



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMIGRATORIO DE UNA TRIPLE TERAPIA EN
LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA, COLON Y CÉRVIX**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. GARCÍA REYES MICAL KARINA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASCENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM,
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/724/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de noviembre de 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **GARCÍA REYES MICAL KARINA** con número de cuenta 307187464 con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMIGRATORIO DE UNA TRIPLE TERAPIA EN LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA, COLON Y CÉRVIX”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ
Vocal: DR. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
Suplente: DR. SIGIFREDO PEDRAZA SÁNCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 04 de noviembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por haberme permitido continuar con mi formación académica.

Agradezco al CONACYT por haberme brindado la beca con número de apoyo 450890. Gracias a dicho apoyo pude llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Agradezco infinitamente a mi tutora principal, la doctora Nadia Judith Jacobo Herrera; por su enorme paciencia, comprensión, consideración, compromiso, responsabilidad, por su enorme temple y bondad hacia mí, sin los cuales no habría terminado mi posgrado.

Agradezco al doctor Carlos Guadalupe Pérez Plasencia, por brindarme consejos y observaciones puntuales y enriquecedoras para mi proyecto y mi carrera profesional.

Agradezco al doctor Alejandro Zentella Dehesa, por ser comprensivo conmigo y brindarme consejos y observaciones que me resultaron sumamente útiles en el desarrollo de este proyecto.

Agradecimientos

Agradezco a los miembros del jurado el doctor Euclides Ávila Chávez, el doctor Octavio Daniel Reyes Hernández, la doctora Patricia García López y el doctor Sigifredo Pedraza Sánchez, por su apoyo invaluable.

A la doctora Verónica García Castillo, por ser parte sustancial de mi formación académica, y personal.

Al doctor Eduardo López Urrutia, por brindarme siempre su apoyo pertinaz en mi formación académica.

A así como a Rocío Chávez Trejo por su inagotable paciencia y compromiso con los estudiantes.

A la doctora Gabriela Figueroa, cuyos comentarios y sus enseñanzas forman parte de esta tesis.

A mis amigos del L-11 y la UBIMED, por acompañarme en tantos momentos que atesoro en mi memoria.

A mis amigas Magali, Mariana y Monse, por su apoyo y paciencia incondicional.

A Randy Váldez, por convertirse en pieza clave para la culminación de este proyecto.

A mi familia, por ser mi mayor refugio e inspiración.

Índice

Lista de figuras

1.	Resumen	1
2.	Abstract	2
3.	Introducción	3
3.1	Cáncer	3
3.1.1	Cáncer de colon	3
3.1.2	Cáncer de mama	4
3.1.3	Cáncer de cérvix	7
3.2	Metástasis como blanco terapéutico	8
3.2.1	Migración	8
3.2.2	Invasión	10
3.2.3	Intravasación	11
3.2.4	Metástasis	11
3.3	Terapias farmacológicas	13
3.3.1	Doxorrubicina	13
3.3.2	Metformina	15
3.3.3	Oxamato de sodio	16
4.	Hipótesis	18
5.	Objetivo	18
6.	Metodología	19
6.1	Cultivo celular	19
6.2	Ensayo de cierre de herida	19
6.3	Ensayos de proliferación en tiempo real	21
6.4	Ensayos de migración en tiempo real	21
7.	Resultados	22
7.1	Ensayo de reparación de heridas	22
7.1.1	Cáncer de colon	22
7.1.2	Cáncer de mama	26
7.1.3	Cáncer de cérvix	29
7.2	Ensayos de proliferación en tiempo real	32
7.3	Ensayos de migración en tiempo real	35
8.	Discusión	37
9.	Conclusiones	40
10.	Referencias bibliográficas	41

Lista de figuras

Figura 1. Determinación del índice celular en función de la impedancia

Figura 2. Morfología celular de la línea HCT116 en respuesta a los distintos tratamientos.

Figura 3. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea HCT116

Figura 4. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea SW620

Figura 5. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea BT20

Figura 6. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea MDA-MB-231

Figura 7. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea SiHa

Figura 8. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea Caski

Figura 9. Proliferación en tiempo real con xCELLigence.

Figura 10. Ensayos de migración en tiempo real.

1. Resumen

El cáncer es una devastadora enfermedad que aumenta progresivamente su incidencia en la población y que por desgracia, no se ha encontrado un tratamiento que sea totalmente eficaz contra ésta cuando se detecta en estados de mayor desarrollo. La peor prognosis está asociada a los eventos de metástasis, los cuales conducen a altos índices de mortalidad por la enfermedad. La metástasis es un proceso que está determinado por la adquisición de características móviles en las células tumorales, que las conducen a migrar a través del epitelio, invadir la membrana basal, irrumpir la circulación linfática o sanguínea y viajar a través de cualquiera de las anteriores, hasta lograr extravasar la circulación y colonizar un nuevo tejido. A pesar de que la proporción de las células que sobreviven en la circulación es sumamente baja, los procesos de invasión e intravasación son bastante más eficientes y pocos son los tratamientos orientados hacia la prevención de dichos procesos.

Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó resultados favorecedores con una nueva combinación farmacológica, la cual consiste en Doxorubicina, Metformina y Oxamato de sodio. Se ha demostrado que esta triple terapia tiene efectos citotóxicos en células tumorales de colon, mama y cérvix y actúa induciendo muerte por autofagia a través de la inhibición de mTOR, LDH y HIF-1. Dado que los blancos de esta triple terapia también se han descrito como participantes en la migración de las células tumorales, se propuso evaluar dicha terapia en procesos relacionados con metástasis.

Para ello, se realizaron ensayos de cierre de herida y de proliferación y migración en tiempo real mediante el software RTCA en xCELLigence, en líneas celulares, metastásicas y no metastásicas, de cáncer de colon, mama y cérvix, probando la triple terapia a las dosis previamente establecidas por el grupo de trabajo. Se comparó el efecto de los tratamientos en los siguientes grupos: 1) Control, sin tratamiento, 2) Doxorubicina (Dox), 3) Metformina/Oxamato de sodio (Met/Ox) y 4) Doxorubicina/Metformina/Oxamato de sodio (3F).

En todas las líneas celulares evaluadas se observó una disminución en la proliferación y migración de las células en respuesta a los tratamientos Met/Ox y 3F, ambos mostraron actuar con eficiencia similar en la mayoría de las líneas. Los grupos Control y Doxorubicina no mostraron diferencias entre sí en ninguna de las líneas celulares evaluadas. Ello nos sugiere que la inhibición en la proliferación y migración está determinada por Metformina y Oxamato de sodio, principalmente. Sin embargo, los resultados previos nos indican que la terapia 3F resulta más efectiva en la inhibición de mTOR, LDH y HIF-1, por lo que es posible sugerir que la inhibición de la proliferación y migración inducido por Met/Ox es resultado de otros mecanismos no evaluados en nuestro grupo de trabajo y que es necesario elucidar.

La triple terapia se perfila como un eficiente tratamiento que, además de inducir muerte celular, tiene potencial como tratamiento preventivo contra la metástasis, mediante mecanismos celulares que es necesario describir.

2. Abstract

Cancer is one of the most important health problems worldwide. Even when therapies like surgery and radiation can be effective, the worst prognosis is given when metastasis occurs. Metastasis consists in dissemination of cancer cells through blood circulation; it begins with invasion, when cancer cells lost their adherence to the other cells and extracellular matrix and intravasate into lymphatic or blood circulation and must survive and adhere to vessel cells to extravasate in a new organ. While survival and extravasation are ineffective processes, invasion is very effective, and an important therapeutic target to avoid metastasis.

Previously, our workgroup reported a new pharmacological combination –Doxorubicin, Metformin and Sodium Oxamate– that synergistically targets DNA repair, mTOR pathway and lactate dehydrogenase, and displayed selective cytotoxic effects on cancer cells. These targets are involved in metastatic pathways too, therefore herein we assayed the efficiency of the triple therapy in invasion and migration of cancer cells.

We tested the pharmacological combination Doxorubicin, Metformin and sodium oxamate (3F) in breast-, cervical-, and colon cancer-derived cell lines and evaluated its effect in proliferation, migration and invasion. Migration was evaluated by a wound healing assay, while proliferation and cell invasion were evaluated in real time using the xCELLigence® RTCA DP Instrument.

The results showed a decrease in proliferation, migration and invasion within 24 h in most of the cell lines treated with 3F. However, the efficiency was different given that some cell lines were more sensitive to the treatment and presented cytotoxic effects at 12 h posttreatment. Also, we evinced that the effect of the Metformin/Oxamate (Met/Ox) combination had a similar effect, decreasing proliferation, migration and invasion in most cell lines.

Our results proved the anti-migratory and anti-invasivity effect of the 3F and Met/Ox pharmacological combinations; therefore, both are suitable anti-metastasis therapy candidates.

3. Introducción

3.1 Cáncer

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades que se desencadenan por la reprogramación de las funciones celulares hacia la proliferación descontrolada, evasión de apoptosis y respuesta inmune, inestabilidad genómica, desbalance del metabolismo, angiogénesis, invasión y metástasis, eventos que promueven la generación de masas tumorales con crecimiento progresivo. Tales tumores conducen a padecimientos crónico-degenerativos que constituyen un severo problema de salud (Hanahan et al. 2011)

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad en adultos mayores de 30 años en países con alto índice de desarrollo social y económico, reportándose hasta 9.6 millones de muertes asociadas a esta enfermedad en el 2018 (Bray et al. 2018). Encabezando la lista de los tipos de cáncer con mayor incidencia se encuentran el cáncer de pulmón, mama, próstata y colon; en cuanto al índice de mortalidad, el cáncer de pulmón e hígado tienen mayor prevalencia entre los hombres, mientras que el cáncer de mama y cérvix presentan un mayor número de muertes asociadas en el sexo femenino (Bray et al. 2018). Mientras tanto, en México el cáncer se coloca en la tercera causa de mortalidad, después de la diabetes y los problemas cardiovasculares (INEGI, 2018). Esta enfermedad presenta mayor prevalencia en la población entre los 30 y 59 años, debido principalmente a los inadecuados hábitos de alimentación y poca cultura de prevención de enfermedades. Entre los tipos de cáncer más comunes en esta población se encuentran el cáncer colorrectal, cuya incidencia se ha incrementado en un 50% en los últimos 25 años, y los tipos de cáncer asociados al sistema reproductor, como el cáncer de próstata y cérvix. En las mujeres, además, destaca el cáncer de mama como la tercera causa de mortalidad en los grupos mayores de 20 años de edad (INEGI, 2018). Dado que el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y el de cérvix tienen altas tasas de incidencia y mortalidad, es importante esclarecer sus características patológicas para determinar posibles tratamientos terapéuticos.

3.1.1 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es el cuarto tipo de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial y en México constituye la principal neoplasia que se desarrolla en el tubo digestivo (González et al. 2010). La mayoría de los tipos de cáncer colorrectal comienzan como pólipos benignos que, eventualmente, conducen a la formación de adenomas menores a 1 cm de tamaño, los cuales pueden tener una histología tubular o tubulovelloso, es decir, con prolongaciones vellosas. Las alteraciones en los genes supresores de tumores y oncogenes, resultado de la inestabilidad genómica y epigenómica, son pieza clave para la adquisición del fenotipo maligno, por lo que si ocurre una displasia favorable para la expansión clonal, los adenomas pueden crecer y desarrollar adenocarcinomas o pólipos serrados, ambos característicos del cáncer colorrectal (Kuipers et al. 2015). Los factores causales pueden ser ambientales o genéticos. Como parte de los factores genéticos, se han caracterizado varios síndromes que pueden conducir al desarrollo del cáncer colorrectal, entre ellos destacan el síndrome de Lynch y el síndrome de la poliposis adenomatosa familiar.

El síndrome de Lynch, también conocido como Cáncer colorrectal hereditario no poliposo, constituye del 5 al 10% de los casos de cáncer colorrectal y aunque no es posible diferenciar entre los adenomas típicos del síndrome y el desarrollo de adenocarcinomas; los carcinomas mucinosos, en forma de anillos y medulares están frecuentemente relacionados con la adquisición del fenotipo maligno y la progresión de la enfermedad (Lynch et al. 2003). Se ha demostrado que el síndrome de Lynch es ocasionado por mutaciones en la línea germinal en genes que intervienen en la reparación del DNA, tales como MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 o EPCAM, del sistema mismatch repair (Patel y Ahnen 2012). La acumulación de mutaciones, consecuencia de la reparación ineficiente del DNA, tiene como resultado el fenómeno descrito como “Inestabilidad de microsátélites”; que son secuencias repetitivas de DNA en los genes involucrados y que, dado que este fenómeno se ha encontrado en el 90% de los tumores resultado del síndrome de Lynch, su reconocimiento se emplea para el diagnóstico de la enfermedad mediante PCR (Kuipers et al. 2015; Vasen et al. 2007)

El segundo tipo de cáncer colorrectal hereditario es conocido como Poliposis Adenomatosa Familiar, que se origina como adenomas en forma de pólipos que se distribuyen a lo largo del intestino y colon y, de no ser tratado, conduce al desarrollo de cáncer colorrectal en el 100% de los casos mayores a 39 años (Galiatsatos y Foulkes 2006; Patel y Ahnen 2012). Esta enfermedad es resultado de un desorden autosómico dominante, caracterizado por mutaciones germinales en el gen *adenomatous polyposis coli* (APC), un gen supresor de tumores que controla la actividad de la vía de señalización Wnt, implicada en la regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (Kuipers et al. 2015). Dentro de la familia de la poliposis adematosa, se han incluido otros desórdenes que también se caracterizan por el desarrollo de pólipos y que pueden conducir a cáncer colorrectal, como son el síndrome de Gardner, el síndrome de Turcot y el síndrome de Peutz–Jeghers, padecimientos que presentan distintas características moleculares e histológicas entre sí (Galiatsatos y Foulkes 2006; Kuipers et al. 2015)

Además de los factores genéticos que determinan el desarrollo del cáncer colorrectal, los factores ambientales y el estilo de vida juegan un papel importante en el desarrollo del mismo, puesto que se ha relacionado el aumento en la incidencia de esta enfermedad con el consumo de alcohol y cigarro, obesidad y colitis crónica.

Uno de los principales tratamientos contra el cáncer colorrectal involucra el procedimiento quirúrgico; sin embargo, se sabe que cerca del 38% de los pacientes con este padecimiento desarrolla reincidencia y metástasis hacia hígado o pulmones entre 1 y 10 años después de los tratamientos operatorios (Andreoni et al. 2007) . Los principales órganos que presentan metástasis de cáncer colorrectal son el hígado y los pulmones (Chang Sun et al. 2015)

3.1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial y nacional. De acuerdo con el INEGI, el cáncer de mama representaba el 19.4% del total de los casos de cáncer diagnosticados en la población mexicana en el 2014; además, la tendencia al aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad se mantiene constante (INEGI, 2016). Dado que únicamente el 10% de los casos de cáncer de mama se explica por mutaciones hereditarias en los genes BRCA1 y BRCA2,

comúnmente asociados a esta enfermedad; se ha postulado que el aumento en la morbilidad y mortalidad se explican por el estilo de vida y los factores de riesgo asociados, como son edad avanzada, menopausia tardía, menarquia precoz, obesidad, entre otros (OMS, 2016).

El cáncer de mama puede tener su origen en los conductos lactíferos (carcinoma ductal) o en los lobulillos (carcinoma lobulillar) que conforman la glándula mamaria y se caracteriza por su nivel de respuesta a los estrógenos, los cuales estimulan la proliferación y diferenciación en las células (BCO, 2014). Debido a ello, se ha establecido la caracterización de diferentes subtipos de cáncer de mama de acuerdo a sus características moleculares (tabla 1), que están determinadas por la presencia y nivel de expresión de los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y receptor 2 al factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). De esta forma, el cáncer de mama se clasifica en Luminal, HER-2+ y Triple negativo (Dai et al. 2015; Yersal 2014).

Luminal

Este subtipo de cáncer es el de mayor prevalencia en la población y mejor pronóstico cuando es detectado a tiempo. Se subdivide a su vez en los tipos A y B y se caracteriza por presentar expresión anormal de los receptores ER/PR/HER2, así como otros receptores de las células epiteliales normales. El subtipo luminal A presenta altos niveles de receptores de estrógenos, expresión de citoqueratinas epiteliales y baja expresión de genes relacionados con proliferación. Diagnosticado de manera temprana, los pacientes con este tipo de cáncer presentan mejor pronosis, reincidencia y metástasis en menos del 10% de los casos, y tratamiento a base de hormonas o fármacos (Yersal 2014). En contraste, el subtipo luminal B presenta un fenotipo más agresivo y peor pronosis. Las células tumorales de este tipo expresan en mayor proporción genes que incrementan la tasa proliferativa y metabólica, como gama glutamil hidrolasa (GGH), ciclina E y factores de crecimiento, como HER2 (Yersal 2014).

HER-2+

Los tumores de este tipo están caracterizados por una alta expresión de HER2 y de todos los miembros de su cascada de señalización, perteneciente a la familia de tirosin cinasas. Asimismo, se ha caracterizado que este subtipo de cáncer presenta un fenotipo más agresivo, con alta tasa proliferativa y un mayor grado histológico, menor expresión de receptores de estrógenos además de presentar mutaciones en p53 en el 40% de los casos. Las terapias más comunes están basadas en la inhibición de HER2, mediante el uso de anticuerpos monoclonales o de inhibidores de tirosina cinasa (Yersal, O. *et al*, 2014).

Tipo basal o triple negativo.

El cáncer de mama tipo basal o triple negativo representa el subtipo más agresivo, con el peor pronóstico y tiene una prevalencia aproximada del 30% dentro de la población. Histológicamente, los tumores de este subtipo se caracterizan por presentar pobre formación de túbulos, además de regiones con necrosis o fibrosis, infiltrado de linfocitos. Además, los tumores presentan una alta tasa proliferativa y comúnmente expresan marcadores de tipo mioepitelial, como CK5, CK14 O CK17;

pero no expresan los receptores ER, PR o HER2, de ahí que reciban el apelativo triple negativo (Yersal 2014).

Se han determinado numerosos genes implicados en el fenotipo agresivo del subtipo triple negativo, entre los que destacan mutaciones y pérdida de TP53 y BRCA1. Asimismo, numerosas vías de señalización también se han visto implicadas, como la vía de Retinoblastoma (Rb), la vía de NF-κB y la vía PI3K/Akt, que por ejercer su actividad sobre el complejo mTOR, es parte de la regulación metabólica de la célula y se ve comúnmente hiperactivada en cáncer de mama (Yersal 2014; Lattouf et al., 2016).

Además de la presencia o ausencia de receptores, el pronóstico de la enfermedad también está relacionada con el grado histopatológico invasivo del tumor, que determina la diseminación de las células tumorales a otros órganos, es decir, la metástasis. El carcinoma ductal invasivo, que se origina a partir de los ductos de las glándulas mamarias, constituye del 50-80% de todos los tipos de cáncer de mama y presenta una tasa de supervivencia de hasta el 50% tras 10 años de detectado el tumor (Weigelt et al., 2005). Se ha observado que las células tumorales de cáncer de mama hacen metástasis principalmente hacia huesos y pulmones; dicho evento es dirigido a estos órganos de forma preferencial por su expresión de quimiocinas, que funcionan como quimioatrayente. Tal es el caso de la quimiocina CXCL12 (motivo C-X-C), que es secretada en mayor proporción por nódulos linfáticos, pulmones y médula ósea; ésta se une al receptor CXCR4, altamente expresado por las células de cáncer de mama, por lo que se considera que la unión ligando-receptor de las quimiocinas CXCL12 y CXCR4 es crítica para la metástasis de las células de cáncer de mama (Scully, O. *et al*, 2012).

