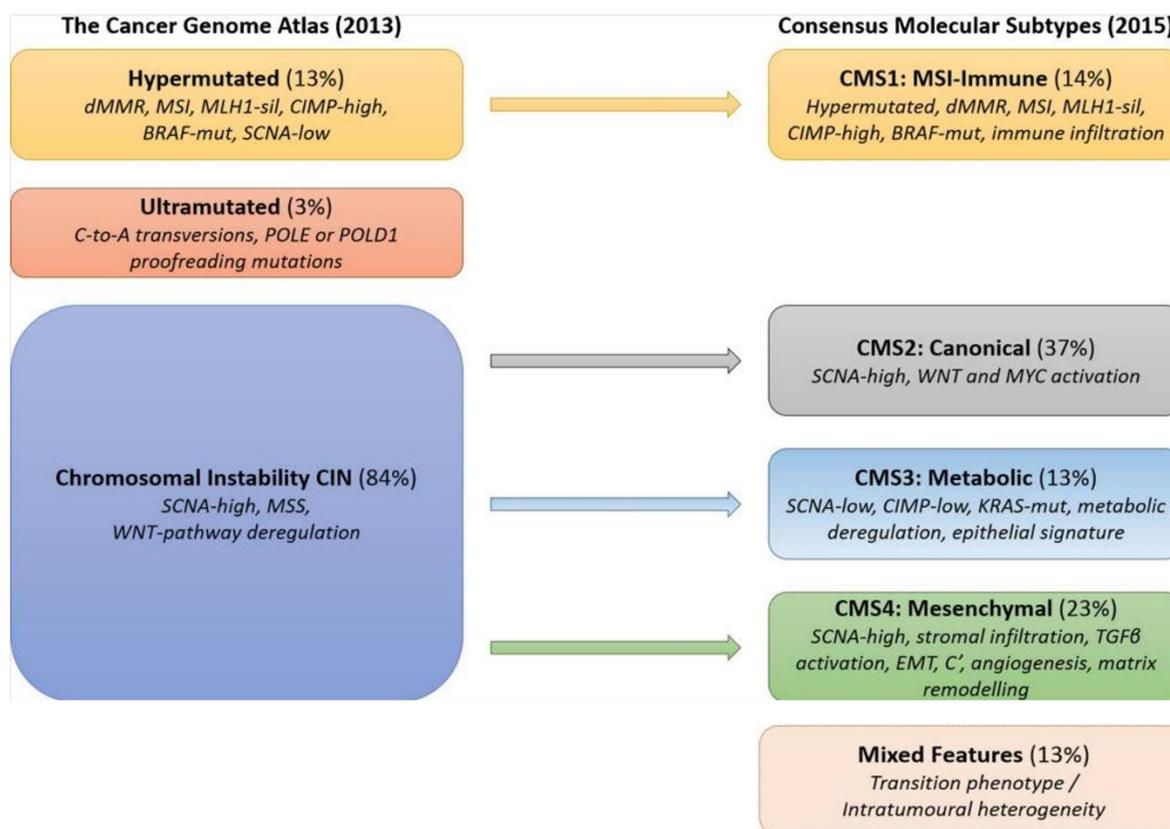
El CCR inicia en el colon o en el recto. El 90% de casos son adenocarcinomas que se originan a partir de las células epiteliales de la mucosa del recto, el 10% restante lo ocupan subtipos más raros como el neuroendócrino, de células escamosas, etc. La principal característica del adenocarcinoma, es la formación de glándulas (Fleming, Ravula, Tatishchev, & Wang, 2012), así como núcleos hiper cromáticos, engrandecidos, con forma de cigarro y agrupados formando empalizadas (Cappell, 2008).

Se ha descrito que el CCR posee una naturaleza heterogénea, pero existen marcadores que permiten caracterizar subtipos, dependiendo de las alteraciones moleculares que posean. El subtipo más común (~80% de los casos esporádicos de CCR) está dado por inestabilidad genómica, reflejada en ganancia y pérdida de información genética y otros re-arreglos cromosómicos; una frecuente alteración o pérdida del gen supresor tumoral Adenomatous Polyposis Coli (APC), así como mutaciones en KRAS y TP53. El segundo grupo, representa alrededor del 16% de casos y se encuentra hiper-mutado con una alta inestabilidad de microsatélites. Se ha descrito que, en este subgrupo, la inestabilidad proviene de un mecanismo defectuoso de *Mismatch Repair* (MMR). El MMR consiste en reparar los “*mismatches*”, es decir, los apareamientos incorrectos base-base que se generan durante el procesamiento del DNA, evitando que estas mutaciones sean permanentes en las células que están en proceso de división.

2.4.1. Subtipos de CCR

De esta manera, se han establecido dos clasificaciones distintas para definir subtipos característicos de CCR, que agrupen una serie de alteraciones moleculares que actuarían como símil de los *Hallmarks* y, por tanto, al entendimiento de la biología de los distintos tipos de CCR y sus posibles terapias (**Fig. 5**; Müller et al., 2016). La primera clasificación consta de tres grupos: 1) Hipermutado; que se caracteriza por alteraciones en los genes de MMR, 2) Ultramutado: cuyas características son mutaciones *proofreading* (mutaciones que afectan los mecanismos de detección y reparación de daño a DNA) y transversiones C-A (sustituciones de Citocina por Adenina) ; e 3) Inestabilidad Cromosómica: un gran número de alteraciones somáticas, inestabilidad en los microsatélites y alteraciones en la vía de Wnt (Cancer Genome Atlas Network, 2012). La segunda clasificación fue propuesta con variantes a estos grupos, 1) Microsatellite Instability (MSI)-Inmune: hipermutado, alteraciones a los genes de MMR, mutaciones a BRAF e inclusive infiltración de células del sistema inmune; 2) Canónico: alteraciones a la vía de Wnt y activación de c-Myc; 3) Metabólico: mutaciones en KRAS, desregulación metabólica y sello epitelial; 4) Mesenquimal: infiltración estromal, activación del (Factor de Crecimiento Transformante-B), por sus siglas en inglés TGF – β , Transición Epitelio – Mesénquima (EMT), angiogénesis y remodelación de la matriz

extracelular. Además, se propuso un cuarto subtipo de CCR, 5) Características combinadas: el cual puede poseer características de todos los subtipos anteriores o heterogeneidad intratumoral y un fenotipo de transición (Guinney et al., 2015). Se ha descrito que, de los cuatro subtipos caracterizados por el Consenso Molecular, el tipo cuatro es el que posee la peor prognosis debido a que suele detectarse en los estadios más avanzados, con una supervivencia a 5 años del 62% y una supervivencia libre de recaída del 60%, los peores de cualquier subtipo (Guinney et al., 2015). Además, de que se ha observado que pocos casos de pacientes en estadio III presentan beneficios con terapias adyuvantes sistémicas (Thanki et al., 2017).



- **Figura 5:** Subtipos moleculares de CCR (Tomado de Müller et al., 2016).

2.4.1. Factores de riesgo de CCR

Se ha descrito de manera muy definida la etiología del CCR, que consta de factores ambientales, así como de factores de estilo de vida que el paciente puede cambiar, y aquellos

que no pueden ser modificados. Dentro de los factores de riesgo asociados al estilo de vida del paciente se encuentran: 1) las prácticas nutricionales, principalmente las que se encuentran asociadas a una dieta “occidental”, es decir, un alto consumo de grasas y carnes rojas y bajo consumo de frutas y vegetales; 2) inactividad física y obesidad; 3) tabaquismo y 4) alto consumo alcohólico (Boyle & Langman, 2000). Se ha observado que modificar estos hábitos puede reducir hasta un ~70% el riesgo de padecer CCR (Willett, 2005).

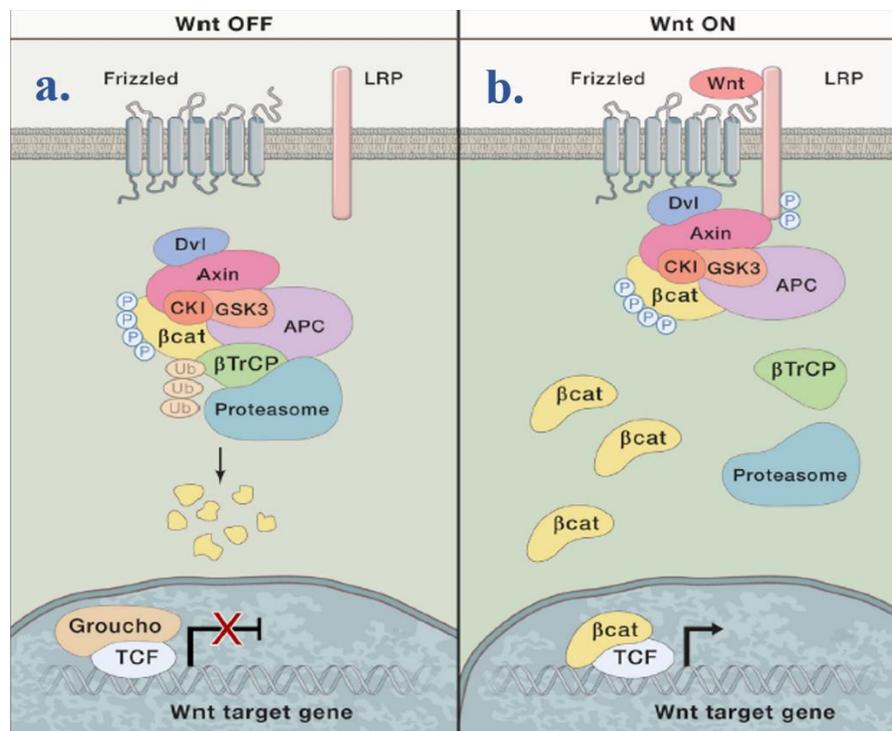
Por otro lado, existen factores de riesgo que el paciente no puede modificar; las formas heredadas de CCR que representan alrededor de 2-5% de los casos. La forma más común de CCR hereditario es la que se encuentra asociada al Síndrome de Lynch, que se hereda en una forma autosomal dominante, afectando a los genes asociados a MMR (Lynch et al., 2009). La segunda forma más común de CCR hereditario se conoce como *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP), la cual se caracteriza por un surgimiento exacerbado de pólipos adenomatosos desde la niñez, los cuales degeneran con certeza en CCR si no se atienden de manera pronta. Esta enfermedad es causada por una mutación heterocigótica en la línea germinal hereda de manera dominante autosomal, así como las mutaciones *de novo* en APC (Kinzler & Vogelstein, 1996). Estas enfermedades autosomales, aunque poco frecuentes, incrementan de manera significativa el riesgo de padecer CCR, además de disminuir en gran medida la edad a la cual puede presentarse el desarrollo neoplásico (Lynch et al., 2009)

2.5. Vía de Wnt/ β – catenina

La vía de Wnt es una cascada de transducción de señales activa principalmente durante el desarrollo embrionario, tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis en tejidos adultos (Clevers & Nusse, 2012; Reya & Clevers, 2005). Se ha observado que dicha vía se encuentra conservada evolutivamente, que su expresión está distribuida en todos los tejidos y que en su forma aberrante está relacionada a diferentes patologías del desarrollo, e inclusive el cáncer (Nusse & Clevers, 2017).

Los ligandos Wnt son glicoproteínas que actúan como factores de crecimiento y están implicados en procesos del desarrollo embrionario, mediante la regulación de la proliferación celular y el destino celular de células troncales (*stem cells*; Niehrs & Acebron, 2012). En general, los ligandos, comprenden ~350 aminoácidos y pesan alrededor de 40 kDa.

La familia de genes para los ligandos Wnt (19 para vertebrados) está definida por su secuencia de aminoácidos, más que por sus propiedades funcionales. Tales ligandos comparten ciertas características, como la necesidad de una secuencia de señales para activar su secreción, aminoácidos cargados, varios sitios de posibles glicosilaciones y un dominio rico en cisteínas de ~25 residuos, que ayuda al correcto plegamiento (*folding*) del ligando (Mikels & Nusse, 2006). Los ligandos inmaduros de Wnt son procesados post-traduccionalmente en el Retículo Endoplásmico mediante una acyl transferasa llamada *Porcupine* (Coudreuse, Korswagen, Robinson, & Kenyon, 2007). Posteriormente son secretados y están asociados fuertemente con membranas plasmáticas, por lo que se ha propuesto un mecanismo de transporte mediado por vesículas externas, para facilitar la propagación de la señal (Nusse & Clevers, 2017).



- **Figura 6:** Vía de Wnt/β - Catenina. a) Apagada; b) Encendida. (Modificado de Nusse & Clevers, 2017).

Los ligandos de Wnt, mediante un mecanismo dependiente de contacto inician la cascada de señalización de la vía, con la interacción con su receptor Frizzled (FZD) una proteína de siete dominios trans-membranales. Esta interacción genera un cambio conformacional en el receptor, lo cual permite la dimerización con el co-receptor *Low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP, por sus siglas en inglés; Nusse & Clevers, 2017). La dimerización expone un dominio conservado que permite la fosforilación de la cola citoplasmática de LRP para que pueda interactuar con Axin. Esta interacción recluta al Complejo de Destrucción (CD) hacia la membrana citoplasmática y la unión es estabilizada mediante la interacción de *Dishevelled* (Dvl) con una de las colas citoplásmicas de Fzl. Mediante una interacción de motivos conservados de Ser/Pro, LRP interactúa con GSK3 β generando un cambio conformacional que inhibe su actividad de cinasa (Stamos, Chu, Enos, Shah, & Weis, 2014). Esto lleva a dos posibles mecanismos complementarios por los cuales se inhibe el CD: 1) la inactivación del complejo mediante el anclaje a la membrana plasmática y 2) la saturación del CD mediante la inhibición de GSK3 β , por lo que la β -catenina es estabilizada y no es reconocida por la *Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase* (β TrCP), por lo que no es llevada a degradación (Li et al., 2012). La inhibición del CD lleva a una rápida acumulación de β -catenina, la cual se trasloca al núcleo donde interactúa con TCF/LEF (*T-Cell Factor*, TCF/ *Lymphoid Enhancer-Binding Factor*, LEF), complejo de factores transcripcionales que están unidos a DNA (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Esto representa la activación transcripcional de diferentes genes relacionados a proliferación, desarrollo y regulación del ciclo celular (Nusse & Clevers, 2017).

Es importante mencionar que β -catenina es esencial en los epitelios, debido a que participa en la unión citoplasmática de varias Caderinas, tales como la E-caderina en las uniones adherentes (Peifer, McCrea, Green, Wieschaus, & Gumbiner, 1992). De esta manera, en condiciones basales β -catenina se degrada constantemente para evitar su acumulación y posterior translocación al núcleo, donde actúa como factor transcripcional (**Fig.6**). Para degradar a β -catenina, ésta es reconocida por el CD y anclada al mismo mediante APC, el cual la estabiliza y permite la interacción con Axin. A su vez, tal interacción expone sitios de reconocimiento para dos serin treonin cinasas: *Casein kinase 1* (CK1); que realiza una fosforilación inicial en la Ser45 de β -catenina, la cual permite el reconocimiento por la

siguiente enzima: *Glycogen Synthase Kinase β* (GSK3 β); encargada de fosforilar 3 veces más en la Thr41, Ser37 y Ser33 (C. Liu et al., 2002). Este código de fosforilaciones, recluta a β TrCP; que es una subunidad de la Ubiquitin ligasa E3 SCF $^{\beta$ TrCP (SKP1-cullin-F-box), que reconoce a β -catenina fosforilada, la ubiquitina, con la cual será identificada y degradada por el proteasoma (Fuchs, Spiegelman, & Suresh Kumar, 2004; Nusse & Clevers, 2017).

2.5.1. Actividad de la vía de Wnt

Se ha descrito que la vía de Wnt tiene actividad durante el desarrollo embrionario, así como en enfermedades degenerativas e inclusive en cáncer (Nusse & Clevers, 2017). De esta manera, evaluar la actividad de la vía de Wnt adquiere gran importancia para la comprensión a nivel molecular de tales padecimientos. Con tal fin existen métodos para la detección de la actividad de la vía de Wnt; el más utilizado actualmente es el ensayo de TOP/FOP Flash, que directamente mide la interacción de la β -catenina con sus sitios canónicos de unión en el núcleo (Molenaar et al., 1996); mediante el gen reportero Luciferasa. La actividad generada puede ser evaluada mediante un luminómetro. Otra forma de medir la actividad de la vía de Wnt es mediante la expresión de sus genes blanco.

En la literatura se menciona que uno de los marcadores canónicos de la actividad de la vía de Wnt es Axin2, debido a que es un regulador negativo de la misma que actúa mediante retroalimentación negativa (Jho et al., 2002); convirtiéndose en uno de los genes por excelencia para detectar la actividad de la vía de Wnt. De la misma manera, se ha reportado que c-Myc es otro factor transcripcional blanco de la actividad de la vía, con diferentes papeles tanto en el desarrollo del embrión, así como oncogen en diferentes tipos de cáncer (T. C. He et al., 1998). Por otro lado, se ha descrito que la actividad de la vía de Wnt puede actuar retroalimentándose aumentando la expresión de los receptores canónicos TCF/LEF (Filali, Cheng, Abbott, Leontiev, & Engelhardt, 2002; Roose et al., 1999), aumentando así de manera autónoma la expresión de la vía

De esta manera se plantea utilizar ambos métodos de detección de la actividad de la vía de Wnt para evaluar el efecto que ejerce MOD. Así mismo, se propone evaluar la actividad de

otros genes blanco de la vía de Wnt con participación en diferentes procesos tumorales. Por ejemplo, Snail-1 es un factor de transcripción que regula positivamente el ciclo celular y es vital para la proliferación, de la misma manera ha sido descrito como uno de los blancos transcripcionales de la vía de Wnt (ten Berge et al., 2008). De la misma manera, se ha descrito que el promotor de FGF18 tiene sitios putativos de unión de TCF4, convirtiéndolo en un blanco de la vía de Wnt, cuya actividad permite el crecimiento autócrino de CCR (Shimokawa et al., 2003). Otro factor transcripcional importante para el crecimiento tumoral es c-Jun, cuya participación es importante para desarrollar un fenotipo agresivo en cáncer de mama (Smith et al., 1999), además de ser un blanco transcripcional importante para la vía de Wnt (Mann et al., 1999). Por otro lado, la angiogénesis ha sido caracterizada como un *Hallmark* del cáncer debido a su importancia para la obtención de los nutrientes necesarios para el mantenimiento del tumor (Hanahan & Weinberg, 2011), uno de los genes que ha sido descrito para este proceso es el *Matrix Metalloprotease 7* (MMP7), así mismo, este gen ha sido caracterizado como otro blanco transcripcional de la vía de Wnt (Brabletz, Jung, Dag, Hlubek, & Kirchner, 1999).

El presente trabajo busca evaluar la actividad de la vía de Wnt medida a través de algunos de sus blancos transcripcionales reportados como indicadores adecuados de si la vía se encuentra activa; así como de algunos genes blanco con funciones importantes para el desarrollo tumoral en colon.

2.5.2. Vía de Wnt/ β – catenina en cáncer

Debido a la importancia de la vía de Wnt para el mantenimiento de la homeostasis de las *células troncales* en los epitelios, es común que se presente una activación aberrante de la cascada de señalización, así como alteraciones en los intermediarios de la misma en diferentes tipos de cáncer (Reya & Clevers, 2005). Recientemente se ha descrito que Wnt juega un papel muy importante en el desarrollo de leucemia, debido a que lleva a cabo una fina regulación para el mantenimiento de las *stem cells* hematopoyéticas, se ha observado que en la gran mayoría de casos de leucemia la actividad de la vía de Wnt se encuentra significativamente incrementada (Luis, Ichii, Brugman, Kincade, & Staal, 2012).

En Melanoma, se ha descrito que alrededor del 25% de casos se originan a partir de melanocitos mutados por un proceso de senescencia inducida por oncogenes como BRAF (Dhomen et al., 2009). El proceso de senescencia inducida por oncogenes, es un mecanismo de defensa que se activa cuando células comienzan a expresar oncogenes y de esta manera se genera un arresto celular similar a la senescencia. La actividad de c – Myc, mediada por la vía de Wnt es uno de los activadores de esta señal (Juan, Muraguchi, Iezza, Sears, & McMahon, 2014), además de participar en la inmortalización de los melanocitos mediante la supresión del gen *p16^{Ink4a}* (Delmas et al., 2007) incrementando el riesgo a desarrollar cáncer.

En cáncer de mama se ha detectado que ~50% de los casos presentan actividad aberrante de la vía de Wnt, y que existe correlación con cierta afectación negativa en la prognosis de los pacientes (Lin et al., 2000). Curiosamente, la forma en como participa la vía de Wnt en estos casos es mediante la sobreexpresión de los ligandos y la disminución significativa en la expresión de sus inhibidores, más que mutaciones somáticas en los intermediarios de la vía (Geyer et al., 2011; Howe & Brown, 2004; Klarmann, Decker, & Farrar, 2008).

2.5.3. Vía de Wnt en CCR

La alteración que se podría considerar como clave para el desarrollo tumoral en colon es inactivar a APC, ya que distintas afectaciones a este gen llevan a diversos niveles de activación de la vía, e inclusive pueden ser localizadas en regiones diferenciales del colon (Buchert et al., 2010; Christie et al., 2013). El papel funcional que tienen las mutaciones de APC es la estabilización de la β -catenina, actuando en conjunto con Axin1/2, GSK β y CK1, formando el llamado “Complejo de Destrucción” (CD), regulando la expresión de la vía de Wnt (Kwong & Dove, 2009), por lo que existe una interacción constitutiva con TCF/LEF en el núcleo (Korinek, 1997; Su et al., 1993). De esta manera, se ha descrito que APC actúa como “portero” (*gatekeeper*) y que su inactivación es fundamental para la promoción del desarrollo neoplásico (Fearnhead, Britton, & Bodmer, 2001).

Se han identificado mutaciones en otros intermediarios de la vía como el Módulo *R-spondin/Lgr5/RNF43*, que llevan a un crecimiento tumoral independiente y mutuamente, excluyente de las alteraciones en APC (Giannakis et al., 2014). Entre otras se han identificado

mutaciones hereditarias en el gen Axin-2, el cual actúa como regulador negativo de la vía mediante un mecanismo de retroalimentación, incrementando la predisposición a padecer CCR (Lammi et al., 2004). Se ha descrito que las mutaciones de *CTNNB1* (gen que codifica para la β -catenina), también alteran los residuos Ser/Thr NH₂ – terminal a nivel de proteína (Morin et al., 1997); así como las mutaciones que afectan sus sitios de fosforilación dentro del CD impidiendo que la β -catenina se degrade, llevando a la acumulación citoplasmática de la misma y su posterior translocación al núcleo (Novellademunt, Antas, & Li, 2015).

