



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Efecto del tratamiento Afatinib-Metformina sobre la regulación glucolítica, en líneas celulares de cáncer de pulmón con mutaciones en el gen de EGFR.

TESIS

QUE OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. PEDRO ALONSO BARRIOS BERNAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRIGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. MARCELA LIZANO SOBERON

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Efecto del tratamiento Afatinib-Metformina sobre la regulación glucolítica, en líneas celulares de cáncer de pulmón con mutaciones en el gen de EGFR.

AGRADECIMIENTOS.

- A mis padres, Pedro y Carmen, por haberme dado todo y motivarme siempre para llegar a este punto.
- A mis hermanos Omar y Saúl, por siempre ser también mis mejores amigos y haber hecho la vida más divertida cuando estuvimos juntos.
- Al resto de mi familia, que siempre me ha cuidado y motivado para no darme por vencido.
- A mis amigos de la infancia Julio y Tony, tantas cosas que aprendimos y vivimos juntos, que me ayudaron a llegar hasta aquí.
- A todos mis amigos que llegaron después a mi vida, pero igual los considero mi familia que se escoge: David, Angel, Tai, Jorge, Kenia, Nara, Mayin, Chito, Mitzi y Diego. Siempre fueron un apoyo brutal y una motivación para seguir adelante.
- A mis amigos de la universidad, que fueron, y a la fecha son parte importante de mi formación y de mi vida: Max, Iker, Ale, Augusto, Yuri, Marco, Oscar, Javi, Arce, Crys y Min.
- A Dany, por haber sido una parte importantísima de mi vida, haberme enseñado tanto y, sobre todo, ser el impulso más grande en esta parte final.
- A los doctores. Norma y Mario por todo lo que me enseñaron y más que eso, por ser mis amigos.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme: Víctor, Elsa, Chema, Xitla, Rubén, Eu, César y Lore.
- Finalmente, a todas esas personas que me faltan, y que nuestros caminos se cruzaron en algún momento, les agradezco, porque todos dejaron algo en mí que me ayudó a crecer de alguna manera.

Apoyos recibidos.

- Laboratorio de Oncología experimental, Instituto Nacional de Cancerología.
- Programa de doctorado en ciencias biomédicas, UNAM.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca CVU 611987

INDICE	PAGINAS
GLOSARIO.....	5-6
RESUMEN.....	7-9
ABSTRACT.....	10-12
INTRODUCCION	
EGFR en CP, señalización y tratamiento.....	14-24
Tratamiento con metformina en cáncer.....	25-27
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	29-35
RESULTADOS.....	35-49
DISCUSION.....	49-56
CONCLUSION.....	57-58
PERSPECTIVAS.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	59-73
INFORMACION SUPLEMENTARIA.....	74-76

GLOSARIO.

- **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- **TKI:** Inhibidor tirosin-cinasa.
- **TEM:** Transición epitelio-mesenquima.
- **CPCNP:** Cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- **CP:** Cáncer de pulmón.
- **EW:** Efecto Warburg.
- **MAPK:** Protein cinasa activada por mitógeno.
- **ATP:** Adenosin trifosfato.
- **SLP:** Supervivencia libre de progresión.
- **FOSFOX:** Fosforilación oxidativa.
- **GLUT:** Transportador de glucosa.
- **HXK:** Hexocinasa.
- **PFK:** Fosfofructo-cinasa.
- **MCT:** Transportador monocarboxilato.
- **OCT:** Transportador orgánico de cationes.
- **AMPK:** Proteín-cinasa activada por AMP.
- **IL-6:** Interleucina 6.
- **IGFR:** Receptor del factor de crecimiento de insulina.
- **AKT:** Proteín-cinasa B.
- **SFB:** Suero fetal bovino.
- **ASB:** Albúmina de suero bovino.

- **SDS:** Sodio dodecil sulfato.
- **KRPH:** Krebs ringer phosphate buffer.
- **DE:** Desviación standard.
- **ANOVA:** Análisis de varianza.
- **PKM2:** Piruvato cinasa M2.
- **IR:** Receptor de insulín.
- **mTOR:** Objetivo de la rapamicina en mamíferos.
- **MMP:** Metaloproteasa de matriz.

RESUMEN.

En años recientes el cáncer de pulmón (CP) se ha reposicionado a nivel mundial como la neoplasia con mayor incidencia reportada en ambos sexos, siendo la causa principal de muerte por cáncer en sexo masculino. Aproximadamente un 80-85 % de los casos se detecta en estadios clínicos avanzados lo que provoca que el combate de esta enfermedad sea un grave problema de salud pública.

El alto grado de complejidad molecular por el que está caracterizado esta neoplasia, fomentó la creación de terapias dirigidas hacia diversas moléculas clave que suelen estar alterada. Dentro de estas moléculas, podemos localizar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como uno de los más importantes debido a su alta frecuencia de alteraciones que oscila entre el 35-40% de pacientes no fumadores y sus capacidades como promotor de cáncer pulmonar. En respuesta a esto, se han desarrollado diferentes tratamientos inhibitorios dirigidos a dicha molécula dentro de los cuales destacan los anticuerpos monoclonales y los inhibidores tirosin-cinasa (TKIs) de EGFR.

Sin embargo, diversos mecanismos de resistencia como transición epitelio-mesenquima (TEM), alteraciones metabólicas y sobreexpresión de otros receptores de membrana se presentan a 6 meses de iniciada la terapia con TKIs en aproximadamente el 50% de pacientes, por lo que ciertos medicamentos como la metformina se han reposicionado como posibles tratamientos para abatir esta resistencia.

Las propiedades anticancerígenas de la metformina han sido reportadas en diversos tipos de cáncer sin embargo el funcionamiento de los mecanismos moleculares implicados en este tratamiento no están completamente dilucidados.

En el presente trabajo nos dimos a la tarea de analizar el efecto de la combinación afatinib-metformina en líneas celulares de cáncer de pulmón, así como algunos de los posibles mecanismos moleculares que se ven modificados por este tratamiento.

Métodos.

Para este trabajo se utilizaron 3 líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón con diferente estado mutacional de EGFR; A549 con EGFR en estado nativo, H1975 con las mutaciones L858R en el exón 21 y la T790M en el exón 20, y la línea HCC827 con delección en el exón 19. Las células se expusieron a concentraciones IC15 de metformina y concentraciones variables de afatinib acorde a cada línea celular, los tratamientos se administraron como unidroga y en combinación. Se evaluó la viabilidad celular por el ensayo MTT, inducción de apoptosis con el ensayo de Anexina V mediante citometría de flujo, el porcentaje de EGFR en membrana fue evaluado a través de citometría de flujo. La expresión de marcadores de TEM, vía de señalización de EGFR, ruta glucolítica y subunidades de fosforilación oxidativa (FOSFOX) fueron evaluados por western blot. Finalmente, la asimilación de glucosa y la secreción de lactato fueron evaluados por colorimetría con la ayuda de kits comerciales.

Resultados.

Con base en el ensayo MTT para citotoxicidad inducida por el tratamiento combinado afatinib-metformina, se pudo observar un incremento estadísticamente significativo por lo menos en alguno de los tratamientos de combinación comparado con afatinib como unidroga en las líneas celulares A549 y HCC827 a 72 horas de haber sido administrado el tratamiento. Posterior a esto se determinaron los índices de combinación de los tratamientos a través de un análisis con el programa compusyn, los resultados develaron comportamiento sinérgico en las tres líneas celulares, siendo la línea A549 la que presentó mayor sinergia, de igual forma no se encontró algún tratamiento que reportara comportamiento antagónico.

El ensayo de apoptosis corroboró los resultados encontrados previamente en citotoxicidad. Los tratamientos combinados mostraron una mayor inducción de apoptosis en las tres líneas celulares que los tratamientos como unidroga, se pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon diferentes concentraciones de afatinib y su combinación con

metformina. La inducción de necrosis con todos los tratamientos se mantuvo prácticamente indetectable.

El análisis de expresión de EGFR en membrana, mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la reducción de expresión proteica principalmente con los tratamientos que incluyen metformina en las líneas celulares con baja afinidad por afatinib (A549 y H1975). En lo que se refiere a la línea celular HCC827 que es sensible al TKI, mostró disminución de EGFR en membrana con todos los tratamientos.

Los análisis de western-blot revelaron una notable inhibición de la vía de señalización de EGFR cuando metformina es añadida al tratamiento, esto se asoció con una regulación a la baja de los marcadores de TEM y un incremento del marcador epitelial E-cadherina. De igual forma, se observó reducción del fenotipo glucolítico, disminuyendo la incorporación de glucosa y la secreción de lactato extracelular. Finalmente se observó una ligera tendencia al aumento en marcadores de subunidades de FOSFOX.

Conclusión.

Se observó una alta sensibilización al tratamiento con afatinib cuando se añade metformina en las 3 líneas celulares, esto se asoció con la disminución en marcadores de TEM y glucólisis, que son importantes promotores del desarrollo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP).

ABSTRACT.

At recent years, lung cancer has been repositioned worldwide as the neoplasm with the highest incidence in both sexes, being the leading cause of cancer death in males. Approximately 80-85% of cases are detected in advanced clinical stages, which makes this disease a serious public health problem.

The high degree of molecular complexity by which this neoplasm is characterized, promoted the creation of therapies directed towards various key molecules that are usually altered. Within these molecules, we can locate the epidermal growth factor receptor (EGFR) as one of the most important due to its high frequency of alterations that ranges between 35-40% of non-smoking patients and its capabilities as a promoter of lung cancer. In response to this, different inhibitory treatments targeting said molecule have been developed, among which monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) stand out. However, various resistance mechanisms such as epithelial-mesenchyme transition (EMT), metabolic alterations, and overexpression of other membrane receptors occur 6 months after starting TKI therapy in approximately 50% of patients, so certain medications such as metformin have been repositioned as possible treatments to break down this resistance.

The anticancer properties of metformin have been reported in various types of cancer, however the functioning of the molecular mechanisms involved in this treatment are not completely elucidated.

In the present work, we undertook the task of analyzing the effect of the afatinib-metformin combination in lung cancer cell lines, as well as the molecular mechanisms that are modified by this treatment.

Methods.

For this work, 3 lung adenocarcinoma cell lines with different EGFR mutational status were used: A549 with EGFR wild-type, H1975 with the L858R mutation in exon 21 and the T790M in exon 20 and the HCC827 cell line with deletion in exon 19. The cells were exposed to IC15 concentrations of metformin and variable concentrations of afatinib according for each cell line, the treatments were administered as a single

drug and in combination. Cell viability was evaluated by the MTT assay, induction of apoptosis with the Annexin V assay by flow cytometry, the percentage of EGFR in the membrane was evaluated by flow cytometry. Protein expression of EMT markers, EGFR signaling pathway, glycolytic pathway and oxidative phosphorylation subunits (FOSFOX) were evaluated by western blot. Finally, the assimilation of glucose and the secretion of lactate were evaluated by colorimetry with commercial kits.

Results.

Based on the MTT assay for cytotoxicity induced by the afatinib-metformin combination treatment, a statistically significant increase could be observed in at least some combination treatment compared with afatinib as monotherapy in the A549 and HCC827 cell lines at 72 hours after the treatment. The combination indices of the treatments were determined through an analysis with the compusyn program, the results revealed synergistic behavior in the three cell lines, being the A549 cell line the one that presented the greatest synergy, in the same way, no treatment that reported antagonistic behavior.

The apoptosis assay corroborated the results previously found in cytotoxicity. The combined treatments showed a greater induction of apoptosis in the three cell lines than the treatments as monotherapy, statistically significant differences could be found when different concentrations of afatinib and its combination with metformin. The induction of necrosis with all the treatments remained practically undetectable.

The membrane EGFR expression analysis showed statistically significant differences in terms of the reduction of protein expression, mainly with treatments that include metformin in cell lines with low afatinib affinity (A549 and H1975). Regarding the HCC827 cell line that is sensitive to TKI, it showed a decrease in EGFR in the membrane with all treatments.

Western-blot analysis revealed a notable inhibition of the EGFR signaling pathway when metformin is added to the treatment, this reflected an impact downregulating EMT markers, and increasing the epithelial marker E-cadherin. Also glycolytic

phenotype, was reduced, decreasing glucose incorporation and secretion of extracellular lactate. Finally, a slight tendency to increase in FOSFOX subunit markers was observed.

Conclusion

High sensitization to afatinib treatment was observed when metformin was added in all 3 cell lines, this was associated with a decrease in markers of EMT and glycolysis, which are important promoters of the development of NSCLC non-small cell lung cancer.

INTRODUCCIÓN.

El cáncer de pulmón (CP) se ha vuelto uno de los cánceres con mayor frecuencia de casos en los últimos tiempos, siendo el tercer cáncer más común en ambos sexos y el primer lugar en mortalidad asociada con cáncer en hombres. Los datos arrojados en Norteamérica develaron al CP como el segundo lugar en frecuencia dentro de los diferentes tipos de cáncer en ambos sexos. En lo que a México se refiere, se estimaron aproximadamente 1.69 millones de fallecimientos atribuidos a CP en el año 2015 y la tasa de diagnóstico anual es de aproximadamente 8,600 casos, y finalmente el tipo de histología más frecuente de esta neoplasia es el CPCNP con una prevalencia de 84% de los casos e incluye los tipos histológicos; epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. El incremento de casos que presenta esta neoplasia a nivel mundial se asocia principalmente con tabaquismo, sin embargo, otros factores como el humo de leña, exposición a químicos, y la contaminación ambiental, se han asociado con el desarrollo y progresión de la enfermedad (Bray et al., 2018; Malhotra, Malvezzi, Negri, La Vecchia, & Boffetta, 2016; O et al., 2013).

El CP está caracterizado por detectarse en estadíos tardíos de la neoplasia de ahí que aproximadamente el 27% de todas las muertes por cáncer, se atribuya a CP, las tasas de sobrevida de la enfermedad a 5 años se mantienen bajas, ya que solo el 15% de pacientes que son diagnosticados con esta neoplasia, sobreviven después de 5 años después del diagnóstico (Sung et al., 2021).

El CP es una enfermedad caracterizada por una gran cantidad de modificaciones a nivel molecular dentro de las cuales, las alteraciones en EGFR se mantienen como una de las más importantes debido a la alta frecuencia con la que se muestran en alrededor del 35% en pacientes no fumadores, pero a menudo con exposición a humo de leña (Arrieta et al., 2015). Las mutaciones, amplificación o sobreexpresión de EGFR, llevan a la activación de diversas vías de señalización que son promotoras del rápido desarrollo del CP (Bethune, Bethune, Ridgway, & Xu, 2010; Rosell & Karachaliou, 2019).