A pesar de que existen terapias para el tratamiento contra el cáncer de mama, ya sea mediante la quimioterapia convencional o los tratamientos dirigidos, la metástasis empeora el pronóstico debido a las complicaciones que representa, por lo que el establecimiento de una estrategia terapéutica preventiva es aún un reto dentro de la investigación.

Tabla 1. Subtipos de cáncer de mama y sus características. Modificado de Lattouf, H. et al, 2016.

Subtipos de cáncer de mama	de	Marcadores moleculares	Prevalencia	Características clínicas	Tratamiento general	Pronóstico
Luminal	A	ER+/PR+ HER2-	60%	El tipo luminal A tiene menor grado histológico que el luminal B	Tamoxifen, Inhibidores de aromatasas, Fulvestrant	Buen pronóstico cuando se detecta a tiempo.
	B	ER+/PR+ HER2+ o HER2- Con alto Ki67			Quimioterapia, principalmente antraciclinas y taxanos	Alto riesgo de reincidencia

HER2	ER-/PR-/ HER2+	20%	Alto grado histológico con nodos linfáticos positivo	Trastuzumab y quimioterapias basadas en antraciclinas	Pobre pronóstico temprano, alta recurrencia y metástasis
Triple negativo	ER-/PR-/ HER2-	20%	Común en mujeres africanas y americanas. Presenta disfunción de BRCA1.	Quimioterapia basada en platino e inhibidores de PARP.	Agresivo con pobre prognosis

3.1.3 Cáncer de cérvix

Después del cáncer de mama, el cáncer de cérvix es la neoplasia más común que afecta únicamente a mujeres. A nivel mundial y nacional, esta enfermedad se encuentra entre los 10 tipos de cáncer que presentan mayor índice de mortalidad (Bray et al. 2018). A pesar de que en países desarrollados la incidencia de este tipo de cáncer ha disminuido progresivamente en los últimos años, en países en vías de desarrollo el cáncer de cérvix aún constituye un severo problema de salud. En México, el cáncer de cérvix es la segunda neoplasia más frecuente en las mujeres, con una incidencia del 15.5% y una tasa de mortalidad del 12% (Ochoa et al. 2015). El principal factor causal relacionado con la enfermedad es el virus del papiloma humano (VPH) (Bosch et al. 2002) y, aunque se ha determinado que la mayoría de las infecciones por este virus son de tipo transitorio y con poco potencial para desarrollar una neoplasia, se sabe que existen otros factores que pueden aumentar el riesgo están íntimamente ligados a la vida sexual y reproductiva, puesto que la tasa de incidencia de estas infecciones entre las mujeres de 20 a 29 años es cercana al 40% (Hernández et al. 2015). También se ha determinado que el riesgo de desarrollar cáncer de cérvix aumenta cuando se comienza la vida sexual antes de los 21 años, se tiene uno o múltiples embarazos antes de los 21 años, se tienen numerosas parejas sexuales o bien, se han tenido otro tipo de infecciones de transmisión sexual, como clamidiasis o herpes genital. La inmunosupresión, asociada o no al virus de inmunodeficiencia humana (VIH), también puede ser un factor de riesgo para desarrollar cáncer de cérvix luego del contacto con el VPH. Otros factores de riesgo no relacionados con la vida sexual incluyen la historia familiar, el consumo de tabaco y el uso de anticonceptivos orales durante más de cinco años (Nour, N., 2009)

El factor causal más común del cáncer de cérvix son las infecciones persistentes por el virus del papiloma humano en la zona de transformación cervical, que es una zona específica de la mucosa donde el epitelio escamoso estratificado del ectocérvix reemplaza al epitelio glandular del endocérvix. El desarrollo de cáncer de cérvix por infección por VPH consta de cuatro etapas: 1) La transmisión del virus, debido al contacto entre mucosas o epitelios; 2) La resistencia viral, que es la persistencia de la infección viral durante 18 meses o más y que puede conducir a anomalías citológicas, 3) la progresión de una clona de células infectadas a precáncer; etapa en la cual las células indiferenciadas que presentan alguna displasia empiezan a desplazar a las células normales

en el epitelio cervical y 4) la invasión, en la que el precáncer forma un carcinoma capaz de alcanzar e invadir la membrana basal. La relación entre la infección por el VPH y el cáncer de cérvix se explica mediante el genoma viral, el cual consiste de 8 genes, entre estos, las proteínas E6 y E7 actúan como oncogenes, dado que inhiben la actividad de p53 y pRb, mediadores de apoptosis y ciclo celular, respectivamente. Tanto E6 como E7 se expresan durante la fase infecciosa; su sobreexpresión puede conducir al precáncer (Schiffman et al. 2007).

Es importante señalar que se ha determinado que la alta mortalidad de estos tipos de cáncer de mama, colon y cérvix está asociada a su capacidad de dispersarse a otros órganos, es decir, a los eventos de metástasis. Se ha reportado que hasta el 90% de las muertes provocadas por cáncer están relacionadas con la metástasis del tumor inicial (Chaffer y Weinberg 2011). El cáncer de cérvix puede diseminarse mediante la invasión directa de los tejidos y órganos colindantes o a través de la circulación linfática o sanguínea. Mientras que, por invasión directa, las células de cáncer de cérvix pueden diseminarse al útero, vagina, vejiga, cavidad peritoneal y recto, a través de la circulación puede alcanzar los pulmones, hígado y huesos, que son los órganos más frecuentes (Aziz y Aziz 2017).

1.2 La metástasis como blanco terapéutico

La metástasis es el proceso de diseminación y colonización de las células tumorales, desde un órgano inicial hacia otras partes del cuerpo, mediante la circulación linfática o sanguínea. Dado que la mortalidad asociada al cáncer está relacionada con metástasis hasta en el 90% de los casos, la investigación clínica se ha enfocado en buscar nuevas formas de detectar tempranamente posibles tumores y erradicarlos antes de que ocurra la metástasis de los mismos, puesto que, una vez que las células tumorales han colonizado otros órganos, las oportunidades de brindar un tratamiento efectivo son nulas (Wells et al. 2013). La metástasis consiste de una serie de eventos denominados “Cascada de invasión – metástasis”, en la cual, células con mayores capacidades de motilidad logran escapar del estrés del microambiente tumoral mediante la pérdida de las uniones celulares y la migración a través del tejido, la posterior invasión de la membrana basal, seguido por intravasación linfática o sanguínea mediante la adhesión a receptores específicos en las células endoteliales, la subsecuente extravasación a través de las células endoteliales y finalmente, la colonización de un nuevo órgano (Guan 2015).

3.2.1 Migración.

Una característica importante que permite que las células tumorales sean capaces de migrar y diseminarse a otros tejidos es la resistencia a la muerte por anoikis. La muerte por anoikis es un tipo de apoptosis que es resultado de la pérdida de las adhesiones célula-célula y célula-matriz extracelular. Cuando una célula normal pierde sus adhesiones celulares, proteínas como BIM o BMF, miembros de la familia pro-apoptótica BCL-2, son liberados del citoesqueleto y son capaces de promover muerte celular mediante las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis (Mehlen y Puisieux

2006). Sin embargo, las células tumorales adquieren resistencia a la muerte por anoikis, que facilita su motilidad, así como un fenotipo tipo mesenquimal poco diferenciado. A este tipo de epitelio, que ya no presenta las características histológicas de polaridad y diferenciación de las células, se le conoce como Transición epitelio-mesénquima (Guan 2015). En este tipo de epitelio es común la disminución o pérdida en la expresión de E-cadherina en las células epiteliales, ya sea por factores epigenéticos o genéticos; la exigua expresión de esta proteína está asociada con grados más avanzados del tumor y por consiguiente, con peor pronóstico para los pacientes (Thiery 2002). La E-cadherina es una proteína que se expresa principalmente en las células epiteliales y forma parte de las uniones adherentes, las cuales median la unión célula-célula en participación con las cateninas, proteínas que a su vez se anclan a los filamentos de actina (Wheelock, M. *et al*, 2007). La disminución en la expresión de E-cadherina correlaciona con la adquisición de un fenotipo más agresivo e invasivo (Cavallaro y Christofori 2004). De manera adicional, se sabe que la expresión de otros miembros de la familia de las cadherinas puede estar involucrada en la motilidad de las células tumorales; por ejemplo, en cáncer de mama se ha demostrado que el aumento en la expresión de N-cadherina, que típicamente forma parte de las uniones adherentes de células mesenquimales, está relacionado con la transición epitelio-mesénquima y con el carácter invasivo del tumor; ya que N-cadherina favorece la motilidad y proliferación celular a través de la unión al receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 1 (FGFR-1). La unión de N-cadherina como ligando de FGFR-1 evita la internalización del mismo y promueve la activación sostenida de la vía de señalización MAPK, la cual conduce a la expresión de genes asociados con proliferación y migración, tal como MMP-9 (Scully, O., *et al*, 2012; Wheelock, M. *et al*, 2007; Suyama *et al*. 2002). De esta manera, en tumores con alto potencial migratorio, se observa una disminución en la expresión de E-cadherina y un aumento en N-cadherina. Además de la pérdida de las uniones celulares, las células de la transición epitelio mesénquima presentan otras características distintivas que favorecen su motilidad, como la sobreexpresión de filamentos de vimentina. Mientras que las células epiteliales expresan filamentos de queratina, las células de tipo mesenquimal presentan filamentos intermedios de vimentina, los cuales otorgan a la célula resistencia al estrés mecánico y participan en la preservación de su integridad. Sin embargo, se ha demostrado que las células tumorales de origen epitelial sobreexpresan filamentos de vimentina de manera directamente proporcional al grado maligno del tumor (Inokuchi 2011; Liu y Parent 2011). Esta sobreexpresión de los filamentos de vimentina se ha relacionado con la adquisición de un fenotipo más invasivo y metastásico, debido a que la interacción de estos filamentos con integrinas promueve la expresión de genes que estimulan la motilidad celular, como slug y H-Ras y el receptor tirosina-cinasa Axl, previamente reportados como oncogenes implicados en la transición epitelio-mesénquima (Vuoriluoto *et al*. 2011; Hendrix *et al*. 1996). Además de las modificaciones en la expresión de proteínas del citoesqueleto, las células de la transición epitelio mesénquima presentan estructuras que favorecen la migración celular, conocidos como invadopodios y podosomas. Los invadopodios y podosomas, comúnmente presentes en las células tumorales con capacidades metastásicas, se forman luego de la disociación de las adhesiones focales y, al igual que éstas, están constituidos por actina, que mantiene la rigidez de la estructura; integrinas, que constituyen el contacto entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, y proteasas, como la MMP-2 Y MMP-9, que promueven la degradación de la matriz

extracelular (Murphy y Courtneidge 2011). La reorganización constante del citoesqueleto de actina y la fuerza mecánica, así como la dinámica de las integrinas y la degradación de la matriz extracelular, permite que la célula tumoral se desplace siguiendo un gradiente de factores de crecimiento autócrinos y parácrinos que promueven la motilidad (Wells et al. 2013). Dentro de los factores de crecimiento que estimulan la formación de invadopodios, se encuentra el Factor de crecimiento epidermal (EGF) el cual estimula a la Src cinasa, el cual regula a la baja las adhesiones célula-célula y promueve la formación de invadopodios (Weaver, 2006). Por otro lado, se ha determinado que el complejo mTOR puede también regular la motilidad mediante la fosforilación de S6K1, la cual se encarga de la reorganización del citoesqueleto de F-actina, importante para la polarización celular, la formación de adhesiones focales y la expresión de MMP-9. Además, el complejo mTORC2 se encarga de la reorganización de los filamentos de actina, principales constituyentes de los invadopodios (Liu y Parent 2011).

La adquisición de características que permitan la motilidad celular es clave para el segundo proceso, que es la invasión.

3.2.2 Invasión.

El proceso de invasión es pieza clave para el desarrollo de metástasis y se lleva a cabo cuando las células transpasan la membrana basal mediante la degradación proteolítica de ésta. Dicha membrana es una estructura que separa el epitelio del estroma de cualquier tejido, constituida por colágena IV, laminina, heparán sulfato, entre otros componentes de la matriz extracelular (Pozzi, et al. 2017). Las funciones de la membrana basal son desde proveer soporte al epitelio, delimitarlo y determinar el comportamiento celular (Kalluri 2003; Pozzi, et al. 2017). La degradación proteolítica de la membrana basal requiere de la actividad de metaloproteasas de matriz, que son endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar componentes de la matriz extracelular y que requieren ser secretadas para mostrar su actividad tras un corte proteolítico en algunos casos. Se ha determinado que la sobreexpresión de las metaloproteasas 1, 2, 3, 7, 9 y 13 está relacionada con metástasis del tumor y peor prognosis en pacientes (Poincloux, Lizarraga, y Chavrier 2009). La secreción de estas metaloproteasas está asociada principalmente con los invadopodios por lo que, al encontrarse con la membrana basal, las células tumorales extienden verticalmente sus invadopodios para irrumpir dicha membrana. Este proceso requiere de la polimerización y reorganización continua de los filamentos de actina, así como formación de integrinas y el aumento en la expresión de metaloproteasas, para dar paso a la protusión y retracción celular que permita el movimiento. Estos procesos son regulados por varias proteínas de respuesta al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), como N-WASP- Arp2/3, RhoA, así como las cinasas ROCK y LIM (Yamaguchi, Wyckoff, y Condeelis 2005; W. Wang et al. 2005).

Las células tumorales que son capaces de degradar la membrana basal son dirigidas hacia la circulación sanguínea, guiadas por un gradiente de quimiocinas y factores de crecimiento capaces de estimular la activación de diversas vías de señalización involucradas en la reorganización del citoesqueleto, como son PI3K/Akt, que inciden sobre el complejo mTOR, Fak-Src, que participa en

la reorganización de las adhesiones focales y la GTPasa Rac, permitiendo la producción de metaloproteasas de matriz y la formación de lamelopodios, que son protusiones membranales que guían el movimiento de la célula (Steeg, 2006).

La invasión las células tumorales les permite escapar de microambientes pobres en nutrientes y oxígeno, para colonizar otros nichos, a través de la circulación linfática o sanguínea mediante su intravasación.

3.2.3 *Intravasación*

Una vez atravesada la membrana basal, las células tumorales buscan alcanzar los vasos sanguíneos o linfáticos, proceso denominado “Migración transendotelial”, siguiendo el gradiente de quimiocinas y factores de crecimiento. Este proceso es favorecido por la angiogénesis o linfogénesis que es promovida por los factores propios del tumor, por ejemplo VEGF, cuya sobreexpresión está asociada a metástasis en sitios remotos al tumor original y con un peor pronóstico de la enfermedad en pacientes (Han 2011). Los mecanismos mediante los cuales las células tumorales alcanzan la circulación son aún inciertos, pero se ha demostrado que estas pueden alcanzar el lumen de los vasos sanguíneos o linfáticos mediante difusión pasiva, la cual es mucho más asequible en los vasos linfáticos debido a la ausencia de membrana basal y revestimiento muscular, o bien; por degradación directa de la vasculatura (van Zijl, Krupitza, y Mikulits 2011). A pesar de que el proceso de intravasación comparte parte de la maquinaria necesaria para invadir la membrana basal, en cáncer de mama se ha logrado establecer a los actores principales en proceso la intravasación de las células tumorales. Por ejemplo, la metaloproteasa de membrana tipo 4 (MT4MMP ó MMP17) favorece la intravasación mediante la degradación de los vasos sanguíneos colindantes al tumor, permitiendo la metástasis a pulmón (Reymond, d’Água, y Ridley 2013). Otra metaloproteasa implicada en este proceso es la disintegrina ADAM12, cuyas funciones normales implican la remodelación de la matriz extracelular y reparación de tejidos, sin embargo, su sobreexpresión en cáncer se ha asociado a la intravasación debido a su capacidad de romper las uniones endoteliales (Nyren-Erickson et al. 2013; Reymond, d’Água, y Ridley 2013). Una vez que las células tumorales han alcanzado el lumen de los vasos sanguíneos o linfáticos, éstas pueden diseminarse a través del cuerpo, colonizando órganos de forma preferencial. Este proceso es conocido como metástasis.

3.2.4 *Metástasis.*

Las células que logran infiltrarse en la circulación, deben someterse a numerosos factores de estrés que involucran la carencia de un sustrato, la resistencia a la presión ejercida por el flujo sanguíneo y la supervivencia al ataque de las células del sistema inmune. Debido a ello, se estima que menos del 0.1% de las células que se diseminan a través de la circulación logran hacer metástasis en órganos distantes al sitio de dispersión, por lo que este proceso resulta sumamente ineficiente (van Zijl, Krupitza, y Mikulits 2011).

Dado que las células tumorales de cada tejido hacen extravasación en órganos preferenciales, se han propuesto algunos mecanismos que expliquen su patrón de distribución. El primer mecanismo establece que las células tumorales se distribuyen de manera similar en todos los órganos; sin embargo, únicamente proliferan en aquellos que cuentan con las condiciones más óptimas en cuanto a factores de crecimiento y microambiente. Por otra parte, se ha propuesto que las moléculas de adhesión de las células tumorales limitan su capacidad de extravasación a órganos específicos, o bien, que los órganos liberen moléculas quimiotácticas específicas para las células tumorales correspondientes (Bogenrieder y Herlyn 2003). La extravasación de las células tumorales está mediada por la unión de distintos ligandos E-selectina, esta última es una glucoproteína de adhesión celular presente en las células endoteliales y que sólo es expresada en respuesta a citocinas proinflamatorias durante una respuesta inmune (P. Mann y Tanaka 2012). Las células tumorales pueden presentar diversas moléculas ligando de E-selectina, como son HCELL, PSLG1, CD24, MUC1, entre otras, las cuales les permiten unirse a las células endoteliales, junto con las integrinas, para detener la velocidad del flujo y extravasar en el órgano correspondiente (Reymond, d'Água, y Ridley 2013). Además de la unión a moléculas de adhesión, las células tumorales también pueden extravasarse siguiendo a un gradiente de quimiocinas. Se sabe que la quimiocina CXCL12, secretada por las células endoteliales y que participa en diversos procesos como embriogénesis, angiogénesis y respuesta inflamatoria, es un buen quimioatrayente para las células tumorales que expresan los receptores de unión a este ligando, como CXCR7 y CXCR4, cuya expresión es inducida por HIF-1 y por lo tanto, se ha reportado la presencia de dicha quimiocina en diversos tipos de cáncer (Janssens, Struyf, y Proost 2018). Las células tumorales sufren múltiples cambios en su morfología que les permiten atravesar el endotelio mediante dos tipos de migración trasendotelial: la migración paracelular, en la cual las células tumorales migran irrumpiendo las uniones entre las células del endotelio, o bien, la migración transcelular, únicamente observada en células de cáncer de colon, en la cual la migración se lleva a cabo a través de la célula endotelial (Reymond, d'Água, y Ridley 2013).

Aún cuando las células tumorales logren sobrevivir en la circulación y extravasar hacia los tejidos, la tasa de colonización del nuevo órgano es sumamente baja, debido a que las células pueden entrar en un período de dormancia por su incapacidad de formar nuevos vasos sanguíneos o de salir del arresto celular y proliferar (Gupta y Massagué 2006). A pesar de que dicho periodo de dormancia puede persistir varios años después de la metástasis de las células tumorales, el proceso de reactivación involucra la participación de varias vías de señalización que permiten la adaptación de las células tumorales al nuevo microambiente, tales como la vía Akt, p38 MAPK, ERK y mTOR. Se ha sugerido que las células en dormancia aprovechan la estimulación parácrina y los factores de estrés endógenos para activar vías de señalización que permitan la proliferación y la subsecuente producción de masas tumorales secundarias, que pueden conducir al peor pronóstico (Giancotti 2013). Dado que la gran mayoría de los fármacos contra el cáncer están orientados hacia la inhibición de la proliferación y no hacia la inhibición de la metástasis, es difícil determinar la presencia de metástasis incluso varios años posteriores a procedimientos quirúrgicos o el uso de quimioterapias como tratamientos contra el cáncer. Por ello, es importante el desarrollo de

estrategias terapéuticas que inhiban, no sólo la proliferación de las células tumorales, sino también sus capacidades móviles que pueden conducir al proceso de metástasis.