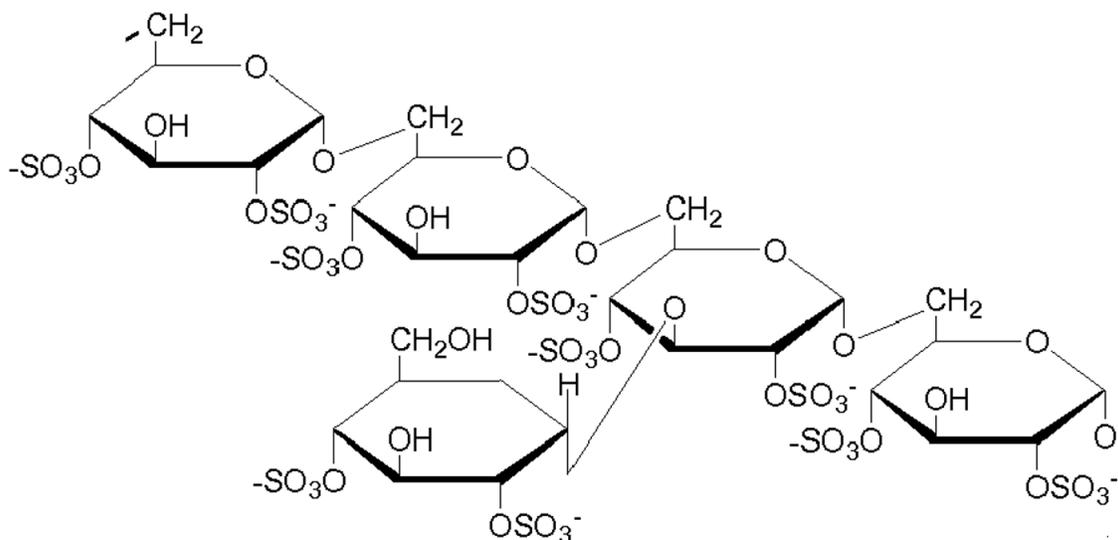
Dentro de los efectores de la vía de Wnt se encuentran *TCF7L1/2*, para los cuales se han descrito diversas alteraciones que promueven el desarrollo neoplásico, tales como mutaciones puntuales, deleciones y *frameshift mutations* (Bass et al., 2011; Cuilliere-Dartigues et al., 2006; Duval et al., 1999). Entonces, se puede observar que existen diferentes eventos en la vía de Wnt que pueden incrementar el riesgo o inclusive ser un evento decisivo para el desarrollo neoplásico.

2.6. Modelo para el estudio de CCR

Para dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la enfermedad, se han planteado modelos *in vitro* e *in vivo*; los cuales permiten realizar estudios sobre fenómenos particulares en condiciones controladas. La ventaja que conceden los modelos animales sobre estudios en líneas celulares es que permiten tener un panorama más cercano a lo real observando las condiciones totales del organismo.

Un modelo que resalta, es el propuesto para el estudio de la colitis ulcerativa en ratones (Okayasu, 1990); en el cual se utiliza Dextran Sulfato de Sodio (DSS) en solución, administrada a ratones con resultados positivos. El DSS es un hidrato de carbono sulfatado cargado negativamente (**Fig.7**), colitígeno y con propiedades anticoagulantes; con un peso molecular de entre 40,000 y 50,000 kDa necesarios para que logre penetrar el epitelio del colon. Se sabe que la manera en como el DSS genera colitis es debido a su carga negativa, ya que esta erosiona el epitelio del colon, permitiendo la diseminación de citocinas pro

inflamatorias, así como cambios en la flora intestinal (Chassaing, Aitken, Malleshappa, & Vijay-Kumar, 2014). De esta manera, se genera un microambiente óptimo para el desarrollo tumoral.

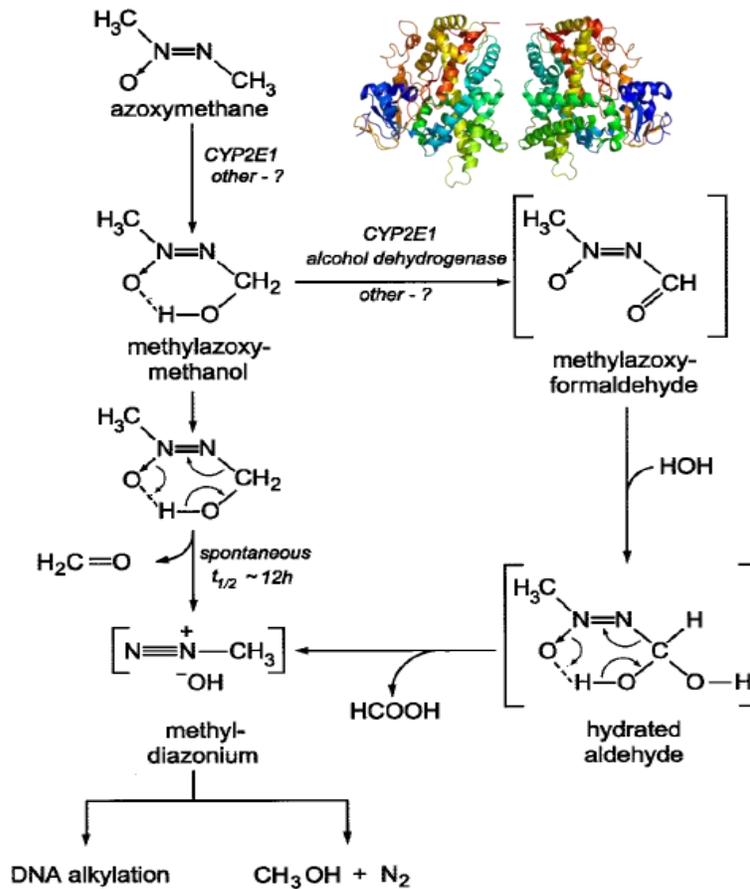


• **Figura 7:** Estructura molecular del Dextran Sulfato de Sodio.

Posteriormente, el modelo fue adaptado para poder desarrollar CCR, agregando un genotóxico, el Azoxymetano (AOM; **Fig.8**), desarrollando tumores alrededor de las 20 semanas en ratones, por lo que se convirtió en un modelo por excelencia para desarrollar CCR (Mori et al., 2005). En su forma basal el AOM no actúa como carcinógeno, para cumplir esta función debe ser procesado por el citocromo P450, específicamente por la isoforma CYP2E1. El cual lo transforma en Metilazoxymetanol, que se degrada en formaldehído y una sustancia alcalina y altamente reactiva, misma que causa daño alquilante al DNA, modificando las Guaninas por O6 – Metilguanina y O4 – Metiltimina (Soon Sohn, Fiala, Requeijo, Weisburger, & Gonzalez, 2001).

Estas modificaciones alteran diversas vías entre ellas la de K-RAS, desregulando las vías de MAPK y PI3K, las cuales, a su vez, regulan procesos celulares como el crecimiento y la proliferación, jugando un papel muy importante en el desarrollo neoplásico. También se ha observado que altera la vía de TGF- β , cuyas isoformas regulan negativamente la proliferación, crecimiento y ciclo celular, actuando como un supresor tumoral, pero las administraciones de AOM han producido disminución en los niveles de esta proteína por

mecanismos aún no descritos (Chen & Huang, 2009). Por último, se ha descrito que el AOM genera mutaciones en los codones 33 y 41 del gen CTNNB1, alterando los residuos que son blanco de GSK3 β (Fujise et al., 2007; Kohno, Suzuki, Sugie, & Tanaka, 2005).



- **Figura 8:** Metabolismo del Azoximetano, arreglo tridimensional de CYP2E1 (Modificado de Soon Sohn et al., 2001).

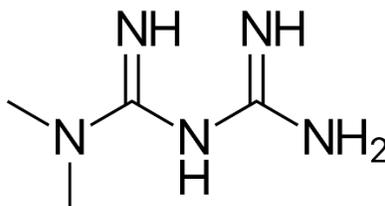
En general, se puede afirmar que este modelo es práctico, relativamente barato y de rápido desarrollo, el cual lo convierte en una opción viable para llevar a cabo estudios relacionados con fenómenos moleculares del CCR.

2.7. Triple Terapia Farmacológica (Metformina-Oxamato de Sodio-Doxorrubicina; MOD)

Actualmente, desarrollar un nuevo medicamento resulta lento, costoso y con un alto riesgo de ineficiencia. Se ha reportado que todo el proceso puede llevar alrededor de 15 años con altos costos y un porcentaje de éxito de tan solo el 2% (Xue, Li, Xie, & Wang, 2018). Para solucionar esta problemática, existe una aproximación conocida como *Drug Repurposing*, en el cual se busca identificar nuevos usos para medicamentos que ya han sido aprobados para uso humano (Ashburn & Thor, 2004). Entre otros se buscan terapias novedosas para el cáncer. Se ha reportado que tres fármacos diferentes 1) Metformina, 2) Doxorrubicina y 3) Oxamato de sodio, en combinación pueden ser utilizados como terapia para CCR con resultados muy alentadores (Figueroa-González et al., 2016). De la misma manera, se registró que la administración de MOD en un modelo murino transplantado subcutáneamente con células MDA-MB-231, mostraron una inhibición completa del crecimiento tumoral, mediante la inhibición de mTOR y de LDH-A, promoviendo la apoptosis y la autofagia (García-Castillo et al., 2017).

2.7.1. Metformina

La Metformina (**Fig.9**) es una biguanida, cuya actividad radica en sensibilizar al tejido hepático para la insulina, se utiliza generalmente para tratar la diabetes tipo II, con resultados significativos similares a tratamiento con monoterapia de insulina (DeFronzo, Goodman, & Group, 1995). La Metformina actúa inhibiendo la gluconeogénesis, lo que se traduce a una menor producción de glucosa hepática; también se ha visto que existe un aumento en la ingesta de glucosa en el músculo esquelético y los adipocitos (Hundal et al., 2000).

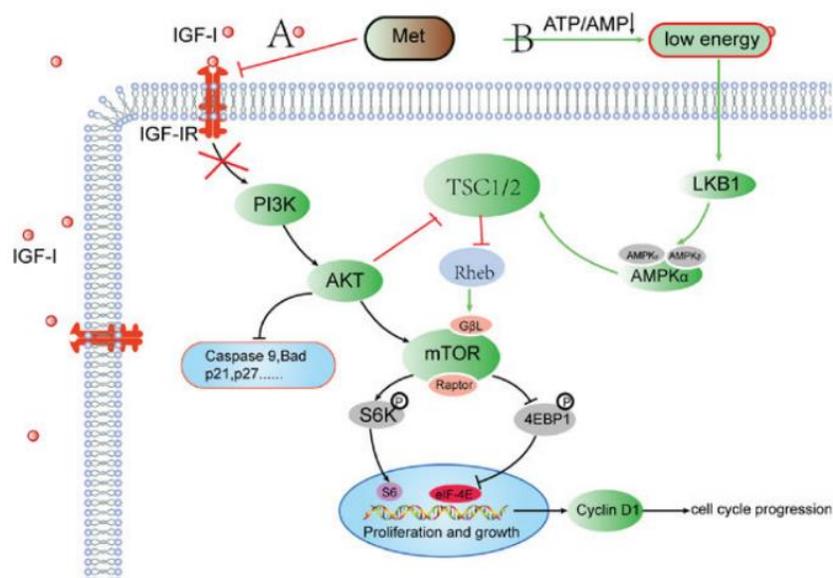


• **Figura 9:** Estructura química de la Metformina.

En el año 2005, en un estudio observacional se detectó que las personas tratadas con Metformina tenían un 23% de menor probabilidad de padecer cáncer de páncreas (Evans, Donnelly, Emslie-Smith, Alessi, & Morris, 2005). Desde entonces se han buscado evidencias de la actividad antitumoral de la Metformina dando como resultado una disminución en la progresión neoplásica en cáncer hepático, así como un efecto protector a pacientes diabéticos de desarrollar este tipo de cáncer (Donadon, Balbi, Mas, Casarin, & Zanette, 2010a; Donadon, Balbi, Valent, & Avogaro, 2010). Otros tipos de cáncer en los que se encontraron resultados similares a los vistos en hepatocarcinoma con el uso de la Metformina, fueron en cáncer de mama (Jiralerspong et al., 2009), ovario (Kumar et al., 2013) y próstata (X.-X. He, Tu, Lee, & Yeung, 2011).

Se ha observado, entonces, que la Metformina genera resultados prometedores como terapia adyuvante. Se han propuesto dos posibles mecanismos por el cual, la Metformina lleva a cabo su efecto antitumoral; el primero es mediante el *Insulin – like Growth Factor Type 1* (I/IGF), el cual está relacionado con procesos celulares como el crecimiento celular, mitosis e inclusive apoptosis, por lo tanto está muy relacionado con los desarrollos neoplásicos (Pollak, 2012). Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de la Metformina lleva a una sensibilización de los tejidos para la insulina (es decir, permite que la insulina que existe en circulación se absorba con mayor eficiencia), e inhibe la absorción de la glucosa. Por lo tanto, se disminuyen los niveles de insulina en la sangre, inactivando a I/IGF, por lo tanto, inhibiendo a su efector río abajo: PI3K/AKT/mTOR (Zi et al., 2018). El segundo mecanismo, está relacionado directamente a la vía de AMPK. El cual es un sensor energético que se encarga de mantener la homeostasis de la proporción AMP/ATP. Se ha propuesto también que la Metformina inhibe al complejo respiratorio mitocondrial I, lo que llevaría a una menor producción de ATP. El desbalance en dicha proporción dirigiría a la activación de AMPK (Pollak, 2012). De la misma forma, se ha descrito que mTOR actúa como uno de los blancos de AMPK, ya que funciona como un sensor regulatorio de control de la síntesis de proteínas, proliferación y el metabolismo. Existen dos mecanismos conocidos, por los cuales la Metformina actúa sobre mTOR (**Fig.10**): 1) puede fosforilar a *Tuberous Sclerosis Complex 2* (TSC2), que activaría el complejo TSC1/TSC2, el cual inactiva a RAS y a mTOR (Inoki, Zhu, & Guan, 2003; Zi et al., 2018); y, 2) AMPK fosforila directamente a Raptor, el cual

interactúa con mTOR, inactivando ambos (Gwinn et al., 2008). De esta manera, la Metformina se convierte en una terapia prometedora para el tratamiento de esta enfermedad.

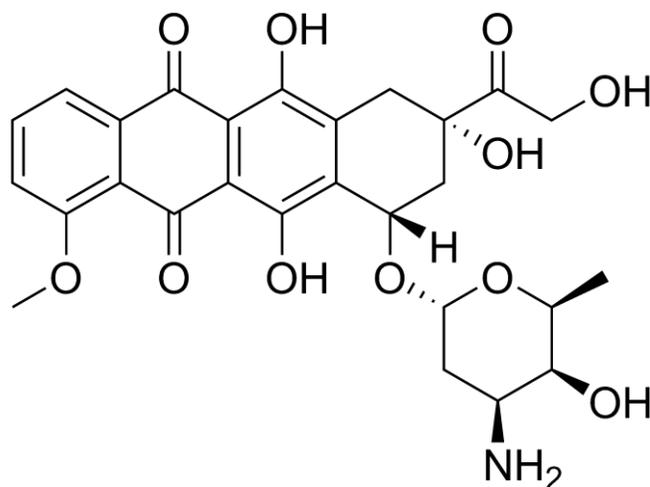


- **Figura 10:** Mecanismo antitumoral de la Metformina: A) Inhibición de la vía de I/IGF, B) Inhibición mediada por AMPK (Tomado de Zi et al., 2018).

2.7.2. Doxorrubicina

La Doxorrubicina (**Fig.11**) es una antraciclina que se extrajo por primera vez de la bacteria *Streptomyces peucetius*. Dicha bacteria producía un compuesto rojo, se aisló y se utilizó como antibiótico por un tiempo, posteriormente, algunos experimentos demostraron que el fármaco tenía actividad antitumoral (Rivankar, 2014). Pero, debido a que genera daño cardiotoxico, su uso ha sido limitado. Se ha descrito que dicho daño, proviene de la bioacumulación durante décadas (Kremer, van Dalen, Offringa, Ottenkamp, & Voûte, 2001; Mulrooney et al., 2009). Por lo que pensar en terapias combinatorias con otros fármacos, y simultáneamente dosis inferiores, lo convierte en una opción viable. Se ha hipotetizado que existen dos mecanismos entrelazados que conllevan al daño cardiotoxico, el primero de ellos es que la Doxorrubicina puede ser reducida a un metabolito llamado Doxorrubicinol, mismo que interfiere con la regulación de los iones de hierro y de calcio, así como la bomba de

protones de la mitocondria, inhibiendo la respiración conduciendo a la liberación del Citocromo-C, y subsecuentemente a la apoptosis (Thorn et al., 2011).



• **Figura 11:** Estructura química de la Doxorubicina.

Se ha descrito el uso de la Doxorubicina como monoterapia, para tratar diferentes tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de vejiga, de mama, de estómago y de pulmón (Rivankar, 2014). Se han descrito dos posibles mecanismos por los cuales la Doxorubicina ejerce su actividad antitumoral (**Fig.12**). El primero es como agente intercalante al DNA, inhibiendo la replicación. Durante este proceso, la Doxorubicina estabiliza a la Topoisomerasa II después de que separó a las cadenas, previniendo que la molécula se vuelva a ensamblar (Fornari, Randolph, Yalowich, Ritke, & Gewirtz, 1994). El segundo mecanismo está relacionado a la producción de radicales libres y el daño que pueden generar a DNA, proteínas y a las membranas celulares (Gewirtz, 1999). La forma en como ocurre este proceso es que tras metabolizarse, la Doxorubicina se oxida a una semiquinona, que debido a su naturaleza inestable se transforma de regreso a Doxorubicina, liberando una gran cantidad de *Especies Reactivas de Oxígeno* (ROS; por sus siglas en inglés), las cuales generan peroxidación de lípidos, daño a las membranas biológicas, daño a DNA, estrés oxidativo e inclusive apoptosis (Thorn et al., 2011).

De esta forma, se puede observar que los mecanismos de acción antitumorales y cardiotoxicos de la Doxorubicina ocurren por eventos diferentes entre sí, por lo que es posible encontrar una forma de inhibir lo más posible los efectos negativos causados por el fármaco y potenciar los beneficios anti cancerígenos del mismo.

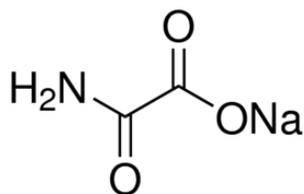


- **Figura 12:** Mecanismo de acción de la Doxorubicina.

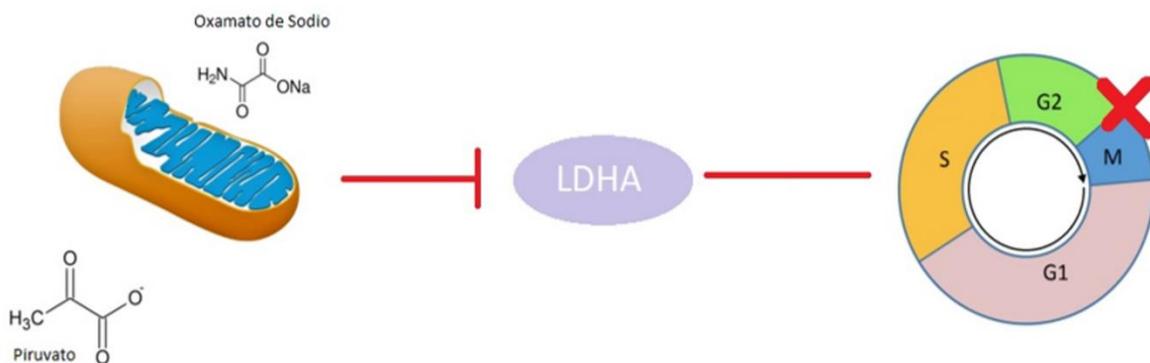
2.7.3. Oxamato de Sodio

Dentro de la investigación en cáncer, es vital la búsqueda de nuevas terapias que permitan el tratamiento de la enfermedad por el problema de salud pública que representa. De esta manera, parte de la búsqueda ha optado como blancos terapéuticos a los *Hallmarks* del cáncer, entre ellos el metabolismo aberrante. Se ha descrito que las células cancerosas, adquieren gran parte de su energía a partir de la glucólisis aerobia (mecanismo que se lleva a cabo cuando no hay oxígeno presente), aun cuando existen condiciones normales de oxígeno, a esto se conoce como efecto Warburg (Koppenol, Bounds, & Dang, 2011). Se ha descrito que el Oxamato de Sodio (**Fig.13**), un fármaco utilizado para acelerar la fermentación láctica (X. Yu et al., 2018), es una terapia novedosa y efectiva debido a que es

un inhibidor competitivo del Piruvato, debido a que la estructuras de los enlaces de ambas moléculas son muy similares entre sí, así, el Oxamato bloquea el sitio catalítico de la enzima (Fig.14), inhibiendo la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH; Miskimins et al., 2014), por lo que se afecta la capacidad de las células cancerosas de realizar Glucólisis Aeróbica (Zhao, Han, Yang, Wu, & Zhan, 2015), dicho efecto induce arresto celular en las fases G2/M y, por lo tanto, las células son llevadas a Apoptosis (Zhai, Yang, Wan, Zhu, & Wu, 2013). Aun cuando, se ha descrito en abundancia el papel anticérrigeno que poseen la Metformina y la Doxorrubicina, la aplicación del Oxamato como monoterapia es relativamente nuevo y poco explorado. De esta manera, el presente trabajo, busca comenzar a dilucidar la eficiencia del Oxamato de Sodio como terapia coadyuvante.



• **Figura 13:** Estructura química del Oxamato de Sodio



• **Figura 14:** Mecanismo de acción del Oxamato de Sodio

2.8. Actividad de MOD en Wnt

Se ha descrito que los fármacos utilizados en la Triple Terapia tienen interacción con la vía de Wnt/ β -catenina. Particularmente, se ha reportado que la Metformina bloquea a SOX4, oncogen asociado a una mala prognosis, el cual es un blanco transcripcional de la vía de Wnt.

Se ha observado que la Metformina al ser un inhibidor del complejo mitocondrial I, induce la acidificación del medio intracelular, la cual resulta en la activación de Respuesta a Proteínas con Plegamiento Incorrecto (*Unfolded Protein Response*) que induce al represor transcripcional DDIT3, que se sabe es un inhibidor de la vía de Wnt (Melnik et al., 2018). Por otro lado, se ha descrito que la activación de AMPK mediada por Metformina, disminuye la expresión de la β -catenina en citoplasma y núcleo, debido a que AMPK activado secuestra a la β -catenina citoplasmática llevándola a degradación proteosomal, por lo que existe una disminución en los niveles de la proteína, y por tanto una disminución en su actividad (Park, Kim, & Kee, 2019).

A su vez, se ha reportado que existe una correlación entre la activación de la vía de Wnt y la quimioresistencia en líneas celulares de cáncer. Particularmente, se ha observado que la Doxorubicina, participa sobreexpresando genes blanco de la vía de Wnt que se relacionan con este proceso (Mutlu, Yalçın Azarkan, Taghavi Pourianazar, Yücel, & Gündüz, 2018). Sin embargo, se ha reportado que la inactivación de la vía de Wnt, disminuye la capacidad de quimioresistencia y que induce sensibilidad a la Doxorubicina (Suebsoonthron, Jaroonwichawan, Yamabhai, & Noisa, 2017). Es importante recalcar que aun cuando el papel del Oxamato de Sodio en el metabolismo energético de la célula, así como la inhibición del Ciclo del Ácido-Tricarboxílico, y la tasa respiratoria de la célula han sido descritos en profundidad (H. Liu, Savaraj, Priebe, & Lampidis, 2002) hasta este momento no se ha descrito el papel que juega el Oxamato de Sodio en relación con la vía de Wnt

Como ya se mencionó, ha sido reportada la eficiencia de los fármacos como monoterapia para distintos tipos de cáncer, de la misma manera, se ha comprobado en artículos anteriores la eficiencia de la administración de la triple terapia como propuesta de tratamiento para distintos tipos de cáncer (Figueroa-González et al., 2016; García-Castillo et al., 2017). Pero hace falta profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a los resultados obtenidos. Por lo que resulta importante evaluar el impacto que tiene MOD sobre diferentes mecanismos celulares y vías de señalización. En el presente trabajo busca evaluar el efecto sobre la regulación de la transcripción de una de las vías de señalización más importante en CCR (Wnt).