De igual forma, se ha observado que las células con modificaciones activadoras de la vía de señalización desencadenada por EGFR, muestran una tendencia a incrementar sus funciones glucolíticas para mantener una proliferación sostenida, y este efecto por lo regular viene acompañado de un aumento en la tasa de fermentación de ácido láctico y una disminución en los procesos de FOSFOX, mostrando lo que se conoce como Efecto Warburg (EW). Así mismo, una activación constitutiva de EGFR, puede llevar a la célula a la pérdida de diferenciación y que emerjan marcadores de células mesenquimales, en un proceso que se conoce como TEM (Suda et al., 2011; Tulchinsky, Demidov, Kriajevska, Barlev, & Imyanitov, 2019; D. Xiao & He, 2010).

EGFR en CP, señalización y tratamiento.

El gen de EGFR también conocido como ERBB1, HER1, ERBB1 se encuentra localizado en el brazo corto p11.2 del cromosoma 7 y está compuesto por 31 exones, este gen codifica para una glicoproteína transmembranal (S. DA, R, & K, 2020).

La proteína de EGFR pertenece a una familia de proteínas con actividad cinasa dentro de las que se encuentran EGFR2, EGFR3 y EGFR4. Esta familia de proteínas es activada a través de la unión del factor de crecimiento epidérmico, lo que lleva a su dimerización y la posterior autofosforilación en los residuos de tirosina de los receptores (U. A et al., 1984; S. DA et al., 2020). La familia de EGFR cuenta tres dominios principales; el dominio extracelular, el dominio transmembranal y el dominio cinasa, que, a su vez, funciona como el dominio regulatorio con el carboxilo-terminal. La unión de alguno de los ligandos, promueve un cambio conformacional en el monómero que permite la dimerización con alguno de los otros miembros de la familia de proteínas y su ligando para de esta forma comenzar con la señalización río abajo (“(PDF) Characterisation and regulation of the Egfr/Egfr ligand system in fish models for melanoma,” n.d.) Fig. 1.

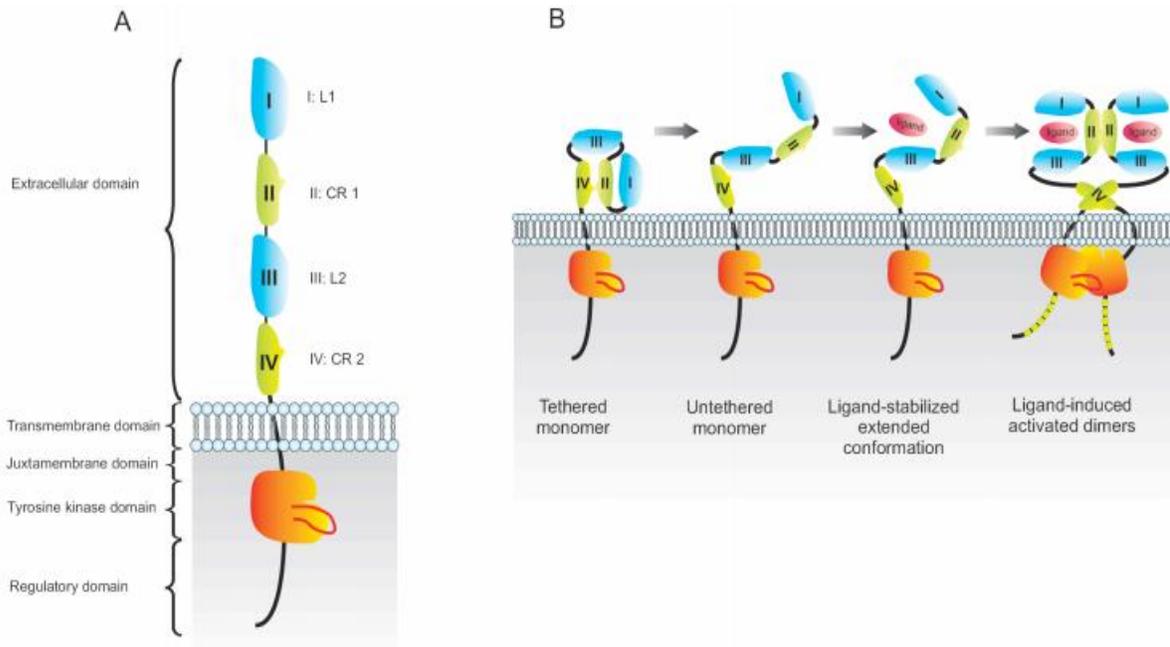


Figura 1. Estructura de EGFR. EGFR se encuentra conformado por tres principales dominios de los cuales el dominio extracelular se forma por 4 sub-dominios, la activación de este receptor se lleva a cabo por 4 pasos secuenciales que finalizan en la dimerización de dos receptores con sus respectivos ligandos y la posterior fosforilación de los dominios cinasa.

La afinidad entre ligandos y receptores juega un papel importante, esta va a ser la determinante para la selección de homodímeros o heterodímeros que se van a formar para comenzar con la señalización (P. Liu et al., 2012).

La activación de EGFR desencadena importantes vías de señalización que promueven proliferación, migración y síntesis de proteínas. Dentro de estas vías de señalización se encuentra la correspondiente al eje de PI3K/AKT/mTOR, esta vía de señalización se activa mediante el reclutamiento de pequeñas proteínas de andamiaje como Grb2 y a través de una serie de fosforilaciones, se lleva a cabo la activación de mTOR que va a actuar a través de su efector río abajo la subunidad ribosómica P70S6K. Por otro lado, otra vía dependiente EGFR es la del eje RAS/RAF/MAPK, esta vía comienza con el intercambio GDP/GTP efectuado por RAS, seguido por una serie de fosforilaciones hasta la protein-cinasa activada por mitógeno (MAPK) que lleva a cabo sus funciones proliferativas a través de sus diferentes efectores río abajo (Z. Zhang, Stiegler, Boggon, Kobayashi, & Halmos, 2010).

a) *Mutaciones de EGFR en CPCNP.*

A menudo el gen de EGFR presenta mutaciones que mantienen constitutivamente activa la vía de señalización desencadenada por la proteína. Estas mutaciones ocurren con una frecuencia del 10 al 20% en población caucásica, y en cuando menos 50% de población asiática con diagnóstico de CPCNP (“Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma,” 2014; Harrison, Vyse, & Huang, 2020; S. Y et al., 2014).

Las mutaciones más frecuentes en EGFR son las deleciones en el exón 19 y la sustitución de aminoácidos L858R en el exón 21, estas dos mutaciones representan aproximadamente el 85% de mutaciones observadas en EGFR en CPCNP y confieren sensibilidad al tratamiento con TKIs. Por otro lado, también existen las mutaciones no comunes de EGFR que se presentan aproximadamente con un 15% de frecuencia e incluyen mutaciones puntuales, inserciones, y deleciones, en los exones 18-25 del gen. Y finalmente, también se pueden localizar mutaciones como la T790M, que se ha asociado con el desarrollo de resistencia al tratamiento con TKIs y se presenta con una frecuencia de aproximadamente 50%, después de 6 meses de iniciado el tratamiento. (AF, 2009; Harrison et al., 2020).

Mutaciones secundarias de resistencia a tratamiento con TKIs se han sido asociado con la activación constitutiva de la vía de señalización de EGFR, como la T790M en el exón 20, que se mencionó previamente, la mutación C797S en el exón 18, así como amplificaciones en la proteína de transición epitelio-mesenquima (MET). Sin embargo, la señalización constitutiva de EGFR también promueve la modificación del metabolismo celular hacia un fenotipo Warburg, esto principalmente a través de los efectos de AKT, cinasa que se encuentra río abajo de EGFR. De igual forma, marcadores de TEM se han observado incrementados cuando EGFR se encuentra activo y también en respuesta al tratamiento con TKIs, este fenómeno se da principalmente por la ramificación de EGFR que desemboca en la vía de las MAPK. (Morgillo, Della Corte, Fasano, & Ciardiello, 2016; Stewart, Tan, Liu, & Tsao, 2015; Zhu, Chen, Liu, & Niu, 2019).

b) Terapia dirigida para EGFR mutado en CP.

En lo que se refiere al tratamiento del CP, la cirugía se mantiene como el mejor tratamiento en tumores que se encuentren localizados, sin embargo, el CP se caracteriza por ser diagnosticado en estadios avanzados por lo que los tratamientos sistémicos con fármacos citotóxicos se han vuelto recurrentes en el tratamiento de esta enfermedad (Y. K, N, Y, & F, 2019). La quimioterapia se mantiene como la terapia sistémica base, pero en CP, desventajas importantes se han mostrado con la terapia basada en platinos en lo que a supervivencia se refiere, observándose beneficios pequeños con supervivencias menores a 2 años (JH et al., 2002; O. Y et al., 2007).

Como respuesta a los bajos resultados obtenidos con terapias sistémicas, surgen como una oportunidad de tratamiento las terapias dirigidas a moléculas clave en el desarrollo del cáncer. El tratamiento con inhibidores tirosin-cinasa en tumores de CP que cuentan con mutaciones en EGFR han mostrado mejores resultados antitumorales que las terapias basadas en platinos, la toma de decisiones en los tratamientos asignados ha evolucionado, ya que ahora se toman en cuenta los perfiles moleculares para poder asignar una terapia dirigida (RS, JV, & SM, 2008; H. WH, JC, TS, & HH, 2018).

Los TKIs de “primera generación” aprobados para su uso en EGFR mutante, fueron gefitinib y erlotinib, estos inhibidores presentan una unión reversible al sitio de unión de adenosín trifosfato (ATP) en el dominio tirosin-cinasa y de esta forma se inhibe la activación del receptor. Ambos TKIs mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la supervivencia libre de progresión en pacientes con TKIs versus pacientes tratados con platinos, por su parte gefitinib mostró tasas de respuesta hasta del 71.2% en pacientes con mutaciones en EGFR (Mok et al., 2009; M. T et al., 2010; YL et al., 2015).

Como se mencionó previamente, en un inicio los pacientes con EGFR mutado que son tratados con TKIs de primera generación, responden de buena forma al tratamiento, aproximadamente de 6-12 meses de empezado el tratamiento, se muestra progresión de la enfermedad con el mecanismo más recurrente que es la

mutación T790M en el exón 20 de EGFR, esta mutación provoca una mayor afinidad del receptor por el ATP (llevándolo a activación) y disminuye la afinidad del mismo por los inhibidores de primera generación. Con la intención de abatir este mecanismo molecular de resistencia adquirida, se desarrollan los TKIs de segunda generación como el afatinib y el dacomitinib, dichos inhibidores presentan unión irreversible a EGFR a través de enlaces covalentes lo que provoca una inhibición más potente de la unión de ATP (Y. CH et al., 2008; M, DS, & KA, 2016; K. S et al., 2005).

El mayor beneficio de la terapia con inhibidores de segunda generación en comparación con gefitinib, ya fue probado mostrando aumento en la supervivencia libre de progresión (SLP), de igual forma, se ha observado la capacidad de estos TKIs, de inhibir a EGFR, aun cuando está presente la mutación T790M (D et al., 2008; P. K et al., 2016; YL et al., 2015). Estos resultados mostraban como potenciales inhibidores efectivos a los TKIs de segunda generación en segunda línea, sin embargo, estudios clínicos mostraron solamente un ligero beneficio cuando se administra afatinib como terapia en CP en pacientes que progresaron al tratamiento con inhibidores de primera generación con una tasa de respuesta media menor al 10%. Adicionalmente, los TKIs de segunda generación, muestran inhibición de EGFR en estado nativo, además de toda la familia de receptores (N et al., 2013; VA et al., 2012).

Finalmente, se desarrollan los TKIs de EGFR de tercera generación como el osimertinib, que se une de forma irreversible al C797 de EGFR. Un estudio que comparó la eficacia de osimertinib con quimioterapia en pacientes con resistencia adquirida con mutación T790M, mostró el beneficio de esta terapia en este tipo de pacientes, por lo cual, se propone y se aprueba para casos con mutación de resistencia T790M adquirida, posterior al tratamiento con inhibidores de primera y segunda generación (C. DA et al., 2014; JC et al., 2018; TS et al., 2017).

c) Estrategias de tratamiento para CPCNP con EGFR mutado.

Una gran variedad de estudios se ha realizado con el objetivo de determinar la mejor estrategia para el uso de TKIs, se han probado las tres generaciones de TKIs como

primera línea y los resultados se han mostrado heterogéneos. Por lo cual es difícil definir un tratamiento estándar para primera línea. Adicionalmente, las mutaciones secundarias en otros receptores y moléculas complican aún más el tratamiento, por lo que son de suma importancia los perfiles moleculares que se puedan obtener durante el combate de la neoplasia (Y. K et al., 2019).

d) EGFR y TEM

La TEM, es un proceso de diferenciación celular donde células epiteliales tienen un proceso génico de regresión hacia células mesenquimales, se ha observado que en cáncer que la TEM, otorga ventajas a diferentes tipos de cáncer a través de un incremento en la plasticidad tumoral, migración, y resistencia a diversas terapias anticancerígenas. Durante el desarrollo del proceso de TEM, la célula cancerosa muestra la pérdida de sus características epiteliales, polaridad, complejos de adhesión y hay un importante remodelamiento de la arquitectura a nivel microambiente. Estos fenómenos, le otorgan a la célula tumoral la habilidad de migrar individualmente y establecer la formación de nuevos nichos tumorales debido al aumento de su capacidad invasiva (Lambert, Pattabiraman, & Weinberg, 2017; Nieto, Huang, Jackson, & Thiery, 2016; Tulchinsky et al., 2019).

La TEM normalmente se presenta principalmente en las fases embrionarias del desarrollo del cuerpo humano, las características de estas células adquiridas por las células tumorales, crean un ambiente propicio para el desarrollo de tumores malignos, juega un papel importante a su vez, en los procesos de intravasación y extravasación, posterior a la invasión del objetivo, las células que participaron en la extravasación, pueden recuperar el fenotipo epitelial con el que contaban previamente y de esta forma llevar a cabo lo que se conoce como macrometástasis (P. A, T, & J, 2014; B. T, R, MA, & RA, 2018).

La TEM en cáncer puede ser activada o iniciada por varios factores, uno de los más importantes es la activación constitutiva de vías de señalización que es desencadenada por la expresión aberrante de receptores de factores de crecimiento en la membrana celular, o proteínas con actividad cinasa en citoplasma. Adicionalmente, la sobreexpresión de ligandos y de citosinas estimuladoras,

también pueden mantener esta activación constitutiva de vías de señalización y promover de esta forma la TEM (Nieto et al., 2016).