3.3 Triple terapia farmacológica

Dada la importancia que tiene la inhibición de la proliferación de las células tumorales y debido a que la sinergia entre fármacos puede presentar una mayor eficacia en el efecto terapéutico, en el equipo de trabajo se postuló que el tratamiento concomitante de los fármacos Doxorubicina, un agente genotóxico; Metformina, implicada en la inhibición de mTOR y Oxamato de sodio, un inhibidor de LDH-A, en las células tumorales podría conducir a la inhibición del metabolismo aberrante mediante la inactivación de mTOR y la enzima lactato deshidrogenasa. Resultados previos han demostrado que la combinación farmacológica es capaz de promover muerte de las células tumorales por apoptosis y autofagia, tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo*, de cáncer colorrectal, mama y cérvix (Figueroa-González et al. 2016; García-Castillo et al. 2017). Sin embargo, se postuló que la actividad de los fármacos podría tener también efecto en las vías de señalización implicadas en la migración de las células tumorales. Para entender el efecto concomitante de la terapia, es necesario considerar los mecanismos de acción individuales de cada fármaco.

3.3.1 Doxorubicina

También conocido como adriamicina ((8S, 10S) – 10 - (4-amino -5- hidroxil -6- metil- tetrahydro- 2H-pirano-2-iloxil) -6,8,11-trihidroxil -8- (2-hidroxiacetil) -1-metoxil - 7, 8, 9, 10 – tetrahidrotetraceno -5, 12-diona), este fármaco es ampliamente utilizado en las quimioterapias como tratamiento contra el cáncer; pertenece a la familia de las antraciclinas y se caracteriza por poseer un grupo aglicona, un radical metoxycarbonilo y un azúcar. El grupo aglicona se encuentra entre los anillos de tetraciclina, los cuales tienen grupos quinona e hidroxiquinona adyacentes (Arcamone et al. 1972) . El fármaco es capturado por las células mediante difusión pasiva y se sabe que este proceso ocurre en pocos minutos cuando es administrado vía intravenosa en pacientes, ello debido a que sus características lipídicas le permiten atravesar rápidamente los tejidos, pese a que presenta unión a proteínas plasmáticas (Tacar et al. 2013). Los efectos citotóxicos de la doxorubicina han sido ampliamente estudiados, ya que dependen del compartimento celular en el que se encuentren, de la concentración o dosis y de la fase del ciclo celular en la que es administrada.

Debido a sus características hidrofóbicas, la doxorubicina puede translocarse al núcleo de forma altamente eficiente, se sabe que la concentración de este fármaco en el núcleo se sobresatura y puede superar entre 10 y 500 veces la concentración que se encuentra en el citoplasma, en donde se distribuye principalmente en los compartimentos membranosos, como el aparato de Golgi, lisosomas y mitocondrias (Tacar et al. 2013). En el núcleo, la doxorubicina tiene una alta afinidad para intercalarse con el DNA, principalmente entre las bases CG adyacentes debido a la formación de puentes de hidrógeno entre la antraciclina y la guanina (Yang et al. 2014). Este evento por sí mismo altera la integridad del DNA, además la planaridad de la molécula de doxorubicina ocasiona un cambio topológico en el DNA y estrés por la torsión del mismo, lo cual se traduce en numerosas

irregularidades en la replicación y transcripción del DNA, así como inestabilidad en los nucleosomas que puede ocasionar que estos se muevan exponiendo o protegiendo distintas regiones promotoras (Yang et al. 2014). De manera adicional, la doxorubicina tiene como blancos las enzimas Topoisomerasas I y II, cuya inhibición por este fármaco acentúa el estrés en el DNA ocasionado por el superenrollamiento del mismo, esta condición incluso puede provocar ruptura de la doble cadena. Además de la afectación en las funciones biológicas del DNA, la doxorubicina está involucrada en la generación de radicales libres debido a la oxidación de su quinona a semiquinona, que reacciona con el oxígeno para formar superóxido y superperóxido, que de igual forma pueden ocasionar daño en el DNA (Yang et al. 2014).

En su conjunto, el estrés genotóxico ocasionado por la doxorubicina se ha asociado como factor causal en numerosos procesos en las células tumorales, como inducción de apoptosis, autofagia, catástrofe mitótica y necrosis, así como cambios en el metabolismo. Asimismo, se ha determinado que la doxorubicina también puede alterar las capacidades de motilidad de las células tumorales. En células de cáncer de ovario, por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento con doxorubicina induce apoptosis y reorganización de los filamentos de F-actina, vimentina y tubulina, de manera dosis-dependiente (Grzanka et al. 2003), además de que el tratamiento con el fármaco es capaz de reducir la migración de estas células, mediante un mecanismo dependiente de la activación de ATM y p53 (Brum et al. 2013). Por otra parte, se ha visto que la doxorubicina puede actuar sinérgicamente con otros fármacos para inhibir la migración e invasión de líneas celulares de distintos tipos de cáncer en modelos *in vitro*. Por ejemplo, al evaluarse en combinación con furanodieno en células de cáncer de mama triple negativo, ambos fármacos alteraron la reorganización del citoesqueleto, además inhibieron las capacidades migratorias e invasivas de la línea celular a través de la regulación de las vías de señalización FAK/Src, PI3K/Akt y de las proteínas MMP-9 y la integrina αV (Zhong et al. 2017). La Doxorubicina también se ha conjugado con nanopartículas de heparina de bajo peso molecular y se ha mostrado su efectividad, tanto *in vitro* como *in vivo*, de inhibir la migración, invasión y metástasis de las células de melanoma, además de reprimir la expresión de P-selectina en las células de torrente sanguíneo, necesaria para ayudar al proceso de metástasis (Mei et al. 2017). Con estos antecedentes, se ha sugerido que la doxorubicina también podría tener un efecto en la inhibición de la migración de las células tumorales.

A pesar de que la Doxorubicina ha sido uno de los tratamientos más usados contra el cáncer, también es cierto que no es un tratamiento selectivo contra las células tumorales y por lo tanto, presenta numerosos efectos adversos, que dependen de la dosis administrada y de la capacidad de recuperación del paciente. Entre los principales efectos adversos se encuentran los malestares gastrointestinales, náuseas, mareos, pérdida de cabello, afecciones en el sistema neurológico. Los pacientes más sensibles pueden también sufrir fatiga, supresión del sistema inmune y lapsos de mala salud, además de afecciones en corazón, hígado, riñones y sistema nervioso (Tacar, Sriamornsak, y Dass 2013). Por lo tanto, las nuevas terapias buscan implementar nuevos vehículos o mecanismos que permitan mantener la eficacia y potencia del fármaco y al mismo tiempo, disminuir los efectos adversos.

3.3.2 Metformina

Ampliamente recetado como tratamiento para la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DBT2), la metformina (1,1-dimetilguanidina) es un análogo de la guanidina, obtenido de la planta *Galega officinalis*. La exploración del potencial de este fármaco en el tratamiento del cáncer resultó de diversos estudios de cohorte, que reportaron que en aquellos pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tratados con metformina había una reducción del 23% de incidencia de cualquier tipo de cáncer (Evans et al. 2005).

La metformina es administrada vía oral y es absorbida después de 6 horas, alcanza una biodisponibilidad del 50-60 % a pesar de que sólo una pequeña porción de la misma se une a proteínas plasmáticas (DrugBank, 2018). Este fármaco es una molécula hidrofílica que, a pH fisiológico, se encuentra en forma protonada, por lo que sólo logra internalizarse en las células a través de la familia de transportadores catiónicos llamados OCT, cuyo nivel de expresión y polimorfismos genéticos son determinantes en la eficiencia de la terapia. Las células de hígado expresan los transportadores OCT1 casi exclusivamente, mientras que el resto de las células pueden capturar la metformina mediante las isoformas OCT2 y OCT3 (Salani et al. 2014). Como dato importante, se ha reportado que en ciertas neoplasias la expresión de OCT1 incrementa considerablemente en comparación con células no tumorales, hecho que se ha planteado como una importante oportunidad terapéutica (Gupta y Massagué 2006; Segal et al. 2011)

El papel de la metformina en el tratamiento contra el cáncer consiste en aprovechar sus características antihiper glucémicas en la regulación del metabolismo aberrante típico de la célula tumoral y es sabido que actúa mediante varios mecanismos de acción. El primer mecanismo descrito fue su acción como inhibidor del Complejo I de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Owen et al. 2000). Se ha hipotetizado que la carga positiva de la metformina le permite acumularse en la matriz mitocondrial; mientras que la parte apolar de la molécula la une a la membrana interna y posteriormente logra inhibir el Complejo I (Viollet et al. 2012; Foretz et al. 2014). Sin embargo, el mecanismo por el cual la metformina puede inhibir al complejo I aún es incierto, puesto que reportes recientes han concluido que la unión del fármaco no es específica ni única al complejo I, sino que su unión a los fosfolípidos de la membrana mitocondrial conducen a alteraciones en la estructura de esta última, los cuales pueden inducir cambios en la conformación y actividad enzimática de las proteínas transmembranales, así como la fluidez de los lípidos, entre otros aspectos. Por ello, se ha propuesto que la actividad de la metformina sobre el complejo I es más bien indirecta, pero potente (Salani et al. 2014). Dicha inhibición tiene como consecuencia una disminución de la carga energética; es decir, la interrupción del flujo de los electrones a través de la cadena evita la formación de ATP por fosforilación oxidativa. Pese a que la glicólisis aerobia está bien caracterizada como un sello distintivo del cáncer, estudios *in vivo* han reportado que algunas células tumorales oxidan completamente la glucosa por fosforilación oxidativa, por lo que el tratamiento con metformina resulta eficiente en estas poblaciones (Marin-Valencia et al. 2012). Además, se ha demostrado que cuando la función del complejo I está comprometida, otras vías catabólicas pueden verse también comprometidas. Por ejemplo, uno de los pasos limitantes de la β -oxidación de los ácidos grasos es llevado a cabo por la enzima L-3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa y requiere NAD⁺ como cofactor, el cual es oxidado a partir del NADH por el complejo I. Se ha

reportado que el efecto de la metformina sobre dicho complejo afecta la proporción NADH/ NAD⁺ y con ello, la β -oxidación de los ácidos grasos (Buzzai et al. 2007).

La disminución de ATP en la célula induce la activación de AMPK, cinasa trimérica compuesta por las subunidades α , β y γ ; ésta última cuenta con sitios de unión para ADP/AMP que al unirse promueven un cambio conformacional en el trímero, entonces la subunidad α es fosforilada en el sitio Thr179 para su activación. Como consecuencia, AMPK es capaz de conducir al arresto celular mediante la inhibición de ciclina D (Zhuang y Miskimins 2008), conducir a apoptosis independiente de p53 (Buzzai et al. 2007), así como regular la actividad de mTOR mediante la activación del complejo de esclerosis tuberosa (TSC2) por su fosforilación en los sitios T1227 y S1345 (Inoki et al. 2012; Salani et al. 2014).

Dado que la metformina es capaz de inhibir al complejo mTOR, se han estudiado también las implicaciones que el tratamiento con este fármaco tiene en la invasión y metástasis de las células tumorales. Se sabe que la actividad del complejo mTOR está asociada con el fenotipo de la transición epitelio-mesénquima, puesto que dicho complejo fosforila a la cinasa p70S6K, la cual, a su vez, estabiliza y evita la degradación proteosomal del factor de transcripción Snail, cuyos blancos están implicados en la transición epitelio-mesénquima, como N-cadherina y vimentina, además de ser capaz de inhibir la transcripción de E-cadherina (Pon et al. 2008). De este modo, se ha comprobado que el tratamiento con metformina es capaz de inhibir la expresión de genes de la transición epitelio-mesénquima, la proliferación y la migración a través del eje mTOR/ p70S6K en células de cáncer de cérvix (Cheng y Hao 2016). Además de su actividad sobre el factor de transcripción Snail, se ha demostrado que la metformina también puede ejercer un efecto inhibitorio, dosis-dependiente, en la expresión de otros factores de transcripción como Slug y ZEB1, que participan en la expresión de genes relacionados con la migración, desdiferenciación y despolarización de las células, también a través de la inhibición del complejo mTOR en células de glioblastoma (Song, Y. et al, 2018). Asimismo, la metformina también ha demostrado reducir la proliferación y migración en células de cáncer colorrectal mediante la inhibición de los factores de transcripción ZEB1 y Snail a través de mir-200 y mir-34, respectivamente, por mecanismos aún no elucidados (Y. Wang, Wu, y Hu 2018). Adicionalmente a su papel en la inhibición de dichos factores de transcripción, también se ha demostrado que la metformina tiene actividad regulatoria sobre la expresión de NF- κ B, MMP-9 y MMP-2, importantes para la invasión y la metástasis (Rattan, Ali Fehmi, y Munkarah 2012).

Dada la versatilidad de la metformina en sus mecanismos de acción, se considera un potente fármaco candidato como tratamiento preventivo en el desarrollo de metástasis.

3.3.3 Oxamato de sodio

Esta molécula se caracteriza por poseer una estructura análoga al piruvato, con un grupo amino y un átomo de sodio sustituyendo los grupos carbonilo. Debido a ello, el oxamato de sodio presenta actividad como inhibidor competitivo de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) (Novoa et al. 1959) de la conversión de piruvato a lactato junto con la oxidación de NADH. Dicha enzima tiene alta actividad en las células tumorales debido al efecto Warburg, fenómeno que consiste en la oxidación

preferencial de la glucosa al lactato, en lugar del piruvato, aún en presencia de oxígeno (Chen et al. 2007) . Se ha reportado que la inhibición de LDH por el oxamato tiene importantes consecuencias en el metabolismo de la célula tumoral; como disminución de los niveles de ATP, arresto del ciclo celular y aumento en los niveles de ROS mitocondriales (Zhai et al. 2013; Lu et al. 2015) , además se ha especulado el papel que juega esta enzima en la migración de las células tumorales. La elevada producción de lactato tiene efectos considerables en la acidificación del microambiente tumoral, evento que puede promover la invasión y metástasis. Por ejemplo, se ha comprobado que un microambiente tumoral ácido promueve la maduración de los invadopodios, sobreexpresión de algunas metaloproteasas y síntesis *de novo* de filamentos de actina que permite la reorganización del citoesqueleto. La acidificación del microambiente tumoral también disminuye la interacción entre las uniones focales y los filamentos de actina, evento que igualmente favorece la migración (Webb et al. 2011). De manera adicional, se ha demostrado que la sobreexpresión de LDH tiene efecto directo sobre la migración de las células tumorales, puesto que su inhibición disminuye la expresión de FAK, MMP-2 y VEGF, además de un aumento en la expresión de E-cadherina, comprobando que la actividad de LDH no sólo promueve la migración e invasión a través de la acidificación del medio (Sheng et al. 2012). Por ello, se ha sugerido que la inhibición de LDH mediante la acción del oxamato de sodio podría tener efecto inhibitorio en la migración de las células tumorales.

Debido a todo lo anteriormente mencionado, la triple terapia farmacológica con doxorubicina, metformina y oxamato de sodio, previamente probada en el grupo de trabajo, podría presentar una nueva característica emergente como tratamiento preventivo ante la migración, invasión y metástasis en distintos tipos de cáncer.

4. Hipótesis

- La triple terapia farmacológica Doxorrubicina/Metformina/Oxamato de sodio inhibe la migración e invasión en distintas líneas celulares de cáncer.

5. Objetivo General

- Evaluar los procesos de proliferación y migración en respuesta a la terapia Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en distintas líneas celulares de cáncer de mama, colon y cérvix.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la triple terapia en la proliferación de las líneas celulares BT20, MDA-MB-231, HCT116, SW620, SiHa y Caski durante 24 hrs.
- Evaluar el efecto de la triple terapia en la migración de las de las líneas celulares BT20, MDA-MB-231, HCT116, SW620, SiHa y Caski durante 24 hrs.

6. Metodología

6.1 Cultivo Celular

Las líneas celulares BT20 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, SiHa y Caski de cáncer de cérvix y SW620 de cáncer de colon se mantuvieron en cultivo con medio DMEM/F12, mientras la línea celular HCT116 también de cáncer de colon se mantuvo en cultivo con medio RPMI; todos los cultivos fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino y antibiótico/antimicótico, a 37°C y con 5% de CO₂, bajo condiciones de esterilidad. Una vez alcanzada la confluencia del 70-80%, las células fueron tratadas con tripsina para ser contadas y sembradas en los ensayos posteriores.

6.2 Ensayo de cierre de herida

El ensayo se realizó con algunas modificaciones del protocolo de Liang, C. (Liang, Park, y Guan 2007). En placas de 6 pozos, se colocó un adhesivo delgado, previamente esterilizado con luz UV, para realizar las heridas de forma sistemática y uniforme. Posteriormente, se sembraron ~500,000 células de las líneas ya mencionadas, a fin de tener pozos confluentes. Al cabo de 24 horas de adherencia, se retiraron los adhesivos y se colocaron los tratamientos Doxorrubicina (Dox), Metformina/Oxamato (Met/Ox) y Doxorrubicina/Metformina/Oxamato (3F) y el control (medio sin suero fetal bovino), de acuerdo con las IC50 previamente calculadas por García y Salgado en sus respectivas tesis de maestría y licenciatura (García et al. 2017)(Salgado, 2018) (Tabla 1). Las heridas resultantes del retiro del adhesivo fueron fotografiadas en campos representativos con el objetivo 40x, a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas posteriores a la administración del tratamiento correspondiente, con el propósito de monitorear el cierre de la herida por la migración de las células. Las fotografías correspondientes a los tratamientos y horas de monitoreo fueron analizadas mediante el software ImageJ (National Institutes of Health), con el cual se midió el área de cierre de la herida. Los resultados fueron graficados en porcentaje de cierre y comparados estadísticamente entre tratamientos y horas con ANOVA de una vía, usando el software GraphPad Prism 7 (Software Mackiev).

Línea celular	IC50
MDA-MB-231	Dox: 0.5µM Met: 25 mM
BT20	Ox: 10 mM
HCT116	Dox: 0.4µM Met: 15 mM
SW620	Ox: 10 mM
SiHa	Dox: 1.5µM Met: 30 mM
Caski	Ox: 15 mM

Tabla 1. IC50 de los fármacos para las líneas celulares indicadas. Las IC50 fueron obtenidas a partir de los ensayos realizados por García y Salgado (García, et al, 2017; Salgado et al, 2018).