3. Justificación

El cáncer como conjunto de enfermedades representa una problemática de salud pública a nivel mundial que va en aumento. Particularmente para México, es importante resaltar que uno de los tipos de cáncer más letales es el de colon, por lo que su estudio resulta de suma importancia. En el grupo de trabajo es de interés conocer los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de la enfermedad, así como posibles tratamientos que ayuden a disminuir el impacto que representa dicha problemática. Dentro del CCR, la vía de Wnt es la más importante por los mecanismos celulares que lleva a cabo, así como también por la alta tasa de alteraciones que sufre; con anterioridad se ha reportado que tanto la Metformina como la Doxorubicina tienen efecto sobre los intermediarios de la vía de Wnt, y, por tanto, la actividad de la vía en sí. Sin embargo, no ha sido evaluada la actividad de los fármacos como terapia coadyuvante, así como el impacto de la misma a nivel transcripcional sobre los genes blancos de la vía. Por lo que su estudio resulta de suma importancia para elucidar con más certeza los mecanismos moleculares que conducen la promoción del CCR. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone evaluar el efecto de una nueva propuesta de tratamiento (MOD) sobre la vía de Wnt medido a través de la actividad transcripcional de algunos de sus genes blanco.

4. Hipótesis

- La Triple Terapia Farmacológica (MOD) tendrá efecto positivo en la regulación de la actividad transcripcional de la vía de Wnt.

5. Objetivos

- **General:** Evaluar el efecto de una triple terapia farmacológica sobre la actividad transcripcional modulada por la vía de Wnt en un modelo murino de Cáncer Colorrectal.
- **Particulares:**
 - Establecer modelo de CCR en ratones hembras BALB/c y administrar la triple terapia farmacológica

- Evaluar la expresión a nivel de mRNA de los blancos transcripcionales c-Myc, TCF-1, c-Jun, Axin-2, FGF-18, LEF-1, MMP-7 y SNAIL-1 de la vía de Wnt en un modelo murino y en cultivo primario de epitelio de colon de ratón.
- Evaluar a nivel de proteína los blancos transcripcionales de la vía de Wnt, c-Myc y SNAIL-1, en un modelo murino y en cultivo primario de epitelio de colon de ratón.
- Evaluar la actividad transcripcional de la vía de Wnt a través de TOP-Flash.

6. Materiales y Métodos

6.1. Estudios *in vivo*.

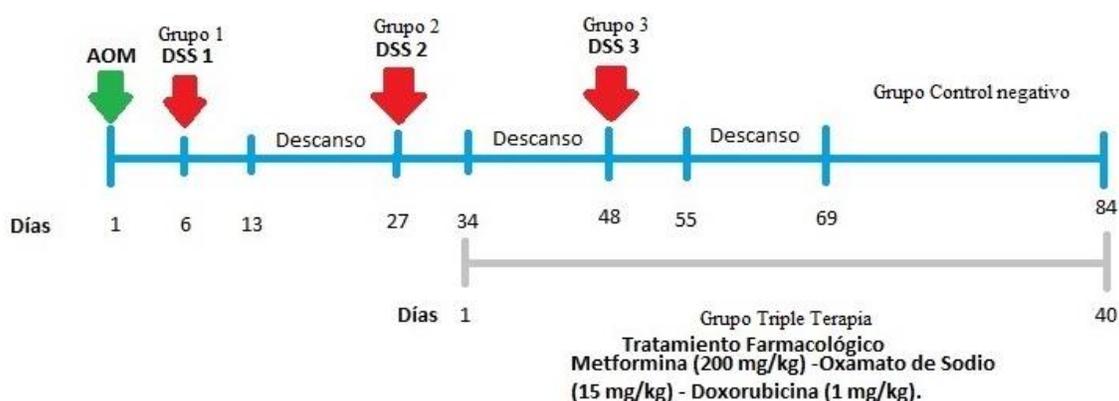
En este estudio se utilizaron 24 ratones hembra de la cepa BALB/c los cuales fueron mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, siguiendo los lineamientos institucionales de cuidado animal ético. Los ratones fueron colocados en microaisladores y repartidos aleatoriamente en los grupos que muestra la **Tabla 1**. Las cajas se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclos luz/oscuridad. Cada microaislador con el respectivo grupo experimental fue colocado en racks ventilados con alimento y agua *ad libitum*. Los ratones fueron sometidos a un periodo de aclimatación de tres semanas para permitir que los ratones tuvieran un peso corporal promedio de 20 g.

- **Tabla 1:** Grupos experimentales del modelo murino.

Grupo	Número de Ratones (N)
Control	3
DSS I	3
DSS II	5
DSS III	6
MOD	6

Al terminar el periodo de aclimatación se administró vía intraperitoneal (i.p) a todos los grupos (excepto al grupo control), Azoximetano (AOM) a una dosis de 12.5mg/kg. Se dejó transcurrir una semana, tras la cual se administró vía oral a través de los bebederos Dextran Sulfato de Sodio (DSS de 30,000 - 40,000 kDa) al 2% p/v. Al final del segundo ciclo de DSS, se comenzó con la administración de MOD (Metformina-20mg/kg; Oxamato de Sodio-15mg/kg; Doxorubicina-1mg/kg; basadas en lo obtenido por Figueroa-González, *et al.*, 2016) al grupo designado. La administración de los fármacos se realizó vía i.p en solución salina isotónica estéril como vehículo. La terapia y los ciclos se siguieron de acuerdo a lo mostrado en la **Fig. 15**. Al finalizar cada ciclo de DSS se llevó a cabo la eutanasia de cada uno de los grupos.

Antes de la disección de los intestinos se cuantificó el número de los tumores por cada tratamiento. La disección de estos se realizó desde la unión ileocecal hasta el recto (debido que es la delimitación anatómica del colon) y fueron lavados con PBS hasta eliminar todos los restos de materia fecal. Se tomaron las medidas de la longitud total utilizando una regla y se cortaron en tres regiones (proximal, medial y distal; para facilitar el manejo de las muestras y permitir la identificación de la región con más tumores); cada una se dividió en dos partes: una para extracción de proteína y otra para RNA y fueron almacenados a -70°C para su conservación.



- **Figura 15:** Modelo murino de CCR, con los grupos experimentales y la administración de MOD.

6.2. Cultivo Primario

Para realizar los análisis moleculares (qPCR y WB) en un modelo *in vitro*, se estableció un cultivo primario de cáncer de colon de ratón obtenido de los tumores desarrollados con el modelo. Se tomó la mayor cantidad de tumores posibles del grupo experimental DSS III, debido a que son tumores establecidos, a diferencia de DSS I y DSS II que están en proceso de desarrollo y, posteriormente bajo condiciones extremas de esterilidad fueron disgregados en placas Petri estériles p100 con medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 15%, adicionado con 100µl de antibiótico – antimicótico. El medio fue renovado diariamente para evitar posibles contaminaciones, hasta que fueron obtenidas células proliferantes en monocapa, tras lo que se consideró que el Cultivo Primario había sido establecido con éxito.

Una vez obtenido el CP se realizaron extracciones de RNA y proteínas en condiciones basales de tumor (sin tratamiento) y CP expuestos a MOD en 4 tiempos (4, 8 12 y 24 horas) post exposición.

6.3. Purificación de RNA

Para poder realizar los análisis de la expresión de mensajeros de los blancos transcripcionales de la vía de Wnt se realizó una purificación de RNA tanto de las muestras de tejido obtenidas del modelo *in vivo*, como del CP establecido. Para la extracción de RNA de los tumores obtenidos del colon de los ratones del grupo experimental DSS III se disgregó la región de colon previamente obtenida destinada a la extracción de RNA utilizando un Politrón (ProScientific) durante 30s con 1 mL de TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific; número de catálogo 15596026) en hielo.

En lo que respecta al CP se realizaron lavados de las cajas Petri p100 con un 60-70% de confluencia (las cuales fueron obtenidas a partir de los tumores disgregados del grupo experimental DSS III, como se mencionó anteriormente) con 1ml de PBS frío Posteriormente se adicionó 1ml del reactivo TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific; número de catálogo

15596026) y colectaron las células con ayuda de un *scraper*, al finalizar se transfirió a un tubo cónico de 1.5 ml nuevo y estéril.

Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de cloroformo para separar la muestra en dos fases, una acuosa en donde se encuentra el RNA, y una fase orgánica que contiene a las proteínas, se dejó incubar durante 2 min tras los cuales se centrifugó a 13,500 rpm durante 15s. Al concluir la centrifugación se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml nuevo, posteriormente se le adicionó 500 μ l de isopropanol y se dejó precipitando *overnight* a -20°C para precipitar el RNA. Posteriormente, el tubo que contiene la muestra con isopropanol fue centrifugado a 13,500rpm durante 15 min para empastillar el RNA, tras los cuales se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 500 μ l de etanol (grado biología molecular) al 70%, y con agitación manual ligera se lavó la pastilla; se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 μ l de agua libre de RNAasas. El RNA obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Epoch (Biotek[®]), empleando el software GENE5 1.11. La integridad del RNA obtenido fue evaluada a través de un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio (BE); la imagen fue analizada en un transiluminador tomando como valores la integridad de las bandas observadas que representan la fracción de RNA de las dos subunidades del ribosoma.

6.4. Purificación de Proteínas

La sección de colon destinada a proteínas fue colocada en 100 μ l de buffer RIPA (Thermo Fisher Scientific[™]; número de catálogo 89901) suplementado con el inhibidor de proteasas cComplete[™] (Takara; número de catálogo 635673) en un tubo cónico de 1.5ml. Inmediatamente después, el tubo se colocó, en hielo y con un Politrón (ProScientific), se disgregó el tejido durante 30s a 4 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se centrifugó durante 30min a 13,500 rpm. Al terminar se transfirió a un tubo cónico nuevo y se desechó el pellet.

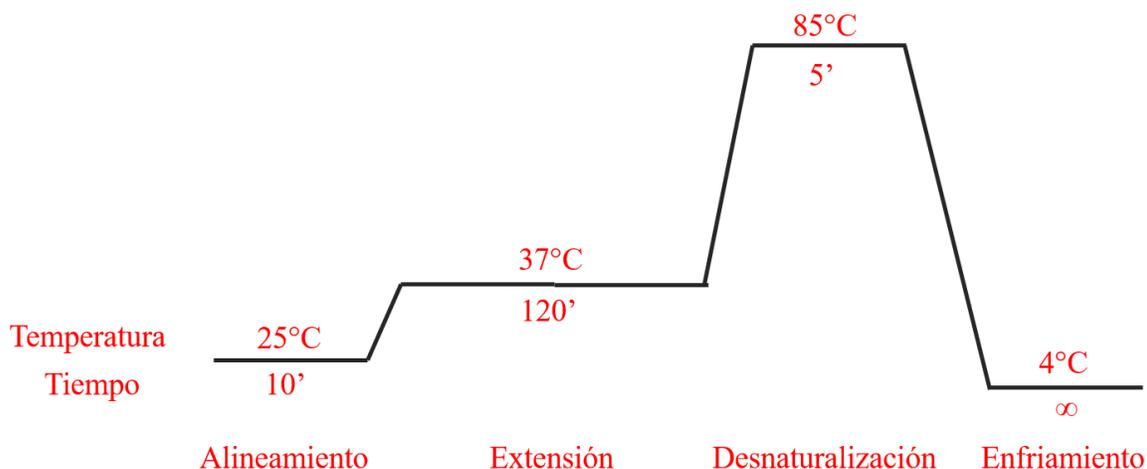
Para la purificación de proteínas de CP, se tomaron cajas Petri p100 con un 60-70% de confluencia celular y fueron lavadas 2 veces con PBS estéril frío. Posteriormente, se

obtuvieron las células con ayuda de un *scraper*. Las células fueron colocadas en un tubo cónico de 1.5ml y se adicionó el buffer RIPA suplementado con el inhibidor de proteasas cOmplete. El tubo fue centrifugado durante 30min a 13,500 rpm. Al terminar, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, de la misma manera se desechó el pellet.

La cuantificación de las proteínas se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford (Bio-Rad; número de catálogo #5000006) en un lector de placas Epoch (Biotek) con una absorbancia de 595 nm utilizando el programa GENE5 1.11.

6.5. Retro Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT PCR)

Para evaluar los niveles de expresión de los mensajeros de los blancos transcripcionales de la vía de Wnt se utilizó el kit High CapacityTM (Thermo Fisher Scientific; número de catálogo 4368814), se obtuvo cDNA a partir de 2 µg de RNA, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El protocolo de amplificación se muestra en la **Fig. 16**.



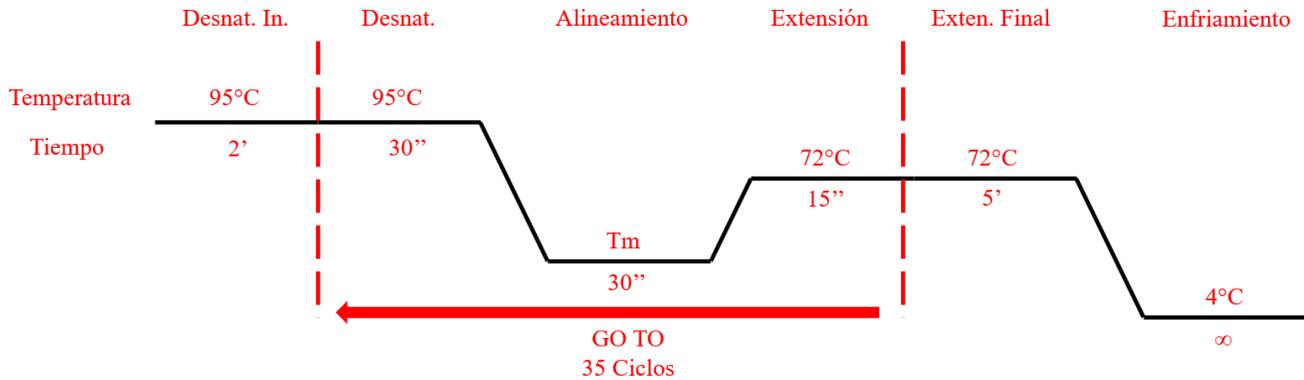
• **Figura 16:** Protocolo de amplificación de la RT

6.6. Polymerase Chain Reaction Punto Final (PCR pf)

Para detectar la expresión de los genes blanco de la vía de Wnt, se diseñaron *primers*, utilizando herramientas bioinformáticas, como el banco de información *Gene Bank* (NCBI), en la cual se utilizaron los siguientes parámetros para la selección de los candidatos: longitud de entre 20 – 25 nucleótidos, un porcentaje de ~40% de G/C y una temperatura de alineación entre 55 – 65°. Posteriormente se utilizó *OligoCalc* (Kibbe, 2007) para comprobar que los *primers* no tuvieran regiones complementarias y formaran estructuras secundarias. Las secuencias de *primers* utilizadas se muestran en la **Tabla 2**. Una vez obtenida la secuencia de interés los oligos fueron enviados a IDT Technologies para su respectiva síntesis. Se realizó la estandarización de las condiciones de PCR, partiendo de la temperatura estimada por IDT, para ello se utilizó el kit *GoTaq[®] DNA Polymerase* (Promega; número de catálogo M3001), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación de los productos se realizó en un termociclador Maxygen (Axygen); el protocolo de amplificación puede observarse en la **Fig. 17**.

• **Tabla 2:** Secuencias de oligos sintetizadas y Tm.

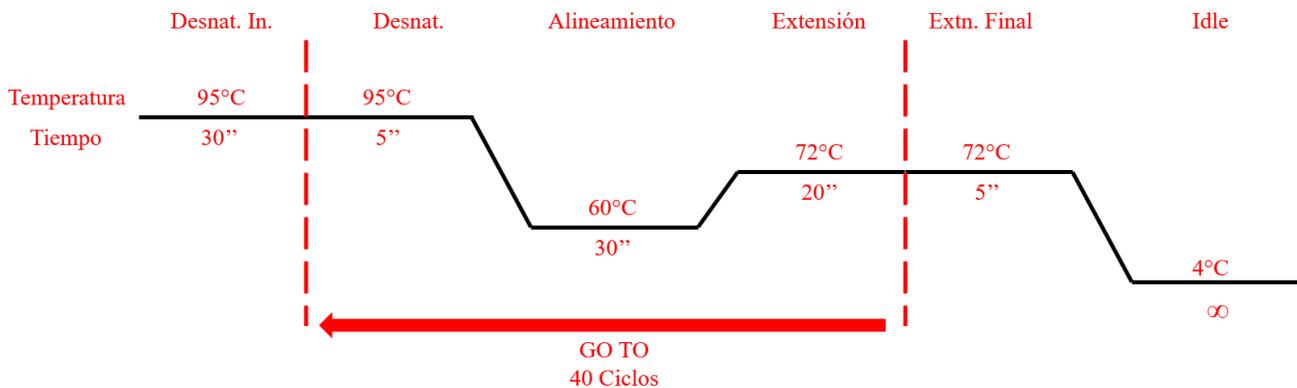
Gen	Sentido	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
c - Myc	Forward	CCC TCA GTG GTC TTT CCC TA	60
	Reverse	ATC TTC TTG CTC TTC AGA GT	60
TCF - 1	Forward	CAA GCA GGT CTT CAC CTC AG	60
	Reverse	ACA CTA TGG TTG GAT GGC AG	60
c - Jun	Forward	AAC CTT GAA AGC GCA AAA CT	60
	Reverse	TCT TGT GTA CCC TTG GCT TC	60
Axin - 2	Forward	TAG GTT CCG GCT ATG TCT TTG	60
	Reverse	GGG TTC TCG GAA AAT GAG GTA	60
FGF - 18	Forward	GCT CTA TAG CAG GAC CAG TG	60
	Reverse	GCT AGT ACC ATC AGG CTT CC	60
LEF - 1	Forward	GAC CTA ATG CAC GTG AAG C	57
	Reverse	TTC TCT TAC CAC CTG AAG TCG	57
MMP - 7	Forward	GCA CTG CAT GCT TTC TAA TTA TCT	60
	Reverse	AGG ATA CAA TTC TGT AGG TGA CAA	60
Snail - 1	Forward	GCG TGT GTG GAG TTC ACC TT	60
	Reverse	GAG CTT TTG CCA CTG TCC TC	60



- **Figura 17:** Protocolo de amplificación PCR Punto Final.

6.7. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Una vez obtenidas las condiciones de amplificación mediante PCR pf, el siguiente paso fue evaluar la expresión relativa a nivel de mensajero de los genes blanco de la vía de Wnt. Por lo tanto, se realizaron qPCR utilizando el kit *SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus;* Takara), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación pueden ser observadas en la **Fig.18**.



- **Figura 18:** Protocolo de amplificación qPCR.

6.8. Western Blot

Para analizar si la expresión de los genes blanco a nivel de mensajero se correlacionaba con su expresión a nivel de proteína se utilizó el ensayo de WB. De las proteínas obtenidas mediante el método de RPPA, a través de electroforesis y bajo condiciones desnaturizantes se separaron 50 µg de proteína en un gel de acrilamida al 10% con 85V para la detección de SNAIL-1 (29kDa) y c-Myc (57kDa). Al terminar este proceso. Después de que las proteínas fueron separadas; se realizó una electrotransferencia en el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) a 25V/1apm/30s, En una membrana de PVDF (Thermo Fischer ScientificTM; 0.45µm). Después de la transferencia la membrana fue bloqueada durante 2hrs con solución de bloqueo al 5% (2.5g de leche descremada en polvo en 50ml de TBS – Tween 0.05%). Posteriormente se realizó un lavado de 10 min con TBS – Tween 0.05% y se dejó incubando con los anticuerpos primarios *overnight*, con agitación y a 4°C constantes. Los anticuerpos utilizados fueron Snail-1 (Cell Signaling; 3895s; 29 kDa; dilución 1:3000) y c-Myc (Cell Signaling; D84C12; 57-65 kDa; dilución 1:1000). Después de la incubación *overnight* realizaron tres lavados con TBS – Tween 0.05% de 10 minutos cada uno, tras los cuales se incubó el anticuerpo secundario correspondiente durante 2hrs con agitación y a 4°C constantes. Los anticuerpos utilizados fueron: Anti-Mouse (Sta. Cruz; sc-2371; dilución 1:3000) y Anti-Rabbit (Sta.Cruz; sc-2370; dilución 1:1000). Después de incubar, se realizaron cuatro lavados con TBS – Tween 0.05% de 10min y un lavado con TBS.

Para detectar la quimioluminiscencia se empleó el kit *Super SignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher ScientificTM, número de catálogo 34096) utilizando el scanner C-Digit (Li-Cor). Para la digitalización de las imágenes y los análisis densitométricos se empleó el programa ImageStudio (LI-COR ver. 5.2). Las densitometrías fueron obtenidas normalizando el gen blanco sobre su actina y con la condición control de cada experimento. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

6.9. Transfección

Con el fin de evaluar si las células de CP pueden ser transfectadas, y posteriormente evaluar la actividad de la vía de Wnt mediante el ensayo de TOP Flash, se realizó una transfección.

En un formato de placa de 6 pozos, se sembraron 4×10^5 millones de células de CP; el cultivo se mantuvo durante 24hrs en una incubadora con un volumen de CO₂ de 5% y una temperatura de 37°C constantes. Después de las 24 h de adherencia celular se llevó a cabo la transfección, para ello se prepararon dos Mix: el primero con un volumen de 120µl de medio OptiMEM + 5µl de Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific™), cada una de las cantidades por los números de pozos a transfectar y el segundo mix con el volumen del vector dependiendo de la concentración y medio OptiMEM, que se lleva a 125µl c.b.p. por cada pozo (10µg de GFP, 2.5 µg de TopFlash y 2.7 µg de FopFlash).

Para los ensayos de luciferasa a las 24hrs, se transfectó 2.5µg de vector pGL3-Basic (Promega) más 1ng de vector pGL4.75 que expresa la luciferasa de Renilla como control basal de la luminiscencia (Promega) en todos los pozos. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Las metodologías particulares para cada vector se describen a continuación.

6.10. Microscopía de Fluorescencia

Para los ensayos de microscopía de fluorescencia, se transfectó por duplicado el vector pEGFP (Clontech;10µg) utilizando la metodología descrita anteriormente. En los dos pozos de la placa, además se agregó un cubreobjetos circular al cual se adhirieron las células. La placa se mantuvo en incubación a temperatura ambiente durante 15 m para permitir la formación de liposomas. El mix de transfección se agregó a los pozos, y la placa se mantuvo en ligera agitación para homogeneizar el medio. La microscopía y ensayos de luciferasa se realizaron a las 24 hrs post-transfección.