En CP, la expresión de diversos marcadores de TEM, se ha visto relacionada con resistencia a terapias dirigidas a EGFR (Tulchinsky et al., 2019). La resistencia al tratamiento con TKIs inducida por TEM, ha sido ampliamente estudiada, mostrando una estrecha relación entre esta vía de señalización, el desarrollo de TEM y la aparición de marcadores de TEM como respuesta al tratamiento con TKIs. Se han mostrado resultados estadísticamente significativos en la expresión de vimentin (importante biomarcador en TEM) en pacientes con EGFR mutado, lo que sugiere relación entre ambos procesos (CR et al., 2017). Un estudio mostró que las células remanentes a la terapia con gefitinib y osimertinib, tienen una mayor capacidad de desarrollar fenotipos TEM o similares a células madre desarrollando marcadores como aumento en vimentin y la pérdida de E-cadherina (W. CH et al., 2019). En lo que se refiere a inhibidores de segunda generación, un estudio mostró marcadores de TEM como respuesta a la terapia con afatinib como segunda línea de tratamiento, esto posterior a la primera línea con el TKI de primera generación (Poh, Liam, Rajadurai, & Chai, 2018).

La figura 2 resume el mecanismo de resistencia a TKIs inducido por TEM (Tulchinsky et al., 2019)

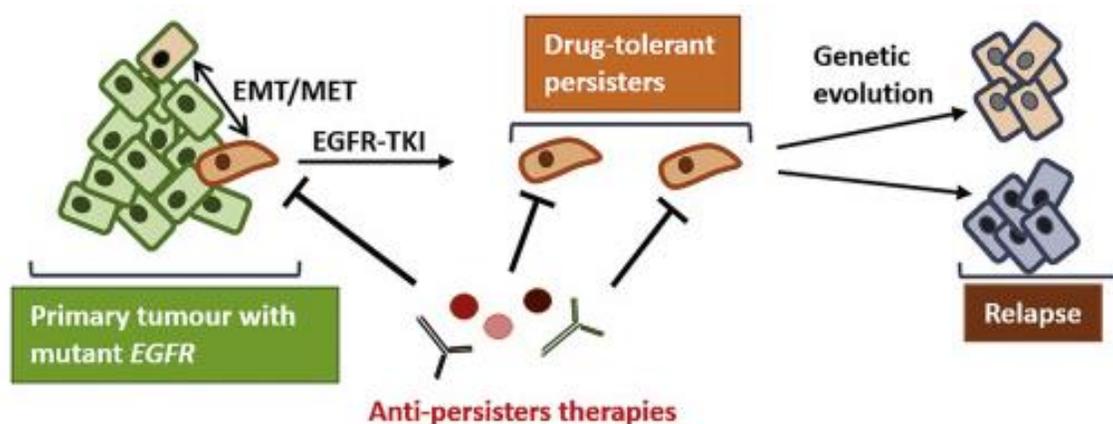


Figura 2. Resistencia a terapias inducida por TEM. Las células sensibles a TKIs del tumor primario desarrollan resistencia a través de la inducción de TEM después de la primera línea de tratamiento, las células persistentes pueden tratarse con una segunda línea de tratamiento, sin embargo, las

características mesenquimales con las que cuentan, les confieren capacidades evolutivas y de ventaja adaptativa permitiendo que el tumor tenga una recaída y pueda volver a proliferar (Tulchinsky et al., 2019).

e) *Cáncer de pulmón y Efecto Warburg.*

Durante los años veinte se comenzaban a desarrollar nuevas hipótesis acerca del metabolismo y su intervención en la formación de tumores, Otto Warburg plantea la hipótesis acerca de la capacidad de las células tumorales de modificar su metabolismo para promover su proliferación descontrolada. El mostró que los tejidos tumorales en cultivo presentaban tasas aceleradas de incorporación de glucosa asociado con secreción de lactato aún en presencia de oxígeno y estas tres características metabólicas constituyen lo que se conoce como Efecto Warburg. La conversión de glucosa en lactato aún en condiciones de normoxia, se postulaba como la principal consecuencia del EW. (DeBerardinis & Chandel, 2020; K. WH, PL, & CV, 2011).

Se ha propuesto un acoplamiento metabólico en las células cancerosas que permite que la glucólisis acelerada que las caracteriza, funcione como un proveedor de macromoléculas para otras vías biosintéticas que son importantes para la proliferación descontrolada como se muestra en la Figura 3. (DeBerardinis & Chandel, 2020)

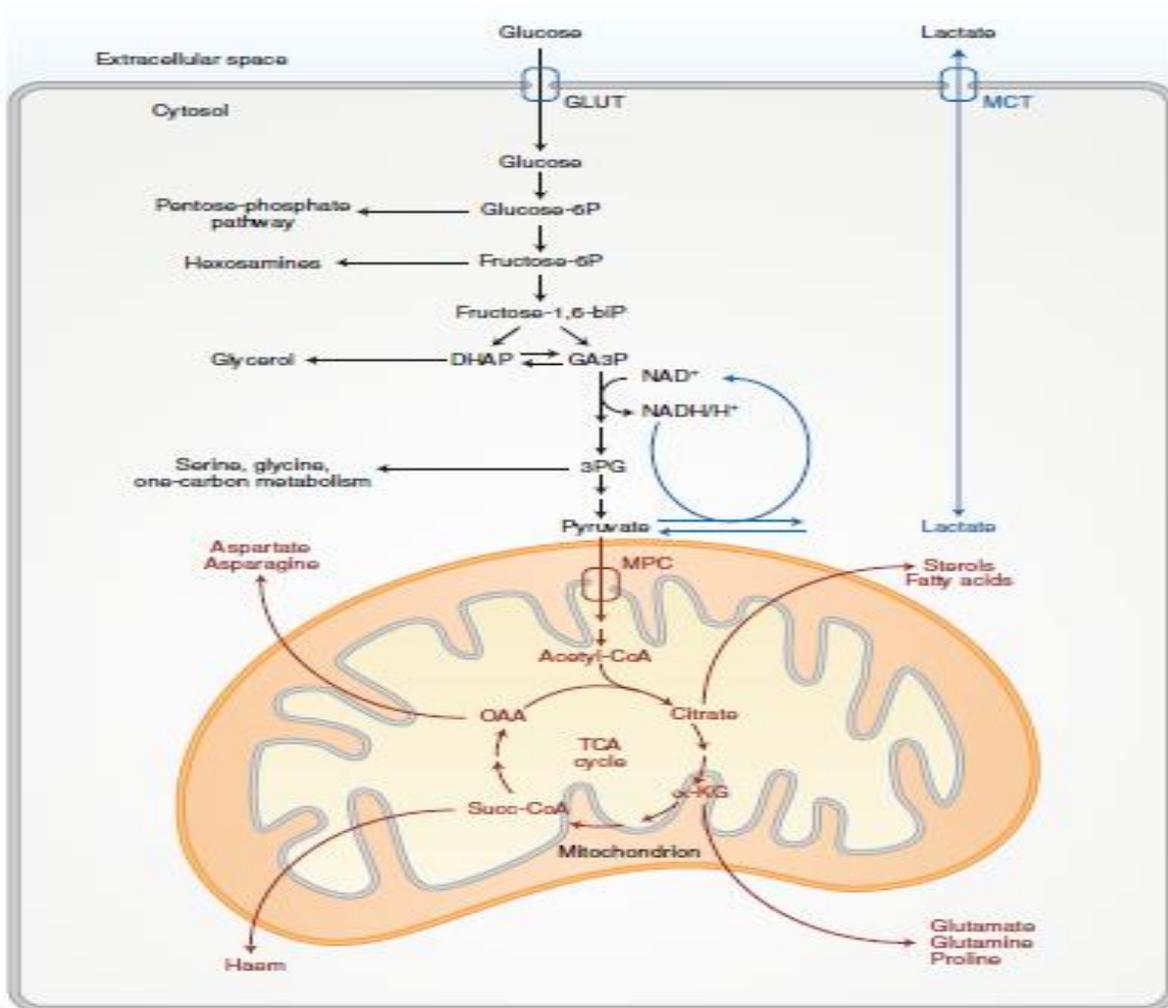


Figura. 3 Acoplamiento entre glucólisis y ciclo de Krebs. La glucólisis acelerada permite que la célula cuente con una alta disposición de intermediarios que pueden ser desviados a rutas metabólicas alternas para mantener las altas tasas de proliferación celular en tumores. De igual forma, el piruvato que no es secretado como lactato, puede ser incorporado al ciclo de Krebs y promover la síntesis de esqueletos carbonados que pueden participar en diversas rutas anabólicas (DeBerardinis & Chandel, 2020).

En un inicio se pensó que en un fenotipo Warburg, la glucólisis trabajaba de forma independiente a la fosforilación oxidativa (FOSFOX), y que incluso esta misma se mantenía inactiva debido a una disfunción en las capacidades oxidativas de las células tumorales. Posteriormente se observó un consumo constante de oxígeno en los tumores por lo que se llegó a la conclusión de que en un fenotipo Warburg el

mecanismo principal de abastecimiento de energía y macromoléculas es la glucólisis, sin embargo, la respiración oxidativa se mantiene encendida pero en menor proporción que en células sin fenotipo Warburg (K. WH et al., 2011).

Con investigaciones más recientes, se pudo confirmar que las altas tasas glucolíticas, pueden estar acopladas al consumo de oxígeno, y que este acoplamiento funciona como un excelente promotor de la proliferación tumoral, sin embargo, cuando existen disfunciones en el flujo de la glucosa, también existe acumulación de metabolitos y estos funcionan como combustible tanto para rutas catabólicas como para rutas anabólicas (Fan et al., 2009; Maher et al., 2012).

Los tumores sólidos están caracterizados por presentar microambientes con pH ácido y reducidas concentraciones de glucosa, producto del consumo acelerado de la misma y la posterior secreción de lactato al ambiente extracelular, aunado a la baja disponibilidad de oxígeno en las zonas internas del tumor. El acoplamiento metabólico permite que el tumor tenga una regresión a la generación de energía a través de FOSFOX, cuando la demanda energética comienza a ser más alta y no hay suficiente glucosa (H, M, & X, 2016; Prado-Garcia, Campa-Higareda, & Romero-Garcia, 2020; W. S & WF, 2004).

En el caso particular de CP, se ha observado el proceso de glucólisis acelerada con la posterior fermentación láctica, esto en procesos de normoxia en las regiones exteriores del tumor y en condiciones hipóxicas en las regiones más interiores (Vanhove et al., 2019; Vazquez, 2018).

Para poder llevar a cabo estos procesos, se ha visto que en CP las células tumorales presentan sobreexpresión de transportadores de glucosa (GLUTs) así como de hexocinasas (HXKs), de igual forma, otro tipo de enzimas que son promotoras del aumento de glucólisis como la fosfofructocinasa-1 (PFK), se han reportado sobre expresadas en adenocarcinoma de pulmón (Altenberg & Greulich, 2004; Higashi et al., 2000). Por su parte, la expresión de transportadores monocarboxilato (MCT) es de suma importancia en tumores de pulmón ya que llevan a cabo la regulación del lactato en el microambiente a través de su conversión en piruvato que puede seguir siendo oxidado o acumulado en el ciclo de Krebs para la construcción de

biomoléculas (Louis et al., 2016). Dentro de las vías más importantes que se han estudiado en CP que se benefician por el aumento de la tasa glucolítica, se ha visto que son; la vía de las pentosas fosfato, la vía sintética de las hexosamina y la vía de la serina-glicina (Vanhove et al., 2019).

f) Relación entre EGFR y metabolismo tumoral

Se ha estudiado en células tumorales de pulmón la relación existente entre la vía de EGFR y el fenotipo metabólico tumoral, en un estudio previo se observó una fuerte asociación entre la activación de la vía de EGFR y glucólisis acelerada, ellos observaron que a través del bloqueo de EGFR, puede haber una reducción en la glucólisis, fermentación de lactato y una regresión a la generación de energía a través de FOSFOX (De Rosa et al., 2015a). De igual forma, en otro estudio se muestra una fuerte influencia de EGFR en plasticidad metabólica de tumores pulmonares, aumentando la glucólisis y acidificación de microambiente a través de la fermentación láctica. También se pudo observar la influencia de la activación de EGFR en la promoción de rutas anabólicas estimuladas de igual forma por el fenotipo de glucólisis acelerada (Makinoshima et al., 2014).

La evidencia de la relación entre EGFR y metabolismo, ha incentivado el uso de terapia dirigida a diferentes marcadores metabólicos que pueda actuar de manera conjunta con los inhibidores de la vía de EGFR. En este sentido, se ha probado bloquear la enzima piruvato deshidrogenasa con el objetivo de bloquear la glucólisis aerobia, se observó que la terapia conjunta de este inhibidor, con radiación ionizante y TKIs, puede inducir un mayor efecto terapéutico disminuyendo la acidificación, en células tanto sensibles como resistentes a la terapia con inhibidores tirosin-cinasa (Dyrstad et al., 2021). Otro estudio demostró que durante el desarrollo de resistencia a la terapia con TKIs, se puede tener como objetivo terapéutico al metabolismo celular, en específico al transportador monocarboxilato 1 (MCT1), y de esta forma se puede atenuar la resistencia a la citotoxicidad causada por el tratamiento con TKIs (Huang et al., 2020).

Tratamiento con metformina en cáncer.

Metformina es un fármaco perteneciente a las biguanidas que se utiliza como terapia estándar para diabetes mellitus tipo 2, a nivel sistémico trabaja reduciendo la glucosa basal, postprandial, y mediante la inhibición de la gluconeogénesis. A nivel celular, es transportada a través de las membranas mediante la acción de transportadores orgánicos de cationes (OCTs). El efecto metabólico en células no transformadas causado por metformina es principalmente a través de una disfunción en el complejo 1 de FOSFOX, esto causa un déficit de generación de ATP que a su vez es censado por la protein-cinasa activada por AMP (AMPK), teniendo como respuesta la estimulación de rutas catabólicas para la generación de energía, aceleración de la incorporación de glucosa, así como la estimulación de receptores de insulina (Foretz et al., 2010; Gunton, Delhanty, Takahashi, & Baxter, 2003; Pernicova & Korbonits, 2014).

Análisis y estudios recientes en varios tipos de cáncer, mostraron un beneficio terapéutico al añadir metformina a las terapias convencionales utilizadas para el tratamiento de cáncer, en general, el mecanismo por el que metformina reduce los tamaños tumorales e inhibe la proliferación celular, es a través de la inhibición de mTOR gracias a la activación de AMPK inducida por el fármaco, este mecanismo atenúa la síntesis de proteínas y el crecimiento celular (Saraei, Asadi, Kakar, & Moradi-Kor, 2019).

Se han descrito diversos mecanismos anti-cancerígenos del tratamiento con metformina: 1) La activación de LKB1 y AMPK asociadas con la inhibición de la actividad de mTOR y sus efectores río abajo; 2) Inhibición de la síntesis de proteínas; 3) Arresto del ciclo celular; 4) Inducción de apoptosis y autofagia; 5) Disminución de los niveles de insulina en sangre; 6) Activación del sistema inmune; 7) Destrucción de células con características "stem"; 8) Prevención de formación de vasos sanguíneos (Barrios-Bernal et al., 2022)

Se ha observado también que otro importante efecto de la metformina en cáncer, es la prevención de la expresión de genes que son clave para la producción de

proteínas ribosomales, y proteínas que están envueltas en la expresión de otros genes (Kourelis & Siegel, 2012; Malek, Aghili, Emami, & Khamseh, 2013).