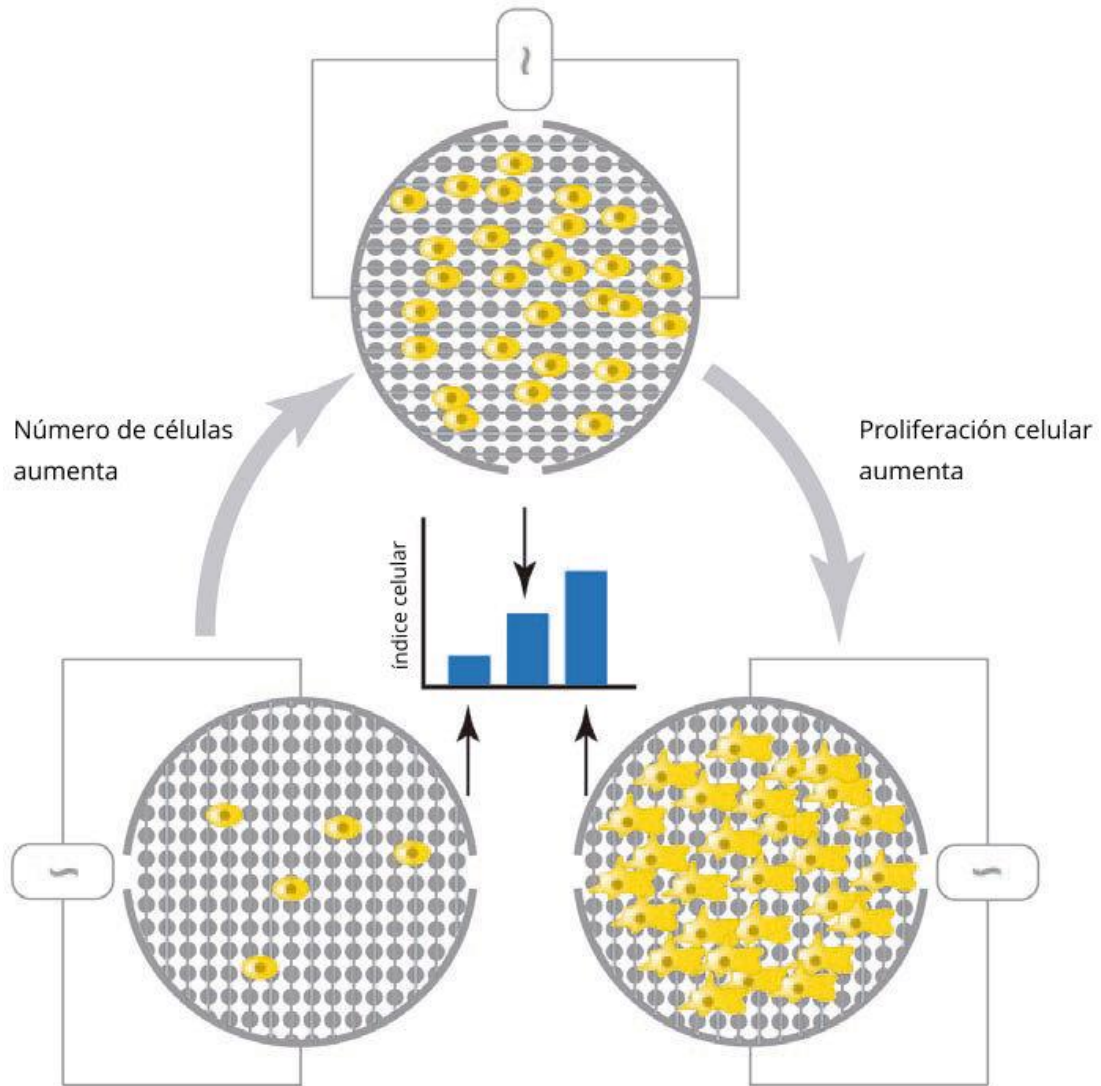


Figura 1. Determinación del índice celular en función de la impedancia. El software RTCA de xCELLigence determina el índice celular como una medida arbitraria, dada por la impedancia que proporciona la interacción de las células con los sensores electrónicos que se localizan en el fondo del micropozo. Este índice celular, por lo tanto, es proporcional al número de células que detectadas por los sensores; este mecanismo es idéntico en las placas E-plate, de proliferación y CIM-plate, de invasión.

6.3 Ensayos de proliferación en tiempo real

Para evaluar la proliferación de las células de las líneas mencionadas en respuesta a los tratamientos, se realizaron ensayos en tiempo real utilizando el sistema xCELLigence (Roche), basados en los protocolos descritos por Dowling (Dowling et al. 2014) y Keogh (Keogh 2010). Para este ensayo se utilizaron placas 96x o E-plate, estas contienen series de sensores electrónicos en el fondo de la placa; de manera que la adhesión o interacción de las células con los sensores produce un cambio en el flujo de la corriente eléctrica, o capacitancia, que es medida por el equipo. En las placas E-plate, previamente temperadas a 37°C en la incubadora, se sembraron 10,000 de cada línea celular con los tratamientos Dox, Met/Ox y 3F a las concentraciones indicadas (ver tabla 1) y disueltos en su medio correspondiente con suero fetal bovino al 2%, para obtener un volumen final de 150 μ L por pozo. Posteriormente, las placas se colocaron en el equipo xCELLigence dentro de la incubadora, a 37°C. La dinámica de la adhesión, elongación y proliferación celular fue graficada por el software RTCA (Roche) como “índice celular”, que es una medida arbitraria definida como $(R_n - R_b)/15$, donde R_n es la impedancia que proporciona la célula al paso de la corriente eléctrica en el electrodo (Figura 1). El ensayo en tiempo real fue monitoreado durante 24 horas, las mediciones de impedancia se tomaron en intervalos de 15 minutos. Las gráficas y los análisis estadísticos fueron realizados usando el software GraphPad Prism 7.

6.4 Ensayos de invasión en tiempo real

Para evaluar el potencial invasivo de las líneas celulares mencionadas, se utilizó también el sistema xCELLigence de acuerdo con las indicaciones del fabricante y basándonos en los protocolos de Dowling (Dowling et al. 2014) y Keogh (Keogh 2010). Para la realización de este ensayo se utilizaron placas CIM-plate 16, que consisten en dos cámaras; la superior, en la cual se siembran las células en las condiciones del experimento, y la cámara inferior, que contiene en el fondo los sensores electrónicos que miden la impedancia dada por la interacción con las células que arriban al fondo de la placa. Previo a sembrar las células, en la cámara inferior de las placas CIM-plate se agregaron 160 μ L del medio adecuado a cada línea celular y con suero fetal bovino al 10%. Este paso fue realizado con sumo cuidado, ya que es indispensable la formación de un menisco en la parte superior del pozo que permita que el medio se encuentre en contacto con la cámara superior; también se evitó la formación de burbujas. Posteriormente, ambas cámaras, inferior y superior, fueron ensambladas e incubadas en el equipo xCELLigence dentro de la incubadora, durante una hora. Al cabo de este periodo se tomó la primer medida de impedancia de fondo. Una vez realizada esta medición, se sembraron 10,000 células en cada pozo superior con los respectivos tratamientos: Dox, Met/Ox y 3F, disueltos en su medio de cultivo correspondiente, sin suero fetal bovino y a las concentraciones previamente indicadas para cada línea celular (ver tabla 1). El volumen final fue de 150 μ L por pozo en la cámara superior. Previo a colocar la placa en el equipo, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La dinámica del ensayo de invasión celular fue monitoreada durante 24 horas, en intervalos de 15 minutos. El índice celular fue calculado y graficado por el software RTCA en función de la impedancia proporcionada por la interacción celular con los sensores electrónicos; de manera similar al ensayo de proliferación. Las gráficas y los análisis estadísticos fueron realizados usando el software GraphPad Prism 7.

7. Resultados

7.1 Ensayo de reparación de heridas.

7.1.1 Cáncer de colon (Líneas celulares HCT116 y SW620)

Con el objetivo de determinar el efecto de la terapia Met/Ox/Dox en la migración de las células procedentes de distintos tipos de cáncer; se realizaron ensayos de reparación de heridas con 24 horas de seguimiento. Al cabo de las tres horas posteriores a la administración de los fármacos en la línea celular HCT116, las células pertenecientes al control negativo y al grupo Dox mostraron cambios en su morfología como elongación y formación aparente de invadopodios orientados hacia el área de la herida (Figura 2, A y B). Estos cambios en la morfología celular son indicadores de la actividad migratoria de las células observada a partir de las 3 horas en el porcentaje de cierre de la herida. Por el contrario, estos indicadores no se observaron en los grupos Met/Ox y 3F, en los que las células presentaron signos de estrés luego de la administración de los respectivos tratamientos (Figura 2, C y D).

Con respecto al porcentaje de cierre de la herida, los grupos Control (Sin tratamiento) y Dox mostraron un porcentaje de cierre entre 10 y 15 a partir de las 3 horas; dicho porcentaje aumentó progresivamente durante las 24 horas de tratamiento alcanzando, aproximadamente, el 30 y 20 % de cierre, respectivamente. La diferencia en el porcentaje entre estos dos grupos fue significativa a partir de las 6 horas; por lo que podemos deducir que en esta línea celular, la actividad migratoria de las células tratadas con Dox fue menor que aquellas sin tratamiento (Figura 3 A, C). Mientras tanto, los grupos Met/Ox y 3F presentaron un porcentaje de cierre menor al 5% después de 3 horas de exposición al tratamiento, el mayor porcentaje de cierre fue alrededor de 15% para ambos y fue alcanzado a las 12 horas. Los grupos Met/Ox y 3F no mostraron diferencias significativas entre sus respectivos porcentajes a las horas posteriores a la administración del tratamiento; sin embargo, sí

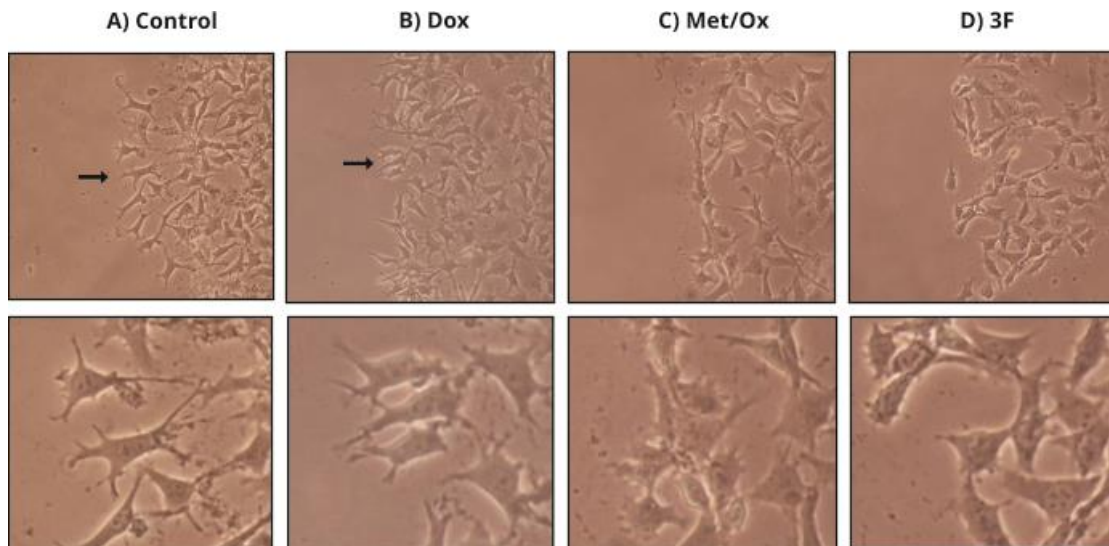


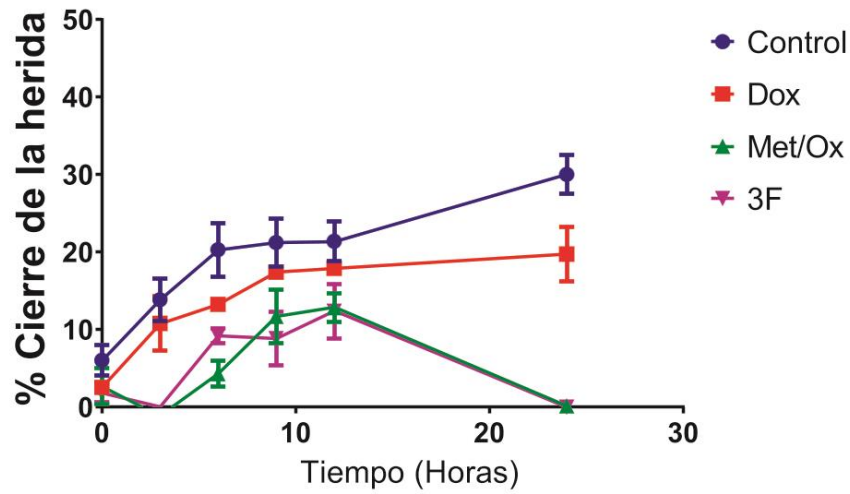
Figura 2. Morfología celular de la línea HCT116 en respuesta a los distintos tratamientos. A, B) A partir de las 3 horas, las células pertenecientes al grupo Control y Dox empezaron a mostrarse polarizadas, elongadas y con presencia de invadopodios orientados hacia el área de la herida. C y D) En los grupos correspondientes a los tratamientos Met/Ox y 3F no se observaron estos indicadores de actividad migratoria, por el contrario, las células mostraron estrés en su morfología luego de tres horas de exposición al tratamiento.

mostraron diferencias al compararse con los grupos Control y Dox desde las 3 horas. Ello nos sugiere que los tratamientos Met/Ox y 3F sí reducen con mayor efectividad la actividad migratoria de las células HCT116 durante las 12 horas posteriores a la administración del tratamiento. A las 24 horas de exposición a los fármacos, los grupos Met/Ox y 3F mostraron una regresión en el tamaño de la herida, sugiriendo con ello la muerte celular inducida por los tratamientos reportas por el equipo de trabajo (García-Castillo et al. 2017)(Salgado, 2018). Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de cierre de la herida entre los tratamientos Met/Ox y 3F a las 6, 9, 12 y 24 horas, por lo que se sugiere que el efecto inhibitorio en la migración es similar con ambos tratamientos.

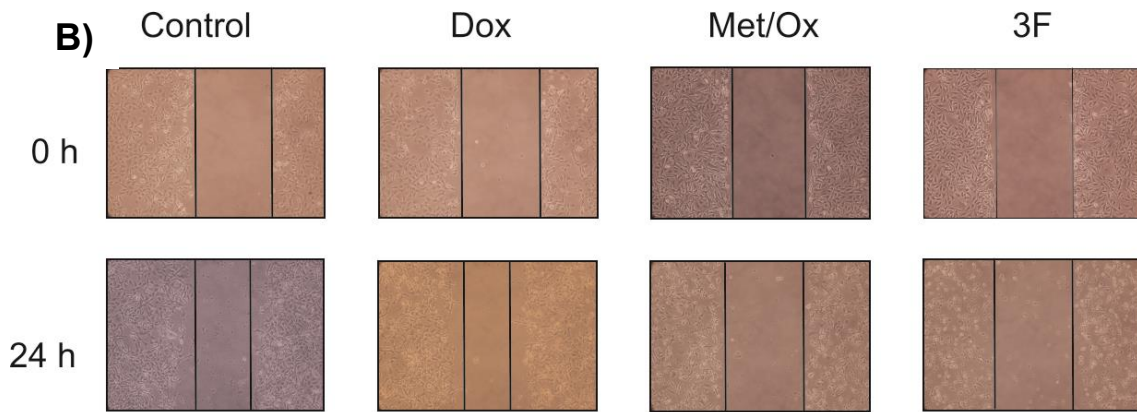
Por su parte, el ensayo también se llevó a cabo en la línea metastásica de cáncer de colon SW620, con resultados similares. Los cambios en el fenotipo asociados a la migración de las células fueron observados a partir de las 3 horas posteriores a la realización de la herida en los grupos Control y Dox, grupos en los cuales numerosas poblaciones celulares mostraron polarización y presencia de invadopodios. Estas poblaciones fueron menos evidentes en los grupos Met/Ox y 3F durante las horas de monitoreo. Con respecto al cierre de la herida (Figura 4, A), el control y los grupos experimentales Dox y 3F mostraron un porcentaje de migración cercano al 20% durante las primeras 9 horas del ensayo, no se mostraron diferencias significativas entre dichos grupos. El grupo Met/Ox sí mostró un porcentaje de cierre de la herida menor con respecto al grupo Dox durante las mismas 9 horas del experimento. Sin embargo, luego de 24 horas de monitoreo, los grupos Met/Ox y 3F mantuvieron el porcentaje de cierre cercano al 20%, significativamente menor que los grupos Control y Dox, que alcanzaron el 40%, aproximadamente. Además, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos Met/Ox y 3F a las 24 horas, tampoco hubo diferencias entre el Control y el grupo Dox. Ello nos indica que los fármacos que los tratamientos Met/Ox y 3F podrían tener un efecto inhibitorio sobre la migración de estas células luego de 9 horas de exposición al tratamiento.

Migración durante 24 h en células HCT116

A)



B)



C)

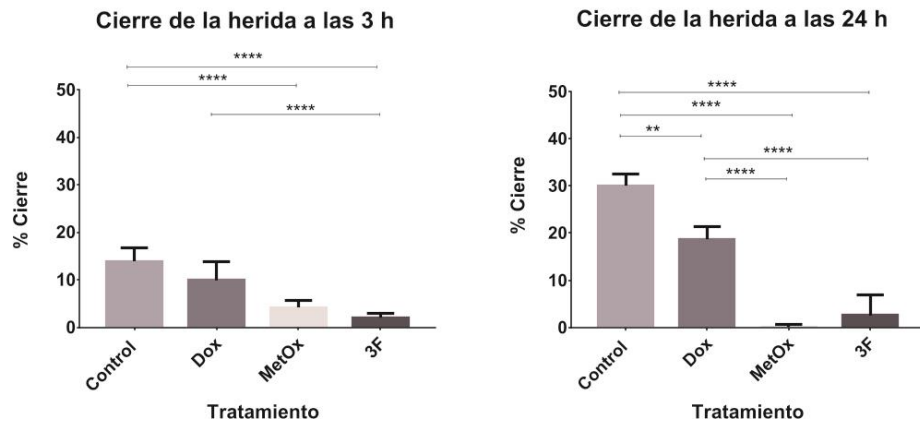


Figura 3. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea HCT116. A) Comparación del porcentaje de cierre de la herida entre los tratamientos Control, Dox, Met/Ox y 3F desde el inicio del tratamiento a las 24 horas de término del mismo. B) Fotografías representativas del cierre de la herida en los tratamientos correspondientes. 40x. C) Porcentaje de cierre de la herida a las 3 y 24 horas de monitoreo. *, $P > 0.05$.

Migración durante 24 h en células SW620

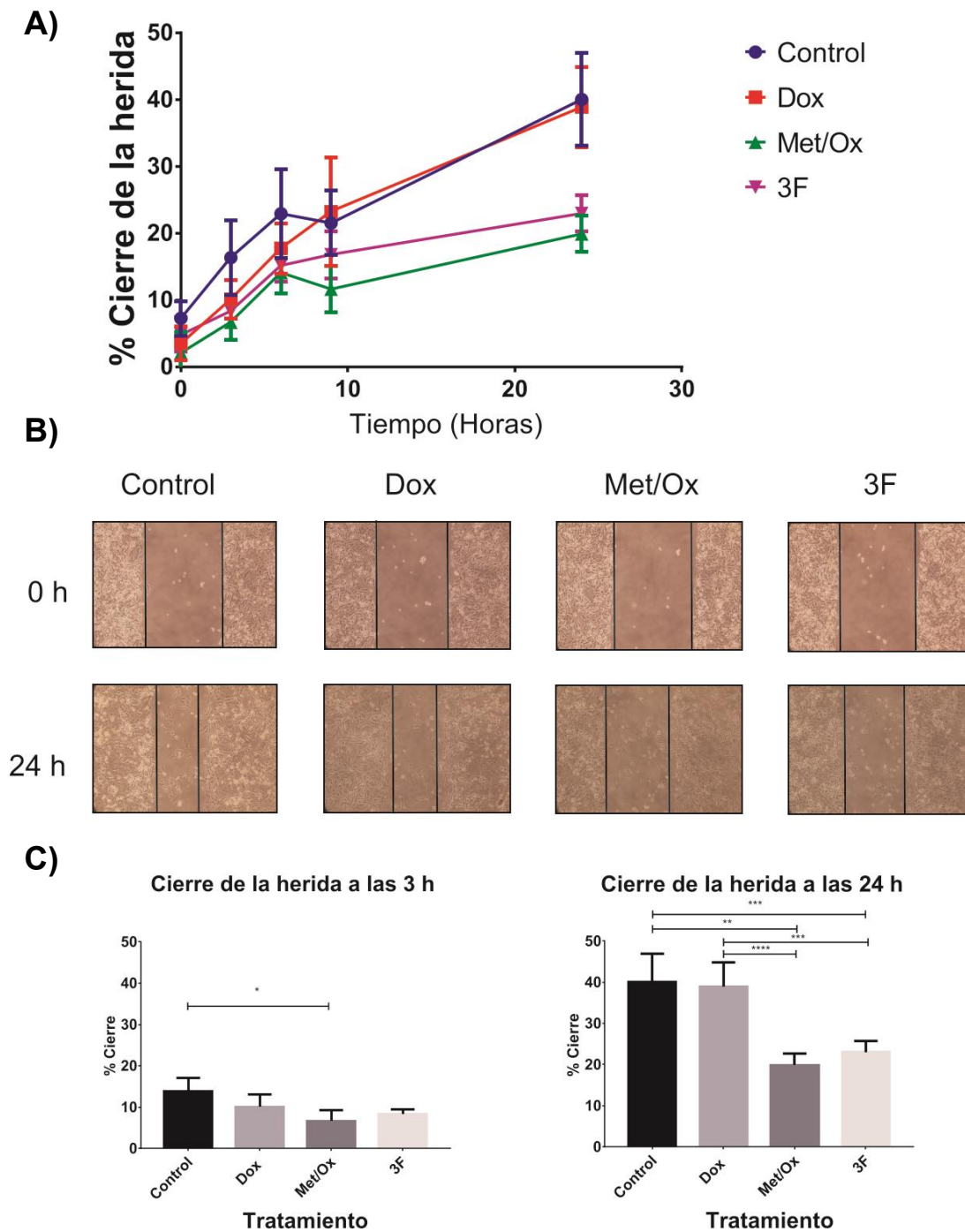


Figura 4. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea SW620. A) Comparación del porcentaje de cierre de la herida entre los tratamientos Control, Dox, Met/Ox y 3F desde el inicio del tratamiento a las 24 horas de término del mismo. B) Fotografías representativas del cierre de la herida en los tratamientos correspondientes. 40x. C) Porcentaje de cierre de la herida a las 3 y 24 horas de monitoreo. *, $P > 0.05$.