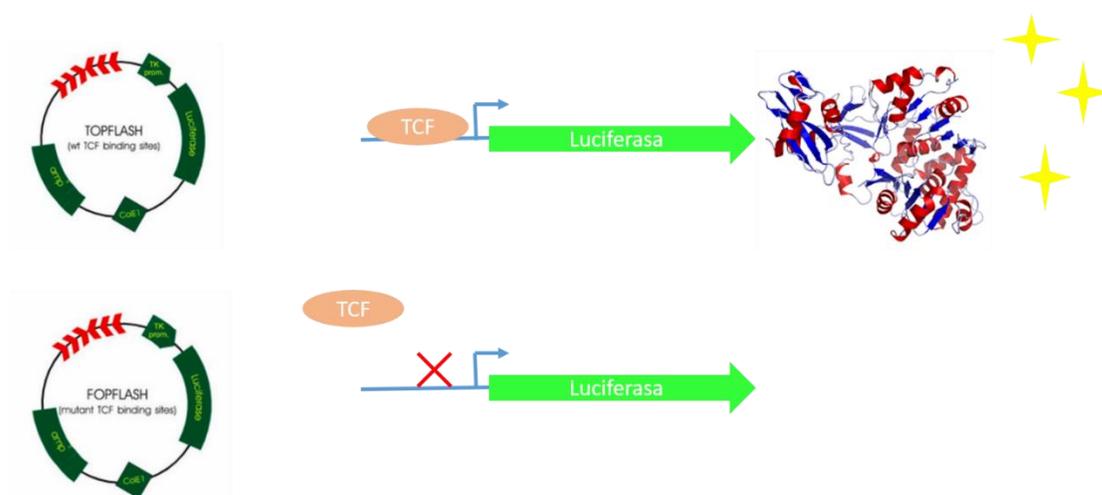
Al transcurrir las 24 hrs las células transfectadas con el vector pEGFP (Clontech) se lavaron con PBS frío, se fijaron durante 30 min con 2 ml de Paraformaldehído al 3.7%, posteriormente se lavaron con 2 ml de PBS frío para eliminar el exceso de Paraformaldehído durante 10 min y se prosiguió a permeabilizar las células con 2 ml de Tritón al 5% durante 30 min, se realizaron tres lavados finales con 2 ml de PBS frío. El cubreobjetos se montó en una laminilla con 20 µL de Entellán® (Sigma-Aldrich) y fue observado en un microscopio de

fluorescencia Modelo AxioPhot Fluorescent Microscope (ZEISS) facilitado por la Dra. Leticia Moreno de la Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores, UNAM.

6.11. TOP – Flash

Para el ensayo de TOP-Flash en formato de placa de 6 pozos, se sembraron 4×10^5 células de CP por pozo con las siguientes condiciones: un pozo solamente con TOP-Flash ($2.5 \mu\text{g}$) y un pozo solamente con FOP-Flash ($2.7 \mu\text{g}$) como controles negativos del experimento; con el fin de tener duplicados experimentales se destinaron dos pozos con TOP Flash y la triple terapia (33.12mg , de Metformina, 8.88mg de Doxorubicina y $1.17 \mu\text{l}$ de Oxamato de Sodio disueltos en $500 \mu\text{l}$ de medio) y dos pozos con FOP Flash y la triple terapia (mismas concentraciones) a cada pozo se llevó a un volumen total de 3mL de medio DMEM/F12, la placa se mantuvo en incubación durante 24 hrs con un volumen de CO_2 al 5% y una temperatura constante de 37°C .

Las células transfectadas con TOP/FOP Flash (**Fig.19**) se lavaron con 2 ml PBS frío y se lisaron con $500 \mu\text{l}$ de buffer STOP and GLO (Promega) durante 15 min para purificar las proteínas. Al terminar, las células fueron transferidas a un tubo cónico de 1.5ml . Para eliminar los residuos celulares se centrifugó el tubo a 1500 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5ml , y se desechó el pellet.



• **Figura 19:** Sistema de vectores TOP/FOP - Flash, y actividad de luciferasa

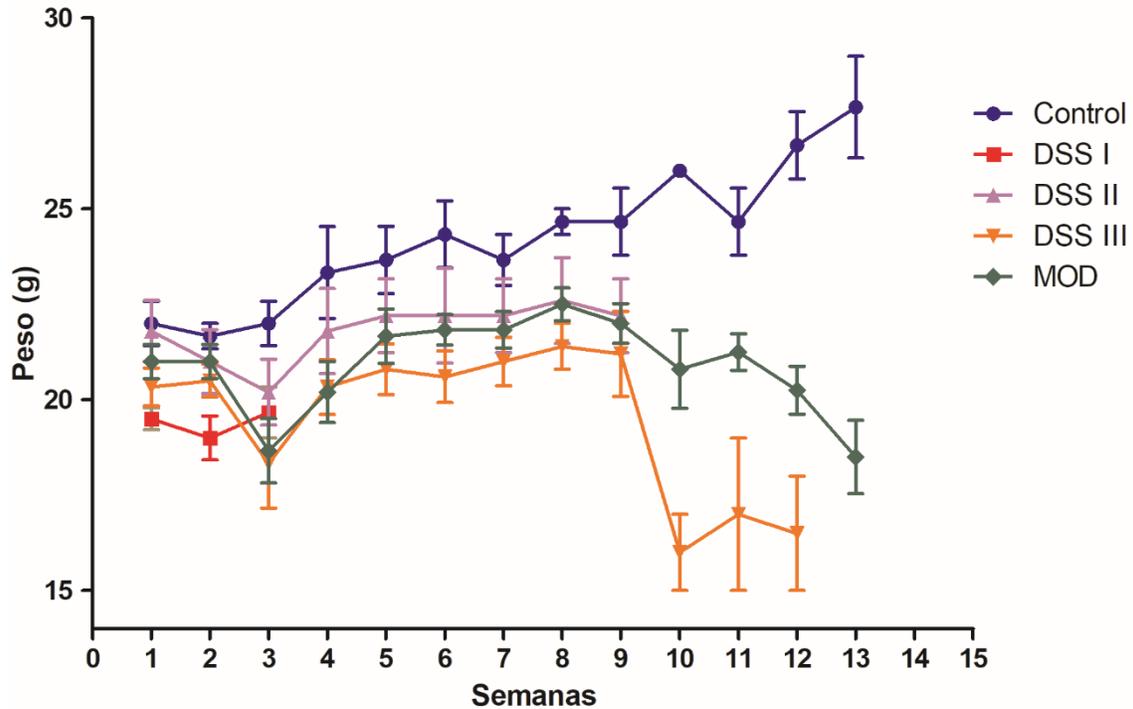
Los extractos proteicos se transfirieron por duplicado a una placa de 96 pozos con fondo transparente, la cual fue leída en un luminómetro de placas de 96 pozos con inyectores (GloMax-96 Microplate Luminometer; Promega). La placa se lee en el luminómetro con un tiempo de lectura de 10s y un delay de 2s, inyectando 50µl de los buffers para Luciferasa (LAR II) y para Renilla (STOP and GO suplementado) estos parámetros fueron utilizados para ambos inyectores, utilizando el software GloMax-96 Microplate Luminometer Software. Los resultados de cada pozo se normalizaron con respecto a la Renilla, tomando en cuenta los cocientes TOP/Renilla y FOP/Renilla, considerando el primer grupo como control.

6.12. Análisis Estadístico

Los valores se analizaron utilizando una ANOVA de una entrada, seguido de una prueba de Tukey, tomando en cuenta la desviación estándar de cada experimento. En los ensayos necesarios, el análisis se realizaron normalizaciones de los datos obtenidos. Todos Los experimentos se realizaron por triplicado o duplicado dependiendo de la disponibilidad de muestras biológicas, considerando aquellos con $p= 0.05$ como estadísticamente significativos.

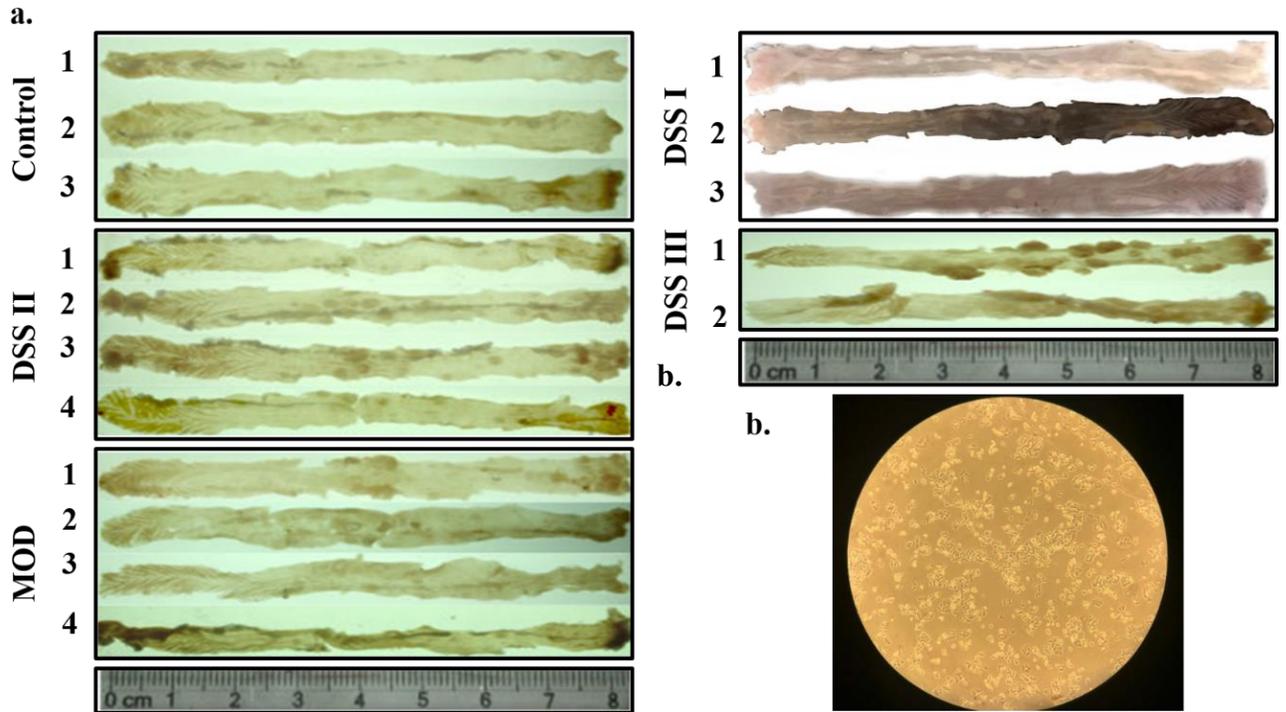
7. Resultados

A lo largo del desarrollo del modelo murino de CCR, se realizó un seguimiento del peso (g) de los ratones, para observar si el tratamiento con la Triple Terapia tiene efecto sobre el mismo, y cómo es dicho efecto. Como se muestra en la **Fig.20** los ratones mantuvieron un peso constante hasta la tercera administración de DSS, entonces se puede apreciar que existió una disminución marcada de peso en el grupo de DSS III, a diferencia del grupo control. Es importante resaltar que el grupo MOD, compartió la tendencia inicial a mantener el peso constante, que continúa al momento del inicio de la terapia e inclusive una disminución de peso menor con respecto a los demás grupos, al transcurrir la tercera administración con DSS, que fue constante hasta el final del tratamiento.

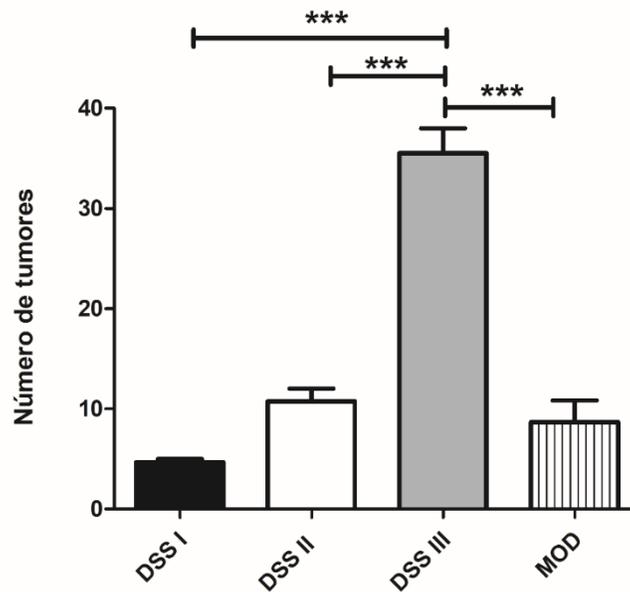


• **Figura 20:** Seguimiento del peso (g) de los ratones.

Al final de cada ciclo de DSS y al final del desarrollo del modelo, se realizó la eutanasia de los grupos experimentales y se obtuvo el colon de cada ratón, las fotografías obtenidas se muestran en la **Fig.21a**. Desde la primera administración de DSS se pudo observar pequeñas formaciones, los cuales pueden ser caracterizadas como pólipos. Posteriormente, se observó que, en la segunda administración, las formaciones aumentaron en número y en tamaño, es en la tercera administración de DSS donde se apreciaron claramente formaciones tumorales en gran número en la región cercana al recto del colon. Al realizar la comparación con el grupo de MOD, se apreció que el número y tamaño de los tumores fueron significativamente menor que los grupos de DSS II y DSS III hasta alcanzar niveles similares a los observados en la primera administración del fármaco. Datos que se ven representados de manera cuantitativa en la **Fig.22**. Para poder establecer el CP para las pruebas moleculares y ensayos funcionales establecidos, se tomaron los tumores de los ratones de la tercera administración de DSS, para realizar la depuración del cultivo con fin de eliminar fibroblastos y tejido se realizaron cambios diarios de medio por mínimo 7 días, cuando las células éstas alcanzaban el 60%-70% de confluencia, se consideró establecido el CP, la imagen que se muestra en la **Fig.21b**, muestra el CP de células de colon de ratón.

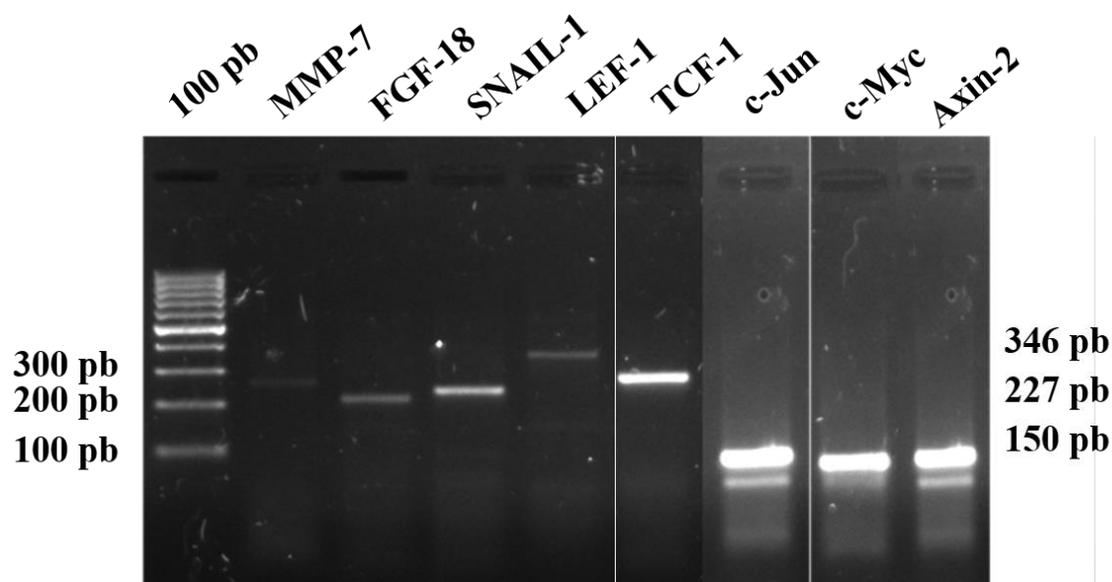


• **Figura 21:** a) Imágenes de colon obtenido de los ratones del modelo murino. Se muestran las imágenes por grupo; b) fotografía de Cultivo Primario de colon de ratón 40X.



• **Figura 22:** Número total de tumores por grupo experimental al finalizar el modelo murino de CCR obtenidos del colon de los ratones. Se puede observar una tendencia al aumento del número de tumores tras las administraciones de DSS y una disminución significativa de tumores tras la administración de MOD ($p=0.05$).

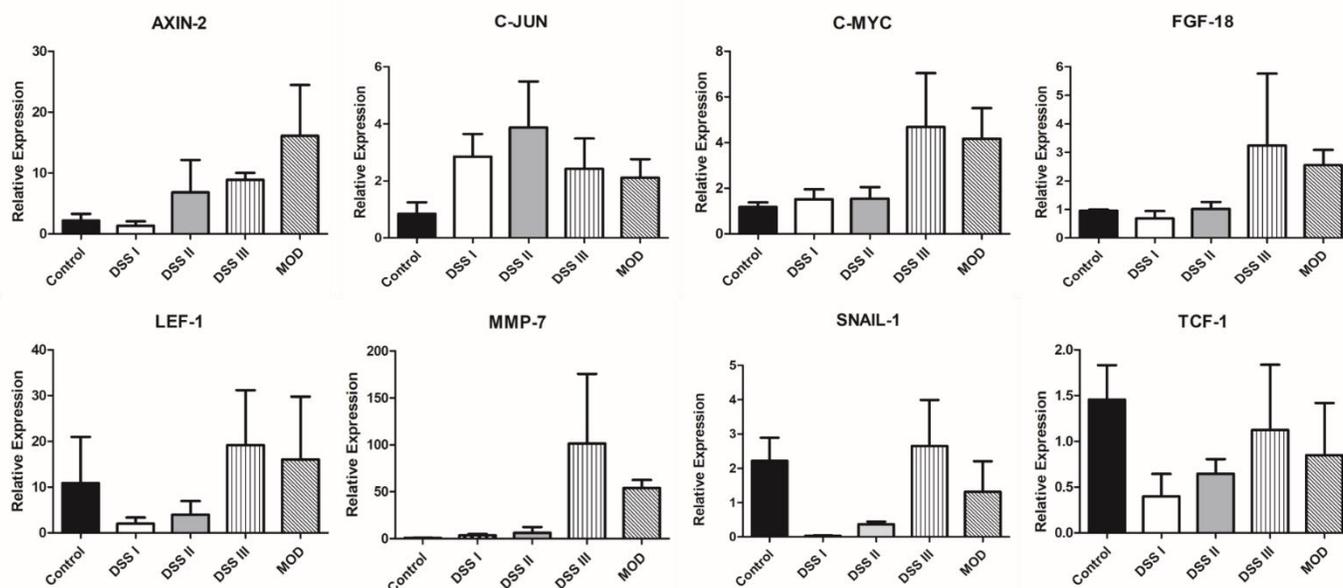
Las estandarizaciones de las condiciones de PCRpf, se pueden apreciar en la **Fig.23**. Todos los amplicones se obtuvieron con un Tm a 60°C, excepto LEF – 1, el cual se obtuvo con una Tm de 57°C.



- **Figura 23:** Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes blanco de la vía de Wnt a través de PCR Punto Final. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100pb. Se muestran también pesos representativos de algunos de los genes blanco.

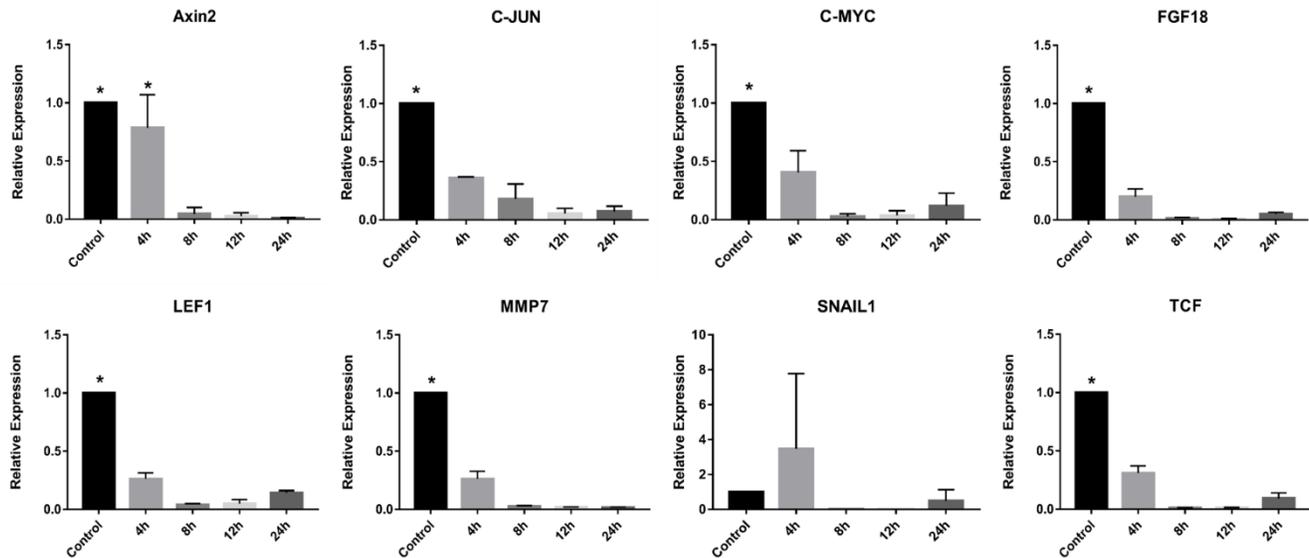
Una vez obtenidas las condiciones de amplificación, se prosigió a realizar las qPCR (**Fig.24**) Se puede apreciar que existieron variaciones en la expresión a lo largo de los tratamientos en todos los genes que fueron evaluados. En particular, dos genes relacionados directamente a la actividad de la vía de Wnt son Axin-2, el cual actúa como un regulador negativo y c-Myc que es uno de los genes blanco canónicos de la vía de Wnt y está relacionado al desarrollo tumoral, se aprecia que en ambos casos existió una tendencia al aumento de la actividad conforme progresa el desarrollo tumoral y una posterior disminución con la triple terapia farmacológica. Así mismo, se detectó que los genes con actividad pro-tumoral (relacionados a proliferación, angiogénesis, metástasis, etc.) como FGF-18, SNAIL, MMP-7 y c-Jun, mostraron una tendencia en el aumento de su actividad conforme progresa la enfermedad. De manera importante se observó que el grupo tratado con MOD disminuyó la actividad de estos genes. Se observó que los receptores canónicos mantuvieron esta tendencia, es decir, conforme el cáncer se encontraba en estados más avanzados (tercera administración de DSS), la actividad de los blancos transcripcionales de la vía incrementaba también. Así mismo,

estos efectos se vieron contrarrestados al aplicar MOD, ya que en todos los casos se apreció una disminución no significativa de la actividad de los genes blanco de la vía de Wnt.



- Figura 24:** Expresión de genes blanco de la vía de Wnt en tejido de colon de ratón del modelo murino evaluado a través de qPCR. Se muestran los niveles de expresión a las diferentes administraciones de DSS, y la disminución de la expresión tras la administración de MOD. No se observan diferencias significativas.