Metabólicamente se ha observado que la metformina puede ejercer sus efectos anticancerígenos tanto de forma dependiente, como de forma independiente de la expresión de AMPK, presentando la característica de oponerse a las modificaciones ejercidas por el efecto Warburg gracias al estímulo de la generación de energía a través de FOSFOX (Davidson et al., 2016; Hirpara et al., 2019). Células de cáncer con señalización de AMPK inactiva o desacoplada han mostrado una mayor sensibilidad al tratamiento con metformina (Carling, 2017). En este sentido existen diversos estudios donde se observa una estrecha relación entre la metformina, la activación de AMPK y los efectos anticancerígenos de esta interacción (Groenendijk et al., 2015; Z. Luo et al., 2019; Saraei et al., 2019).

Por otro lado, los efectos antitumorales de metformina en cáncer también pueden ser mediados de forma independiente a la expresión de AMPK. Se ha visto inhibición de proliferación en células deficientes en AMPK y LKB1, además, en algunos tipos de cáncer se ha visto que la regulación a la baja de AMPK no afecta el tratamiento con metformina y la inhibición de mTOR, en melanoma se observó reducción de viabilidad con metformina de forma independiente de la expresión de AMPK y en hepatocitos, se reportó que la inhibición de producción de glucosa por metformina, fue efectiva en células con expresión deficiente de AMPK y LKB1 (Foretz et al., 2010; Janjetovic et al., 2011; Sahra et al., 2011). Estos datos sugieren que metformina puede ejercer sus efectos a través de vías de señalización alternativas, que están encargadas del control y regulación de la proliferación de células de cáncer.

a) Metformina en cáncer de pulmón.

En años recientes se ha descrito recurrentemente el uso de metformina en CP como tratamiento adyuvante, en la clínica se ha observado que el tratamiento con metformina tiene efectos benéficos en la supervivencia de pacientes diabéticos con este tratamiento, observando reducción en cáncer y la mortalidad asociada con esta

neoplasia (Evans, Donnelly, Emslie-Smith, Alessi, & Morris, 2005; Landman et al., 2010).

En pacientes con CPCNP y diabetes mellitus, se reportó un beneficio en supervivencia en pacientes que fueron tratados con metformina respecto a los que no recibieron este tratamiento (Arrieta et al., 2016a). En otro estudio retrospectivo, se observó que la adición de metformina a la terapia convencional de TKIs de EGFR, aumentó la SLP en los pacientes que recibieron la combinación de estas terapias además de un incremento en la supervivencia media (Hung et al., 2019). Finalmente, en un estudio prospectivo, se comprueba el efecto benéfico de la adición de metformina al tratamiento con TKIs, reportando un aumento en SLP y supervivencia media (Arrieta et al., 2019a).

Se han propuesto diversas modificaciones a nivel celular como posibles mecanismos de acción de metformina en CP, dentro de los más estudiados y con resultados más concluyentes, se ha encontrado sinergia en el tratamiento combinado de metformina con TKIs de primera generación, asociado con la inactivación del eje PI3K/AKT/mTOR en líneas de CPCNP. La reducción del fenotipo celular de TEM, la regresión a características epiteliales y su asociación con un bloqueo de la señalización de Interlucina-6 (IL-6) cuando se combina metformina con TKIs de primera generación. De igual forma esta terapia combinada ha mostrado efectos favorables en la inhibición de la señalización desencadenada por receptores de factores de crecimiento como el receptor de factor de crecimiento de insulina (IGFR) y sus efectores río abajo como la protein-quinasa B (AKT) (JC et al., 2018; Morgillo et al., 2013; Zhao et al., 2014).

En resumen, los diversos mecanismos de acción de metformina en CP, aún no han sido completamente dilucidados, principalmente, como se modifica el cruce de caminos entre señalización y metabolismo celular, por lo que el presente trabajo evaluó dichas modificaciones, inducidas por la combinación de tratamientos afatinib-metformina.

HIPOTESIS

La adición de metformina al tratamiento con el TKI de segunda generación afatinib, incrementará su citotoxicidad de forma sinérgica, regulando a la baja la vía de señalización de EGFR, la TEM, así como marcadores de fenotipo glucolítico que se ven envueltos en el favorecimiento de proliferación celular, en líneas celulares de CPCNP con diferente estado mutacional de EGFR.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el tipo de interacción del tratamiento afatinib-metformina y su efecto sobre la vía de señalización de EGFR, la TEM, así como la regulación glucolítica, en líneas celulares de CPCNP con diferentes mutaciones en EGFR.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si existe una relación sinérgica, aditiva o antagónica con el tratamiento afatinib-metformina en líneas celulares de CPCNP.
- Determinar la apoptosis inducida por el tratamiento afatinib-metformina.
- Evaluar la expresión proteica y activación de la vía de señalización de EGFR y asociarla con la expresión y activación de AMPK.
- Evaluar la regulación causada por el tratamiento afatinib-metformina sobre los marcadores de TEM, fenotipo glucolítico, y FOSFOX.
- Medir los cambios en asimilación de glucosa y secreción de lactato, causados por el tratamiento afatinib-metformina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos y líneas celulares

Todas las líneas celulares de CPCNP estudiadas fueron adquiridas en ATCC (Estados Unidos de América). Las 3 líneas celulares utilizadas difieren en su estado mutacional de EGFR, lo que les confiere un patrón diferencial de sensibilidad al tratamiento con TKIs; La línea celular A549 cuenta con un EGFR en estado nativo, mientras que las células H1975 tienen un EGFR doblemente mutado (L858R en el exón 21 y T790M en el exón 20), y la línea celular HCC827 que posee una delección en el exón 19 de EGFR, dichas mutaciones le confieren a la proteína la capacidad de mantenerse constitutivamente activa. La línea celular A549 se ~~hizo crecer~~ cultivó en medio F12 (Gibco, 21700-075). De manera diferente, las líneas celulares H1975 y HCC827 se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado (Gibco, 31800-022). Ambos medios se complementaron con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco, 26140-079) y 1% de antibiótico penicilina-estreptomomicina-anfotericina B (MP Biomedicals, 091674049). Todas las líneas celulares se incubaron a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. De igual forma las 3 líneas celulares, se encontraban en pases tempranos (menores a pase 10), al momento de su descongelación.

Las líneas celulares se trataron con afatinib (laboratorios LC A-8644) y metformina (Sigma Aldrich PHR1084) durante 72 horas, según el esquema de concentraciones descrito en la tabla 1. Dichas concentraciones se obtuvieron con el uso de ensayos dosis-respuesta.

Tabla 1.

Líneas celulares	Concentraciones en medicamentos.	
	Metformina	Afatinib
A549	15 mM IC ₁₅	6 µM (Combo 1)
		7 µM IC ₅₀ (Combo 2)
		8 µM (Combo 3)
H1975	5 mM IC ₁₅	1 µM (Combo 1)
		2 µM IC ₅₀ (Combo 2)

		3 μ M (Combo 3)
		3 nM (Combo 1)
HCC827	8 mM IC ₁₅	4 nM IC ₅₀ (Combo 2)
		5 nM (Combo 3)

Para evaluar las modificaciones en el metabolismo, las vías de señalización y la expresión de proteínas modificadas por nuestro tratamiento, utilizamos los combos con el mayor grado de sinergia para cada una de las líneas celulares (combo 3 para A549, combo 3 para H1975 y combo 1 para HCC827).

Ensayo MTT

Para evaluar el efecto citotóxico del tratamiento con afatinib-metformina, se realizaron ensayos MTT con bromuro de tetrazolio (Sigma Aldrich M2128), esta técnica tiene su fundamento en la reducción mitocondrial de dicho compuesto por la acción de la succinato deshidrogenasa en células que se encuentran funcionalmente viables, posteriormente, las sales de formazán que son formadas en este proceso metabólico, son disgregadas para obtener una lectura colorimétrica de la cual es adquirida la absorbancia a 570 nm. Para ello, las líneas celulares A549, H1975 y HCC827 se sembraron por triplicado para cada tratamiento a una densidad de 1×10^4 en placas de 96 pozos, y se incubaron en medio suplementado con SFB al 10% a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Una vez que las células se adhirieron, se trataron de acuerdo a las concentraciones que se muestran en la Tabla 1.

Después de 72 horas se aspiró el medio de los pocillos y se reemplazó por 10 μ l de solución MTT (5 mg / ml) y 90 μ l de medio complementado.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Después, se aspiró el medio con MTT de los pocillos y se solubilizaron los cristales de formazán añadiendo 200 μ l de solución de DMSO-isopropanol (1: 1) a las placas. Finalmente, las absorbancias de se midieron mediante un lector de microplacas a 570 nm (BioTek ELX 808).

El porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante normalización de datos con la siguiente fórmula.

$\%Viabilidad = (Densidad\ \acute{o}ptica\ de\ c\acute{e}lulas\ tratadas \times 100) / Densidad\ \acute{o}ptica\ de\ c\acute{e}lulas\ control.$

Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado para cada línea celular.

Análisis de interacciones farmacológicas

Para determinar si el tratamiento combinado de afatinib-metformina produce efectos sinérgicos en citotoxicidad en las líneas celulares de CP, utilizamos el software Compusyn 1.0 (Biosoft) para obtener el índice de combinación (IC) correspondiente a cada interacción farmacológica, dicho programa está basado en el índice y modelo matemático propuesto por Chou y Talalay. En este sentido, se utilizaron los porcentajes de viabilidad obtenidos en el ensayo MTT, los valores menores a 1 en IC, denotan que las combinaciones terapéuticas tienen algún grado de sinergismo. De manera diferente, si el IC varía de 1 a 1.10, los tratamientos muestran un comportamiento de aditividad, y finalmente, los IC superiores a 1.10 revelan un efecto antagónico.

Ensayo de apoptosis

Para determinar la inducción de apoptosis por el tratamiento propuesto, se sembraron las 3 líneas celulares en placas de 24 pocillos en una confluencia de 5×10^4 . Una vez adheridas a la placa, se trataron según las concentraciones descritas en la Tabla 1 y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente, las células se separaron del fondo de los pocillos utilizando tripsina, se lavaron dos veces con 1X solución salina tampón fosfato (PBS), se colectaron en tubos de ensayo y se evaluaron con el kit de apoptosis "Annexin-V-FLUOS Staining Kit" (Roche 11988549001) mediante citometría de flujo (Life Technologies), agregando 1 μl de IP (para marcar células necróticas gracias a sus características intercalantes) y 1 μl de Anexina V FITC (para marcaje de células apoptóticas, debido a su unión a fosfatidil-serina cuando la misma se encuentra expuesta) diluidos en 300 μl de buffer de unión. Se llevó a cabo una incubación en obscuridad durante 30

minutos, y posteriormente se adquirieron los porcentajes para realizar el análisis en Flowjo v.10.1.

Ensayo de expresión en membrana de EGFR

La expresión de EGFR en la membrana celular se detectó mediante citometría de flujo. Las células se sembraron a una confluencia de 5×10^4 en placas de 24 pozos, se trataron acorde a la tabla 1 y se incubaron durante 72 horas. Luego, las células se despegaron, tratando de mantener íntegra la membrana celular con el objetivo de detectar la mayor cantidad de expresión de la proteína, se lavaron dos veces con PBS 1x y se fijaron con la solución tampón Cytfix (BD 554655). Posteriormente, las células se lavaron una vez con solución de PBS, se tiñeron con un anticuerpo acoplado a un fluoróforo (ficoeritrina, PE) dirigido a EGFR, y se realizó una incubación durante 30 minutos. Después de la incubación, el exceso de anticuerpo se lavó una vez con PBS 1X y la detección del mismo se realizó mediante citometría de flujo, el análisis correspondiente se realizó con Flowjo v.10.1, donde se determinó el porcentaje de expresión de EGFR en membrana para cada una de las líneas celulares y su respectivo tratamiento.

Western blot

Las líneas celulares se sembraron en una confluencia de 3×10^5 en placas de 6 pozos, luego se trataron con las concentraciones de tratamientos mencionadas anteriormente y se incubaron durante 72 horas. Posteriormente, las células se lisaron con el sistema de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology SC-24948A), complementado con inhibidores de proteasas, inhibidor de fosfatasa, y PMSF, adicional al lisado químico, se llevó a cabo un rompimiento mecánico de membrana con la ayuda de scrappers. Los lisados celulares se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad # 5000205), adquiriendo las absorbancias correspondientes a 570 nm, la interpolación de datos se realizó en Excel para obtener las concentraciones de proteína $\mu\text{g/ml}$. Se cargaron cantidades iguales de proteínas en los pocillos del gel de poliacrilamida y se analizaron mediante el sistema de electroforesis de separación de proteínas SDS-PAGE (25 ng para proteínas totales y 50 ng para las proteínas fosforiladas). Posteriormente, los lisados

de proteína ya separados se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m precortadas utilizando el Trans-Blot Turbo transfer System (Bio-Rad). Estas membranas se bloquearon con una solución de albúmina de suero bovino (ASB) al 5%, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 1X durante 10 minutos y posteriormente se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios específicos contra EGFR (SC-311550; 1: 1000), P-EGFR (SC-101669; 1: 1000), AKT (SC-5298; 1: 1000), P-AKT (SC- 514032; 1: 1000), GLUT-1 (SC-3777228; 1: 1000), GLUT-3 (SC-74399; 1: 1000), HKI-I (SC-46695; 1: 1000), HKI- II (SC-374091; 1: 1000), GAPDH (SC-47724; 1: 10000), P70S6K (Cell signalling 9202S; 1: 1000), P-P70S6K (Cell signalling 9205S; 1: 1000), Vimentina (Cell signalling 5741S; 1: 1000), N-Cadherina (Cell signalling 13116S; 1: 1000), β -Catenina (Cell signalling 8480S; 1:1000), E-Cadherina (SC-8426 1:1000), AMPK (Cell signalling 2603S; 1:1000), P-AMPK (Cell signalling 25315S; 1:1000), P-PKM2 (Cell signalling 3827S; 1: 1000) y el cóctel OXPPOS (Abcam # 110413; 1: 1000). Al día siguiente, las membranas de nitrocelulosa se lavaron 5 veces durante 10 minutos con PBS-Tween 1X, para eliminar el exceso de anticuerpos, y luego se añadió una solución de ASB al 5% que contenía anticuerpos secundarios específicos dirigidos de ratón o conejo según el caso que se presentara (Li-Cor 1:5000). Después de una hora de incubación, las membranas se lavaron tres veces durante 15 minutos con PBS-Tween 1X. Las membranas fueron expuestas al sustrato de revelado (Li-Cor) durante 5 minutos y se analizaron con el escáner de transferencia C-Digit (Li-Cor). A continuación, la densidad de bandeos se cuantificó con el software ImageJ (NIH). Se realizaron 3 ensayos de western-blot independientes para cada proteína.