7.1.2 Cáncer de mama

Para comprobar el efecto anti migratorio de la triple terapia en distintos tipos de cáncer, se prosiguió a realizar ensayos de reparación de heridas en las líneas celulares BT20 y MDA-MD-231, de cáncer de mama. Ambas mostraron actividad anti migratoria, sin embargo, la sensibilidad y efectividad del tratamiento fue diferente entre estas.

De manera similar a lo observado en la línea de cáncer de colon HCT116, las células de la línea BT20 de los grupos Control y Dox también mostraron cambios en su morfología a las primeras horas de tratamiento; es decir, se mostraron elongadas y con aparentes invadopodios orientados hacia el área de la herida. Sin embargo, este cambio fue mucho más evidente a partir de las 9 horas de exposición al tratamiento, ya que una mayor proporción de las células adyacentes al área de la herida mostró dicho fenotipo. Una proporción muy pequeña de las células correspondientes a los grupos Met/Ox y 3F mostraron características de un fenotipo en migración; este fenómeno también fue observado después de las 9 horas. En cuanto al cierre de la herida (Ver Figura 5), el grupo Dox superó significativamente al grupo Control en su actividad migratoria al cabo de 24 horas, sugiriendo un posible efecto pro migratorio inducido por el fármaco. Por otro lado, las células correspondientes al grupo Met/Ox presentaron mayor sensibilidad a este tratamiento, puesto que desde las 3 horas de exposición se observó un aumento significativo en el tamaño de la herida inicial y a las 24 horas posteriores, no se mostró mayor actividad migratoria. Ello fue atribuido a la muerte celular asociada con el efecto citotóxico al tratamiento. Sorpresivamente, el grupo 3F no mostró indicios de muerte celular a las primeras horas de tratamiento, pero sí una disminución de la actividad migratoria en comparación con los grupos Control y Dox.

En la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, de manera similar a las líneas antes mencionadas, los grupos Control y Dox mostraron un fenotipo migratorio al cabo de tres horas de exposición al tratamiento así como una mayor actividad migratoria, en porcentaje de cierre de la herida, en comparación con los grupos Met/Ox y 3F (Ver figura 6). En estos últimos las células con características migratorias fueron menos evidentes. El porcentaje de cierre de la herida aumentó progresivamente durante las 24 horas en los grupos Control y Dox, alcanzando un porcentaje cercano al 40%, sin que se encontraran diferencias significativas entre ambos; no así los grupos Met/Ox y 3F, cuya actividad migratoria fue discreta con un porcentaje de cierre de 15% aproximadamente. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de cierre de los grupos Met/Ox y 3F, pero su actividad migratoria sí fue significativamente menor al compararse con los grupos Control y Dox. Por lo tanto, puede inferirse que en la línea MDA-MB-231, el tratamiento con Dox no tiene ningún efecto en la actividad migratoria, pero las combinaciones Met/Ox y 3F tienen la misma efectividad en la inhibición de la migración.

Migración durante 24 h en células BT20

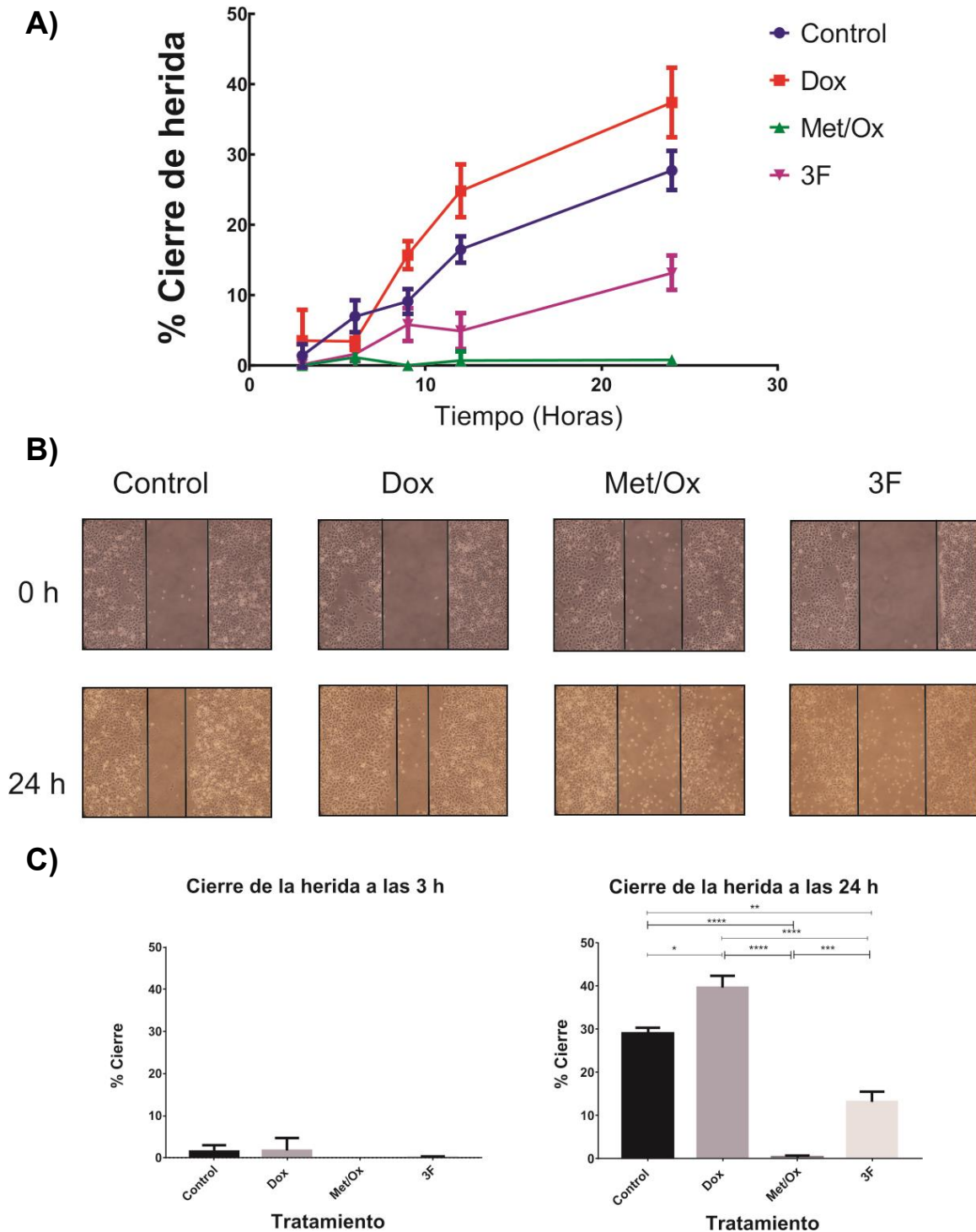


Figura 5. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea BT20. A) Comparación del porcentaje de cierre de la herida entre los tratamientos Control, Dox, Met/Ox y 3F desde el inicio del tratamiento a las 24 horas de término del mismo. B) Fotografías representativas del cierre de la herida en los tratamientos correspondientes. 40x. C) Porcentaje de cierre de la herida a las 3 y 24 horas de monitoreo. *, $P > 0.05$.

Migración durante 24 h en células MDA-MB-231

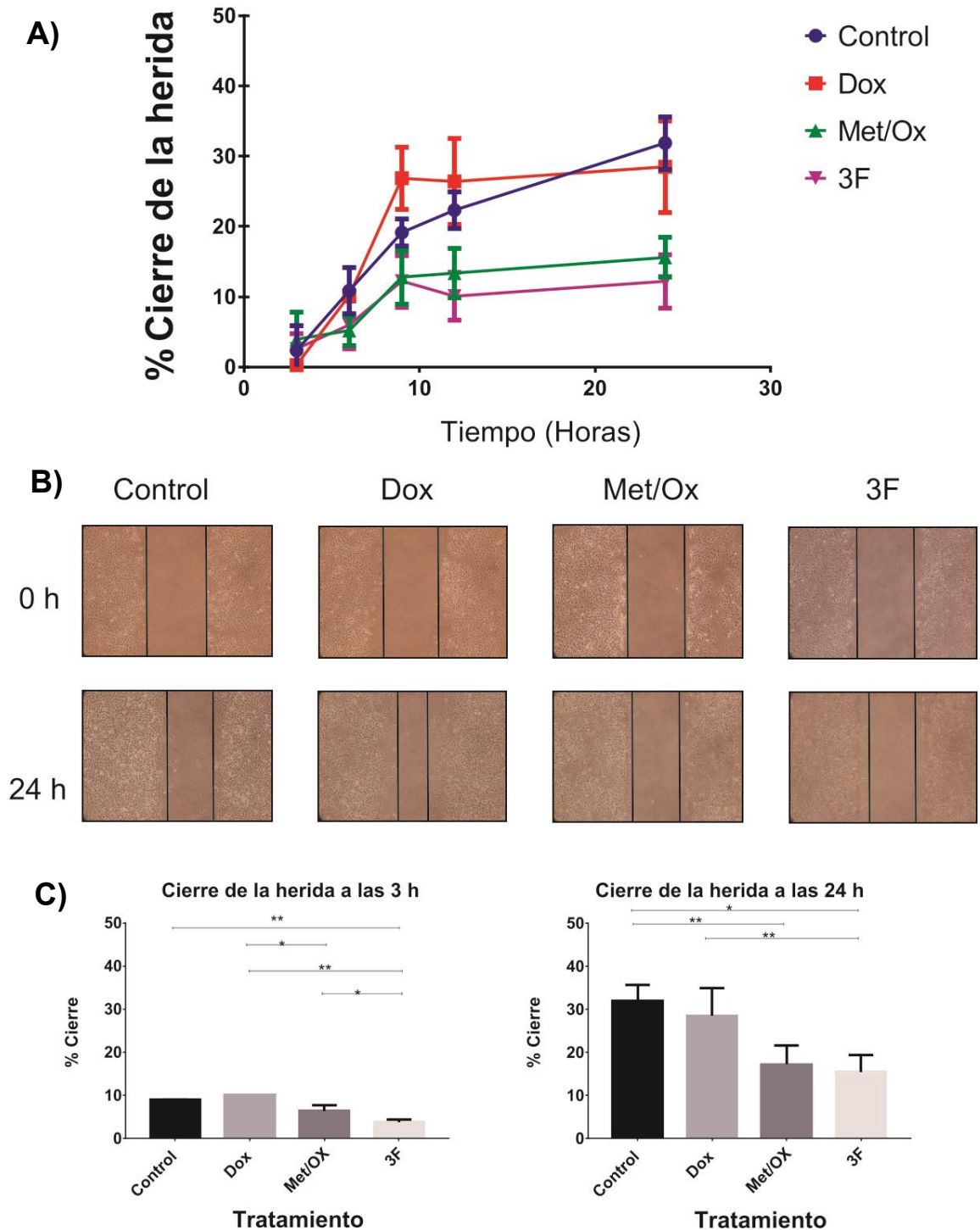


Figura 6. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea MDA-MB-231. A) Comparación del porcentaje de cierre de la herida entre los tratamientos Control, Dox, Met/Ox y 3F desde el inicio del tratamiento a las 24 horas de término del mismo. B) Fotografías representativas del cierre de la herida en los tratamientos correspondientes. 40x. C) Porcentaje de cierre de la herida a las 3 y 24 horas de monitoreo. *, $P > 0.05$.

7.1.3 Cáncer de cérvix

Siguiendo con los propósitos planteados, se prosiguió a evaluar el efecto anti migratorio también en células de cáncer de cérvix. La línea celular SiHa mostró la menor actividad migratoria en comparación con todos los tipos celulares evaluados, incluyendo los tipos de cáncer de mama y colon. Al examinar el fenotipo de las células de todos los grupos, luego de varias horas posteriores a la administración de sus respectivos tratamientos, no se detectaron los cambios indicativos a la actividad migratoria que previamente fueron mencionados. De manera congruente con ello, el porcentaje de cierre de la herida fue el menor reportado en las líneas celulares, tanto en los grupos Control y Dox, como en Met/Ox y 3F (Figura 7). Asimismo, no se mostraron cambios significativos en el porcentaje de cierre de la herida entre los grupos experimentales, durante las primeras 12 horas. Al cabo de 24 horas de tratamiento, los grupos Control y Dox mostraron actividad migratoria moderada, puesto que su porcentaje de cierre fue menor al 20%. Los grupos Met/Ox y 3F mantuvieron un porcentaje de cierre cercano al 5%, significativamente menor al grupo Control. El grupo Dox sólo mostró diferencias con el grupo 3F; mientras que los grupos 3F y Met/Ox no mostraron diferencias entre ellos. Ello sugiere que, pese a que esta línea celular mostró una actividad migratoria muy baja al término de las 24 horas, las combinaciones de fármacos inhibieron dicha actividad.

Por otra parte, la línea celular Caski, también de cáncer de cérvix derivada de un sitio metastásico, mostró una mayor actividad migratoria en comparación con la línea celular SiHa (Figura 8). Al cabo de tres horas de exposición al tratamiento, las células correspondientes a los grupos Control y Dox mostraron una actividad migratoria notoria, al polarizarse y avanzar hacia la herida. Esta actividad migratoria se acentuó durante las horas posteriores en los grupos mencionados, ya que a diferencia de las líneas celulares previamente descritas, las células Caski migraron en grupos y no de manera individual. Mientras tanto, los grupos Met/Ox no presentaron ningún fenotipo distinguible asociado a migración durante las primeras horas de exposición al tratamiento, pero sí fue observable un cambio de morfología asociado al efecto citotóxico de los tratamientos. Al cabo de 6 horas, el porcentaje de cierre de la herida presentó diferencias significativas entre los grupos Met/Ox y 3F con respecto a Dox, grupo que, cabe destacar, presentó el mayor porcentaje de cierre de la herida durante las 24 horas de monitoreo. Pese a que los grupos Met/Ox y 3F mostraron una actividad migratoria discreta durante las primeras horas, luego de 12 horas de exposición a los tratamientos el efecto citotóxico de los mismos fue notorio, puesto que hubo una regresión en el área de la herida asociado a la muerte celular. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de cierre de herida entre Met/Ox y 3F hasta las 12 horas. Sin embargo, de manera similar a la línea tumoral de cáncer de mama BT20, las células Caski mostraron una mayor sensibilidad al tratamiento Met/Ox, luego de 24 horas, ya que la monocapa de cultivo se desprendió por completo, sin que quedara vestigio de las heridas para analizar. El grupo 3F también mostró muerte celular luego de 24 horas, sin embargo, los efectos no fueron tan contundentes con comparación con Met/Ox.

Migración durante 24 h en células SiHa

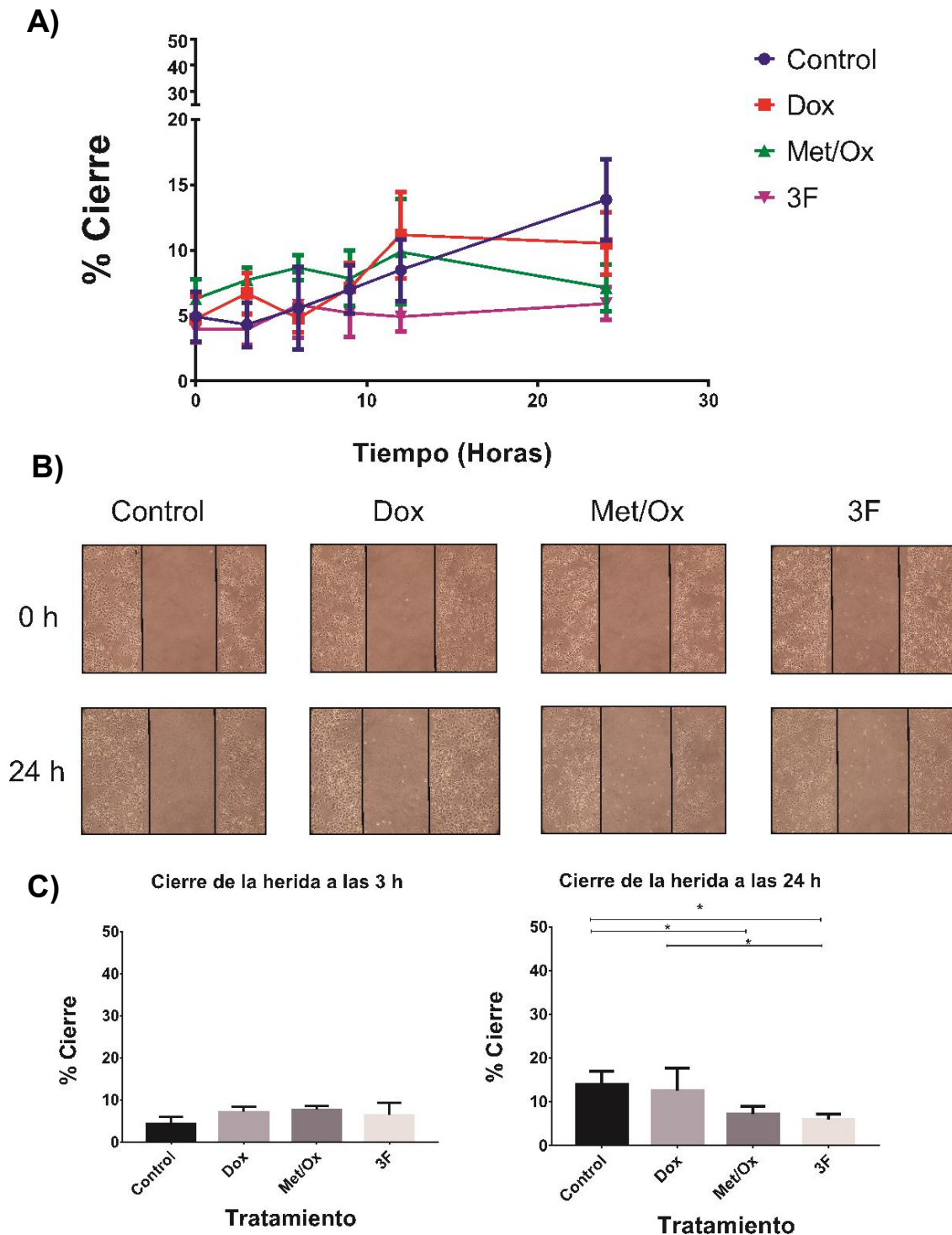


Figura 7. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea SiHa. A) Comparación del porcentaje de cierre de la herida entre los tratamientos Control, Dox, Met/Ox y 3F desde el inicio del tratamiento a las 24 horas de término del mismo. B) Fotografías representativas del cierre de la herida en los tratamientos correspondientes. 40x. C) Porcentaje de cierre de la herida a las 3 y 24 horas de monitoreo. *, $P > 0.05$.