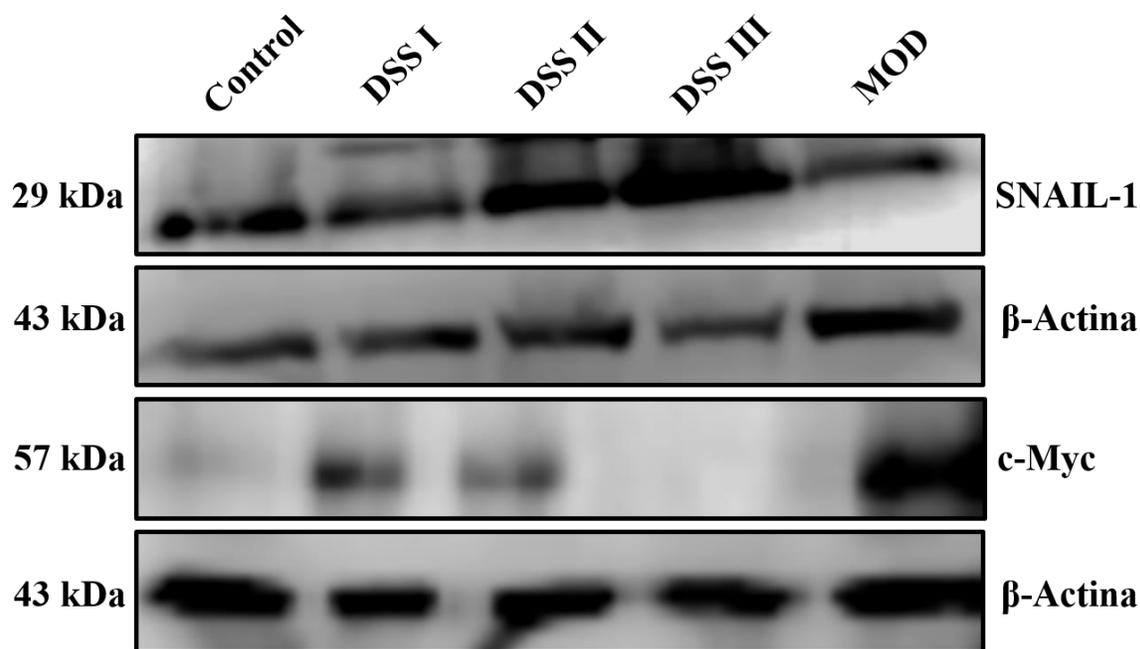
Los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*, se confirmaron con ensayos *in vitro* en células de CP; los resultados se muestran en la **Fig.25**. Se puede apreciar que, en casi todos los casos, con excepción de Snail-1, la actividad disminuyó significativamente tras aplicar el tratamiento con MOD y que esta disminución es más notoria conforme transcurrió el tiempo. En el caso particular de Snail-1, se puede apreciar que 4h post tratamiento, la expresión aumenta notoriamente, para una posterior disminución casi en su totalidad a las 8h y 12h, recuperándose tras 24 horas. Estos resultados se correlacionan con lo observado en tejido, es decir, la administración de la Triple Terapia farmacológica disminuyó la actividad transcripcional de los genes blanco de la vía de Wnt.



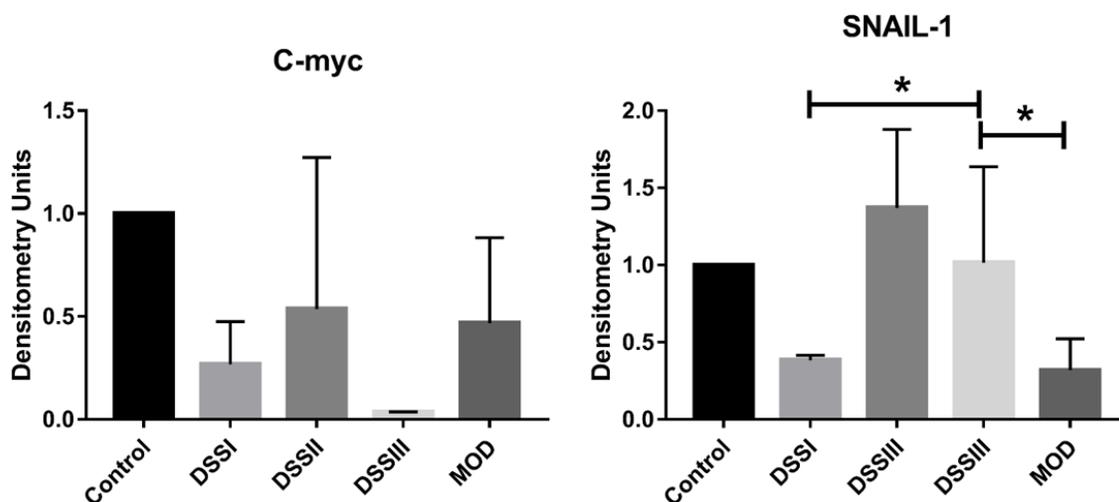
- **Figura 25:** Expresión relativa a nivel de mensajero de los genes blanco de la vía de Wnt en Cultivo Primario evaluado a través de qPCR. Se puede apreciar que tras la exposición de MOD la expresión disminuye de manera significativa desde las posteriores 4h ($\rho=0.05$).

A nivel de proteína, se midió la actividad de Snail-1 y c-Myc (ambos factores transcripcionales blanco de la vía de Wnt), tales ensayos arrojaron resultados que muestran que tras la administración de la triple terapia disminuyó la actividad de los genes blanco de la vía de Wnt (**Fig.26**), sin embargo, al realizar los análisis densitométricos se pudo apreciar que aun cuando existió disminución en la expresión relativa de c-Myc, esta no fue significativa. En contraste, la expresión de Snail-1, tras la administración de MOD, disminuyó significativamente su actividad (**Fig.27**). Posteriormente, los ensayos fueron confirmados con experimentos *in vitro* con células de CP, donde se observó que la proteína Snail-1, tuvo una actividad marcada en las condiciones basales del tumor y que tras la administración de MOD, a las 4 horas disminuyó la actividad de la proteína, casi en su totalidad; asimismo, se observó que dicha actividad se restableció a las 12 h y se mantuvo estable hasta el análisis de las 24 h. Por otro lado, se apreció que c-Myc tras transcurrir 12 h post-tratamiento, la actividad de la proteína disminuyó, efecto que permaneció hasta las 24 h (**Fig.28**). De la misma forma, se realizaron los análisis densitométricos, donde se observó una disminución significativa de Snail-1 a partir de las 4 h post-administración del tratamiento, así mismo, se observó que la expresión aumentó significativamente a las 12 h

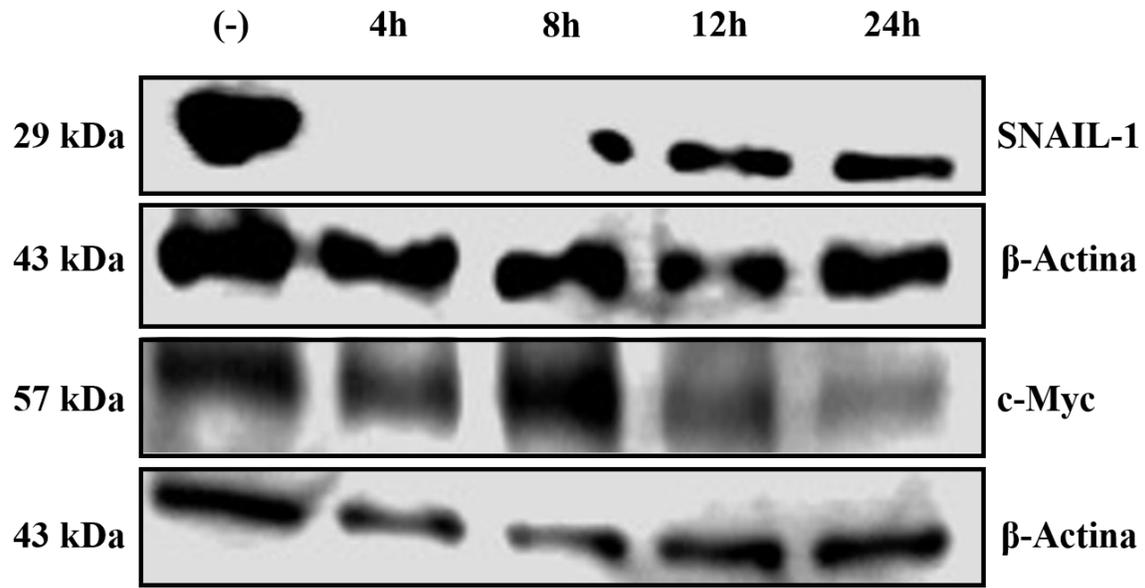
hasta volver a tener una disminución significativa a las 24h; de la misma forma, c-Myc mostró una disminución en su actividad, pero no es estadísticamente significativa (Fig.29).



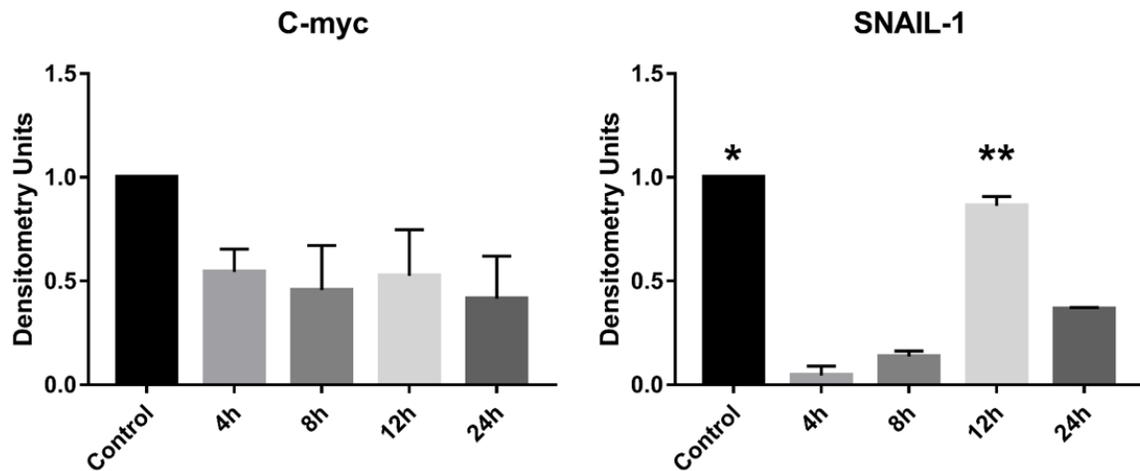
- **Figura 26:** Ensayo de WB, de las proteínas de modelo murino. Se puede apreciar que la actividad de SNAIL1 aumenta conforme se administra DSS, y una disminución significativa de la expresión tras la administración de MOD. Se observa que la expresión de c-Myc es muy poca durante el desarrollo del modelo, pero tras la administración de MOD, la expresión aumenta.



- **Figura 27:** Análisis densitométrico de la expresión de los genes blanco de la vía de Wnt obtenidos de los WB en el modelo murino. La desviación estándar observada proviene de los triplicados de los análisis densitométricos. Se aprecia la disminución significativa de la actividad de SNAIL1 tras la administración de MOD ($p=0.05$).

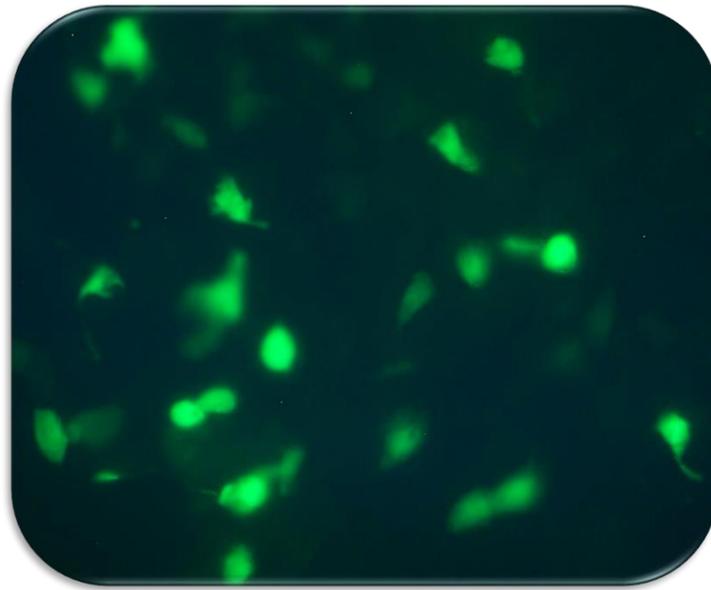


• **Figura 28:** Ensayo de WB de las proteínas de los genes blanco de la vía de Wnt evaluados en Cultivo Primario. Se puede apreciar que la actividad de SNAIL1 disminuye tras las 4 hrs post exposición a MOD y lentamente es restablecida hasta las 24 hrs. Así mismo, se observa que la actividad de c-Myc disminuye tras la exposición de MOD hasta las 24 hrs donde muestra sus niveles más bajos.



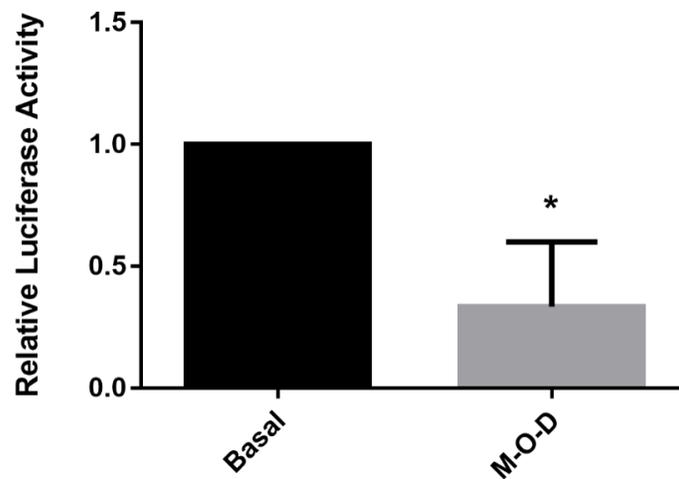
• **Figura 29:** Análisis densitométrico obtenido de los WB de las proteínas de los genes blanco de la vía de Wnt en el Cultivo Primario de colon de ratón. Se puede apreciar que la disminución de la actividad de c-Myc ocurre desde las 4 hrs post exposición a MOD, aunque no disminuye de manera significativa. Por el otro lado, se observa que la disminución de la actividad de SNAIL1 ocurre de manera significativa a las 4 hrs post exposición, para una recuperación de la expresión normal a las 12 hrs post exposición, y una disminución significativa a las 24 hrs post exposición. La desviación estándar se generó de los triplicados del ensayo. ($p=0.05$).

Cuando se estableció el CP, se realizó una transfección con el vector pEGFP para comprobar que las células de colon de ratón fueran susceptibles de ser transfectadas. En la **Fig.30**. se observa que 24h post- transfección y al excitar las células con luz UV, estas mostraron presencia de la GFP en grandes concentraciones citoplasmáticas, lo que indica que las células de CP de colon de ratón eran susceptibles de ser transfectadas. De esta manera, se pudieron realizar los experimentos de TOP-Flash para evaluar la actividad de la vía de Wnt.



- **Figura 30:** Transfección de GFP en células de Cultivo Primario de colon de ratón, observadas en microscopio de fluorescencia tras 24 hrs post transfección (40X). La fluorescencia de color verde que se observa en las células es emitida por la GFP que se encuentra en el citoplasma tras ser excitada con luz UV. De esta manera, se puede apreciar que el gen en efecto fue transfectado.

Posteriormente se utilizó el vector TOP – Flash, para evaluar la actividad de la vía de Wnt. El gen reportero que posee este vector, es la luciferasa, el cual al llevar a cabo su reacción enzimática emite luminiscencia que puede ser cuantificada en un luminómetro. Al aplicar el tratamiento con MOD se observó que existe una disminución significativa de la actividad de la luciferasa, la cual se traduce a una disminución marcada en la interacción de la β -catenina nuclear, con sus sitios canónicos, de esta manera, se puede suponer que la administración de MOD disminuye significativamente la actividad de la vía de Wnt. (**Fig.31**).



- Figura 31:** Ensayo de luciferasa para evaluar la actividad de la vía de Wnt. Las condiciones basales son las obtenidas en el tumor. Se puede apreciar que existe una disminución significativa tras la administración de MOD medida a las 24 hrs, lo que indicaría que la triple terapia disminuye de manera significativa la actividad de la vía de Wnt. ($p=0.05$).

8. Discusión

En el presente trabajo se desarrolló un modelo de inducción de CCR utilizando Azoxymetano y DSS, se observó que tras una sola administración de AOM y tres dosis de DSS, se desarrolla un número significativo de tumores en el colon. También se evaluó el efecto de un tratamiento con tres fármacos Metformina – Oxamato – Doxorrubicina disminuye de manera significativa el número de tumores, y mitiga la sintomatología generada por la enfermedad, es decir, sangrado rectal y heces sanguinolentas, pilo erección, palidez y particularmente, la pérdida de peso. Como efectos de la triple terapia se pudo observar que diferentes genes blanco de la vía de Wnt disminuyen su expresión a nivel de mensajero y su actividad a nivel de proteína, tanto en el modelo murino, como en el CP establecido durante el proyecto, tras la administración de MOD. Así mismo, se observó que dicha terapia disminuye la actividad de la vía de Wnt.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la Triple Terapia funciona como una propuesta de tratamiento para el CCR como se ha descrito previamente (Figueroa-González et al., 2016; García-Castillo et al., 2017); estos resultados se complementan con los ensayos obtenidos sobre la actividad de la vía de Wnt. Es importante mencionar que, debido

a la facilidad de obtención, mantenimiento y por las similitudes filogenéticas el ratón como modelo experimental ha sido utilizado en la investigación biomédica y particularmente en cáncer (Fox, 2007). Recientemente se han observado que los modelos murinos no son tan eficientes para analizar la respuesta que tendría un ser humano, debido a diferencias biológicas entre las dos especies, como el tamaño, tasa metabólica, historia de vida, dieta y las diferencias originadas del proceso de domesticación y crianza de los ratones para la investigación (Perlman, 2016). Otro de los factores que han sido considerados a profundidad es la variabilidad biológica de tales modelos, lo cual conlleva a una baja reproducibilidad y a un resultante sesgo estadístico (Henderson, Kimmelman, Fergusson, Grimshaw, & Hackam, 2013; Ranstam & Cook, 2017). Las razones mencionadas anteriormente podrían explicar la ausencia de resultados con diferencias significativas observables en el presente trabajo. Para solventar tales dificultades, los resultados se complementan con ensayos *in vitro*, que como se reporta presentan una respuesta más homogénea, en la que se pueden realizar con mayor confianza los análisis estadísticos necesarios (Dimitrov et al., 2016; Laajala et al., 2016).

Conforme se administran dosis de DSS a los ratones se observa el progreso de la enfermedad. Se puede apreciar que en la tercera administración de DSS, existe una marcada disminución de peso, esto puede ser atribuido a que el cáncer ya se encuentra en los estadios más avanzados y estar relacionado a que los ratones presenten caquexia, como se reportó en un modelo diseñado para el desarrollo de cáncer con una administración diaria de TNF α , donde se observó la pérdida progresiva del peso (Mulligan, Mahony, Ross, & Tisdale, 1992). En otro modelo murino, se reportó que la caquexia tiene como consecuencia primaria, la pérdida de peso y un síndrome sistémico de gasto o desperdicio, lo cual tiene como consecuencias secundarias, disminuida resistencia a la progresión de la enfermedad, de respuesta a tratamientos e impacto en la supervivencia general (Jourdain, Melly, Summermatter, & Hatakeyama, 2018). De la misma manera se observa que en el grupo experimental al que se le administró MOD, la pérdida de peso es mitigada de manera notable. Esto podría estar indicando que la triple terapia farmacológica está disminuyendo el progreso de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con lo reportado con tratamientos con thalidomina, inhibidores de COX-2, entre otros (Tazi & Errihani, 2010), y con lo reportado anteriormente

para la triple terapia (Figuroa-González et al., 2016), es decir, MOD ejerce su efecto a través de la inhibición de mTOR fosforilado, así como la inducción de la autofagia y apoptosis, así como la inhibición de la glucólisis (García-Castillo et al., 2017)

Se ha descrito que cada uno de los fármacos puede alterar procesos celulares que disminuyen el desarrollo de cáncer. Para el caso particular de la Metformina, se ha reportado que tiene resultados positivos en modelos *in vitro* e *in vivo* (Coyle, Cafferty, Vale, & Langley, 2016). Así mismo, se ha reportado la eficiencia de la Metformina como tratamiento en cáncer hepático, donde la reducción del riesgo puede ser de hasta un 80% (Donadon, Balbi, Mas, et al., 2010a); en cáncer de próstata, donde la supervivencia aumenta significativamente, así como una marcada disminución de la reincidencia y letalidad del mismo (Zaidi, Gandhi, Joshi, Smith, & Khan, 2019), en cáncer de mama, donde se midió el efecto sobre la expresión de biomarcadores (Hadad et al., 2015) y colon (Bradley et al., 2018; Coyle et al., 2016), entre otros (Heckman-Stoddard, DeCensi, Sahasrabudhe, & Ford, 2017). Se ha reportado que estos efectos antitumorales mejoran cuando se administra Metformina en combinación con otros fármacos (Ben Saha et al., 2010; Hanna et al., 2012; Jiralerspong et al., 2009), debido a que los efectos del fármaco como monoterapia son citoestáticos más que citotóxicos, causando arresto del ciclo celular transitorio entre las fases G0 – G1 (Mogavero et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, la efectividad de las antraciclinas (en particular la Doxorubicina) son tratamientos de primera línea para distintos tipos de cáncer, pero su efectividad se ve disminuida debido a sus efectos secundarios cardiotóxicos (Rivankar, 2014). Se han planteado alternativas para minimizar los daños, manteniendo los efectos antitumorales con efectos similares a los obtenidos en el presente trabajo, como la combinación con otros fármacos (Borlle et al., 2019; Figuroa-González et al., 2016) o terapias más novedosas, en las cuales se utilizan conjugados quiméricos peptídicos para la inhibición de metástasis en un modelo murino (Mastria et al., 2015), así como liposomas para la administración del fármaco en cáncer de mama (Xing, Yan, Yu, & Shen, 2015), de hígado (Poon & Borys, 2009), de ovario (Lorusso, Ferrandina, Lo voi, Fagotti, & Scambia, 2004), cáncer gástrico (Tang et al., 2014), entre otros (Lao et al., 2013). Por lo que es evidente la

eficacia que tiene la Doxorubicina como tratamiento y las alternativas que existen para disminuir la cardiotoxicidad.

De la misma forma, se ha observado que el Oxamato de Sodio es un candidato importante como terapia novedosa contra el cáncer, debido a la eficiencia reportada con anterioridad (Zhai et al., 2013). Así mismo, se ha reportado que los resultados obtenidos por el uso del Oxamato en Meduloblastoma pueden ser más eficientes si se realiza una inhibición selectiva de enzimas de la misma familia de la LDH (Valvona & Fillmore, 2018). Por otro lado, existen reportes, que la combinación del Oxamato de Sodio, con la Phenformina (biguanida, miembro de la familia de la Metformina) tiene efectos sinérgicos anticancerígenos muy potentes (Lea, Guzman, & Desbordes, 2016). De esta manera, los resultados obtenidos en el presente trabajo, refuerzan lo observado en la literatura, en la que la combinación de fármacos que afecten diferentes procesos celulares, tiene efectos benéficos que pueden ser explorados y explotados con investigación a fondo.

Uno de los principales reguladores negativos de la vía de Wnt es Axin2, la expresión de este gen es un indicador canónico de la actividad de la vía de Wnt y de esta manera sus niveles de expresión están directamente relacionados a su actividad (Jho et al., 2002). En el presente trabajo se observó una disminución significativa de la expresión de Axin2, esto supone que la disminución observada en la expresión tras la administración de MOD puede ser explicada como resultado de la actividad de MOD sobre dicha vía. Se ha reportado que la Metformina lleva a la acidificación del medio intracelular y a la inactivación de la vía de Wnt, medida a través de la actividad de Axin2 (Melnik et al., 2018). Algunos autores mencionan que Axin2 es un supresor tumoral, por el carácter de regulador negativo que ya se mencionó; debido a esto ha sido propuesto como un blanco terapéutico (Jho et al., 2002; Lustig et al., 2001; Waaler et al., 2012). Además se ha observado que la expresión aberrante de este blanco transcripcional, puede llevar a un desarrollo oncogénico en colon (Z.-Q. Wu et al., 2012), mama (Yook et al., 2006) y pulmón (Gunes, Pinarbasi, Pinarbasi, & Silig, 2009). Esta aparente dualidad de Axin2, resalta la importancia de realizar más estudios respecto su actividad en cáncer.