Zimograma

Las líneas celulares se trataron y se incubaron en placas de 6 pozos durante 72 horas. Se analizaron MMP-2 (Cell signalling 87809S; 1:1000) y MMP-9 (Cell signalling 13667S 1:1000) mediante zimografía en gel. Las células se homogeneizaron en un tampón de lisis con inhibidores de proteasa. El sobrenadante se separó por electroforesis usando geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones no reductoras. Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos

veces con Triton X-100 al 2,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente para eliminar el dodecil-sulfato de sodio (SDS). A continuación, los geles se incubaron a 37°C durante 24 horas en una solución activadora. La actividad de MMP apareció como una banda clara que contrastaba con un fondo azul. Se realizaron dos ensayos independientes para cada una de las MMPs.

Ensayo de captación de glucosa

Las células se sembraron en placas de 6 pozos a una confluencia de 1×10^5 y se incubaron durante 24 horas. Después, el medio de cultivo inicial se reemplazó con medio suplementado con SFB al 2% y las placas se incubaron durante toda la noche. A la mañana siguiente, el medio mencionado se reemplazó con solución buffer Krebs Ringer Phosphate Hepes (KRPH), junto con el tratamiento como unidroga y combinado afatinib-metformina, y las placas se incubaron durante 3 horas. Posteriormente, se añadió a los pozos 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato (2DG6P) sin insulina con el objetivo de llevar a cabo la detección de la misma por método de colorimetría, y las placas se incubaron durante 35 minutos. Finalmente, se continuó con el protocolo del kit, (Sigma Aldrich MAK083), según las instrucciones del fabricante y se adquirió en el lector de microplacas a 420 nm. Las concentraciones en pmol de 2DG6P se obtuvieron mediante la interpolación de las absorbancias con el uso de la curva standard incluida en el kit.

Ensayo de secreción de lactato

Las células se sembraron a una confluencia de 1×10^5 en placas de 6 pozos y se incubaron durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con la combinación o unidroga de afatinib-metformina, se incubaron durante 3 horas para que llevara a cabo su efecto el tratamiento evitando que se empezara a ejercer citotoxicidad para reducir el sesgo del ensayo y se procesaron acorde a las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich MAK064). La lectura se realizó en el lector de microplacas a 570 nm. Las concentraciones en ng/ μ l se obtuvieron mediante la interpolación de las absorbancias con el uso de la curva standard incluida en el kit.

Análisis estadístico

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar (DE). Los datos proporcionados por el MTT y los ensayos de anexina V / yoduro de propidio se analizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Los resultados de los ensayos de proteína, absorción de glucosa y secreción de lactato se analizaron mediante pruebas ANOVA de una vía. Todos los análisis mencionados se realizaron con las pruebas post-hoc de Tukey en el software GraphPad (Scientific, San Diego, California, EE. UU.). Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS.

Las líneas utilizadas para el presente trabajo con su estado mutacional de EGFR se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2.

Línea celular	Estado mutacional (EGFR)
A549	Estado nativo
H1975	L858R en exón 21 y T790M en exón 20
HCC827	Deleción en exón 19

Tabla 2. Estado mutacional de EGFR en líneas celulares.

Efecto citotóxico inducido por el tratamiento afatinib-metformina y análisis de interacción farmacológica. El efecto citotóxico y la interacción del tratamiento con afatinib-metformina, se evaluó a través de ensayos MTT. Se encontró que metformina tiene la capacidad de sensibilizar a la línea celular resistente a TKI, H1975, mostrando una tendencia al aumento de la capacidad citotóxica de afatinib, sin embargo, no se pudieron encontrar resultados estadísticamente significativos. La línea celular sensible HCC827, mostró inhibición por el combo número 1 cuando la comparamos con 3 nM de tratamiento con afatinib (38% vs 60% $p= 0.0046$). Curiosamente, la línea celular A549 que cuenta con EGFR en estado nativo, presentó un efecto citotóxico notable cuando afatinib se combina con metformina,

se observó sensibilización de esta línea celular, con una mayor citotoxicidad en el combo número 3 de tratamiento en comparación con 8 μ M de afatinib (24% vs 50% $p= 0.0054$) (Fig. 4A)

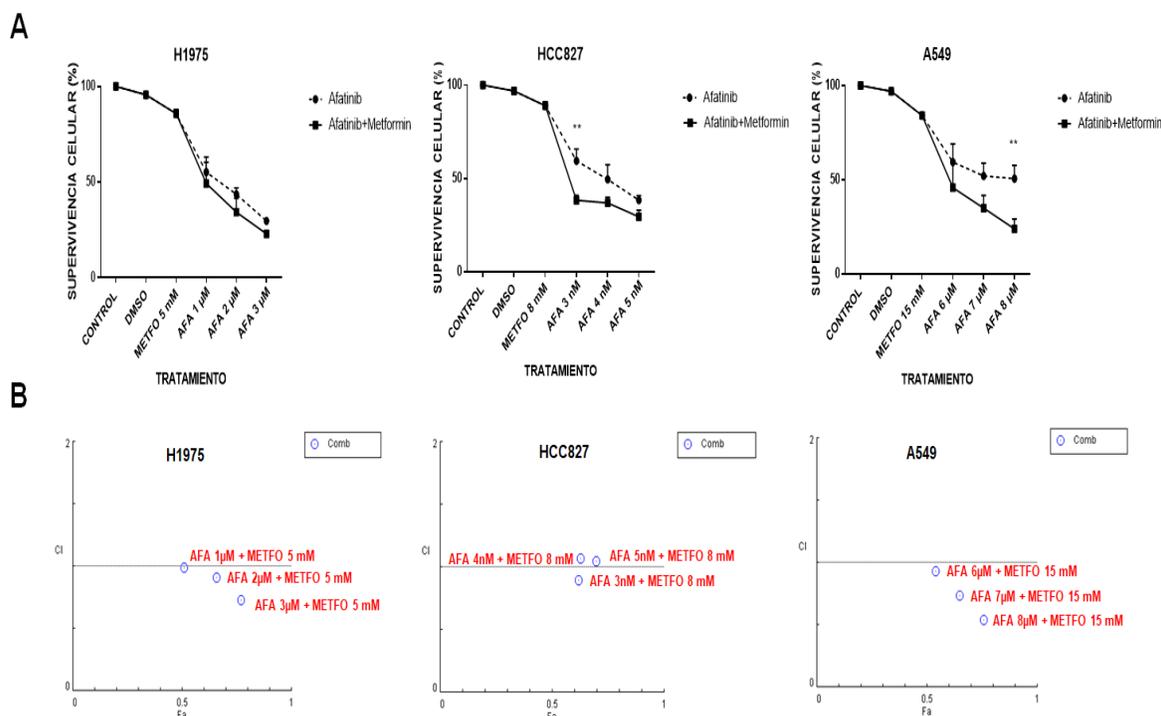


Figura 4. Citotoxicidad e interacción de la combinación afatinib-metformina (A) Efecto citotóxico de afatinib (AFA) solo o en combinación con metformina (METFO) en las líneas celulares de CPCNP H1975, HCC827 y A549. Las células se sembraron y trataron con el esquema descrito anteriormente durante 72 horas, se realizó el ensayo MTT como mencionamos en materiales y métodos. Los puntos representan las medias de 3 experimentos independientes por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. **(B) Gráficos de interacción farmacológica en las líneas celulares de CPCNP.** Los gráficos mostraron que la línea celular H1975 mostró sinergismo con las dos concentraciones más altas de afatinib (2 μ M y 3 μ M), la línea celular HCC827 solo tenía cierto grado de sinergia con la concentración más baja de afatinib (3 nM). Por su parte la línea celular A549, presentó efecto sinérgico en los tres tratamientos combinados (el eje de las X representa la fracción celular afectada y en el eje de las Y, se representa el índice de combinación).

Posteriormente se analizó el tipo de interacción entre ambos medicamentos con el programa Compusyn, que se basa en el método propuesto por Chou-Talalay para

determinar el índice de combinación de tratamientos (IC). Las gráficas de interacción farmacológica obtenidas de Compusyn indican antagonismo cuando los tratamientos se ubican por encima del umbral, el efecto aditivo se ubica cercano al umbral y el efecto sinérgico se refleja cuando los puntos de tratamiento están por debajo del umbral. Las tres líneas celulares mostraron por lo menos una combinación con efecto sinérgico en uno o más tratamientos combinados que se localizaron por debajo del umbral (Fig. 4B).

El cálculo de índice de combinación entre afatinib-metformina reveló que la línea celular H1975 muestra un efecto sinérgico con 2 μ M y 3 μ M de afatinib combinado con metformina 5mM. La línea celular HCC827 únicamente mostró un ligero sinergismo con 3 nM de afatinib combinado con 8 mM de metformina y finalmente la línea celular A549 tuvo sinergismo en sus tres concentraciones de afatinib combinadas con 15 mM de metformina. Por otra parte, Ninguna de las combinaciones mostró antagonismo en alguna de las líneas celulares de LC. Los valores de índice de combinación encontrados para cada línea celular se encuentran reflejados en la Tabla 3.

Cell line	Treatment	Combination index (CI)	Description
H1975	AFA 1 μ M+ METFO 5 mM	.99173	Cercano a aditivo
	AFA 2 μ M+ METFO 5 mM	.90775	Sinergismo leve
	AFA 3 μ M+ METFO 5 mM	.72703	Sinergismo moderado
HCC827	AFA 3 nM+ METFO 8 mM	.89682	Sinergismo leve
	AFA 4 nM+ METFO 8 mM	1.06555	Cercano a aditivo
	AFA 5 nM+ METFO 8 mM	1.04850	Cercano a aditivo
A549	AFA 6 μ M+ METFO 15 mM	.93289	Cercano a aditivo
	AFA 7 μ M+ METFO 15 mM	.73329	Sinergismo moderado
	AFA 8 μ M+ METFO 15 mM	.53721	Sinergismo

Tabla 3. Valores de índices de combinación del tratamiento afatinib-metformina.

En la tabla 4 se pueden observar los rangos de cada tipo de interacción, acorde al inserto del software Compusyn.

<i>CI</i>	Description	Symbol
< 0.1	Very Strong Synergism	████████████████████
0.1–0.3	Strong Synergism	██████████████████
0.3–0.7	Synergism	████████████████
0.7–0.85	Moderate Synergism	██████████████
0.85–0.90	Slight Synergism	██████████
0.90–1.10	Nearly Additive	██████
1.10–1.20	Slight Antagonism	- - - - -
1.20–1.45	Moderate Antagonism	- - - - -
1.45–3.3	Antagonism	■ ■ ■ ■ ■
3.3–10	Strong Antagonism	■ ■ ■ ■ ■
> 10	Very Strong Antagonism	■ ■ ■ ■ ■

Tabla 4. Intervalos para cada tipo de interacción.

Inducción de apoptosis.

Para corroborar la inducción de citotoxicidad y muerte causada por nuestro tratamiento, se realizó un ensayo de apoptosis. Las tres líneas celulares revelaron un aumento en la inducción de apoptosis estadísticamente significativo cuando se añade metformina a la terapia con afatinib. La línea celular H1975 exhibió una mayor inducción de apoptosis en el combo número 1 en comparación con afatinib 1 μ M (48% frente a 26% $p= 0.0001$). En la línea celular HCC827, la inducción de apoptosis más alta fue por el combo número 2 en comparación con afatinib 4nM (58% vs 45% $p= 0.0041$). Finalmente, la línea celular A549 mostró una mayor inducción de apoptosis por el combo número 1 en comparación con afatinib 6 μ M (50% vs 28% $p= 0.013$) (Fig 5).

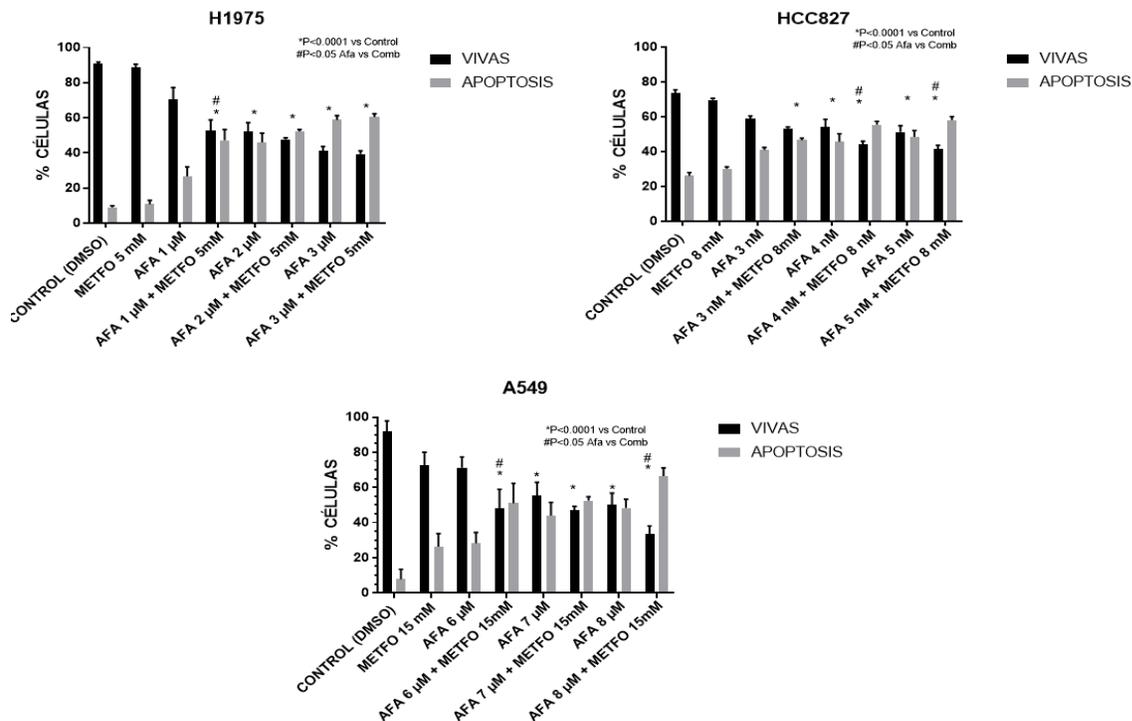


Figura 5. Inducción de apoptosis causada por el tratamiento afatinib-metformina. Se analizaron 5.000 eventos para cada ensayo. Las células se sembraron y trataron con el esquema descrito anteriormente durante 72 horas y luego se evaluaron con el kit de apoptosis y citometría de flujo. Se determinaron como células vivas, aquellas que no presentaron ninguna marca, células en apoptosis, aquellas con marca de Anexina V, y finalmente células necróticas, aquellas que presentaron marca con yoduro de propidio. Las barras representan las medias de 3 experimentos independientes por triplicado. Las referencias estadísticas del análisis ANOVA son presentadas en cada gráfico. * $p < 0.0001$ vs control, # $p < 0.05$ Afa vs Comb.