Migración durante 24 h en células Caski

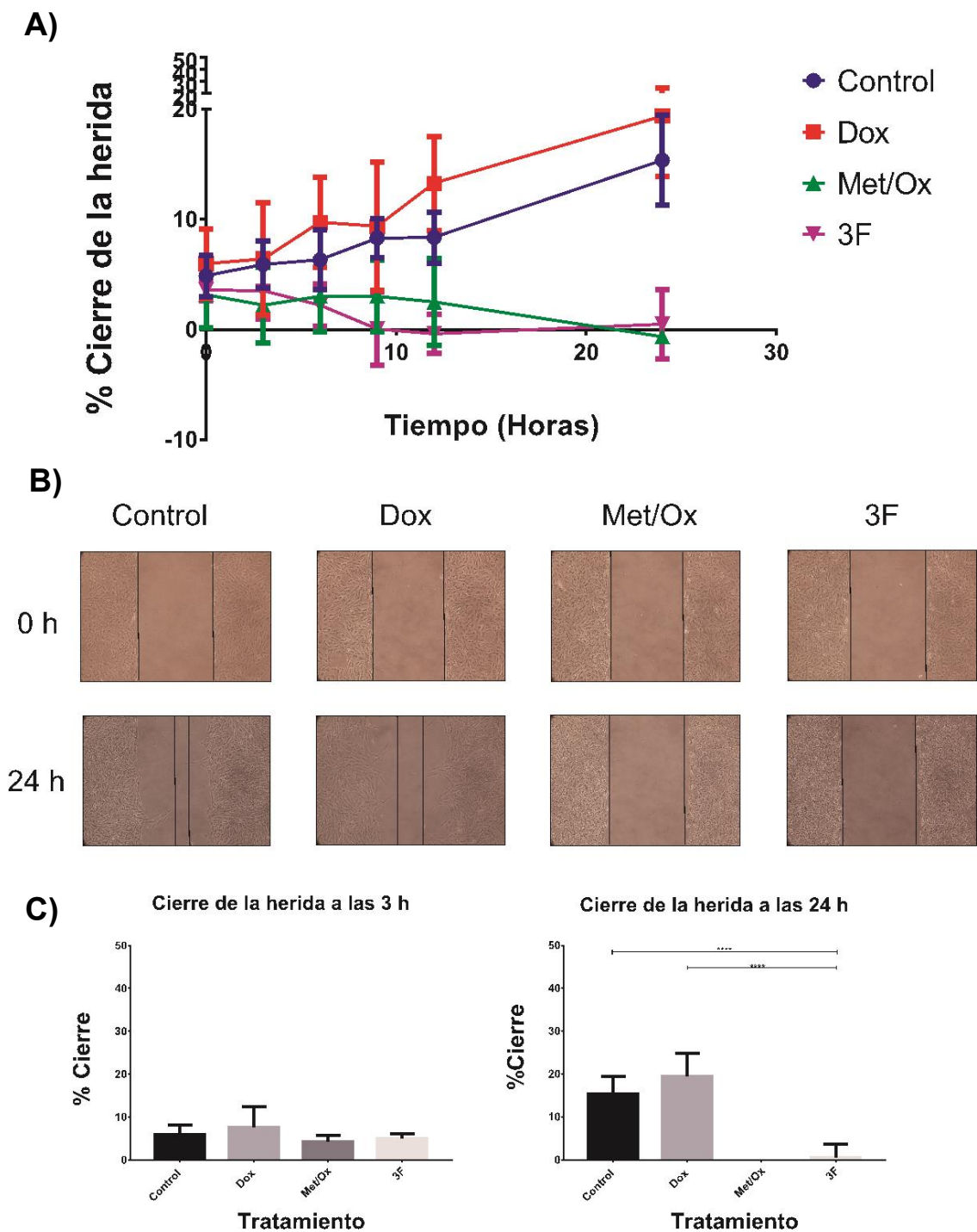


Figura 8. Porcentaje de cierre de la herida con los respectivos tratamientos, en la línea Caski. A) Comparación del porcentaje de cierre de la herida entre los tratamientos Control, Dox, Met/Ox y 3F desde el inicio del tratamiento a las 24 horas de término del mismo. B) Fotografías representativas del cierre de la herida en los tratamientos correspondientes. 40x. C) Porcentaje de cierre de la herida a las 3 y 24 horas de monitoreo.

7.2 Ensayos de proliferación en tiempo real.

Para confirmar que los resultados en los ensayos de cierre de la herida eran debido a la migración de las células y no a su proliferación, se realizaron ensayos de proliferación en tiempo real durante 24 horas. Estos ensayos se llevaron a cabo con el equipo xCELLigence y el software RTCA; los resultados fueron graficados como “índice celular”, que es un valor arbitrario que aumenta en función al número de células detectadas por los biosensores de las placas E-plate. La tendencia observada en los datos de los tratamientos correspondientes fue similar en todas las líneas celulares evaluadas (Figura 9).

Las células de cáncer de colon HCT116 de los grupos Control y Dox presentaron un índice celular que aumentó progresivamente durante las 24 horas de tratamiento; sin embargo, la tendencia a este aumento fue mayor en el grupo Control que en el grupo Dox. Mientras tanto, el índice celular de los grupos Met/Ox y 3F fue significativamente más bajo que el Control; ambas curvas mantuvieron un comportamiento muy similar hasta la finalización del experimento sugiriendo, por lo tanto, que se presentaron pocos cambios en el número de células y baja proliferación (ver Figura 9A). La línea celular metastásica, SW620, tuvo un comportamiento muy semejante; mientras que los tratamientos Control y Dox mostraron mayor actividad proliferativa, el índice celular de los grupos Met/Ox y 3F fue menor en comparación, durante las 24 horas de evaluación. Por su parte, también se mostraron diferencias entre el grupo Control y Dox; debido a que el segundo presenta una aumento significativo en la actividad proliferativa en comparación con el control, después de las primeras 10 horas de exposición al mismo. Asimismo, también se encontraron diferencias significativas entre los grupos Met/Ox y 3F, lo cual sugiere que la terapia Met/Ox por sí misma es más eficiente en la disminución de la proliferación en esta línea celular.

Las células de cáncer de mama BT20 y MDA-MB-231 también mostraron una disminución en la proliferación con los tratamientos Met/Ox y 3F. En el caso particular de BT20, las células correspondientes a los grupos Control y Dox mostraron una actividad proliferativa exponencial, puesto que las fases de crecimiento logarítmico y de confluencia se alcanza dentro de las primeras 12 horas, seguido por la fase de muerte celular, en la que las células perdieron sus adhesiones a la placa, disminuyendo con ello el índice celular. No se encontraron diferencias en las curvas de proliferación de los grupos Control y Dox. Por otro lado, los grupos Met/Ox mostraron actividad proliferativa discreta entre las primeras 10 horas, la cual fue en declive también en las horas posteriores. Las curvas de proliferación de estos grupos también fueron muy similares, sugiriendo que ambas terapias tienen un efecto anti proliferativo en esta línea celular. La línea celular MDA-MB-231 mostró menor actividad proliferativa en comparación con BT20, puesto que la fase de crecimiento logarítmico se alcanza después de las 12 horas. Las curvas de proliferación de los grupos Control y Dox mantuvieron un aumento progresivo típico de la fase de crecimiento logarítmico en el índice celular durante las primeras 10 horas; posteriormente, la curva de Dox disminuyó su tendencia al aumento en comparación con el grupo Control. El grupo Met/Ox, por otro lado, presentó un índice celular que fue aumentando moderadamente con relación al tiempo, hasta casi equipararse a la tendencia de Dox. Sin embargo, el tratamiento 3F tuvo un efecto en la inhibición de la proliferación, puesto que el índice celular que aumentó discretamente durante las primeras horas, decayó hasta cero al cabo de 10 horas, demostrando con ello la inhibición total de la

proliferación. Esto nos indica que, en la línea celular MDA-MB-231 únicamente el tratamiento 3F tiene un efecto anti proliferativo.

En la línea de cáncer de cérvix, SiHa, los índices celulares de los grupos Control y Dox presentaron un aumento progresivo durante las 24 horas de monitoreo, mostrando curvas muy similares entre ambos grupos. Sin embargo, de manera consistente con los resultados obtenidos en las otras líneas celulares, en los tratamientos Met/Ox y 3F observamos un efecto anti proliferativo al cabo de 24 horas. Pese a que se presenta un aumento moderado en el índice celular durante las primeras horas de monitoreo, en menos de 10 horas sus respectivas curvas alcanzaron una asíntota que se mantuvo constante hasta las 24 horas, con un índice celular menor a los tratamientos Control y Dox. Por otra parte, la línea celular Caski no mostró diferencias en el índice celular de los grupos Control y Dox, cuyas curvas de proliferación mostraron también un aumento constante durante las 24 horas de monitoreo. Mientras tanto, el grupo Met/Ox presentó un índice celular bastante menor a los grupos antes mencionados, que fue decreciendo paulatinamente a lo largo del tiempo de monitoreo. Sorpresivamente, el índice celular con el tratamiento 3F fue bastante discreto y no presentó cambios en las 24 horas del ensayo.

Por lo tanto, los ensayos de proliferación en tiempo real nos sugieren que, aunque los efectos pueden ser heterogéneos en las distintas líneas celulares hablando de sensibilidad y efectividad a los mismos, los tratamientos Met/Ox y 3F tienen un efecto anti proliferativo en las líneas celulares evaluadas.

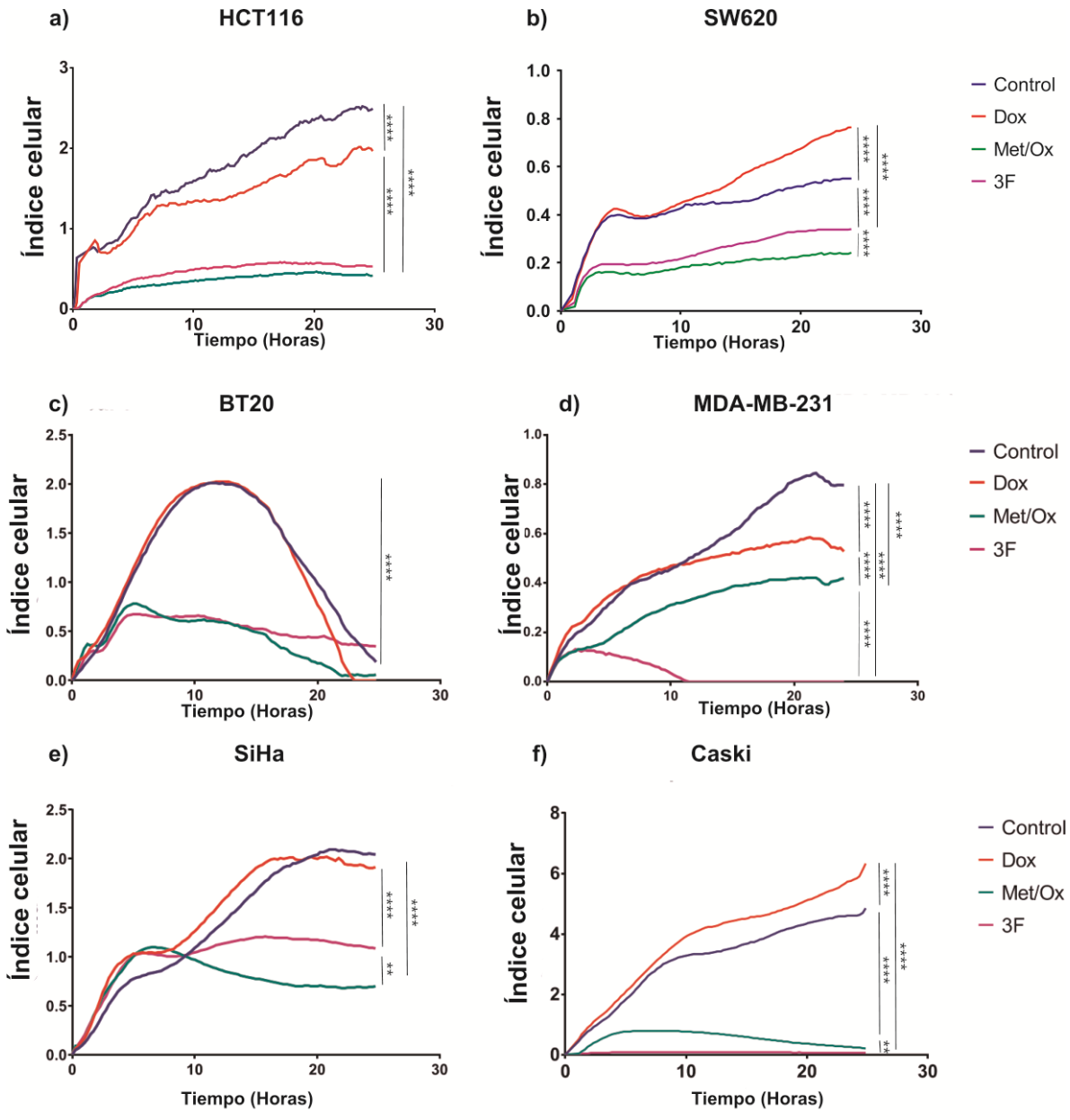


Figura 9. Proliferación en tiempo real con xCELLigence. Los ensayos de proliferación fueron monitoreados durante 24 horas, en presencia de los tratamientos previamente mencionados. En las líneas celulares HCT116(A), SW620 (B), BT20 (C), MDA-MB-231 (D), SiHa (E) y SW620 (F) se mostraron curvas con una disminución significativa de la proliferación en respuesta a las combinaciones Met/Ox y 3F. El efecto de estos últimos fue similar en la mayoría de las líneas celulares evaluadas. Es importante resaltar que el índice celular es una medida arbitraria resultado del algoritmo $(R_n - R_b)/15$, y es sensible a la morfología de cada célula, por lo que la escala obtenida resulta poco comparable entre líneas celulares. *, $P < 0.5$.

7.3 Ensayos de migración en tiempo real

Finalmente y dados los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación en tiempo real, quisimos verificar y discernir si los tratamientos resultan eficaces en inhibir también la migración de las células, como lo sugieren los ensayos de reparación de herida, y no sólo la proliferación. Por ello, se llevaron a cabo ensayos de invasión en tiempo real también con el equipo xCELLigence apoyado con el software RTCA.

Para las líneas celulares de cáncer de colon, únicamente se logró realizar el ensayo de migración en tiempo real con la línea celular metastásica SW620, ya que la línea HCT115 presentó numerosas irregularidades y discrepancias en comparación con los ensayos previamente mencionados e incluso, con la realización del ensayo en repetidas ocasiones. Por tal motivo, dicho resultado fue excluido de esta tesis, pero las consideraciones serán mencionadas en la discusión. Respecto a la línea celular SW620, los índices celulares registrados muestran un efecto importante de la triple terapia, puesto que es el tratamiento que tiene el mayor efecto en la inhibición de la migración. Sorpresivamente y en contraposición con lo previamente citado en esta tesis, el grupo Dox presentó menor actividad migratoria que el tratamiento Met/Ox, el cual no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Control. Los resultados sugieren que el tratamiento con Doxorubicina y 3F tienen mayor efectividad en impedir la migración de esta línea celular en particular.

Por otra parte y de acuerdo con los índices celulares registrados (Figura 10), los resultados para las líneas celulares de cáncer de mama, BT20 y MDA-MB-231; coinciden con lo previamente descrito con los ensayos de reparación de herida, los tratamientos Met/Ox y 3F muestran un efecto inhibitorio similar en la migración de las células monitoreada durante 24 horas. Particularmente BT20 no presenta ningún cambio en su índice celular durante las 24 horas con el tratamiento Met/Ox, mientras que el tratamiento con 3F muestra cambios discretos, que difieren de los grupos Control y Dox, cuyas curvas de migración tienen un aumento exponencial a partir de las 20 horas. En MDA-MB-231, las curvas de los grupos Met/Ox y 3F se sobrelapan a lo largo de las 24 horas de monitoreo, indicando que ambos tratamientos podrían tener el mismo efecto en la inhibición de la migración. Por otro lado, el grupo Dox también presenta una menor actividad migratoria que el grupo Control, dicho efecto no fue observado en los ensayos de reparación de herida, lo cual nos podría indicar la alta sensibilidad del equipo xCELLigence para determinar el comportamiento e interacción de las células con los biosensores de la placa CIM-plate.

Por su parte, la línea celular SiHa, de cáncer de cérvix no metastásica también mostró una disminución en la migración con los tratamientos Met/Ox y 3F, cuyas curvas se sobrelaparon en el tiempo, indicando que el efecto inhibitorio de la migración es indistinto de la presencia o ausencia de Doxorubicina en los grupos con Metformina y Oxamato de sodio (Figura 10, c). En contraste, el índice celular del grupo Dox fue incluso mayor que el grupo Control en estas células, lo que podría sugerir que este fármaco podría promover la migración de las células. La línea celular Caski, la cual es una línea metastásica procedente de cérvix, respondió mejor a la triple terapia, puesto que el grupo 3F presentó un menor índice celular que el resto de los grupos y contrario a lo que se observó en los ensayos de scratch, el grupo Met/Ox no parece haber sido tan eficaz como 3F en la migración de estas células (Figura 10,d).