Por otro lado, se observó que la actividad de c-Jun disminuye de manera significativa que como se ha reportado; su expresión está directamente relacionada a la actividad de la vía de Wnt (Mann et al., 1999). De esta manera se ha descrito que c-Jun actúa como regulador negativo de la vía, al inducir la expresión de Dkk-1 y que una sobreexpresión del mismo puede llevar a la apoptosis mediada por Bmp-4 (Grotewold & Rüther, 2002). Se ha reportado que esta regulación negativa es llevada a cabo debido a que c-Jun induce la sobreexpresión de GSK3 β (Hu et al., 2008). Por lo que una menor actividad de dicho gen indica que se podría estar inactivando la vía de Wnt. A su vez se ha reportado que la Metformina protege a las células de la apoptosis inducida por estrés originado en el Retículo Endoplásmico, debido a que inhibe la activación de c-Jun, encargado de disparar este proceso (Jung, Lee, Lee, & Kim, 2012); así como la disminución de la severidad de los efectos del DSS, como la hiperpermeabilidad, pérdida de las *Tight Junctions* (uniones estrechas), etc. Debido a que se ha reportado que la Metformina mediante la activación de AMPK inhibe la cascada de señalización de c-Jun, encargado de realizar los daños mencionados anteriormente (Deng et al., 2018). Se describió que la delección de c-Jun sensibiliza al osteosarcoma a los efectos de la Doxorubicina (Dass, Khachigian, & Choong, 2008), por lo que se puede suponer que los efectos inhibitorios de MOD sobre la vía de Wnt, pueden llevar como consecuencia secundaria a una mayor efectividad de tratamiento de los fármacos.

Uno de los genes más importantes para el desarrollo de cáncer es el factor transcripcional c-Myc, el cual se encuentra desregulado en muchos tipos de cáncer y es necesario para el desarrollo tumoral en colon (Morton & Sansom, 2013). Se sabe que al interactuar con el factor transcripcional MAX, regulan una miríada de procesos que incluyen el metabolismo, regulación del ciclo celular, síntesis de proteínas e inclusive la biogénesis de los ribosomas (Dang et al., 2006). Ha sido reportado que c-Myc actuando en solitario (es decir, sin interactuar con MAX), promueve el crecimiento y la proliferación celular (Rennoll & Yochum, 2015). En la literatura se menciona que c-Myc es uno de los principales genes blanco de la vía de Wnt, ya que su expresión se encuentra directamente relacionada a la actividad de la vía (Shi et al., 2017), además de ser necesaria para el desarrollo de cáncer (You et al., 2002; S. Zhang et al., 2012). En el presente trabajo se observó que la administración de MOD disminuye significativamente la expresión de c-Myc a nivel de

mensajero, estos resultados concuerdan con lo descrito, donde la inactivación de la vía de Wnt mediante siRNAs en colangiocarcinoma, disminuye la expresión de mensajero de c-Myc (Zhang, Zhou, Wang, & Liang, 2013). En otro reporte se menciona que los niveles de la vía de c-Myc responden al nivel de actividad de la vía de Wnt y que estos disminuyen mediante la inducción de HOXA5 (represor del destino celular de las *stem cells* intestinales; Ordóñez-Morán, Dafflon, Imajo, Nishida, & Huelsken, 2015).

Es importante recalcar que c-Myc es uno de los factores importantes en la vía de señalización de Wnt, debido a que ha sido reportado que la interacción es recíproca, es decir, la vía de Wnt activa a c-Myc y a su vez c-Myc activa a la vía de Wnt (Cowling & Coles, 2007). Esta relación se ve acentuada debido a que la delección de c-Myc puede impedir el desarrollo carcinogénico en colon en ausencia de APC (Sansom et al., 2007). La información anterior resalta los resultados obtenidos, debido a que el tener una terapia que inhiba de manera transcripcional a Wnt y como resultante a c-Myc se convierte en un potencial tratamiento aplicable a nivel clínico, debido a la importancia de c-Myc en la progresión tumoral. Además, anteriormente, Carabet y colaboradores han descrito la dificultad de tratar directamente a c-Myc con fármacos (Carabet, Rennie, & Cherkasov, 2018), siendo el mejor candidato un homólogo sintetizado llamado Omomyc, expresado transgénicamente de manera artificial que polimeriza con la forma nativa e inhibe su actividad dentro del núcleo (Villanueva, 2019).

Se ha reportado que la Metformina inhibe la proliferación de células neoplásicas en cáncer de próstata mediante la reducción de c-Myc por mecanismos aún no descritos (Akinyeke et al., 2013). Una de las hipótesis propuestas es que la Metformina inhibe la síntesis de c-Myc a nivel de proteína en CCR mediante la inhibición de mTOR-4EBP-eIF4E y la señalización de MNK1-eIF4G-eIF4E (Shen et al., 2018) a diferencia de lo obtenido en el presente trabajo, donde se observa una disminución de los niveles de c-Myc a nivel de proteína, aunque dicha disminución no es significativa; por lo que se propone profundizar en el papel que juega MOD en la modulación de los niveles de la proteína c-Myc. Se ha reportado que la Metformina activa la transcripción de DICER, regulando negativamente el mRNA de c-Myc (Blandino et al., 2012). Pero, contradictoriamente, la sobreexpresión de c-Myc sensibiliza a

las células a la apoptosis (Haikala et al., 2019). Esta aparente dualidad, resalta la importancia de profundizar en el papel que juega c-Myc en la progresión tumoral en cáncer de colon y el efecto que tiene el uso de una terapia que abate su expresión.

En el presente trabajo se observó que, al administrar la Triple Terapia farmacológica, la actividad transcripcional de Wnt disminuye significativamente y de la misma forma la actividad de FGF-18 también. Se ha descrito que FGF-18 es un blanco canónico de la vía y que el bloqueo de la actividad de la β -catenina lleva a la disminución de FGF-18 (Reinhold & Naski, 2007). De la misma manera, se ha observado que el bloqueo de los sitios canónicos de interacción TCF-4 depleta los niveles de expresión de FGF-18, al inhibir un proceso de secreción autócrina, inhibiendo así la proliferación de células de cáncer de colon (Koneczny et al., 2015). De la misma manera, se sabe que los niveles aumentados del mensajero de FGF-18 son una mala prognosis en cáncer de pulmón, mama, ovario y colon, debido a que regula positivamente el crecimiento, migración e invasividad (Sonvilla et al., 2007; Wei et al., 2013; Z. Yu, Lou, & Zhao, 2018). Se ha descrito que el daño renal con una sola dosis de Doxorubicina incrementa el nivel de la expresión de FGF-18 en colon, debido a que participa en el reclutamiento y distribución de las células encargadas de reparar el daño (S. L. King, Mohiuddin, & Dekaney, 2013), por lo que no es claro el papel que podría estar desempeñando la Triple Terapia sobre este gen.

Por otro lado, también se observó la disminución significativa de los niveles de expresión de los factores transcripcionales TCF/LEF. Los cuales han sido descritos como los compañeros principales de β -catenina para la regulación de la expresión de genes blanco de la vía de Wnt (Archbold, Yang, Chen, & Cadigan, 2012). Además de estar expresados en todos los metazoarios (King et al., 2008). Se sabe que TCF/LEF poseen dominios particulares de interacción con DNA, con proteínas auxiliares, con represores y con β -catenina. Lo que los convierte en un embudo regulador de los genes que se expresen bajo los estímulos de la vía de Wnt (Cadigan & Waterman, 2012). De tal forma que LEF es un facilitador de la Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) y regulador positivo de proliferación y que la disminución de sus niveles inactiva a la vía de Wnt sin alterar la estabilidad de la β -catenina ni su distribución subcelular (Polyak & Weinberg, 2009), sin embargo, esta regulación puede ocurrir a nivel de

mensajero mediada por miRNAs, específicamente miR-181a y un clúster de mir-17-92 (Liang et al., 2015; Mu et al., 2019) así como a nivel de proteína (Song, Lee, Kim, & Jho, 2018; Zhu et al., 2018). Por otro lado, ha sido reportado que la inhibición de TCF en cáncer utilizando como inhibidor competitivo a los factores transcripcionales SOX9 y KLF4 (antagonistas de la β -catenina) se inhibe la actividad de la vía de Wnt en diferentes líneas celulares (Sellak, Wu, & Lincoln, 2012). De esta manera, se puede observar que depletar la actividad de los principales factores transcripcionales de la vía de Wnt puede tener efectos benéficos como terapia para el cáncer.

Otro de los genes blanco evaluados en este trabajo fue MMP-7, el cual codifica para una endopeptidasa dependiente de calcio y zinc (Tan & Liu, 2012). Se ha descrito que degrada componentes de la matriz extracelular, corta sustratos y puede activar a otras enzimas de la misma familia (Zhou et al., 2017). Se ha descrito que MMP-7 es uno de los genes blancos de la vía de Wnt, dependiente de la actividad de LEF-1 (Gustavson, Crawford, Fingleton, & Matrisian, 2004), y aún más su actividad ha sido reportada para la progresión tumoral en cáncer de células escamosas (Iwai et al., 2010). En el presente trabajo se describe que la administración de MOD reduce significativamente la actividad de MMP-7 a nivel de mensajero, concordante, se ha reportado que la inhibición de la vía de Wnt mediante su principal antagonista Dkk-1, disminuye significativamente la migración e invasión celular de cáncer de mama al mostrar una inhibición de la actividad de la vía de Wnt y una disminución significativa en la actividad de MMP-7 (Niu et al., 2019). Además se ha propuesto que en este tipo de cáncer, el aumento de la expresión de MMP-7 lleva a la pérdida de PTEN (uno de los principales supresores tumorales) y que los niveles de MMP-7 están relacionados directamente con la actividad de la vía de Wnt (Dey et al., 2013). De la misma manera se ha observado que los niveles de MMP-7 disminuyen conforme se atenúa la actividad de la vía de Wnt mediante el uso de supresores tumorales (Pan et al., 2018). Debido a esto MMP-7 es utilizado como un biomarcador de la progresión tumoral (W. He et al., 2012; Zhou et al., 2017), y la disminución del mismo como una buena prognosis. Por otro lado, se ha reportado que la activación de AMPK inducida por la administración de Metformina, disminuye los niveles de MMP-7, además de potenciar los efectos antitumorales de la rapamicina y el cisplatino, disminuyendo la expresión de MMP-7 así como la progresión tumoral en cáncer

gástrico (Yu et al., 2015). Además se ha reportado que MMP-7 es uno de los principales encargados para el desarrollo de la quimioresistencia a la Doxorubicina (Mitsiades, Yu, Poulaki, Tsokos, & Stamenkovic, 2001), así como al Oxaliplatino, mediante una modificación del ligando Fas, para inducir vías de supervivencia en vez de la apoptosis (W. He et al., 2012; Zhou et al., 2017). De lo observado en la literatura, resalta la importancia de tener una terapia combinatoria que utilice fármacos dirigidos contra distintos procesos celulares ya que como se puede observar, los resultados son más eficaces.

Se sabe que SNAIL1 es un factor transcripcional que reprime la actividad transcripcional, mediante el reclutamiento de una histona desacetilasa, se ha descrito que la inhibición de la E-caderina por parte de Snail-1 es un evento necesario para el inicio de la TEM. De la misma manera, se ha reportado que la actividad de Snail-1 depende directamente de la actividad de la vía de Wnt (Stemmer, de Craene, Berx, & Behrens, 2008). De esta forma, se ha descrito que Snail-1 es un blanco alternativo para GSK3 β y que la activación de la vía de Wnt lleva al aumento de Axin2 que estabiliza a Snail-1 y permite su actividad de factor transcripcional (Yook et al., 2006). En el presente trabajo se puede apreciar que la disminución significativa de Snail-1 a nivel de mRNA y proteína se correlacionan con un menor desarrollo tumoral, de manera significativa se observa que la disminución ocurre a las 4h y la posterior recuperación en la expresión a las 12h, así como una subsecuente caída a las 24h. Se ha reportado que Snail-1 es una proteína altamente inestable, pues se ha descrito que debe traslocarse al núcleo para ejercer su función y que en el citoplasma tiene una vida media muy corta (Wu & Zhou, 2010). Se ha reportado que entre las enzimas capaces de regular a Snail-1 se encuentran GSK3 β miembro fundamental del Complejo de Destrucción (CD) (Yifan Wang, Shi, Chai, Ying, & Zhou, 2013), fosforila a Snail-1 para enviarlo a degradación por proteasoma. Por lo que se puede suponer que la inhibición de la vía de Wnt y la consecuente re-activación del complejo de destrucción, podría estar permitiendo la regulación de Snail-1, evitando que ejerza su función.

Se han reportado resultados similares para colon, donde la inhibición de la vía de Wnt mediante shRNAs lleva a la disminución de la distribución nuclear de Snail-1, así como a la disminución en la capacidad proliferativa y migratoria de células de CCR (G. Liang, Fang,

Yang, & Song, 2018). En la literatura se ha descrito que realizar un knockdown de la β -catenina lleva a la disminución de Snail-1 a nivel de proteína y a su vez, a disminuir la capacidad metastática en cáncer de pulmón (Yang et al., 2015). Por otro lado, se ha reportado que la activación de la vía de Wnt mediante una Tankirasa lleva al incremento en los niveles de proteína de Snail-1, promoviendo la proliferación en cáncer de ovario (Yang et al., 2019).

En la literatura se menciona que la administración de Metformina mostró efector inhibitorios en la proliferación, migración e invasión, actuando sobre el núcleo de regulación de la TEM [Snail-1/miR-34]: [Zeb/miR-200], para CCR (Yaodu Wang, Wu, & Hu, 2018). Algunos autores mencionan que la administración de Metformina a células de Colangiocarcinoma disminuye la viabilidad y la capacidad de formación de colonias, migración y proliferación, así como de la inhibición en la expresión de Snail-1 (Trinh, Nguyen, Saimuang, Prachayasittikul, & Chan On, 2017). Existen resultados que complementan lo mencionado anteriormente, se ha descrito que la administración de Metformina es capaz de revertir el fenotipo mesenquimal en células de cáncer de mama medido a través del marcador mesenquimal Snail-1 (Cerezo et al., 2013; Esparza-López, Alvarado-Muñoz, Escobar-Arriaga, Ulloa-Aguirre, & de Jesús Ibarra-Sánchez, 2019). Se sabe también, que la Metformina disminuye la capacidad de formar esferas de las células HepG2, al revertir el fenotipo mesenquimal, mediante una disminución de Snail-1 (Feng et al., 2018). Y resultados similares han sido descritos para Snail-2, miembro de la familia de factores transcripcionales (Zhang et al., 2015). Por lo que se puede suponer que los efectos benéficos de MOD pueden estar llevándose a cabo en más de uno de estos factores transcripcionales.

Como se mencionó anteriormente, uno de los ensayos más confiables para la evaluación de la actividad de la vía de Wnt es el TOP-Flash. En el presente trabajo se detectó que la administración de MOD en células de CP de ratón disminuye significativamente la actividad de la vía de Wnt a las 24 h. Lo cual podría estar sugiriendo que la triple terapia inactiva a la vía de Wnt, resultado que se complementa con lo observado en la actividad de los genes blanco. En un ensayo reportado en la literatura mediante siRNA se modificaron a la baja los niveles de expresión de los receptores de Wnt, disminuyendo los niveles de actividad de la vía de Wnt medido a través del TOP-flash, inclusive se observó que una menor actividad de

la vía de Wnt lleva a un menor desarrollo de CCR (Ueno et al., 2008). Algunos autores han observado que la inhibición de la vía de Wnt mediante la administración de Curcumina, suprime la proliferación de células de CCR (Dou et al., 2017). Los resultados obtenidos en este trabajo, así como los ya mencionados en la literatura, convierten a la vía de Wnt en un posible blanco terapéutico en el cual se puede profundizar respecto a los mecanismos de regulación que subyacen el desarrollo de cáncer; además, se realza la importancia de una terapia que disminuya la actividad de dicha vía, como lo es la propuesta por el grupo de trabajo.

En el presente trabajo el enfoque fue plantear una aproximación de los efectos que tiene MOD sobre la vía de Wnt por su importancia durante el desarrollo de CCR. Es esa misma importancia durante la progresión de la enfermedad, así como en distintos procesos durante el desarrollo embrionario (Nusse & Clevers, 2017) los que convierten a la vía de Wnt en un jugador central que interactúa con distintas vías; las cuales pueden estar siendo alteradas ya sea directa o indirectamente por la administración de la Triple Terapia. Se ha reportado que la actividad de la vía de Wnt está correlacionada con mayor actividad de mTOR, una de las principales vías afectadas en cáncer, debido a la cantidad de procesos de proliferación y síntesis de biomoléculas que regula (Morris & Huang, 2016). Además, se ha reportado que GSK3 β es una quinasa promiscua con diversos blancos, dentro de estos se encuentran algunos de la cascada de señalización PI3K-AKT-mTOR, llevando a efectos de disminución de la capacidad proliferativa en células de cáncer (Hermida, Dinesh Kumar, & Leslie, 2017), de la misma forma, se ha reportado que GSK3 β disminuye la actividad de PTEN, uno de los principales supresores tumorales (Maccario, Perera, Davidson, Downes, & Leslie, 2007); por lo que la actividad de la vía de Wnt tiene efectos benéficos para el desarrollo del tumor, distintos a la activación de sus genes blancos.

De la misma forma, se ha observado que Wnt antagoniza a la vía Notch, encargada de diferenciar a las *stem cells* a un fenotipo luminal (van Amerongen, Bowman, & Nusse, 2012); esta relación permite extender el tiempo de vida de las células por tiempos muy largos, favoreciendo que adquieran un fenotipo tumoral (Teulière et al., 2005). Otra de las vías que se pueden ver alteradas es la vía de señalización de Hedgehog, la cual es uno de los

reguladores de la embriogénesis, así como la morfogénesis de estructuras neurales (Fuccillo, Joyner, & Fishell, 2006), además de un papel marcado en la progresión tumoral de cáncer gástrico, meduloblastoma y piel (Lee et al., 2010). En este caso, se ha descrito que ambas vías son mutuamente excluyentes y que el desbalance entre las dos es lo que lleva al desarrollo neoplásico, dependiendo de los estímulos y del tejido específico (Ding & Wang, 2017). Por lo que resulta importante profundizar en el efecto que generan las alteraciones de la vía de Wnt sobre su red de interacción, y el posible efecto que tenga la Triple Terapia sobre la misma, así como los subsecuentes efectos fisiológicos.

En el presente trabajo, se observó que la Triple Terapia propuesta por el grupo de trabajo también funciona inhibiendo la actividad de la vía de Wnt además de los resultados publicados por el grupo de trabajo, donde se disminuye la progresión de CCR e inclusive de cáncer de mama, en modelos murinos (Figuroa-González et al., 2016; García-Castillo et al., 2017). Como se ha descrito, dicha vía es clave para el desarrollo de CCR. Es importante resaltar que la Triple Terapia farmacológica representa un ejemplo claro del “*Drug Repurposing*”, es decir, la investigación de nuevas aplicaciones para tratamientos que ya han sido aprobados para uso humano, o que están en proceso de investigación (Pushpakom et al., 2019). Se ha descrito que este proceso tiene tres grandes ventajas, 1) el riesgo de generar efectos secundarios es menor debido a que ya se han realizado las pruebas pertinentes; 2) debido a que los ensayos en estadios preclínicos y pruebas subsecuentes se han realizado con resultados satisfactorios, se reduce significativamente el tiempo que tarda el proceso para desarrollar una nueva aplicación para el fármaco y 3) se disminuye la inversión necesaria para sacar al mercado una propuesta novedosa del fármaco (Breckenridge & Jacob, 2019). Además, cabe resaltar que los fármacos que se utilizan en la Triple Terapia son de fácil adquisición. De tal manera, se tiene una propuesta de tratamiento que en ensayos pre-clínicos ha mostrado ser prometedora.

Gracias a los resultados pre-clínicos favorables que se han obtenido con el uso de la Metformina como una propuesta de tratamiento antitumoral, se han realizado estudios clínicos con distintos resultados. Se ha observado que en cáncer de mama, el número de células tumorales disminuyó significativamente tras la administración de Metformina (Hada

et al., 2015), y los efectos son más observables en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad (Niraula et al., 2012). Por otro lado, se ha descrito que la administración de Metformina previo a recibir cirugía no tiene dicho efecto en los marcadores tumorales, pero que esto ocurre tras la remoción del tumor primario (Bonanni et al., 2012). En otro estudio preclínico se ha descrito que la administración de Metformina no tiene efecto sobre la apoptosis en las células tumorales de cáncer de mama en fase pre-quirúrgica pero sí en la etapa post-cirugía (Cazzaniga et al., 2013). Sin embargo, en cáncer endometrial se ha observado que la administración del fármaco en la etapa pre-operatoria, conlleva a la disminución de marcadores tumorales de cáncer endometrial (Laskov et al., 2014; Mitsuhashi, Kiyokawa, Sato, & Shozu, 2014; Schuler et al., 2015). De la misma forma, se ha reportado que la administración de Metformina en pacientes con cáncer de próstata localizado y en etapas avanzada, mejora la prognosis de los pacientes, al mostrar alta tolerancia a la administración del fármaco e inclusive, la disminución de marcadores de progresión tumoral como tratamiento previo a un procedimiento radical de extracción de próstata (Joshua et al., 2014).

Se ha reportado que la administración de la Metformina, tiene efectos positivos en pacientes con otros tipos de cáncer. Entre ellos, se ha observado que el fármaco disminuye en un 80% el riesgo a desarrollar cáncer hepático en pacientes con diabetes que utilizan la Metformina como tratamiento (Donadon, Balbi, Mas, Casarin, & Zanette, 2010b). En cáncer de Ovario se ha descrito que el riesgo de desarrollar la enfermedad disminuye, además de mejorar la supervivencia media de los pacientes (Kumar et al., 2013). Otro ejemplo es un estudio clínico en pacientes con cáncer de tiroides, donde se puede apreciar que el tratamiento con Metformina favorece una mayor regresión tumoral (Klubo-Gwiedzinska et al., 2013). Se ha propuesto que la Metformina más que inducir la apoptosis o llevar a cabo efectos citotóxicos en los tumores, transitoriamente inhiben el ciclo celular, es decir, poseen un efecto citoestático (Mogavero et al., 2017), que es más eficiente para detener el desarrollo de la enfermedad en etapas iniciales, que disminuir los tumores ya establecidos. Lo anterior puede explicar la aumentada eficiencia de la Metformina en tumores que comienzan a formarse o en aquellos pacientes en los que se ha removido el tumor primario.