A partir de este punto, solo se evaluaron las combinaciones con mayor grado de sinergismo para cada una de las líneas celulares (Tabla 2)

Regulación a la baja de la expresión de EGFR en membrana celular, por el tratamiento con afatinib-metformina.

Para evaluar el impacto del tratamiento combinado en EGFR, se evaluaron los cambios en el porcentaje de expresión de esta proteína en la membrana celular mediante citometría de flujo. Se realizó una tinción tratando de no comprometer la membrana celular para detectar la mayor cantidad de proteína posible en las líneas celulares H1975, HCC827 y A549. La línea celular H1975 mostró una reducción en

EGFR del 14% en el tratamiento combinado versus afatinib como unidrogas ($p= .0120$). Por el contrario, la línea celular HCC827 no mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de EGFR en membrana entre afatinib y su combinación con metformina. Curiosamente, la línea celular A549 mostró una mayor inhibición de EGFR con el tratamiento combinado en comparación con afatinib con una reducción del 15.7% ($p= 0.0433$) (Fig. 6).

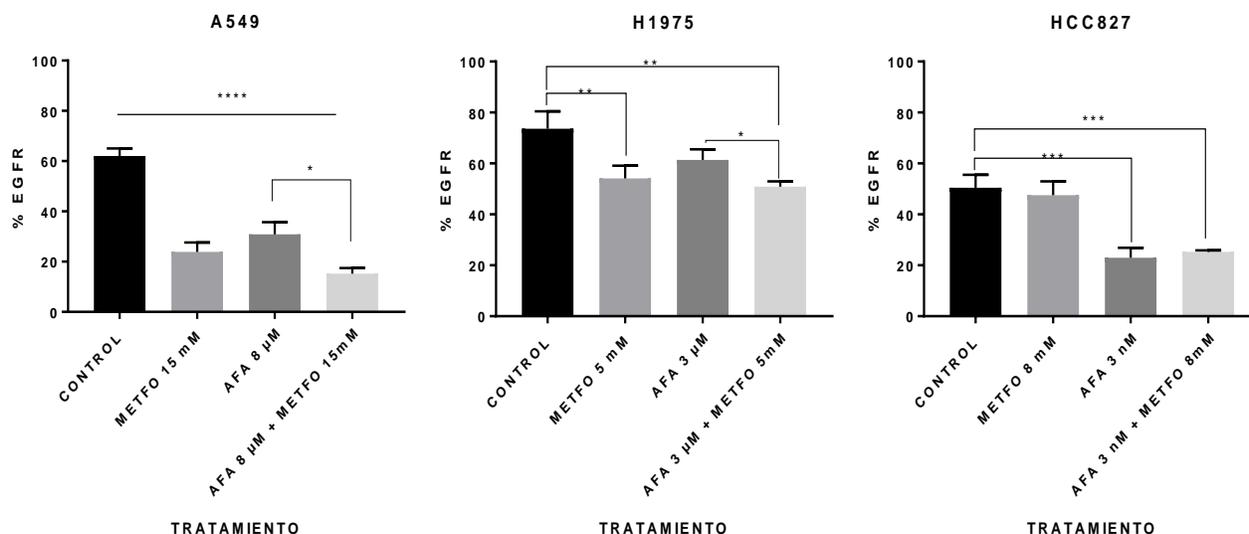


Figura 6. Regulación de EGFR en membrana por afatinib-metformina. Las células se sembraron y trataron con sus dosis respectivas durante 72 horas, luego se analizaron 5.000 eventos mediante citometría de flujo con un anticuerpo específico para EGFR. Las barras representan las medias de 3 experimentos independientes por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Regulación de la vía de señalización desencadenada por EGFR. Para dilucidar el impacto del tratamiento en la vía de EGFR, realizamos un ensayo western-blot. Se detectó inhibición de la vía de EGFR en todas las líneas celulares cuando se añadió el tratamiento con metformina. La línea celular H1975 mostró diferencias estadísticamente significativas en la inhibición de la proteína total de EGFR y formas fosforiladas de EGFR, AKT y P70S6K (Fig. 7) Como era de esperar, la línea celular HCC827 mostró inhibición del eje con el tratamiento con afatinib, por su parte, la metformina también mostró inhibición de las proteínas activadas en esta línea celular (Fig. 7) así como de las proteínas totales (Información suplementaria Fig.1),

siendo la proteína ribosómica P70S6K la que reportó una mayor reducción. En la línea celular A549 observamos una tendencia al aumento de las formas activas con afatinib, sin embargo, cuando metformina se administra como unidroga y en combinación con afatinib, reduce notablemente las proteínas totales, con la excepción de AKT (información suplementaria, figura 1), así como las formas fosforiladas de esta vía de señalización (Fig. 7).

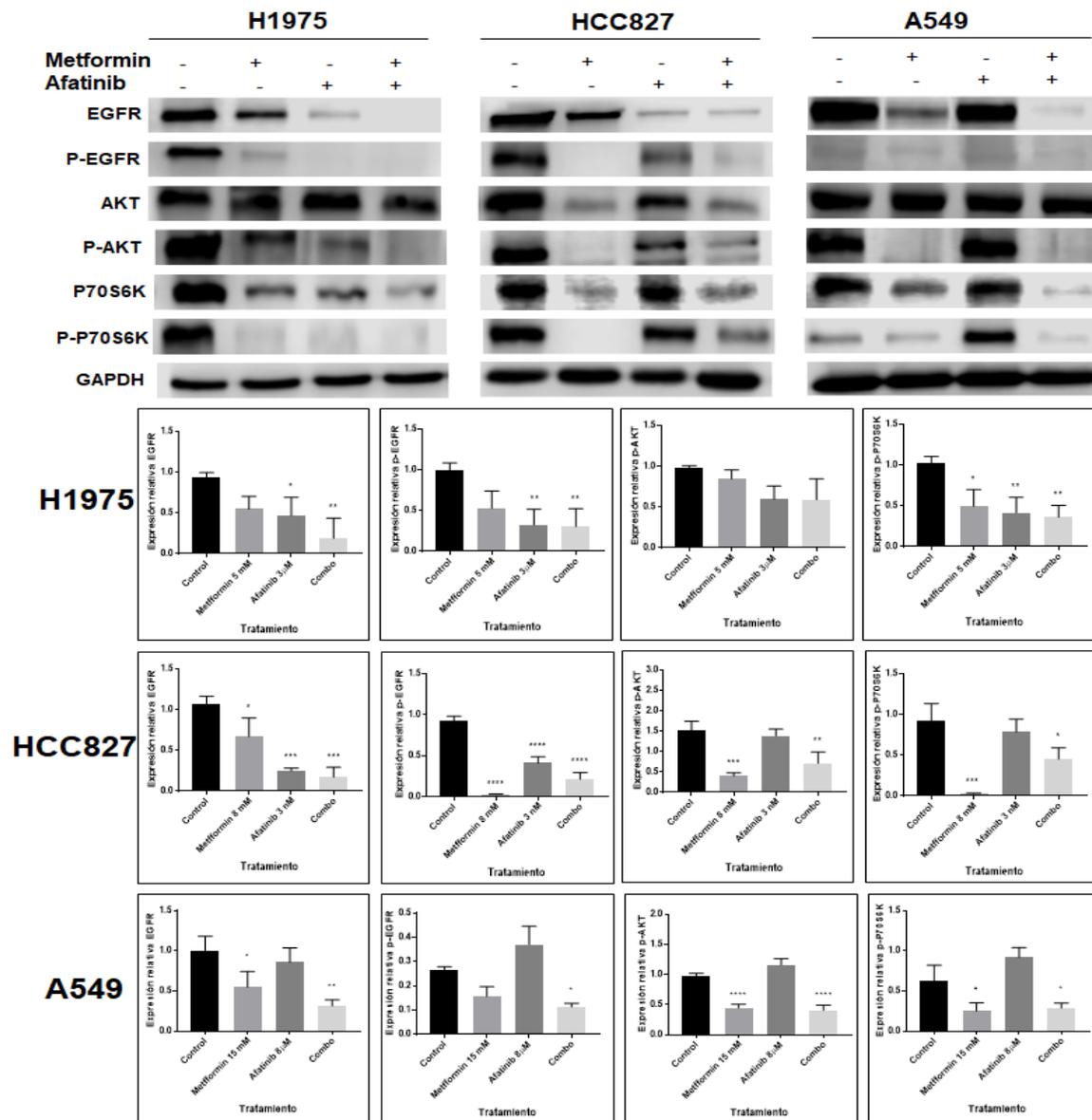


Figura 7. Efecto del tratamiento combinado afatinib-metformina sobre la vía de señalización de EGFR. Las células se sembraron y trataron durante 72 horas con sus respectivas concentraciones de metformina-afatinib. Se utilizó GAPDH como control constitutivo, las imágenes se analizaron mediante Image (NIH) y se representaron como barras. Las imágenes son representativas de tres

experimentos independientes y los resultados de la densitometría de las bandas correspondientes a las diferentes proteínas, se presentan como media \pm desviación estándar de estos tres experimentos. Los datos se normalizaron con respecto al control endógeno y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

De forma complementaria, se realizó un comparativo en los cambios de expresión (reducción) de las proteínas fosforiladas, respecto a las proteínas totales, para clarificar si los efectos de los fármacos se dan principalmente en las formas activadas, en las totales o en ambas (Tabla 5). Como se puede observar en la Tabla 5, los cambios que se atribuyen a metformina, se reflejan en ambas formas, pero principalmente en las formas fosforiladas, de igual forma, se observa una mayor disminución de expresión de dichas proteínas, cuando el tratamiento combinado es administrado.

H1975	P. Total	P. Fosfo	Cambio en Expresión (Fosfo/total %)	HCC827	P. Total	P. Fosfo	Cambio en Expresión (Fosfo/total %)	A549	P. Total	P. Fosfo	Cambio en Expresión (Fosfo/total %)
EGFR				EGFR				EGFR			
Control	1.831	1.876	2.468	Control	1.930	1.927	-0.178	Control	1.803	1.503	-16.642
Metformina	1.066	0.931	-12.641	Metformina	1.220	0.155	-87.287	Metformina	0.786	0.603	-23.223
Afatinib	0.891	0.560	-37.174	Afatinib	0.478	0.455	-4.677	Afatinib	1.252	1.252	-0.027
Combo	0.338	0.334	-1.183	Combo	0.296	0.243	-18.009	Combo	0.475	0.270	-43.066
AKT				AKT				AKT			
Control	1.302	0.976	-25.046	Control	1.288	1.516	17.644	Control	1.333	1.297	-2.668
Metformina	1.083	0.846	-21.897	Metformina	0.738	0.406	-45.046	Metformina	1.029	0.593	-42.339
Afatinib	0.838	0.397	-52.631	Afatinib	1.241	1.187	-4.370	Afatinib	0.999	1.539	54.071
Combo	0.823	0.390	-52.645	Combo	0.788	0.513	-34.904	Combo	0.867	0.536	-38.113
P70S6K				P70S6K				P70S6K			
Control	1.560	1.420	-8.984	Control	0.966	0.850	-12.070	Control	1.366	1.195	-12.532
Metformina	0.842	0.697	-17.184	Metformina	0.046	0.016	-66.466	Metformina	0.809	0.495	-38.839
Afatinib	0.892	0.617	-30.856	Afatinib	0.873	0.833	-4.545	Afatinib	1.297	1.553	19.766
Combo	0.595	0.361	-39.319	Combo	0.490	0.465	-5.092	Combo	0.426	0.343	-19.438

Tabla 5. Cambios en expresión de proteínas fosforiladas en comparación con proteínas totales.

Regresión de marcadores de TEM. Una vez confirmada la inhibición de la vía de EGFR por el tratamiento con afatinib-metformina, se averiguó si el tratamiento propuesto afecta la expresión de proteínas relacionadas con TEM. Se llevaron a cabo ensayos de western-blot y zimograma para medir los niveles de proteínas clave y metaloproteasas de matriz. La línea celular H1975 mostró inhibición de todos los marcadores de TEM, principalmente sobre β -catenina ($p = 0,0067$ frente al control), con el tratamiento combinado. La línea celular HCC827 mostró inhibición

principalmente en N-Cadherina con el tratamiento combinado ($p= 0,0028$ frente al control). De la misma manera, el tratamiento combinado inhibió la vimentina y la N-cadherina en la línea celular A549. Por su parte, se pudo observar un incremento en el marcador epitelial E-cadherina en las 3 líneas celulares tanto con los tratamientos como unidroga, como con la combinación. Con respecto a la expresión de las enzimas MMP, todas las líneas celulares mostraron una reducción similar mediante la administración de metformina, afatinib y su combinación (Fig. 8).

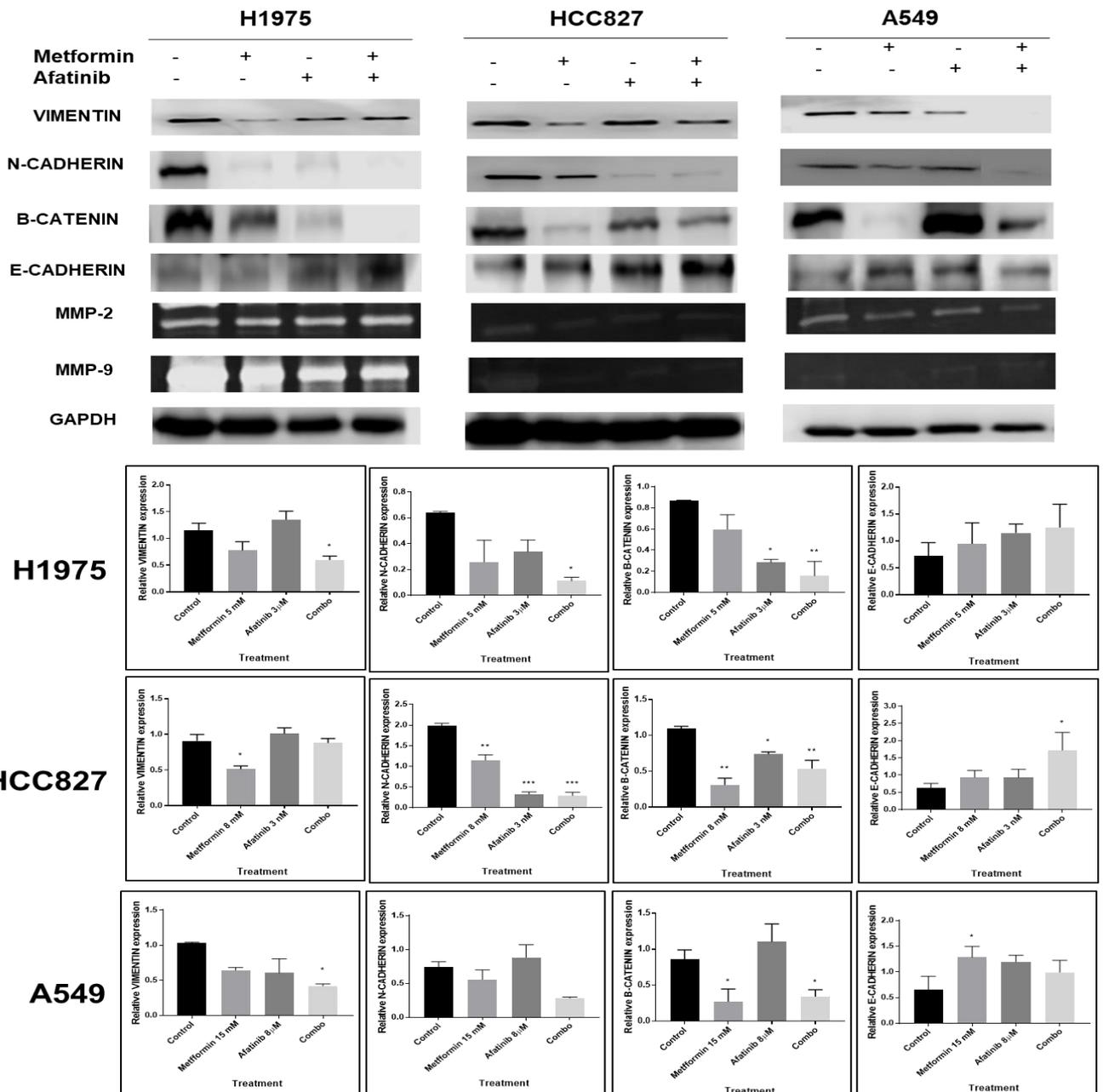


Figura 8. Reducción de TEM mediante la administración de metformina en líneas celulares de CPCNP. Las células se sembraron y trataron durante 72 horas con sus respectivas concentraciones de metformina-afatinib. Se utilizó GAPDH como control constitutivo, las imágenes se analizaron mediante Image (NIH) y se representaron como barras. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y los resultados del área se presentan como media \pm desviación estándar de estos tres experimentos. Los datos se normalizaron con respecto al control endógeno y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Modificación inducida por el tratamiento afatinib-metformina en marcadores metabólicos, asimilación de glucosa, y secreción de lactato.