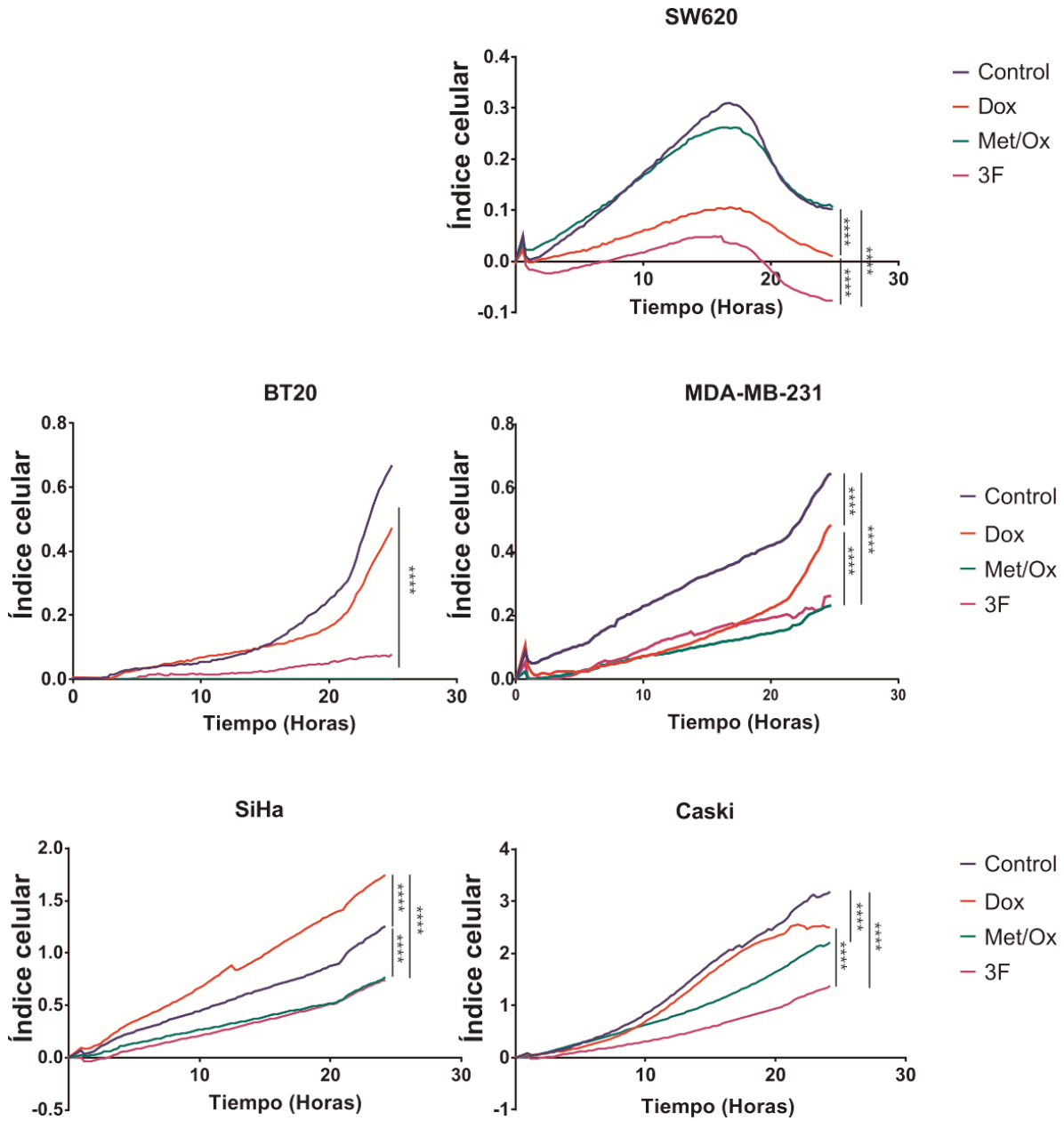


Figura 10. Ensayos de migración en tiempo real. Los ensayos de migración fueron monitoreados durante 24 horas, en presencia de los tratamientos previamente mencionados. Las líneas celulares MDA-MB-231 y SiHa presentaron un efecto similar con relación al efecto de los distintos tratamientos; ambos mostraron un menor índice celular en respuesta a las terapias Met/Ox y 3F durante las 24 horas de seguimiento. Mientras que las líneas celulares SW620 Caski mostró el menor índice celular únicamente con el tratamiento 3F. Es importante resaltar que el índice celular es una medida arbitraria resultado del algoritmo $(Rn-Rb)/15$, y es sensible a la morfología de cada célula, por lo que la escala obtenida resulta poco comparable entre líneas celulares. $P < 0.5$

8. Discusión

Los ensayos de reparación de herida, proliferación y migración en tiempo real mostraron que la triple terapia 3F presenta un efecto positivo en la inhibición de la proliferación y migración en las líneas celulares de cáncer de colon, mama y cérvix. Dicho efecto, sin embargo, es heterogéneo en las líneas celulares y en la mayoría de las mismas se observa que Met/Ox tiene efectos muy similares a 3F.

En primera instancia, ambas líneas de cáncer de colon mostraron efectos antiproliferativos en presencia de las terapias Met/Ox y 3F. En la línea celular HCT116, los tratamientos Met/Ox y 3F fueron eficientes en la inhibición de la proliferación, corroborando los resultados previamente reportados por Figueroa en su modelo *in vivo* (Figueroa-González et al. 2016). Ello podría sugerir que el cierre de la herida en los grupos Control y Dox es mayor debido a la proliferación, mientras que en los grupos Met/Ox y 3F, cuya actividad proliferativa se ve inhibida, el cierre también es menor. Los ensayos de migración en esta línea celular no se concretaron debido a vicisitudes durante el desarrollo y ejecución de dicho ensayo. Las inconsistencias de estos ensayos podrían deberse al propio fenotipo no metastásico de la línea celular; las células HCT116 crecen en monocapa y establecen uniones entre ellas mediadas por E-cadherina (El-Bahrawy et al. 2004), además de ser negativas a la expresión de vimentina, por lo que su motilidad es bastante más reducida que el resto de las líneas celulares evaluadas y de ser así, no se observarían cambios entre ninguno de los grupos comparativos. Por otra parte, la línea celular metastásica SW620 mostró la misma respuesta a los fármacos con relación a la proliferación; los grupos Control y Dox no presentaron diferencias entre ellos, mientras que Met/Ox y 3F inhibieron la proliferación durante las 24 horas del ensayo. Ello también correlaciona con el ensayo de cierre de la herida, en el que se observaron resultados similares. Sin embargo, el ensayo de migración en tiempo real sugiere que las terapias que parecen inhibir la motilidad de las células son 3F y Dox, siendo el primero más efectivo, mientras que el grupo Met/Ox no mostró diferencias significativas en comparación con el control. Estos resultados parecen sugerir que la línea celular SW620 presenta una mayor sensibilidad a la doxorrubicina que el resto de las líneas celulares de colon, mama y cérvix empleadas en estos ensayos. Estos resultados se contraponen con previos reportes que indican que la doxorrubicina incrementa la expresión de integrina αV , la fosforilación de FAK, Src y Akt, asociadas al fenotipo metastásico, además de favorecer la transición epitelio-mesénquima y la formación de lamelopodios que promueven la migración en otros tipos de cáncer (Zhong et al. 2017; Amalina, Nurhayati, y Meiyanto 2017). Sin embargo, también se ha demostrado que la doxorrubicina tiene efectos antimigratorios a bajas concentraciones, siendo capaz de inhibir la fosforilación de la GTPasa RhoA involucrada en la reorganización de los filamentos de actina en fibrosarcoma (Said et al. 2012). La disparidad sugiere que doxorrubicina podría tener ambos efectos en función de la concentración y la línea celular. De manera que, al tratar esta línea celular con la triple terapia, hay un efecto acentuado en la inhibición de la migración, lo que podría sugerir un efecto sinérgico entre los tres fármacos.

En el grupo control de las líneas celulares de cáncer de mama, ambas con fenotipo triple negativo, BT20 presentó una actividad proliferativa mucho mayor que MDA-MB-231. El grupo tratado con Dox no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo control ante la exposición al fármaco en ninguna de las líneas celulares, por lo que podemos inferir que este fármaco no tiene ningún efecto

antiproliferativo ni inhibitorio en la migración en las líneas celulares evaluadas. Mientras tanto, las líneas celulares mostraron una menor actividad migratoria en respuesta a la terapia Met/Ox y/o 3F, efecto que parece más acentuado en la línea celular BT20. Dicha línea celular, no metastásica, presenta un fenotipo con bajas capacidades mótilas, puesto que se ha reportado que mantiene la expresión de E-cadherina, queratina y una morfología de célula epitelial. Por su parte, MDA-MB-231, derivada de un sitio metastásico, presenta N-cadherina, vimentina y morfología tipo fibroblasto, características asociadas a células del tipo transición epitelio-mesénquima y por lo tanto, más mótilas (Sommers et al. 1994; Nieman et al. 1999). Dichas diferencias en el fenotipo de las líneas de cáncer de mama triple negativo podrían explicar en la eficacia en la inhibición de la migración en BT20 en respuesta a 3F y particularmente a Met/Ox, cuyo efecto fue mucho más acentuado que en MDA-MB-231 tanto en los ensayos de cierre de la herida como en los ensayos de tiempo real.

Respecto a las líneas de cáncer de cérvix, el efecto de los tratamientos Met/Ox y 3F fue similar al de las líneas celulares previamente descritas. Por su parte, el tratamiento Dox tampoco mostró diferencias en comparación con el grupo control en el cierre de la herida, migración y proliferación en estas líneas celulares. La línea celular SiHa mostró baja actividad migratoria en los ensayos de cierre de la herida, sin embargo, los ensayos en tiempo real demostraron que dicha actividad también se ve reducida en presencia de los tratamientos Met/Ox y 3F, los cuales no mostraron ninguna diferencia en la eficiencia de la inhibición. Asimismo, la proliferación en estas células también se ve comprometida con los tratamientos Met/Ox y 3F, dado que la fase de confluencia del grupo Met/Ox parece mostrar una disminución del índice celular, se podría sugerir que dicho tratamiento presenta un efecto incluso más citotóxico en estas células que el 3F. Por otra parte, la línea celular Caski también mostró menor actividad migratoria en los ensayos de cierre de la herida que, nuevamente, fueron validados mediante los ensayos de migración y proliferación en tiempo real. Si bien la proliferación se vio reducida en presencia de Met/Ox y 3F, sólo la migración con el tratamiento 3F es significativamente menor al control. La eficacia con la que actúa cada tratamiento en la inhibición de las capacidades mótilas de ambas líneas celulares puede estar dada por la expresión de E-cadherina; el fenotipo de SiHa corresponde a una línea no metastásica con baja expresión de E-cadherina a nivel de proteína, en contraste con la línea Caski, que procede de un sitio metastásico y no expresa E-cadherina (Denk, Hülsken, y Schwarz 1997). La diferencia en la expresión de dicha molécula de adhesión podría jugar un papel importante en el efecto inhibitorio que presentan las terapias Met/Ox y 3F en ambas líneas, además de otras características mótilas inherentes al fenotipo de cada una, como la expresión de vimentina y sobreexpresión de Snail, descritas en carcinomas in situ (Myong 2012).

Dado que se ha comprobado que la pérdida de E-cadherina y la expresión de vimentina son importantes para la adquisición de características mótilas que permitan la migración, y debido a que la migración se ve disminuida en presencia de Met/Ox y 3F, es factible sugerir que ambas terapias actúan mediante la inhibición de características asociadas al fenotipo de la transición epitelio-mesénquima, que presenta vimentina y no E-cadherina. Salgado, R. en su tesis de maestría, demostró que la triple terapia inhibe la actividad de la vías PI3K/Akt y mTOR y la expresión de HIF-1 desde las 12 horas de exposición al tratamiento, en células de cáncer colorrectal (Salgado, R. 2016).

Previamente se ha descrito el papel que juegan dichas proteínas en la reorganización del citoesqueleto y la migración celular. Por ejemplo, se ha propuesto que la inhibición de la vía PI3K/Akt disminuye la invasión y la migración en líneas celulares de cáncer nasofaríngeo y hepatocarcinoma, principalmente a través de la inhibición de mTOR y la disminución de la MMP-9 (Saxena et al. 2007; Changyu Sun et al. 2017; Li et al. 2017). Asimismo, el complejo mTOR juega un papel importante en la transición epitelio-mesénquima, puesto que la activación de uno de sus blancos, S6K, está ligada a la traducción de N-cadherina y vimentina. Además, se ha demostrado que S6K también promueve la actividad del factor de transcripción Snail, un importante represor de E-cadherina. De modo que, la sobre expresión de S6K conduce a un aumento en las capacidades mótils de la célula, como la pérdida de uniones celulares, despolarización y desdiferenciación de las células (Pon et al. 2008). Por ello, se ha demostrado que la inactivación de mTOR puede inhibir algunos de las características propias de fenotipo de la transición epitelio mesénquima (Zhou y Huang, 2011).

Como se mencionó previamente, la triple terapia también inhibe la expresión de HIF-1, factor de transcripción que esta involucrado en la expresión de genes de la transición epitelio-mesénquima, tales como vimentina, fibronectina, queratinas 14, 18 y 19, MMP-2, catepsina y el receptor de quimiocinas CXCR4 (Pouysségur, Dayan, y Mazure 2006). Además, HIF-1 inhibe la expresión de E-cadherina mediante la activación del eje HIF-1/LOX/Snail, que es un represor de la transcripción de E-cadherina (Schietke et al. 2010). Por ello, se podría sugerir que el efecto antimigratorio en las distintas líneas celulares puede estar dado por la inhibición farmacológica de PI3K/Akt, mTOR o HIF-1, como candidatos principales pausibles.

Sin embargo, la terapia Met/Ox mostró el mismo efecto en la inhibición de la migración que 3F en la mayoría de las líneas celulares evaluadas, aun cuando Salgado (2016) mostró que dicha terapia actúa inhibiendo a Akt, mTOR y S6K hasta las 24 horas de tratamiento en líneas de cáncer colorrectal. Aunque el efecto inhibitorio de Met/Ox sobre las vías mencionadas puede variar entre las líneas celulares, también se sugiere que sean metformina y oxamato de sodio los que desempeñen el papel principal en los tratamientos Met/Ox y 3F, mediante vías que no han sido evaluadas previamente por nuestro grupo de trabajo. Por ejemplo, Jang y colaboradores demostraron que metformina es capaz de disminuir la migración e invasión de células de cáncer de mama a través de la inhibición transcripcional de MMP-9, mediante los factores de transcripción AP1 o NFκB (Jang et al. 2014). Por otro lado, Yu y sus colaboradores describieron la actividad de la metil-transferasa de histonas, SUV39H1, en la migración mediada por la autofosforilación FAK y las integrinas α V y β 1, cuyo mecanismo aún falta por elucidar. Ellos también sugieren que metformina es capaz de modular la actividad de SUV39H1 e inhibir la migración (Yu et al. 2017). Adicionalmente, se ha propuesto que la metformina también podría promover la adherencia y polaridad de la célula a través de la activación de la cinasa LKB1 y sus blancos, como AMPK y cdc42, proteínas implicadas en la polaridad celular; o la inhibición de las proteínas src-FAK y MLC2, implicadas en la motilidad, la reorganización de las adhesiones celulares y por lo tanto, en la migración celular (Marcus y Zhou 2010). De este modo, es importante determinar si la metformina es el principal efector en la inhibición de la motilidad celular, para luego elucidar los mecanismos sobre los cuales actúa, en virtud de describir el fenómeno observado en presencia de las terapias Met/Ox y 3F.

Asimismo, no hay que descartar la labor que cumple el oxamato de sodio, puesto que, como inhibidor de la enzima lactato deshidrogenasa, impide la liberación de lactato al microambiente. El lactato se ha visto también involucrado en el aumento de la motilidad celular de manera independiente de los cambios de pH, puesto que en células de cáncer de laringe, la liberación de este producto aumenta la expresión de integrina $\beta 1$, molécula que mantiene la comunicación con la matriz extracelular y cuya expresión está asociada a una peor prognosis en distintos tipos de cáncer (Goetze 2011). Por otra parte, Baumann y sus colaboradores demostraron que, tanto el lactato como la enzima LDH-A, inducen la expresión y actividad de TGF- $\beta 2$, que a su vez, promueve la expresión de MMP-2 y de las integrinas $\alpha v\beta 3$, de manera que la inhibición de LDH-A es capaz de disminuir la migración en células de glioma (Baumann et al. 2009). Por ello, es posible sugerir que la inhibición de LDH por el oxamato de sodio coadyuve a la metformina en la disminución de la migración mediante mecanismos aún no explorados por nuestro grupo de trabajo.

Las terapias Met/Ox y 3F inhiben la proliferación y migración de las distintas líneas celulares de cáncer de colon, mama y cérvix, de forma heterogénea pero consistente. Es necesario determinar quiénes son los actores principales en la regulación de la migración, pero la vía de PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 es un candidato pausable para su evaluación en respuesta a las terapias propuestas, además de la expresión de integrinas, moléculas de adhesión focal y metaloproteasas de matriz; cuya evaluación nos permitiría identificar a plenitud el mecanismo de acción de los fármacos en la migración de las células tumorales.

9. Conclusiones

En las líneas celulares de cáncer de mama y cérvix, las terapias Met/Ox y 3F disminuyen la proliferación y migración de las células. En las líneas de cáncer de colon, ambos tratamientos disminuyen la proliferación de las células, pero solo 3F favorece la inhibición de la migración en la línea celular SW620.

10. Referencias bibliográficas

- Amalina, Nur, Ika Putri Nurhayati, y Edy Meiyanto. 2017. «Doxorubicin Induces Lamellipodia Formation and Cell Migration». *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* 8 (2): 61. <https://doi.org/10.14499/indonesianjcanchemoprev8iss2pp61-67>.
- Andreoni, Bruno, Antonio Chiappa, Emilio Bertani, Massimo Bellomi, Roberto Orecchia, MariaGiulia Zampino, Nicola Fazio, et al. 2007. «Surgical Outcomes for Colon and Rectal Cancer over a Decade: Results from a Consecutive Monocentric Experience in 902 Unselected Patients». *World Journal of Surgical Oncology*, 10.
- Arcamone, F., G. Cassinelli, G. Franceschi, S. Penco, C. Pol, S. Redaelli, y A. Selva. 1972. «Structure and Physicochemical Properties of Adriamycin (Doxorubicin)». En *International Symposium on Adriamycin*, editado por Stephen K. Carter, A. Di Marco, M. Ghione, I. H. Krakoff, y G. Mathé, 9-22. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-95227-2_2.
- Aziz, S.W., y M.H. Aziz. 2017. «Cervical Cancer Metastasis». En *Introduction to Cancer Metastasis*, 77-94. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804003-4.00005-0>.
- Bogenrieder, Thomas, y Meenhard Herlyn. 2003. «Axis of Evil: Molecular Mechanisms of Cancer Metastasis». *Oncogene* 22 (42): 6524-36. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206757>.
- Bosch, F X, A Lorincz, N Munoz, C J L M Meijer, y K V Shah. 2002. «The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer». *Journal of Clinical Pathology* 55 (4): 244-65. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, y Ahmedin Jemal. 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>.
- Brum, Gabriella, Thomas Carbone, Eric Still, Vendita Correia, Kevin Szulak, David Calianese, Charles Best, et al. 2013. «N-Acetylcysteine Potentiates Doxorubicin-Induced ATM and P53 Activation in Ovarian Cancer Cells». *International Journal of Oncology* 42 (1): 211-18. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1680>.
- Buzzai, Monica, Russell G. Jones, Ravi K. Amaravadi, Julian J. Lum, Ralph J. DeBerardinis, Fangping Zhao, Benoit Viollet, y Craig B. Thompson. 2007. «Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs P53-Deficient Tumor Cell Growth». *Cancer Research* 67 (14): 6745-52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4447>.
- Cavallaro, Ugo, y Gerhard Christofori. 2004. «Cell Adhesion and Signalling by Cadherins and Ig-CAMs in Cancer». *Nature Reviews Cancer* 4 (2): 118-32. <https://doi.org/10.1038/nrc1276>.
- Chaffer, C. L., y R. A. Weinberg. 2011. «A Perspective on Cancer Cell Metastasis». *Science* 331 (6024): 1559-64. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
- Chen, Zhao, Weiqin Lu, Celia Garcia-Prieto, y Peng Huang. 2007. «The Warburg Effect and Its Cancer Therapeutic Implications». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39 (3): 267-74. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9086-x>.
- Cheng, Keyan, y Min Hao. 2016. «Metformin Inhibits TGF-B1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition via PKM2 Relative-MTOR/P70s6k Signaling Pathway in Cervical Carcinoma Cells». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12): 2000. <https://doi.org/10.3390/ijms17122000>.
- Dai, Xiaofeng, Ting Li, Zhonghu Bai, Yankun Yang, Xiuxia Liu, Jinling Zhan, y Bozhi Shi. s. f. «Breast Cancer Intrinsic Subtype Classification, Clinical», 15.