Por otra parte, la Doxorrubicina ya ha sido aprobada por la FDA como tratamiento para diferentes tipos de cáncer, sin embargo recientemente se publicó un ensayo clínico en el que se prueba la eficiencia de una terapia adyuvante a base de Doxorrubicina para el tratamiento de sarcoma de tejido blando (Le Cesne et al., 2014). Por otro lado, en los proyectos publicados anteriormente por el grupo de trabajo (Figuerola-González et al., 2016; García-Castillo et al., 2017), también se describieron resultados *in vitro* prometedores sobre el Oxamato de sodio, sin embargo a pesar de observar estos resultados aún no hay ensayos a nivel clínico de este fármaco como monoterapia o en combinación con otros fármacos; por lo que resulta importante continuar con la evaluación de los efectos de la propuesta de tratamiento de este trabajo para poder escalar los ensayos obtenidos a ensayos clínicos de Fase 0 a Fase I.

En próximos trabajos se propone profundizar en el efecto molecular que tiene MOD en la vía de Wnt y su red de interacción durante la progresión neoplásica, así como en reincidencia. Además, se propone optimizar las dosis utilizadas en el tratamiento para obtener mejores resultados, es decir, se plantea utilizar ensayos funcionales tanto en CP, como en líneas celulares de distintos tipos de cáncer. Debido a los resultados positivos, se hipotetiza pueden ser extrapolados a diferentes tipos de cáncer, se propone también, llevar a cabo los ensayos necesarios para poder escalar la propuesta de tratamiento hasta ensayos clínicos.

9. Conclusiones

- La administración de MOD disminuye la progresión tumoral de CCR en el modelo murino y CP de colon de ratón.
- La administración de MOD disminuye la actividad transcripcional de los genes blanco de la vía de Wnt.
- La administración de MOD disminuye la actividad de la vía de Wnt.
- La administración de MOD disminuye de manera significativa el desarrollo de CCR tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la regulación de la actividad transcripcional de la vía de Wnt.

10. Referencias

- Akinyeke, T., Matsumura, S., Wang, X., Wu, Y., Schalfer, E. D., Saxena, A., ... Li, X. (2013). Metformin targets c-MYC oncogene to prevent prostate cancer. *Carcinogenesis*, *34*(12), 2823–2832. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt307>
- Archbold, H. C., Yang, Y. X., Chen, L., & Cadigan, K. M. (2012). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway. *Acta Physiologica*, *204*(1), 74–109. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02293.x>
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(8), 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Ashworth, A., Lord, C. J., & Reis-Filho, J. S. (2011). *Leading Edge Perspective Genetic Interactions in Cancer Progression and Treatment*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.020>
- Bass, A. J., Lawrence, M. S., Brace, L. E., Ramos, A. H., Drier, Y., Cibulskis, K., ... Meyerson, M. (2011). Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nature Genetics*, *43*(10), 964–968. <https://doi.org/10.1038/ng.936>
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, *382*(6592), 638–642. <https://doi.org/10.1038/382638a0>
- Ben Sahra, I., Laurent, K., Giuliano, S., Larbret, F., Ponzio, G., Gounon, P., ... Bost, F. (2010). Targeting Cancer Cell Metabolism: The Combination of Metformin and 2-Deoxyglucose Induces p53-Dependent Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, *70*(6), 2465–2475. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2782>
- Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., ... Strano, S. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature Communications*, *3*(1), 865. <https://doi.org/10.1038/ncomms1859>
- Bonanni, B., Puntoni, M., Cazzaniga, M., Pruneri, G., Serrano, D., Guerrieri-Gonzaga, A., ... Decensi, A. (2012). Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the*

- American Society of Clinical Oncology*, 30(21), 2593–2600.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.3769>
- Borlle, L., Dergham, A., Wund, Z., Zumbo, B., Southard, T., & Hume, K. R. (2019). Salinomycin decreases feline sarcoma and carcinoma cell viability when combined with doxorubicin. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 36.
<https://doi.org/10.1186/s12917-019-1780-5>
- Boyle, P., & Langman, J. S. (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 321(7264), 805–808. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7264.805>
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., & Kirchner, T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American Journal of Pathology*, 155(4), 1033–1038. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65204-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65204-2)
- Bradley, M. C., Ferrara, A., Achacoso, N., Ehrlich, S. F., Quesenberry, C. P., & Habel, L. A. (2018). A Cohort Study of Metformin and Colorectal Cancer Risk among Patients with Diabetes Mellitus. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 27(5), 525–530. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0424>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Breckenridge, A., & Jacob, R. (2019). Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 1–2.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2018.92>
- Buchert, M., Athineos, D., Abud, H. E., Burke, Z. D., Faux, M. C., Samuel, M. S., ... Ernst, M. (2010). Genetic Dissection of Differential Signaling Threshold Requirements for the Wnt/ β -Catenin Pathway In Vivo. *PLoS Genetics*, 6(1), e1000816. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000816>
- Burns, L. (2017). AML Treatments: Costs and Value - Celgene. Retrieved December 23, 2019, from <https://www.celgene.com/aml-treatments-costs-value/>
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11).

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>

- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, *487*(7407), 330–337.
<https://doi.org/10.1038/nature11252>
- Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, *37*(1), 1–24.
<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>
- Carabet, L. A., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2018). Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1).
<https://doi.org/10.3390/ijms20010120>
- Cazzaniga, M., DeCensi, A., Pruneri, G., Puntoni, M., Bottiglieri, L., Varricchio, C., ... Bonanni, B. (2013). The effect of metformin on apoptosis in a breast cancer presurgical trial. *British Journal of Cancer*, *109*(11), 2792–2797.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2013.657>
- Cerezo, M., Tichet, M., Abbe, P., Ohanna, M., Lehraiki, A., Rouaud, F., ... Rocchi, S. (2013). Metformin Blocks Melanoma Invasion and Metastasis Development in AMPK/p53-Dependent Manner. *Cancer Therapeutics Insights*, *5*, 1605–1615.
Retrieved from <https://mct.aacrjournals.org/content/molcanther/12/8/1605.full.pdf>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, *104*, Unit 15.25. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>
- Chen, J., & Huang, X. F. (2009). The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biology and Therapy*, *8*(14), 4–8.
<https://doi.org/10.4161/cbt.8.14.8983>
- Christie, M., Jorissen, R. N., Mouradov, D., Sakthianandeswaren, A., Li, S., Day, F., ... Sieber, O. M. (2013). Different APC genotypes in proximal and distal sporadic colorectal cancers suggest distinct WNT/ β -catenin signalling thresholds for tumorigenesis. *Oncogene*, *32*(39), 4675–4682. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.486>
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, *149*(6), 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>

- Coudreuse, D., Korswagen, H. C., Robinson, N., & Kenyon, C. (2007). The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development (Cambridge, England)*, *134*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1242/dev.02699>
- Cowling, V. H., & Coles, M. D. (2007). Turning the Tables: Myc Activates Wnt in Breast Cancer. *Cell Cycle*, *6*(21), 2625–2627. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cc.6.21.4880>
- Coyle, C., Cafferty, F. H., Vale, C., & Langley, R. E. (2016). Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*, *27*(12), 2184–2195. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw410>
- Cuilliere-Dartigues, P., El-Bchiri, J., Krimi, A., Buhard, O., Fontanges, P., Fléjou, J.-F., ... Duval, A. (2006). TCF-4 isoforms absent in TCF-4 mutated MSI-H colorectal cancer cells colocalize with nuclear CtBP and repress TCF-4-mediated transcription. *Oncogene*, *25*(32), 4441–4448. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209471>
- Dang, C. V., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., & Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*, *16*(4), 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.014>
- Dass, C. R., Khachigian, L. M., & Choong, P. F. M. (2008). c-Jun knockdown sensitizes osteosarcoma to doxorubicin. *Molecular Cancer Therapeutics*, *7*(7), 1909–1912. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0086>
- DeFronzo, R. A., Goodman, A. M., & Group, the M. M. S. (1995). Efficacy of Metformin in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, *333*(9), 541–549. <https://doi.org/10.1056/NEJM199508313330902>
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., ... Larue, L. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes & Development*, *21*(22), 2923–2935. <https://doi.org/10.1101/gad.450107>
- Deng, J., Zeng, L., Lai, X., Li, J., Liu, L., Lin, Q., & Chen, Y. (2018). Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPK α 1-dependent inhibition of JNK signalling activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(1), 546–557. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13342>
- Dey, N., Young, B., Abramovitz, M., Bouzyk, M., Barwick, B., De, P., & Leyland-Jones,

- B. (2013). Differential Activation of Wnt- β -Catenin Pathway in Triple Negative Breast Cancer Increases MMP7 in a PTEN Dependent Manner. *PLoS ONE*, 8(10), e77425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077425>
- Dhomen, N., Reis-Filho, J. S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., ... Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*, 15(4), 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.022>
- Dimitrov, S., Detroyer, A., Piroird, C., Gomes, C., Eilstein, J., Pauloin, T., ... Mekenyan, O. (2016). Accounting for data variability, a key factor in *in vivo/in vitro* relationships: application to the skin sensitization potency (*in vivo* LLNA versus *in vitro* DPRA) example. *Journal of Applied Toxicology*, 36(12), 1568–1578. <https://doi.org/10.1002/jat.3318>
- Ding, M., & Wang, X. (2017). Antagonism between Hedgehog and Wnt signaling pathways regulates tumorigenicity. *Oncology Letters*, 14(6), 6327–6333. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7030>
- Donadon, V., Balbi, M., Mas, M. D., Casarin, P., & Zanette, G. (2010a). Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. *Liver International*, 30(5), 750–758. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02223.x>
- Donadon, V., Balbi, M., Mas, M. D., Casarin, P., & Zanette, G. (2010b). Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. *Liver International*, 30(5), 750–758. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02223.x>
- Donadon, V., Balbi, M., Valent, F., & Avogaro, A. (2010). Glycated hemoglobin and antidiabetic strategies as risk factors for hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 16(24), 3025. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i24.3025>
- Dou, H., Shen, R., Tao, J., Huang, L., Shi, H., Chen, H., ... Wang, T. (2017). Curcumin Suppresses the Colon Cancer Proliferation by Inhibiting Wnt/ β -Catenin Pathways via miR-130a. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 877. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00877>
- Duval, A., Gayet, J., Zhou, X.-P., Iacopetta, B., Thomas, G., & Hamelin, R. (1999). Frequent Frameshift Mutations of the TCF-4 Gene in Colorectal Cancers with

- Microsatellite Instability 1. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 59). Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/59/17/4213.full.pdf>
- Esparza-López, J., Alvarado-Muñoz, J. F., Escobar-Arriaga, E., Ulloa-Aguirre, A., & de Jesús Ibarra-Sánchez, M. (2019). Metformin reverses mesenchymal phenotype of primary breast cancer cells through STAT3/NF- κ B pathways. *BMC Cancer*, *19*(1), 728. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5945-1>
- Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R., & Morris, A. D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *330*(7503), 1304–1305. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7>
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P., & Bodmer, W. F. (2001). The ABC of APC. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 10).
- Feng, Y., Guo, X., Huang, X., Wu, M., Li, X., Wu, S., & Luo, X. (2018). Metformin reverses stem cell-like HepG2 sphere formation and resistance to sorafenib by attenuating epithelial-mesenchymal transformation. *Molecular Medicine Reports*, *18*(4), 3866–3872. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9348>
- Figuroa-González, G., García-Castillo, V., Coronel-Hernández, J., López-Urrutia, E., León-Cabrera, S., Arias-Romero, L. E., ... Pérez-Plasencia, C. (2016). Anti-inflammatory and antitumor activity of a triple therapy for a colitis-related colorectal cancer. *Journal of Cancer*, *7*(12), 1632–1644. <https://doi.org/10.7150/jca.13123>
- Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., & Engelhardt, J. F. (2002). Wnt-3A/ β -catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(36), 33398–33410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107977200>
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, *3*(3), 153. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2078-6891.2012.030>
- Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., & Gewirtz, D. A. (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, *45*(4).
- Fox, J. G. (2007). *The Mouse in biomedical research*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/book/9780123694546/the-mouse-in-biomedical->

research

- Fuccillo, M., Joyner, A. L., & Fishell, G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(10), 772–783. <https://doi.org/10.1038/nrn1990>
- Fuchs, S. Y., Spiegelman, V. S., & Suresh Kumar, K. G. (2004). The many faces of β -TrCP E3 ubiquitin ligases: reflections in the magic mirror of cancer. *Oncogene*, 23(11), 2028–2036. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207389>
- Fujise, T., Iwakiri, R., Kakimoto, T., Shiraishi, R., Sakata, Y., Wu, B., ... Fujimoto, K. (2007). Long-term feeding of various fat diets modulates azoxymethane-induced colon carcinogenesis through Wnt/ β -catenin signaling in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(4), G1150–G1156. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00269.2006>
- García-Castillo, V., López-Urrutia, E., Villanueva-Sánchez, O., Ávila-Rodríguez, M. A., Zentella-Dehesa, A., Cortés-González, C., ... Pérez-Plasencia, C. (2017). Targeting metabolic remodeling in triple negative breast cancer in a murine model. *Journal of Cancer*, 8(2), 178–189. <https://doi.org/10.7150/jca.16387>
- Gewirtz, D. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727–741. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00307-4)
- Geyer, F. C., Lacroix-Triki, M., Savage, K., Arnedos, M., Lambros, M. B., MacKay, A., ... Reis-Filho, J. S. (2011). β -Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern Pathology*, 24(2), 209–231. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.205>
- Giannakis, M., Hodis, E., Jasmine Mu, X., Yamauchi, M., Rosenbluh, J., Cibulskis, K., ... Garraway, L. A. (2014). RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nature Genetics*, 46(12), 1264–1266. <https://doi.org/10.1038/ng.3127>
- Grotewold, L., & Rüther, U. (2002). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *The EMBO Journal*, 21(5), 966–975. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.966>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Sonesson, C., ...

- Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, *21*(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Gunes, E., Pinarbasi, E., Pinarbasi, H., & Silig, Y. (2009). Prevention and Treatment of Human Urological Cancer. *Molecular Medicine Reports*, *2*, 1029–1035. <https://doi.org/10.3892/mmr>
- Gustavson, M. D., Crawford, H. C., Fingleton, B., & Matrisian, L. M. (2004). Tcf binding sequence and position determines β -catenin and Lef-1 responsiveness of MMP-7 promoters. *Molecular Carcinogenesis*, *41*(3), 125–139. <https://doi.org/10.1002/mc.20049>
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., ... Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Hadad, S. M., Coates, P., Jordan, L. B., Dowling, R. J. O., Chang, M. C., Done, S. J., ... Thompson, A. M. (2015). Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: biomarker analysis in a pre-operative window of opportunity randomized trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, *150*(1), 149–155. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3307-5>
- Haikala, H. M., Anttila, J. M., Marques, E., Raatikainen, T., Ilander, M., Hakanen, H., ... Klefström, J. (2019). Pharmacological reactivation of MYC-dependent apoptosis induces susceptibility to anti-PD-1 immunotherapy. *Nature Communications*, *10*(1), 620. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08541-2>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*, 57–70. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/gr-qc/0208024>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanna, R. K., Zhou, C., Malloy, K. M., Sun, L., Zhong, Y., Gehrig, P. A., & Bae-Jump, V. L. (2012). Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway. *Gynecologic Oncology*, *125*(2), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.01.009>
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., Da Costa, L. T., ... Kinzler,

- K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281(5382), 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.281.5382.1509>
- He, W., Tan, R. J., Li, Y., Wang, D., Nie, J., Hou, F. F., & Liu, Y. (2012). Matrix metalloproteinase-7 as a surrogate marker predicts renal Wnt/ β -catenin activity in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(2), 294–304. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011050490>
- He, X.-X., Tu, S. M., Lee, M.-H., & Yeung, S.-C. J. (2011). Thiazolidinediones and metformin associated with improved survival of diabetic prostate cancer patients. *Annals of Oncology*, 22(12), 2640–2645. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr020>
- Heckman-Stoddard, B. M., DeCensi, A., Sahasrabudhe, V. V., & Ford, L. G. (2017). Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *Diabetologia*, 60(9), 1639–1647. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4372-6>
- Henderson, V. C., Kimmelman, J., Fergusson, D., Grimshaw, J. M., & Hackam, D. G. (2013). Threats to Validity in the Design and Conduct of Preclinical Efficacy Studies: A Systematic Review of Guidelines for In Vivo Animal Experiments. *PLoS Medicine*, 10(7), e1001489. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001489>
- Hermida, M. A., Dinesh Kumar, J., & Leslie, N. R. (2017). GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Advances in Biological Regulation*, 65, 5–15. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOR.2017.06.003>
- Howe, L. R., & Brown, A. M. C. (2004). Wnt Signaling and Breast Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 3(1), 36–41. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.1.561>
- Hu, D., Fang, W., Han, A., Gallagher, L., Davis, R. J., Xiong, B., & Yang, W. (2008). c-Jun N-terminal kinase 1 interacts with and negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling through GSK3beta pathway. *Carcinogenesis*, 29(12), 2317–2324. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn239>
- Hundal, R. S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., ... Shulman, G. I. (2000). Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*, 49(12), 2063–2069. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.12.2063>
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577–590. <https://doi.org/10.1016/s0092->

8674(03)00929-2

- Iwai, S., Yonekawa, A., Harada, C., Hamada, M., Katagiri, W., Nakazawa, M., & Yura, Y. (2010). Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, *37*(5), 1095–1103. https://doi.org/10.3892/ijco_00000761
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., & Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(4), 1172–1183. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1172-1183.2002>
- Jiralerspong, S., Palla, S. L., Giordano, S. H., Meric-Bernstam, F., Liedtke, C., Barnett, C. M., ... Gonzalez-Angulo, A. M. (2009). Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(20), 3297–3302. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.19.6410>
- Joshua, A. M., Zannella, V. E., Downes, M. R., Bowes, B., Hersey, K., Koritzinsky, M., ... Pollak, M. (2014). A pilot “window of opportunity” neoadjuvant study of metformin in localised prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, *17*(3), 252–258. <https://doi.org/10.1038/pcan.2014.20>
- Jourdain, M., Melly, S., Summermatter, S., & Hatakeyama, S. (2018). Mouse models of cancer-induced cachexia: Hind limb muscle mass and evoked force as readouts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *503*(4), 2415–2420. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.170>
- Juan, J., Muraguchi, T., Iezza, G., Sears, R. C., & McMahon, M. (2014). Diminished WNT / b-catenin / c-MYC signaling is a barrier for malignant progression of BRAF V600E-induced lung tumors. *Genes & Development*, *28*, 561–575. <https://doi.org/10.1101/gad.233627.113>
- Jung, T. W., Lee, M. W., Lee, Y. J., & Kim, S. M. (2012). Metformin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through AMPK-PI3K-c-Jun NH2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *417*(1), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.073>
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic*

- Acids Research*, 35(Web Server issue), W43-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>
- King, N., Westbrook, M. J., Young, S. L., Kuo, A., Abedin, M., Chapman, J., ... Rokhsar, D. (2008). The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature*, 451(7180), 783–788. <https://doi.org/10.1038/nature06617>
- King, S. L., Mohiuddin, J. J., & Dekaney, C. M. (2013). Paneth cells expand from newly created and preexisting cells during repair after doxorubicin-induced damage. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(2), G151–G162. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00441.2012>
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159–170. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81333-1)
- Klarmann, G. J., Decker, A., & Farrar, W. L. (2008). Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics*, 3(2), 59–63. <https://doi.org/10.4161/epi.3.2.5899>
- Klubo-Gwiedzinska, J., Costello, J., Patel, A., Bauer, A., Jensen, K., Mete, M., ... Vasko, V. (2013). Treatment with metformin is associated with higher remission rate in diabetic patients with thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(8), 3269–3279. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3799>
- Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., & Tanaka, T. (2005). β -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, 96(2), 69–76. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00020.x>
- Koneczny, I., Schulenburg, A., Hudec, X., Knöfler, M., Holzmann, K., Piazza, G., ... Marian, B. (2015). Autocrine fibroblast growth factor 18 signaling mediates Wnt-dependent stimulation of CD44-positive human colorectal adenoma cells. *Molecular Carcinogenesis*, 54(9), 789–799. <https://doi.org/10.1002/mc.22146>
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), 325–337. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>
- Korinek, V. (1997). Constitutive Transcriptional Activation by a β -Catenin-Tcf Complex in APC^{-/-} Colon Carcinoma. *Science*, 275(5307), 1784–1787. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784>

- Kremer, L. C., van Dalen, E. C., Offringa, M., Ottenkamp, J., & Voûte, P. A. (2001). Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *19*(1), 191–196. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.1.191>
- Kumar, S., Meuter, A., Thapa, P., Langstraat, C., Giri, S., Chien, J., ... Shridhar, V. (2013). Metformin intake is associated with better survival in ovarian cancer. *Cancer*, *119*(3), 555–562. <https://doi.org/10.1002/cncr.27706>
- Kwong, L. N., & Dove, W. F. (2009). APC and its modifiers in colon cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *656*, 85–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1145-2_8
- Laajala, T. D., Jumppanen, M., Huhtaniemi, R., Fey, V., Kaur, A., Knuutila, M., ... Aittokallio, T. (2016). Optimized design and analysis of preclinical intervention studies in vivo. *Scientific Reports*, *6*(1), 30723. <https://doi.org/10.1038/srep30723>
- Lammi, L., Arte, S., Somer, M., Järvinen, H., Lahermo, P., Thesleff, I., ... Nieminen, P. (2004). Mutations in AXIN2 Cause Familial Tooth Agenesis and Predispose to Colorectal Cancer. *The American Journal of Human Genetics*, *74*(5), 1043–1050. <https://doi.org/10.1086/386293>
- Lao, J., Madani, J., Puértolas, T., Alvarez, M., Hernández, A., Pazo-Cid, R., ... Antón Torres, A. (2013). Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *Journal of Drug Delivery*, *2013*, 456409. <https://doi.org/10.1155/2013/456409>
- Laskov, I., Drudi, L., Beauchamp, M.-C., Yasmeen, A., Ferenczy, A., Pollak, M., & Gotlieb, W. H. (2014). Anti-diabetic doses of metformin decrease proliferation markers in tumors of patients with endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, *134*(3), 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.06.014>
- Le Cesne, A., Ouali, M., Leahy, M. G., Santoro, A., Hoekstra, H. J., Hohenberger, P., ... Van Der Graaf, W. T. A. (2014). Doxorubicin-based adjuvant chemotherapy in soft tissue sarcoma: Pooled analysis of two STBSG-EORTC phase III clinical trials. *Annals of Oncology*, *25*(12), 2425–2432. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu460>
- Lea, M. A., Guzman, Y., & Desbordes, C. (2016). Inhibition of Growth by Combined Treatment with Inhibitors of Lactate Dehydrogenase and either Phenformin or

- Inhibitors of 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 3. *Anticancer Research*, 36(4), 1479–1488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069123>
- Lee, E. Y., Ji, H., Ouyang, Z., Zhou, B., Ma, W., Vokes, S. A., ... Scott, M. P. (2010). Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21), 9736–9741. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004602107>
- Li, V. S. W., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., ... Clevers, H. (2012). Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, 149(6), 1245–1256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.002>
- Liang, G., Fang, X., Yang, Y., & Song, Y. (2018). Silencing of CEMIP suppresses Wnt/ β -catenin/Snail signaling transduction and inhibits EMT program of colorectal cancer cells. *Acta Histochemica*, 120(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2017.11.002>
- Liang, J., Li, X., Li, Y., Wei, J., Daniels, G., Zhong, X., ... Lee, P. (2015). LEF1 targeting EMT in prostate cancer invasion is mediated by miR-181a. *American Journal of Cancer Research*, 5(3), 1124–1132. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045991>
- Lin, S.-Y., Xia, W., Wang, J. C., Kwong, K. Y., Spohn, B., Wen, Y., ... Hung, M.-C. (2000). β – Catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4262–4266. Retrieved from www.pnas.org
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., ... He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108(6), 837–847. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00685-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00685-2)
- Liu, H., Savaraj, N., Priebe, W., & Lampidis, T. J. (2002). Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors: A strategy for solid tumor therapy (Model C). *Biochemical Pharmacology*, 64(12), 1745–1751. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01456-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01456-9)
- Lorusso, D., Ferrandina, G., Lo voi, R., Fagotti, A., & Scambia, G. (2004). Role of

- Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) in Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Chemotherapy*, 16(sup4), 98–103. <https://doi.org/10.1179/joc.2004.16.Supplement-1.98>
- Luis, T. C., Ichii, M., Brugman, M. H., Kincade, P., & Staal, F. J. T. (2012). Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia*, 26(3), 414–421. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.387>
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Rarsten, U., ... Behrens, J. (2001). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 386(6), 466. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1184-1193.2002>
- Lynch, H., Lynch, P., Lanspa, S., Snyder, C., Lynch, J., & Boland, C. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics*, 76(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x>
- Maccario, H., Perera, N. M., Davidson, L., Downes, C. P., & Leslie, N. R. (2007). PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr³⁶⁶. *Biochemical Journal*, 405(3), 439–444. <https://doi.org/10.1042/BJ20061837>
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., ... Hanski, C. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1603–1608. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1603>
- Mastria, E. M., Chen, M., McDaniel, J. R., Li, X., Hyun, J., Dewhirst, M. W., & Chilkoti, A. (2015). Doxorubicin-conjugated polypeptide nanoparticles inhibit metastasis in two murine models of carcinoma. *Journal of Controlled Release*, 208, 52–58. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2015.01.033>
- Melnik, S., Dvornikov, D., Müller-Decker, K., Depner, S., Stannek, P., Meister, M., ... Glinka, A. (2018). Cancer cell specific inhibition of Wnt/ β -catenin signaling by forced intracellular acidification. *Cell Discovery*, 4(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0033-2>
- Mikels, A. J., & Nusse, R. (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception.