Para evaluar si la regulación a la baja inducida por afatinib-metformina en la vía de señalización de EGFR puede modificar la vía glucolítica, se midió la expresión de transportadores de glucosa, enzimas y subunidades de FOSFOX, que son clave para definir un fenotipo glucolítico de las células CP. Además, se evaluaron los cambios en la captación de glucosa celular y la secreción de lactato.

En primer lugar, evaluamos los cambios en la expresión de GLUTs, HXKs, AMPK y formas fosforiladas de AMPK y piruvato cinasa M2 (PKM2) mediante ensayos de western-blot.

La línea celular H1975 mostró inhibición con todos los tratamientos sobre la expresión de GLUT1 y GLUT3. La terapia de combinación inhibió GLUT3 ($p = 0.0003$ respecto a control), de igual forma, metformina en monoterapia y en combinación con afatinib inhibió GLUT1 en la línea celular HCC827. La línea celular A549 presentó reducción en ambos transportadores con el tratamiento con metformina, además, el tratamiento combinado presentó inhibición de GLUT1 y GLUT3 ($p = 0.0348$ y $p = 0.0011$ respecto a control respectivamente) (Fig. 9). Ninguna de las líneas celulares mostró cambios en AMPK total (información suplementaria, figura 2); sin embargo, las líneas celulares A549 y H1975 mostraron un aumento notable en los niveles de P-AMPK cuando se añadió metformina ($p = 0.0357$ y $p < 0.0001$ respecto al control, respectivamente). Los niveles de HXK1 no mostraron cambios en alguna de las líneas celulares en respuesta al tratamiento y la línea celular A549 no mostró expresión basal de HXK2. Por otro lado, las líneas celulares H1975 y

HCC827 mostraron una reducción notable en los niveles de HXK2 con el tratamiento con metformina. Finalmente, las líneas celulares A549 y HCC827 mostraron reducción en la expresión de p-PKM2 con metformina y de igual forma con los tratamientos combinados (Fig. 9). Por el contrario, la línea celular H1975 solo mostró reducción de p-PKM2 con el tratamiento combinado (información suplementaria, figura 2).

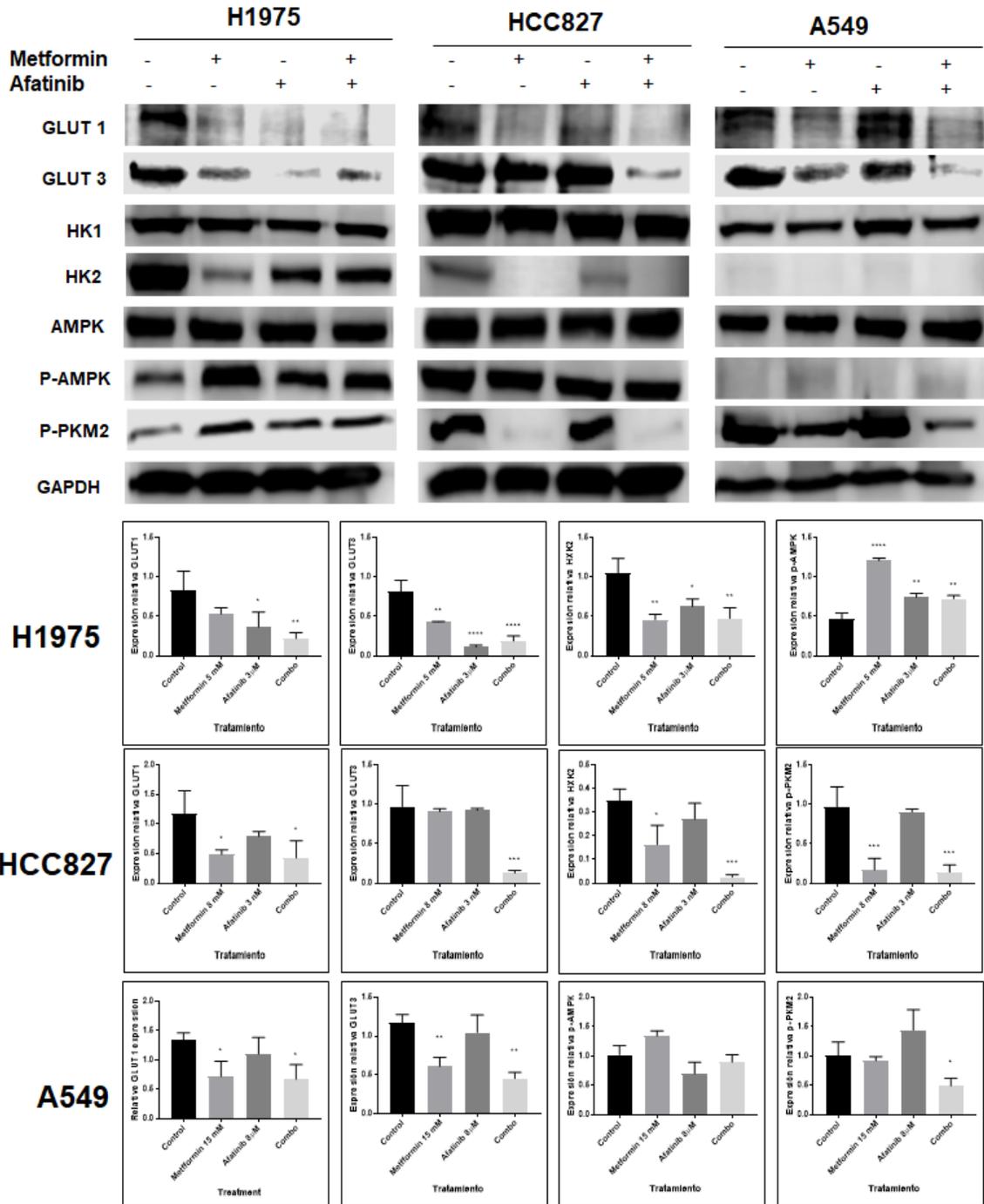


Figura 9. Efecto del tratamiento combinado de afatinib-metformina sobre enzimas y proteínas de la vía glucolítica. Las células se sembraron y trataron durante 72 horas con sus respectivas concentraciones de metformina-afatinib. Se utilizó GAPDH como control constitutivo, las imágenes se analizaron mediante Image (NIH) y se representaron como barras. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y los resultados del área se presentan como media \pm desviación estándar de estos tres experimentos. Los datos se normalizaron con respecto al

control endógeno y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

En cuanto a la relación de AMPK total y su forma fosforilada, podemos observar en la tabla 6, que el principal aumento fue por el efecto de metformina, y esto principalmente en la línea celular H1975, donde este efecto es notable cuando se adiciona dicho tratamiento.

H1975	P. Total	P. Fosfo	Cambio en Expresión (Fosfo/total %)	HCC827	P. Total	P. Fosfo	Cambio en Expresión (Fosfo/total %)	A549	P. Total	P. Fosfo	Cambio en Expresión (Fosfo/total %)
AMPK				AMPK				AMPK			
Control	0.907	0.596	-34.328	Control	1.930	1.932	0.075	Control	0.891	0.824	-7.550
Metformina	1.086	1.556	43.199	Metformina	1.220	1.144	-6.303	Metformina	1.021	0.844	-17.279
Afatinib	1.057	0.955	-9.585	Afatinib	1.148	1.107	-3.514	Afatinib	1.042	0.870	-16.519
Combo	0.861	0.932	8.222	Combo	1.096	1.025	-6.492	Combo	1.051	0.899	14.472

Tabla 6. Relación AMPK, proteína total y forma fosforilada.

De forma complementaria, exploramos el impacto del tratamiento con afatinib-metformina sobre la captación de glucosa mediante la evaluación de incorporación celular de 2DG6P y la secreción de lactato, a través de su medición en medio de cultivo. La línea celular H1975 tuvo una reducción de 33,4 pmol con el tratamiento combinado en comparación con el control ($p = 0,0009$). La línea celular A549 mostró una reducción de 42,6 pmol en la detección de la captación de 2DG6P ($p = <0,0001$) por el tratamiento combinado. Acorde a lo esperado, la línea celular HCC827 mostró inhibición de la captación de glucosa con todos los tratamientos ($p = <0,0001$) (Fig. 10A).

Como se muestra en la Figura 10B, la línea celular H1975 no mostró significancia estadística en la secreción de lactato, sin embargo, las líneas celulares HCC827 y A549 presentaron una reducción con el tratamiento combinado de 6.0 ng/ μ l ($p = 0.0005$) y 4.6 ng/ μ l ($p = 0,04$) respectivamente, frente al control.

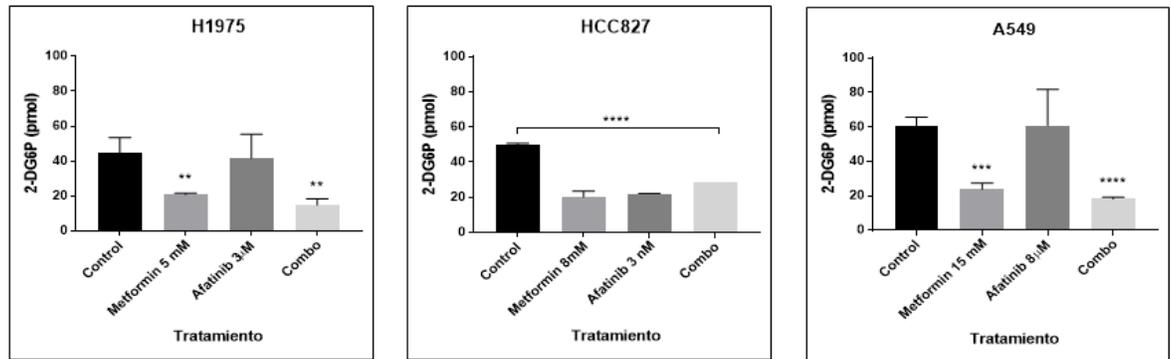
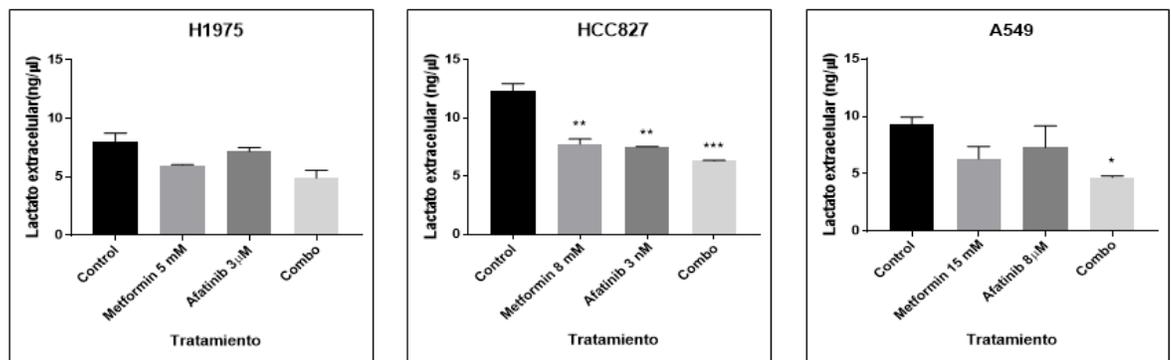
A**B**

Figura 10. Modificaciones de la captación de glucosa celular y la secreción de lactato. (A). Para el ensayo de captación de glucosa, se sembraron células y se administró tratamiento con metformina-afatinib en tampón KRPH durante 3 horas, luego se añadió 2-DG6P y posteriormente se evaluó su consumo mediante ELISA. (B). Las células se sembraron y luego se trataron con metformina-afatinib durante 3 horas, los niveles de lactato presentes en el medio de cultivo se midieron mediante ELISA. Los gráficos representan las medias de dos experimentos independientes por duplicado. Se realizó un análisis ANOVA de una vía para determinar la significancia estadística * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

DISCUSIÓN.

La metformina es una biguanida que actúa como un potente modificador del metabolismo celular, reduce la glucosa basal y posprandial y su transporte a través de las membranas celulares se lleva a cabo por la acción de transportadores OCTs. Los principales efectos sobre las células no transformadas tratadas con metformina

incluyen: inhibición de gluconeogénesis hepática, aumento y aceleración de la captación de glucosa, y estimulación de los receptores de insulina (IRs) (Foretz, Guigas, Bertrand, Pollak, & Viollet, 2014; Gunton et al., 2003; Pernicova & Korbonits, 2014)

A la fecha el tratamiento con metformina en cáncer presenta una gran variabilidad tanto en los resultados en investigación básica como en la clínica. En este trabajo nos dimos a la tarea de probar la eficacia del EGFR-TKI de segunda generación afatinib solo o en combinación con metformina en líneas celulares de CPCNP con diferente estado mutacional de EGFR. De igual forma, dilucidar algunas de las vías metabólicas y de señalización que se pueden ver modificadas por la aplicación de este tratamiento.