- Denk, Claudia, Jörg Hülsken, y Elisabeth Schwarz. 1997. «Reduced Gene Expression of E-Cadherin and Associated Catenins in Human Cervical Carcinoma Cell Lines». *Cancer Letters* 120 (2): 185-93. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00308-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00308-X).
- Dowling, Catriona M., Carmen Herranz Ors, y Patrick A. Kiely. 2014. «Using Real-Time Impedance-Based Assays to Monitor the Effects of Fibroblast-Derived Media on the Adhesion, Proliferation, Migration and Invasion of Colon Cancer Cells». *Bioscience Reports* 34 (4): 415-27. <https://doi.org/10.1042/BSR20140031>.
- El-Bahrawy, Mona, S. Richard Poulson, Andrew J. Rowan, Ian T. Tomlinson, y Malcolm R. Alison. 2004. «Characterization of the E-Cadherin/Catenin Complex in Colorectal Carcinoma Cell Lines: E-Cadherin/Catenin Complex and Colorectal Carcinoma». *International Journal of Experimental Pathology* 85 (2): 65-74. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2004.0371.x>.
- Evans, Josie M M, Louise A Donnelly, Alistair M Emslie-Smith, Dario R Alessi, y Andrew D Morris. 2005. «Metformin and Reduced Risk of Cancer in Diabetic Patients». *BMJ* 330 (7503): 1304-5. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7>.
- Figueroa-González, Gabriela, Verónica García-Castillo, Jossimar Coronel-Hernández, Eduardo López-Urrutia, Sonia León-Cabrera, Luis E Arias-Romero, Li Terrazas, et al. 2016. «Anti-Inflammatory and Antitumor Activity of a Triple Therapy for a Colitis-Related Colorectal Cancer». *Journal of Cancer* 7 (12): 1632-44. <https://doi.org/10.7150/jca.13123>.
- Foretz, Marc, Bruno Guigas, Luc Bertrand, Michael Pollak, y Benoit Viollet. 2014. «Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies». *Cell Metabolism* 20 (6): 953-66. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>.
- Galiatsatos, Polymnia, y William D. Foulkes. 2006. «Familial Adenomatous Polyposis». *The American Journal of Gastroenterology* 101 (2): 385-98. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00375.x>.
- García-Castillo, Verónica, Eduardo López-Urrutia, Octavio Villanueva-Sánchez, Miguel Á. Ávila-Rodríguez, Alejandro Zentella-Dehesa, Carlo Cortés-González, César López-Camarillo, Nadia J Jacobo-Herrera, y Carlos Pérez-Plasencia. 2017. «Targeting Metabolic Remodeling in Triple Negative Breast Cancer in a Murine Model». *Journal of Cancer* 8 (2): 178-89. <https://doi.org/10.7150/jca.16387>.
- Giancotti, Filippo G. 2013. «Mechanisms Governing Metastatic Dormancy and Reactivation». *Cell* 155 (4): 750-64. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.029>.
- Goetze, Kristina. 2011. «Lactate Enhances Motility of Tumor Cells and Inhibits Monocyte Migration and Cytokine Release». *International Journal of Oncology*, mayo. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1055>.
- Grzanka, A., D. Grzanka, y M. Orlikowska. 2003. «Cytoskeletal Reorganization during Process of Apoptosis Induced by Cytostatic Drugs in K-562 and HL-60 Leukemia Cell Lines». *Biochemical Pharmacology* 66 (8): 1611-17. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00532-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00532-X).
- Guan, Xiangming. 2015. «Cancer Metastases: Challenges and Opportunities». *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5 (5): 402-18. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.005>.
- Gupta, Gaorav P., y Joan Massagué. 2006. «Cancer Metastasis: Building a Framework». *Cell* 127 (4): 679-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>.
- Han, Mingyong. 2011. «Tumor-Derived Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A Facilitates Tumor Metastasis through the VEGF-VEGFR1 Signaling Pathway». *International Journal of Oncology*, julio. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1138>.
- Hanahan, Douglas. s. f. «Hallmarks of Cancer: The Next Generation», 29.

- Hendrix, Mary J. C., Elisabeth A. Seftor, Yi-Wen Chu, Katrina T. Trevor, y Richard E. B. Seftor. 1996. «Role of Intermediate Filaments in Migration, Invasion and Metastasis». *Cancer and Metastasis Review* 15 (4): 507-25. <https://doi.org/10.1007/BF00054016>.
- Hernández-Hernández, Dulce M, Teresa Apresa-García, y Rosa Ma Patlán-Pérez. s. f. «Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino». *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 8.
- Inoki, Ken, Joungmok Kim, y Kun-Liang Guan. 2012. «AMPK and MTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 52 (1): 381-400. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537>.
- Inokuchi. 2011. «Vimentin Expression Is Associated with Decreased Survival in Gastric Cancer». *Oncology Reports* 25 (5). <https://doi.org/10.3892/or.2011.1185>.
- Jang, Soon Young, Aeree Kim, Jin Kyoung Kim, Chungyel Kim, Youl-Hee Cho, Jong-Ho Kim, Chul Hwan Kim, y Ji-Yun Lee. 2014. «Metformin Inhibits Tumor Cell Migration via Down-Regulation of MMP9 in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells». *ANTICANCER RESEARCH*, 8.
- Janssens, Rik, Sofie Struyf, y Paul Proost. 2018. «The Unique Structural and Functional Features of CXCL12». *Cellular & Molecular Immunology* 15 (4): 299-311. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.107>.
- Kalluri, Raghu. 2003. «Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis: Angiogenesis». *Nature Reviews Cancer* 3 (6): 422-33. <https://doi.org/10.1038/nrc1094>.
- Keogh, R.J. 2010. «New Technology for Investigating Trophoblast Function». *Placenta* 31 (4): 347-50. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.02.008>.
- Kuipers, Ernst J., William M. Grady, David Lieberman, Thomas Seufferlein, Joseph J. Sung, Petra G. Boelens, Cornelis J. H. van de Velde, y Toshiaki Watanabe. 2015. «Colorectal Cancer». *Nature Reviews Disease Primers*, noviembre, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>.
- Lattouf, Hanine, Coralie Poulard, Isabelle Treilleux, Nader Hussein, Mona Diab-Assaf, y Muriel Le Romancer. s. f. «LKB1, a New Biomarker in Breast Cancer», 20.
- Li, Bin, Wen Wen Xu, Alfred King Y. Lam, Yang Wang, Hui-Fang Hu, Xin Yuan Guan, Yan Ru Qin, et al. 2017. «Significance of PI3K/AKT Signaling Pathway in Metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Potential as a Target for Anti-Metastasis Therapy». *Oncotarget* 8 (24). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16333>.
- Liang, Chun-Chi, Ann Y Park, y Jun-Lin Guan. 2007. «In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro». *Nature Protocols* 2 (2): 329-33. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.
- Liu, Lunhua, y Carole A. Parent. 2011. «TOR Kinase Complexes and Cell Migration». *The Journal of Cell Biology* 194 (6): 815-24. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102090>.
- Lu, Qing-Yi, Lifeng Zhang, Jennifer K. Yee, Vay-Liang W. Go, y Wai-Nang Lee. 2015. «Metabolic Consequences of LDHA Inhibition by Epigallocatechin Gallate and Oxamate in MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cells». *Metabolomics* 11 (1): 71-80. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0672-8>.
- Lynch, Henry T, Jane F Lynch, Trudy G Shaw, y Jan Lubinski. 2003. «HNPCC (Lynch Syndrome): Differential Diagnosis, Molecular Genetics and Management - a Review». *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 1 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-1-1-7>.
- Marcus, Adam I., y Wei Zhou. 2010. «LKB1 Regulated Pathways in Lung Cancer Invasion and Metastasis». *Journal of Thoracic Oncology* 5 (12): 1883-86. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181fbc28a>.

- Marin-Valencia, Isaac, Chendong Yang, Tomoyuki Mashimo, Steve Cho, Hyeonman Baek, Xiao-Li Yang, Kartik N. Rajagopalan, et al. 2012. «Analysis of Tumor Metabolism Reveals Mitochondrial Glucose Oxidation in Genetically Diverse Human Glioblastomas in the Mouse Brain In Vivo». *Cell Metabolism* 15 (6): 827-37. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.05.001>.
- Mehlen, Patrick, y Alain Puisieux. 2006. «Metastasis: A Question of Life or Death». *Nature Reviews Cancer* 6 (6): 449-58. <https://doi.org/10.1038/nrc1886>.
- Mei, Ling, Yayuan Liu, Chunyu Xia, Yubei Zhou, Zhirong Zhang, y Qin He. 2017. «Polymer–Drug Nanoparticles Combine Doxorubicin Carrier and Heparin Bioactivity Functionalities for Primary and Metastatic Cancer Treatment». *Molecular Pharmaceutics* 14 (2): 513-22. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00979>.
- Murphy, Danielle A., y Sara A. Courtneidge. 2011. «The “ins” and “Outs” of Podosomes and Invadopodia: Characteristics, Formation and Function». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (7): 413-26. <https://doi.org/10.1038/nrm3141>.
- Myong, Na-Hye. 2012. «Loss of E-Cadherin and Acquisition of Vimentin in Epithelial-Mesenchymal Transition Are Noble Indicators of Uterine Cervix Cancer Progression». *Korean Journal of Pathology* 46 (4): 341. <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2012.46.4.341>.
- Nieman, Marvin T., Ryan S. Prudoff, Keith R. Johnson, y Margaret J. Wheelock. 1999. «N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-Cadherin Expression». *The Journal of Cell Biology* 147 (3): 631-44. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.631>.
- Nour, Nawal M. s. f. «Cervical Cancer: A Preventable Death». *Cervical Cancer*, 5.
- Nyren-Erickson, Erin K., Justin M. Jones, D.K. Srivastava, y Sanku Mallik. 2013. «A Disintegrin and Metalloproteinase-12 (ADAM12): Function, Roles in Disease Progression, and Clinical Implications». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830 (10): 4445-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.011>.
- Ochoa Carrillo, Francisco Javier, Diana Beatriz Guarneros de Regil, y María Teresa Velasco Jiménez. 2015. «Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención». *Gaceta Mexicana de Oncología* 14 (3): 157-63. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.08.002>.
- P. Mann, Aman, y Takemi Tanaka. 2012. «E-Selectin: Its Role in Cancer and Potential as a Biomarker». *Translational Medicine* 01 (S1). <https://doi.org/10.4172/2161-1025.S1-002>.
- Patel, Swati G., y Dennis J. Ahnen. 2012. «Familial Colon Cancer Syndromes: An Update of a Rapidly Evolving Field». *Current Gastroenterology Reports* 14 (5): 428-38. <https://doi.org/10.1007/s11894-012-0280-6>.
- Poincloux, R., F. Lizarraga, y P. Chavrier. 2009. «Matrix Invasion by Tumour Cells: A Focus on MT1-MMP Trafficking to Invadopodia». *Journal of Cell Science* 122 (17): 3015-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.034561>.
- Pon, Y. L., H. Y. Zhou, A. N.Y. Cheung, H. Y.S. Ngan, y A. S.T. Wong. 2008. «P70 S6 Kinase Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition through Snail Induction in Ovarian Cancer Cells». *Cancer Research* 68 (16): 6524-32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6302>.
- Pouyssegur, Jacques, Frédéric Dayan, y Nathalie M. Mazure. 2006. «Hypoxia Signalling in Cancer and Approaches to Enforce Tumour Regression». *Nature* 441 (7092): 437-43. <https://doi.org/10.1038/nature04871>.
- Pozzi, Ambra, Peter D. Yurchenco, y Renato V. Iozzo. 2017. «The Nature and Biology of Basement Membranes». *Matrix Biology* 57-58 (enero): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.12.009>.

- Rattan, Ramandeep, Rouba Ali Fehmi, y Adnan Munkarah. 2012. «Metformin: An Emerging New Therapeutic Option for Targeting Cancer Stem Cells and Metastasis». *Journal of Oncology* 2012: 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/928127>.
- Reymond, Nicolas, Bárbara Borda d'Água, y Anne J. Ridley. 2013. «Crossing the Endothelial Barrier during Metastasis». *Nature Reviews Cancer* 13 (12): 858-70. <https://doi.org/10.1038/nrc3628>.
- Said, Georges, Marie Guilbert, Hamid Morjani, Roselyne Garnotel, Pierre Jeannesson, y Hassan El Btaouri. 2012. «Extracellular Matrix Proteins Modulate Antimigratory and Apoptotic Effects of Doxorubicin». *Chemotherapy Research and Practice* 2012: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/268681>.
- Salani, Barbara, Alberto Del Rio, Cecilia Marini, Gianmario Sambuceti, Renzo Cordera, y Davide Maggi. 2014. «Metformin, Cancer and Glucose Metabolism». *Endocrine-Related Cancer* 21 (6): R461-71. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0284>.
- Saxena, N. K., D. Sharma, X. Ding, S. Lin, F. Marra, D. Merlin, y F. A. Anania. 2007. «Concomitant Activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK Signaling Is Involved in Leptin-Mediated Promotion of Invasion and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells». *Cancer Research* 67 (marzo): 2497-2507. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3075>.
- Schietke, Ruth, Christina Warnecke, Ingrid Wacker, Johannes Schödel, David R. Mole, Valentina Campean, Kerstin Amann, et al. 2010. «The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-Cadherin in Hypoxia: INSIGHTS INTO CELLULAR TRANSFORMATION PROCESSES MEDIATED BY HIF-1». *Journal of Biological Chemistry* 285 (9): 6658-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042424>.
- Schiffman, Mark, Philip E Castle, Jose Jeronimo, Ana C Rodriguez, y Sholom Wacholder. 2007. «Human Papillomavirus and Cervical Cancer» 370: 18.
- Segal, Eric D., Amber Yasmeen, Marie-Claude Beauchamp, Joshua Rosenblatt, Michael Pollak, y Walter H. Gotlieb. 2011. «Relevance of the OCT1 Transporter to the Antineoplastic Effect of Biguanides». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414 (4): 694-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.134>.
- Sheng, Shi L., Jian J. Liu, Yun H. Dai, Xiao G. Sun, Xiao P. Xiong, y Gang Huang. 2012. «Knockdown of Lactate Dehydrogenase A Suppresses Tumor Growth and Metastasis of Human Hepatocellular Carcinoma». *FEBS Journal* 279 (20): 3898-3910. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08748.x>.
- Sommers, Connie L., Stephen W. Byers, Erik W. Thompson, Jeffrey A. Torri, y Edward P. Gelmann. 1994. «Differentiation State and Invasiveness of Human Breast Cancer Cell Lines». *Breast Cancer Research and Treatment* 31 (2-3): 325-35. <https://doi.org/10.1007/BF00666165>.
- Steeg, Patricia S. 2006. «Tumor Metastasis: Mechanistic Insights and Clinical Challenges». *Nature Medicine* 12 (8): 895-904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>.
- Sun, Chang, Yuan Deng, Haiyang Zhou, y Zhi Qian Hu. 2015. «Risk Factors for the Development of Metachronous Bone Metastasis in Colorectal Cancer Patients after Curative Resection». *International Journal of Surgery* 21 (septiembre): 145-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2015.07.706>.
- Sun, Changyu, Zhihao Zhang, Ping He, Yan Zhou, y Xuhua Xie. 2017. «Involvement of PI3K/Akt Pathway in the Inhibition of Hepatocarcinoma Cell Invasion and Metastasis Induced by SASH1 through Downregulating Shh-Gli1 Signaling». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 89 (agosto): 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.06.006>.

- Suyama, Kimita, Irina Shapiro, Mitchell Guttman, y Rachel B. Hazan. 2002. «A Signaling Pathway Leading to Metastasis Is Controlled by N-Cadherin and the FGF Receptor». *Cancer Cell* 2 (4): 301-14. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00150-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00150-2).
- Tacar, Oktay, Pornsak Sriamornsak, y Crispin R. Dass. 2013. «Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems: Doxorubicin Cell and Molecular Biological Activity». *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65 (2): 157-70. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>.
- Thiery, Jean Paul. 2002. «Epithelial–Mesenchymal Transitions in Tumour Progression». *Nature Reviews Cancer* 2 (6): 442-54. <https://doi.org/10.1038/nrc822>.
- Vasen, H F A, G Moslein, A Alonso, I Bernstein, L Bertario, I Blanco, J Burn, et al. 2007. «Guidelines for the Clinical Management of Lynch Syndrome (Hereditary Non-Polyposis Cancer)». *Journal of Medical Genetics* 44 (6): 353-62. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.048991>.
- Viollet, Benoit, Bruno Guigas, Nieves Sanz Garcia, Jocelyne Leclerc, Marc Foretz, y Fabrizio Andreelli. 2012. «Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin: An Overview». *Clinical Science* 122 (6): 253-70. <https://doi.org/10.1042/CS20110386>.
- Vuoriluoto, K, H Haugen, S Kiviluoto, J-P Mpindi, J Nevo, C Gjerdrum, C Tiron, J B Lorens, y J Ivaska. 2011. «Vimentin Regulates EMT Induction by Slug and Oncogenic H-Ras and Migration by Governing Axl Expression in Breast Cancer». *Oncogene* 30 (12): 1436-48. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.509>.
- Wang, Weigang, Sumanta Goswami, Erik Sahai, Jeffrey B. Wyckoff, Jeffrey E. Segall, y John S. Condeelis. 2005. «Tumor Cells Caught in the Act of Invading: Their Strategy for Enhanced Cell Motility». *Trends in Cell Biology* 15 (3): 138-45. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.01.003>.
- Wang, Yaodu, Zhiyang Wu, y Likuan Hu. 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 (septiembre): 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.006>.
- Weaver, Alissa M. 2006. «Invadopodia: Specialized Cell Structures for Cancer Invasion». *Clinical & Experimental Metastasis* 23 (2): 97-105. <https://doi.org/10.1007/s10585-006-9014-1>.
- Webb, Bradley A., Michael Chimenti, Matthew P. Jacobson, y Diane L. Barber. 2011. «Dysregulated PH: A Perfect Storm for Cancer Progression». *Nature Reviews Cancer* 11 (9): 671-77. <https://doi.org/10.1038/nrc3110>.
- Weigelt, Britta, Johannes L. Peterse, y Laura J. van't Veer. 2005. «Breast Cancer Metastasis: Markers and Models». *Nature Reviews Cancer* 5 (8): 591-602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>.
- Wells, Alan, Jelena Grahovac, Sarah Wheeler, Bo Ma, y Douglas Lauffenburger. 2013. «Targeting Tumor Cell Motility as a Strategy against Invasion and Metastasis». *Trends in Pharmacological Sciences* 34 (5): 283-89. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.03.001>.
- Yamaguchi, Hideki, Jeffrey Wyckoff, y John Condeelis. 2005. «Cell Migration in Tumors». *Current Opinion in Cell Biology* 17 (5): 559-64. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.002>.
- Yang, Fan, Sheila S. Teves, Christopher J. Kemp, y Steven Henikoff. 2014. «Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1845 (1): 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>.
- Yersal, Ozlem. 2014. «Biological Subtypes of Breast Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications». *World Journal of Clinical Oncology* 5 (3): 412. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>.

- Yu, T, C Wang, J Yang, Y Guo, Y Wu, y X Li. 2017. «Metformin Inhibits SUV39H1-Mediated Migration of Prostate Cancer Cells». *Oncogenesis* 6 (5): e324.
<https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.28>.
- Zhai, Xiaoming, Yang Yang, Jianmei Wan, Ran Zhu, y Yiwei Wu. 2013. «Inhibition of LDH-A by Oxamate Induces G2/M Arrest, Apoptosis and Increases Radiosensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma Cells». *Oncology Reports* 30 (6): 2983-91.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2735>.
- Zhong, Zhang-Feng, Wen Tan, Ke Tian, Hua Yu, Wen-An Qiang, y Yi-Tao Wang. 2017. «Combined Effects of Furanodiene and Doxorubicin on the Migration and Invasion of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells in Vitro». *Oncology Reports* 37 (4): 2016-24.
<https://doi.org/10.3892/or.2017.5435>.
- Zhou, Hongyu, y Shile Huang. s. f. «Role of MTOR Signaling in Tumor Cell Motility, Invasion and Metastasis», 13.
- Zhuang, Yongxian, y W Keith Miskimins. 2008. «Cell Cycle Arrest in Metformin Treated Breast Cancer Cells Involves Activation of AMPK, Downregulation of Cyclin D1, and Requires P27^{Kip1} or P21^{Cip1}». *Journal of Molecular Signaling* 3 (diciembre): 18.
<https://doi.org/10.1186/1750-2187-3-18>.
- Zijl, Franziska van, Georg Krupitza, y Wolfgang Mikulits. 2011. «Initial Steps of Metastasis: Cell Invasion and Endothelial Transmigration». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 728 (1-2): 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002>.