- Oncogene*, 25, 7461–7468. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210053>
- Miskimins, W. K., Ahn, H. J., Kim, J. Y., Ryu, S., Jung, Y.-S., & Choi, J. Y. (2014). Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PloS One*, 9(1), e85576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085576>
- Mitsiades, N., Yu, W., Poulaki, V., Tsokos, M., & Stamenkovic, I. (2001). Matrix Metalloproteinase-7-mediated Cleavage of Fas Ligand Protects Tumor Cells from Chemotherapeutic Drug Cytotoxicity. *Cancer Research*, 61(2).
- Mitsuhashi, A., Kiyokawa, T., Sato, Y., & Shozu, M. (2014). Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: a preoperative prospective trial. *Cancer*, 120(19), 2986–2995. <https://doi.org/10.1002/cncr.28853>
- Mogavero, A., Maiorana, M. V., Zanutto, S., Varinelli, L., Bozzi, F., Belfiore, A., ... Gariboldi, M. (2017). Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production. *Scientific Reports*, 7(1), 15992. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16149-z>
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., ... Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86(3), 391–399. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80112-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80112-9)
- Mori, H., Sugie, S., Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., & Yamada, Y. (2005). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, 94(11), 965–973. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x>
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5307), 1787–1790. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1787>
- Morris, S.-A. L., & Huang, S. (2016). Crosstalk of the Wnt/ β -catenin pathway with other pathways in cancer cells. *Genes & Diseases*, 3(1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.12.003>
- Morton, J. P., & Sansom, O. J. (2013). MYC-y mice: From tumour initiation to therapeutic targeting of endogenous MYC. *Molecular Oncology*, 7(2), 248–258.

<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.015>

- Mu, F., Huang, J., Xing, T., Jing, Y., Cui, T., Guo, Y., ... Wang, N. (2019). The Wnt/ β -Catenin/LEF1 Pathway Promotes Cell Proliferation at Least in Part Through Direct Upregulation of miR-17-92 Cluster. *Frontiers in Genetics*, *10*, 525. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00525>
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E. K., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, *469*(2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>
- Mulligan, H. D., Mahony, S. M., Ross, J. A., & Tisdale, M. J. (1992). Weight loss in a murine cachexia model is not associated with the cytokines tumour necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Cancer Letters*, *65*(3), 239–243. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(92\)90238-q](https://doi.org/10.1016/0304-3835(92)90238-q)
- Mulrooney, D. A., Yeazel, M. W., Kawashima, T., Mertens, A. C., Mitby, P., Stovall, M., ... Leisenring, W. M. (2009). Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *339*, b4606. <https://doi.org/10.1136/bmj.b4606>
- Mutlu, P., Yalçın Azarkan, S., Taghavi Pourianazar, N., Yücel, M., & Gündüz, U. (2018). Determination of the relationship between doxorubicin resistance and Wnt signaling pathway in HeLa and K562 cell lines. *EXCLI Journal*, *17*, 386–398. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1129>
- National Cancer Institute. (2015). What Is Cancer? - National Cancer Institute. Retrieved July 9, 2019, from What is Cancer website: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Niehrs, C., & Acebron, S. P. (2012). Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *The EMBO Journal*, *31*(12), 2705–2713. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.124>
- Niraula, S., Dowling, R. J. O., Ennis, M., Chang, M. C., Done, S. J., Hood, N., ... Goodwin, P. J. (2012). Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Research and Treatment*, *135*(3), 821–830. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2223-1>
- Niu, J., Li, X.-M., Wang, X., Liang, C., Zhang, Y.-D., Li, H.-Y., ... Fang, D. (2019).

- DKK1 inhibits breast cancer cell migration and invasion through suppression of β -catenin/MMP7 signaling pathway. *Cancer Cell International*, 19(1), 168.
<https://doi.org/10.1186/s12935-019-0883-1>
- Novellasdemunt, L., Antas, P., & Li, V. S. W. (2015). Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 309, 511–521.
<https://doi.org/10.1152/ajpccell.00117.2015.-The>
- Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6), 985–999.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- Okayasu, I. S. A. (1990). *Reliable Experimental Acute and Chronic*. 694–702.
- Orangio, G. R. (2018). The Economics of Colon Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(2), 327–347. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.007>
- Ordóñez-Morán, P., Dafflon, C., Imajo, M., Nishida, E., & Huelsken, J. (2015). HOXA5 Counteracts Stem Cell Traits by Inhibiting Wnt Signaling in Colorectal Cancer. *Cancer Cell*, 28(6), 815–829. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2015.11.001>
- Pan, S., Deng, Y., Fu, J., Zhang, Y., Zhang, Z., Ru, X., & Qin, X. (2018). Tumor Suppressive Role of ARHGAP17 in Colon Cancer Through Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(5), 2138–2148.
<https://doi.org/10.1159/000489543>
- Park, S. Y., Kim, D., & Kee, S.-H. (2019). Metformin-activated AMPK regulates β -catenin to reduce cell proliferation in colon carcinoma RKO cells. *Oncology Letters*, 17(3), 2695–2702. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9892>
- Peifer, M., McCrea, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E., & Gumbiner, B. M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *The Journal of Cell Biology*, 118(3), 681–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.681>
- Perlman, R. L. (2016). Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2016(1), 170–176.
<https://doi.org/10.1093/emph/eow014>
- Pollak, M. (2012). The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia:

- an update. *Nature Reviews Cancer*, 12(3), 159–169. <https://doi.org/10.1038/nrc3215>
- Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 265–273. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- Poon, R. T., & Borys, N. (2009). Lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin: a novel approach to enhance efficacy of thermal ablation of liver cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10(2), 333–343. <https://doi.org/10.1517/14656560802677874>
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., ... Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Ranstam, J., & Cook, J. A. (2017). Considerations for the design, analysis and presentation of in vivo studies. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(3), 364–368. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2016.06.023>
- Reinhold, M. I., & Naski, M. C. (2007). Direct interactions of Runx2 and canonical Wnt signaling induce FGF18. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(6), 3653–3663. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608995200>
- Rennoll, S., & Yochum, G. (2015). Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(4), 290–300. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.290>
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. 434, 843–850 (2005). *Nature*, 434, 843–850. Retrieved from www.nature.com/nature
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(4), 853. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Robert A. Weinberg. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*, 62–70. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/3b1c/7940f6ef101124cf478f5f8de2113ee1c5fb.pdf>
- Roose, J., Huls, G., Van Beest, M., Moerer, P., Van Der Horn, K., Goldschmeding, R., ... Clevers, H. (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the β -catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*, 285(5435), 1923–1926. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1923>

- Sansom, O. J., Meniel, V. S., Muncan, V., Phesse, T. J., Wilkins, J. A., Reed, K. R., ... Clarke, A. R. (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature*, *446*(7136), 676–679. <https://doi.org/10.1038/nature05674>
- Santarosa, M., & Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1654*(2), 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.01.001>
- Schuler, K. M., Rambally, B. S., Difurio, M. J., Sampey, B. P., Gehrig, P. A., Makowski, L., & Bae-Jump, V. L. (2015). Antiproliferative and metabolic effects of metformin in a preoperative window clinical trial for endometrial cancer. *Cancer Medicine*, *4*(2), 161–173. <https://doi.org/10.1002/cam4.353>
- Sellak, H., Wu, S., & Lincoln, T. M. (2012). KLF4 and SOX9 transcription factors antagonize β -catenin and inhibit TCF-activity in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1823*(10), 1666–1675. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2012.06.027>
- Shen, P., Reineke, L. C., Knutsen, E., Chen, M., Pichler, M., Ling, H., & Calin, G. A. (2018). Metformin blocks MYC protein synthesis in colorectal cancer via mTOR-4EBP-eIF4E and MNK1-eIF4G-eIF4E signaling. *Molecular Oncology*, *12*(11), 1856–1870. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12384>
- Shi, L., Wu, Y., Yu, J., Chen, X., Luo, X., & Yin, Y. (2017). Research of the relationship between β -catenin and c-myc-mediated Wnt pathway and laterally spreading tumors occurrence. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *20*, 252–257. Retrieved from [https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/252-257-Relationship-between- \$\beta\$ -catenin-and-c-myc-mediated-Wnt-pathway-and-LSTs-occurrence.pdf](https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/252-257-Relationship-between-β-catenin-and-c-myc-mediated-Wnt-pathway-and-LSTs-occurrence.pdf)
- Shimokawa, T., Furukawa, Y., Sakai, M., Li, M., Miwa, N., Lin, Y. M., & Nakamura, Y. (2003). Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the β -catenin/T-cell factor complex. *Cancer Research*, *63*(19), 6116–6120.
- Smith, L. M., Wise, S. C., Hendricks, D. T., Sabichi, A. L., Bos, T., Reddy, P., ... Birrer, M. J. (1999). cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*, *18*(44), 6063–

6070. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202989>

- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2011). *TNM Classification of Malignant Tumours*. Wiley.
- Song, Y., Lee, S., Kim, J.-R., & Jho, E.-H. (2018). Pja2 Inhibits Wnt/ β -catenin Signaling by Reducing the Level of TCF/LEF1. *International Journal of Stem Cells*, 11(2), 242–247. <https://doi.org/10.15283/ijsc18032>
- Sonvilla, G., Allerstorfer, S., Stattner, S., Karner, J., Klimpfinger, M., Fischer, H., ... Grusch, M. (2007). FGF18 in colorectal tumour cells: autocrine and paracrine effects. *Carcinogenesis*, 29(1), 15–24. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm202>
- Soon Sohn, O., Fiala, E. S., Requeijo, S. P., Weisburger, J. H., & Gonzalez, F. J. (2001). Differential Effects of CYP2E1 Status on the Metabolic Activation of the Colon Carcinogens Azoxymethane and Methylazoxymethanol 1. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 61). Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/61/23/8435.full.pdf>
- Stamos, J. L., Chu, M. L.-H., Enos, M. D., Shah, N., & Weis, W. I. (2014). Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6. *ELife*, 3, e01998. <https://doi.org/10.7554/eLife.01998>
- Stemmer, V., de Craene, B., Berx, G., & Behrens, J. (2008). Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with β -catenin. *Oncogene*, 27(37), 5075–5080. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.140>
- Su, L., Vogelstein, B., Kinzler, K., Fiol, C., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, 262(5140), 1734–1737. <https://doi.org/10.1126/science.8259519>
- Suebsoonthron, J., Jaroonwichawan, T., Yamabhai, M., & Noisa, P. (2017). Inhibition of WNT signaling reduces differentiation and induces sensitivity to doxorubicin in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Anti-Cancer Drugs*, 28(5), 469–479. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000478>
- Tan, R. J., & Liu, Y. (2012). Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 302(11), F1351-61. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00037.2012>
- Tang, L., Duan, R., Zhong, Y., Firestone, R. A., Hong, Y., Li, J., ... Li, Y. (2014).

Synthesis, identification and in vivo studies of tumor-targeting agent peptide doxorubicin (PDOX) to treat peritoneal carcinomatosis of gastric cancer with similar efficacy but reduced toxicity. *Molecular Cancer*, 13(1), 44.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-44>

Tazi, E., & Errihani, H. (2010). Treatment of cachexia in oncology. *Indian Journal of Palliative Care*, 16(3), 129–137. <https://doi.org/10.4103/0973-1075.73644>

ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., & Nusse, R. (2008). Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies. *Cell Stem Cell*, 3(5), 508–518. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.013>

Terese Winslow. (2014). Cellular and Scientific — Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration. Retrieved July 9, 2019, from Image website:

<https://www.teresewinslow.com/cellular-scientific/ihj90o9dtfaen5y6klyz2c97o92vr7>

Teulière, J., Faraldo, M. M., Deugnier, M.-A., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., Thiery, J. P., & Glukhova, M. A. (2005). Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development (Cambridge, England)*, 132(2), 267–277.

<https://doi.org/10.1242/dev.01583>

Thanki, K., Nicholls, M. E., Gajjar, A., Senagore, A. J., Qiu, S., Szabo, C., ... Chao, C. (2017). Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *International Biological and Biomedical Journal*, 3(3), 105–111.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28825047>

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440–446.

<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>

Trinh, S. X., Nguyen, H. T. B., Saimuang, K., Prachayasittikul, V., & Chan On, W. (2017). Metformin Inhibits Migration and Invasion of Cholangiocarcinoma Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 18(2), 473–477.

<https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.2.473>

Ueno, K., Hiura, M., Suehiro, Y., Hazama, S., Hirata, H., Oka, M., ... Hinoda, Y. (2008). Frizzled-7 as a Potential Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Neoplasia*, 10(7),

- 697–705. <https://doi.org/10.1593/NEO.08320>
- Valvona, C. J., & Fillmore, H. L. (2018). Oxamate, but Not Selective Targeting of LDH-A, Inhibits Medulloblastoma Cell Glycolysis, Growth and Motility. *Brain Sciences*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/brainsci8040056>
- van Amerongen, R., Bowman, A. N., & Nusse, R. (2012). Developmental Stage and Time Dictate the Fate of Wnt/ β -Catenin-Responsive Stem Cells in the Mammary Gland. *Cell Stem Cell*, 11(3), 387–400. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.05.023>
- Villanueva, M. T. (2019). Long path to MYC inhibition approaches clinical trials. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00055-2>
- Waler, J., Machon, O., Tumova, L., Dinh, H., Korinek, V., Wilson, S. R., ... Krauss, S. (2012). A Novel Tankyrase Inhibitor Decreases Canonical Wnt Signaling in Colon Carcinoma Cells and Reduces Tumor Growth in Conditional APC Mutant Mice. *Cancer Research*, 72(11), 2822–2832. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3336>
- Wang, Yaodu, Wu, Z., & Hu, L. (2018). The regulatory effects of metformin on the [SNAIL/miR-34]:[ZEB/miR-200] system in the epithelial-mesenchymal transition(EMT) for colorectal cancer(CRC). *European Journal of Pharmacology*, 834, 45–53. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.07.006>
- Wang, Yifan, Shi, J., Chai, K., Ying, X., & Zhou, B. P. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 13(9), 963–972. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24168186>
- Wei, W., Mok, S. C., Oliva, E., Kim, S., Mohapatra, G., & Birrer, M. J. (2013). FGF18 as a prognostic and therapeutic biomarker in ovarian cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(10), 4435–4448. <https://doi.org/10.1172/JCI70625>
- Willett, W. C. (2005). Diet and Cancer. *JAMA*, 293(2), 233–234. <https://doi.org/10.1001/jama.293.2.233>
- Wu, Y., & Zhou, B. P. (2010). Snail: More than EMT. *Cell Adhesion & Migration*, 4(2), 199–203. <https://doi.org/10.4161/cam.4.2.10943>
- Wu, Z.-Q., Brabletz, T., Fearon, E., Willis, A. L., Hu, C. Y., Li, X.-Y., & Weiss, S. J. (2012). Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 109(28), 11312–11317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203015109>
- Xing, M., Yan, F., Yu, S., & Shen, P. (2015). Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLOS ONE*, 10(7), e0133569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133569>
- Xue, H., Li, J., Xie, H., & Wang, Y. (2018). Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *International Journal of Biological Sciences*, 14(10), 1232–1244. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24612>
- Yang, H.-Y., Shen, J.-X., Wang, Y., Liu, Y., Shen, D.-Y., & Quan, S. (2019). Tankyrase Promotes Aerobic Glycolysis and Proliferation of Ovarian Cancer through Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling. *BioMed Research International*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/2686340>
- Yang, X., Li, L., Huang, Q., Xu, W., Cai, X., Zhang, J., ... Xiao, J. (2015). Wnt signaling through Snail1 and Zeb1 regulates bone metastasis in lung cancer. *American Journal of Cancer Research*, 5(2), 748–755. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25973312>
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3), 497–503. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.497>
- Yook, J. I., Li, X.-Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H. S., Kim, N. H., ... Weiss, S. J. (2006). A Wnt–Axin2–GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nature Cell Biology*, 8(12), 1398–1406. <https://doi.org/10.1038/ncb1508>
- You, Z., Saims, D., Chen, S., Zhang, Z., Guttridge, D. C., Guan, K.-L., ... Wang, C.-Y. (2002). Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 157(3), 429–440. <https://doi.org/10.1083/jcb.200201110>
- Yu, G., Fang, W., Xia, T., Chen, Y., Gao, Y., Jiao, X., ... Xie, K. (2015). Metformin potentiates rapamycin and cisplatin in gastric cancer in mice. *Oncotarget*, 6(14), 12748–12762. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3327>
- Yu, X., Yin, J., Shen, D., Shentu, J., Long, Y., & Chen, T. (2018). Improvement of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from protein-rich substrate in food waste. *Waste Management*, 74, 177–184.

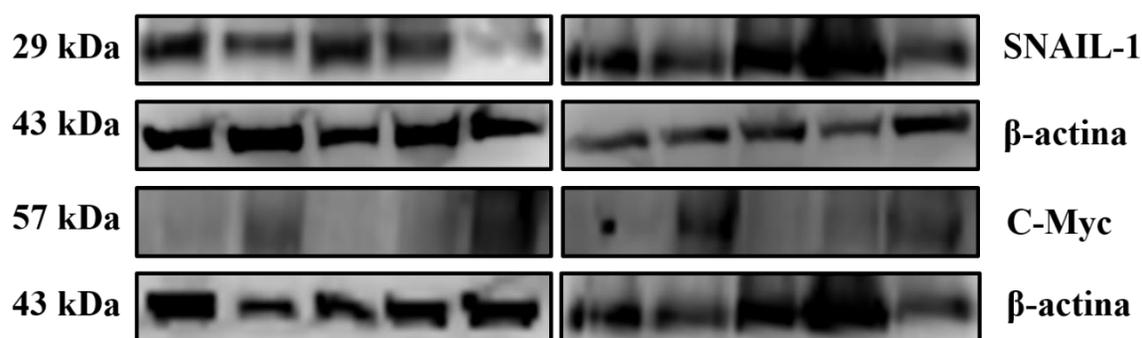
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.047>

- Yu, Z., Lou, L., & Zhao, Y. (2018). Fibroblast growth factor-18 promotes the growth, migration and invasion of MDA-MB-231 cells. *Oncology Reports*, 40(2), 704–714. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6482>
- Zaidi, S., Gandhi, J., Joshi, G., Smith, N. L., & Khan, S. A. (2019). The anticancer potential of metformin on prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0085-2>
- Zhai, X., Yang, Y., Wam, J., Zhu, R., & Wu, Y. (2013). Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncology Reports*, 30(6), 2983–2991. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2735>
- Zhang, K.-S., Zhou, Q., Wang, Y.-F., & Liang, L.-J. (2013). Inhibition of Wnt signaling induces cell apoptosis and suppresses cell proliferation in cholangiocarcinoma cells. *Oncology Reports*, 30(3), 1430–1438. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2560>
- Zhang, R., Zhang, P., Wang, H., Hou, D., Li, W., Xiao, G., & Li, C. (2015). Inhibitory effects of metformin at low concentration on epithelial–mesenchymal transition of CD44+CD117+ ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0249-0>
- Zhang, S., Li, Y., Wu, Y., Shi, K., Bing, L., & Hao, J. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway Upregulates c-Myc Expression to Promote Cell Proliferation of P19 Teratocarcinoma Cells. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(12), 2104–2113. <https://doi.org/10.1002/ar.22592>
- 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(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.046>
- Zhou, D., Tian, Y., Sun, L., Zhou, L., Xiao, L., Tan, R. J., ... Liu, Y. (2017). Matrix Metalloproteinase-7 Is a Urinary Biomarker and Pathogenic Mediator of Kidney Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 28(2), 598–611. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016030354>
- Zhu, X., Yuan, C., Tian, C., Li, C., Nie, F., Song, X., ... Li, L. (2018). The plant

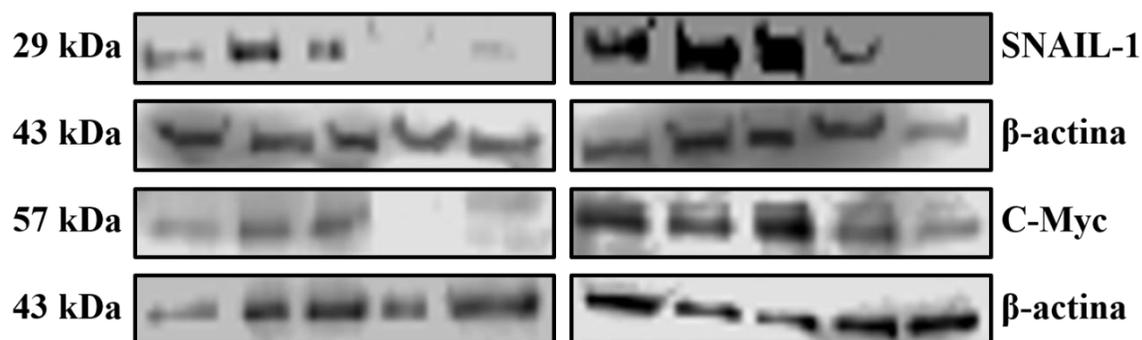
sesquiterpene lactone parthenolide inhibits Wnt/ β -catenin signaling by blocking synthesis of the transcriptional regulators TCF4/LEF1. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(14), 5335–5344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.819300>

Zi, F., Zi, H., Li, Y., He, J., Shi, Q., & Cai, Z. (2018). Metformin and cancer: An existing drug for cancer prevention and therapy. *Oncology Letters*, 15(1), 683–690. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7412>

11. Anexos



- Anexo 1: Duplicados de los ensayos de WB de tejido.



- Anexo 2: Duplicados de los ensayos de WB de CP.