Trabajos previos donde se combinó metformina con TKIs de primera generación como el gefitinib, han demostrado inducción de citotoxicidad, inhibición de resistencia al tratamiento y sensibilización al efecto citotóxico del TKI en líneas celulares de CP con resistencia a inhibidores de tirosin-cinasa (L et al., 2020; Ling Li et al., 2020; Morgillo et al., 2013).

Nuestro trabajo demostró que la combinación afatinib-metformina, tiene efecto sinérgico en la inducción de citotoxicidad y de apoptosis en las tres líneas celulares de trabajo. De forma interesante, las líneas celulares que cuentan con baja afinidad a TKIs (A549 y H1975), presentaron un mayor efecto sinérgico en la inducción de citotoxicidad, mostrando un alto grado en la línea A549, esto quizá a un efecto directo en AMPK en esta línea celular. Estudios previos han mostrado que el TKI de primera generación erlotinib en combinación con metformina puede inhibir la proliferación celular y reducir el crecimiento tumoral en un modelo murino derivado de la línea celular A549. Por el contrario, otro estudio en líneas de CP, midió el índice de combinación entre gefitinib y metformina, encontrando antagonismo en la línea A549 y sinergismo en el caso de la línea celular H1975. Esta variabilidad en resultados, parece ser dependiente del tipo de TKI, su concentración, al igual que las concentraciones de metformina utilizadas, y de igual forma, con los niveles basales de expresión de las moléculas que pueden ser modificadas por estos

tratamientos. Además, se ha visto que las concentraciones elevadas de fármacos, pueden tener una gran influencia en el análisis de interacción entre diferentes tratamientos (Chao et al., 2015; Chen et al., 2015; Morgillo et al., 2016; TS et al., 2017).

En la inducción de apoptosis por nuestros tratamientos, se pudo observar un rango del 10 al 60 % considerando los tratamientos como monoterapia, y la combinación de los mismos. En estudios previos se reportó que el principal mecanismo de muerte inducido por afatinib como monoterapia es apoptosis, mientras que por el lado de metformina se ha reportado arresto de ciclo celular, autofagia, y apoptosis, siendo este el que se presenta con una mayor frecuencia. Por nuestra parte, los resultados muestran un incremento significativo en la inducción de apoptosis celular cuando metformina es añadida al tratamiento citotóxico con afatinib a través de la inhibición farmacológica de vías de señalización proliferativas, en todas nuestras líneas celulares, siendo el caso más notorio, el de la A549, mostrando una mayor sensibilización por metformina que las otras líneas celulares. (Ashinuma et al., 2012; Chao et al., 2015; Chung et al., 2020).

Posterior a las evaluaciones de citotoxicidad causada por nuestro tratamiento combinado, nos dimos a la tarea de evaluar el impacto molecular y metabólico del mismo. Se evaluó la expresión y activación de la vía de señalización de EGFR, en los análisis de proteína se pudo observar una disminución de esta vía en las líneas celulares H1975 y A549 cuando se adiciona metformina al tratamiento, sin embargo, el tratamiento como monoterapia con afatinib, no reportó disminución de las proteínas totales en la línea celular A549. Como se esperaba, la línea celular sensible HCC827 mostró reducción en la actividad de la vía de EGFR con ambos tratamientos debido a la alta sensibilidad por el TKI con la que cuenta esta línea , de forma interesante, metformina presentó incluso un mayor impacto en la inhibición de proteínas activadas del eje de EGFR que el TKI. Un estudio previo mostró que en líneas celulares no sensibles a TKIs, es necesaria una alta concentración de fármaco para disminuir la activación de la vía de EGFR (Z. Liu & Gao, 2019). En nuestro trabajo, pudimos observar que la sensibilización inducida por metformina

cuando se añade al tratamiento con afatinib, tiene la capacidad de disminuir las concentraciones requeridas de TKI que se reportaron previamente.

De igual forma, se encontró una estrecha relación entre la activación de la vía de EGFR, el metabolismo de la glucosa y la TEM, como se había reportado en estudios previos. Se asoció la inhibición causada por el tratamiento afatinib-metformina en las formas activas de AKT con la regulación a la baja del fenotipo glucolítico en las células tumorales y con la disminución de la actividad de P70S6K que funciona como un importante efector río debajo de la proteína objetivo de la rapamicina en mamíferos (mTOR), que a su vez funciona como un potente promotor de síntesis de proteínas y el fenómeno de TEM (De Rosa et al., 2015b; S. Zhang et al., 2019).

El uso de metformina como tratamiento anticancerígeno, se ha propuesto como un potente reductor de TEM, de igual forma, se ha combinado con TKIs de primera generación y se observa que este efecto se exagera con dicha combinación. En este sentido, nos dimos a la tarea de analizar proteínas y metaloproteasas de matriz (MMPs) que se encuentran frecuentemente sobreexpresadas durante el desarrollo del CP, así como E-cadherina, que a menudo se encuentra regulada a la baja en ciertos tipos de cáncer. Acorde a lo reportado con TKIs de primera generación, observamos regulación a la baja de los marcadores de TEM mediante el uso de metformina como monoterapia y en combinación con afatinib. De forma dependiente al estado mutacional de EGFR que presenta nuestras líneas celulares, afatinib tiene la capacidad de inhibir N-cadherina y β -catenina en la línea resistente H1975 y solo N-cadherina en la línea sensible HCC827. De forma diferencial, estudios previos no mostraron efecto inhibitorio de TEM con el uso de TKIs de primera generación, esto puede ser asociado a una inhibición inestable de la vía de señalización de EGFR y la resistencia a dicha generación de TKIs inducida por la activación del eje IL-6R/JAK/STAT3 (Kim et al., 2012; Lee et al., 2016; Li Li et al., 2014; Zhao et al., 2014). De igual forma, la combinación de metformina con TKIs de primera generación, resultó eficiente en la disminución de marcadores de TEM. Acorde a lo reportado previamente, los niveles de E-cadherina, se vieron aumentados con las

monoterapias, así como con la combinación, estos efectos sobre TEM, tuvieron impacto disminuyendo la supervivencia celular (Li Li et al., 2014; Zhao et al., 2014).

A nivel mitocondrial, la metformina ha mostrado capacidad de inhibir indirectamente el complejo 1 de la cadena de transporte de electrones, causando un déficit en la producción de ATP, que, a su vez, es censado por AMPK, provocando una respuesta de señalización celular que tiene como objetivo la estimulación de vías catabólicas para oponerse al déficit energético, y de forma complementaria, las vías anabólicas son reguladas a la baja (Andrzejewski, Gravel, Pollak, & St-Pierre, 2014; Luengo, Sullivan, & Heiden, 2014).

Se ha observado una estrecha relación entre la actividad antitumoral que ejerce metformina y modificaciones metabólicas. El metabolismo celular en tumores, permanece como un tema controversial debido a la gran heterogeneidad que se ha obtenido en diferentes investigaciones del tema. Resultados previos en CP, han mostrado una importante reprogramación metabólica, cuando dichas células son tratadas con metformina. Dentro de estos resultados, se ha reportado un incremento en el consumo de glucosa y degradación de la célula de cáncer en estadios tempranos (Chun et al., 2020). Por el contrario, diversas investigaciones proponen inhibición de la asimilación de glucosa, resultando en la reducción de procesos glucolíticos y una regresión metabólica a la generación de energía a través de FOSFOX (C. Li, Xue, Xi, & Xie, 2017; Y. Liu, He, & Huang, 2017; Salani et al., 2013). Por nuestra parte, pudimos detectar una reprogramación metabólica similar inducida por metformina, que se asoció con la regulación a la baja de la vía de señalización de EGFR, dicho tema será discutido más adelante.

En la asociación entre la vía de señalización desencadenada por EGFR y la promoción de un fenotipo celular de tipo Warburg, un estudio previo mostró que la cuando existe sobre activación del eje de señalización PI3K/mTOR, se propicia la utilización de glucólisis aerobia como principal fuente de producción de energía, adicionalmente, se mostró que la inhibición de la activación de EGFR, puede reducir la producción de lactato celular, además de marcadores moleculares y metabolitos que están ampliamente relacionados con glucólisis (Makinoshima et al., 2015). Los

hallazgos encontrados en dicho estudio correlacionan con otros estudios en los cuales, a través de inhibidores de EGFR en células de CP, observaron reducción de GLUTs y HXK, adicionalmente, se reportó reducción de marcadores glucolíticos en respuesta al tratamiento con TKIs de primera generación (De Rosa et al., 2015b; Makinoshima et al., 2014).

Nuestros resultados muestran una clara inhibición de marcadores glucolíticos, asimilación de glucosa y secreción de lactato, cuando el tratamiento combinado afatinib-metformina es administrado en nuestras líneas celulares. La línea celular A549 que no cuenta con expresión de LKB1, mostró una fuerte inhibición de los GLUTs, y un notable incremento en la activación de AMPK, esto puede ser explicado mediante la capacidad de los inhibidores cinasa, de activar AMPK a través del censo de la disfunción mitocondrial, y respondiendo a través de la activación de vías de señalización alternas que pueden promover la generación de energía, sin que LKB1 se encuentre involucrado (L. Luo, Jiang, Huang, Lu, & Luo, 2015; Ross et al., 2017).

Se ha asociado la activación de AMPK inducida con metformina, con procesos de inhibición de síntesis de proteína mediante el bloqueo de mTOR, esto podría explicar la reducción en los niveles de proteína analizadas en este trabajo, tanto total, como en sus formas activadas (Shaw, 2009). De forma similar, un estudio previo mostró que ciertas modificaciones metabólicas que pueden activar a AMPK, llevan a la inhibición de la proliferación celular en células de CP, de manera independiente a la expresión de LKB1 (Q. Guo et al., 2016). Por nuestra parte, los resultados obtenidos mostraron una importante activación de AMPK principalmente en las líneas celulares A549 y H1975 que cuentan con un estado basal de p-AMPK bajo, cuando metformina fue administrada, este efecto se vio asociado con una reducción en los niveles de GLUTs, HXK 2 y un decremento de la asimilación de glucosa, y la secreción de lactato, este fenómeno se reportó previamente en estudios que combinaron metformina con otro tipo de compuestos, observando activación de AMPK y regulando a la baja la vía glucolítica (L. Guo et al., 2021; Z. Xiao, Sperl, Ullrich, & Knyazev, 2014).

De forma contraria, la línea celular HCC827, no mostró sobre activación de AMPK inducida por alguno de los tratamientos, probablemente debido a que los cambios son imperceptibles debido a la alta expresión basal de esta proteína activada, sin embargo, en un estudio previo se mostró que la resistencia adquirida al tratamiento con TKIs, puede reducir la expresión de p-AMPK, y esto podría ser explicado mediante la activación constitutiva de vías de señalización desencadenadas por varios receptores de factores de crecimiento. Adicionalmente, el tratamiento con metformina puede abatir estos mecanismos de resistencia a través del mantenimiento de la activación de AMPK (Ling Li et al., 2020). En tumores sólidos, se ha evaluado la relevancia clínica de AMPK, en donde la pérdida de funcionalidad o de expresión de dicha proteína ha sido reportada como factor de mal pronóstico o de progresión de la enfermedad (Chen et al., 2017; Zheng et al., 2013).

En lo que respecta a la línea celular HCC827, mostró una reducción significativa en los niveles de GLUTs, HXK2 y en p-PKM2, cuando el tratamiento con metformina fue administrado, particularmente, PKM2 juega un rol crucial en la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, una vez que PKM2 se dimeriza, puede llevar a cabo un cambio metabólico de respiración normal, a una basada en lactato en las células tumorales, lo que vuelve a esta proteína como un potencial blanco terapéutico. De igual forma, las células HCC827 disminuyeron la asimilación de glucosa y producción de lactato con todos los tratamientos administrados. Estos resultados pueden ser explicados debido a la sensibilidad de esta línea al tratamiento con TKIs, observando la dependencia de la señalización constitutiva de la vía desencadenada por EGFR (PI3K/Akt), sobre el fenotipo glucolítico celular (Sun, Liu, Fu, Zhou, & Zhong, 2016; Zahra, Dey, Ashish, Mishra, & Pandey, 2020).

Se ha reportado una fuerte asociación entre la inhibición de EGFR y una regresión metabólica de fenotipo Warburg a la generación de energía a través de FOSFOX, sin embargo, este fenómeno permanece como un tema controversial ya que ha funcionado como promotor o represor tumoral. Algunos reportes sugieren que a través de la vía de señalización de EGFR, se puede reestablecer el metabolismo oxidativo en la célula, y de esta forma, disminuir los marcadores de glucólisis, al

igual que la producción de lactato, lo que resultaría en una limitante de combustible para la proliferación celular descontrolada (De Rosa et al., 2015b; Majem, Nadal, & Muñoz-Pinedo, 2020). De forma contraria, estudios clínicos han señalado la FOSFOX, como un posible mecanismo promotor de la resistencia al tratamiento con TKIs, posiblemente a través de métodos de adaptación de las células tumorales como respuesta a la inhibición de EGFR (Hirpara et al., 2019; Martin et al., 2016).

Con esto en mente, exploramos el impacto de nuestros tratamientos en los niveles de expresión de subunidades pertenecientes a los cinco complejos encargados de realizar la FOSFOX. A pesar de que no encontramos diferencias estadísticamente significativas, pudimos notar una tendencia al aumento en los niveles de las subunidades que fueron evaluadas en todas nuestras líneas celulares, principalmente en aquellas que cuentan con mutaciones en EGFR (información suplementaria, figura 3). Evidencia previa, mostró que un aumento en FOSFOX, secundario a la inhibición de la vía de EGFR, es asociada con un incremento en el ATP intracelular, una disminución en la activación de PKM2, estimulación de catabolismo, y estos efectos impactan directamente en la proliferación celular del tumor y síntesis de proteínas, como pudimos observar con nuestros tratamientos (De Rosa et al., 2015b).

La evidencia clínica que existe donde se combina metformina y afatinib en pacientes con CPCNP, muestra un incremento en la tasa de respuesta al tratamiento, así como en la supervivencia. Complementario a esto, nuestros resultados sugieren una sensibilización al tratamiento con TKIs inducida por metformina en células de CP con baja afinidad por el inhibidor, además de una interacción sinérgica entre ambos tratamientos. Aunque el mecanismo a través del cual se induce este efecto sinérgico, no está bien dilucidado, nuestro trabajo arroja algunos posibles mecanismos de esta interacción y las modificaciones asociadas al metabolismo de la glucosa inducidas por el tratamiento (Arrieta et al., 2019b, 2016b; Li Li et al., 2019; Wang et al., 2020).

Con base en los resultados encontrados en nuestra investigación, y la literatura citada, podemos proponer dos posibles mecanismos de interacción biológica de

nuestro tratamiento, en función de la línea celular y su estado mutacional de EGFR (Figura 11)

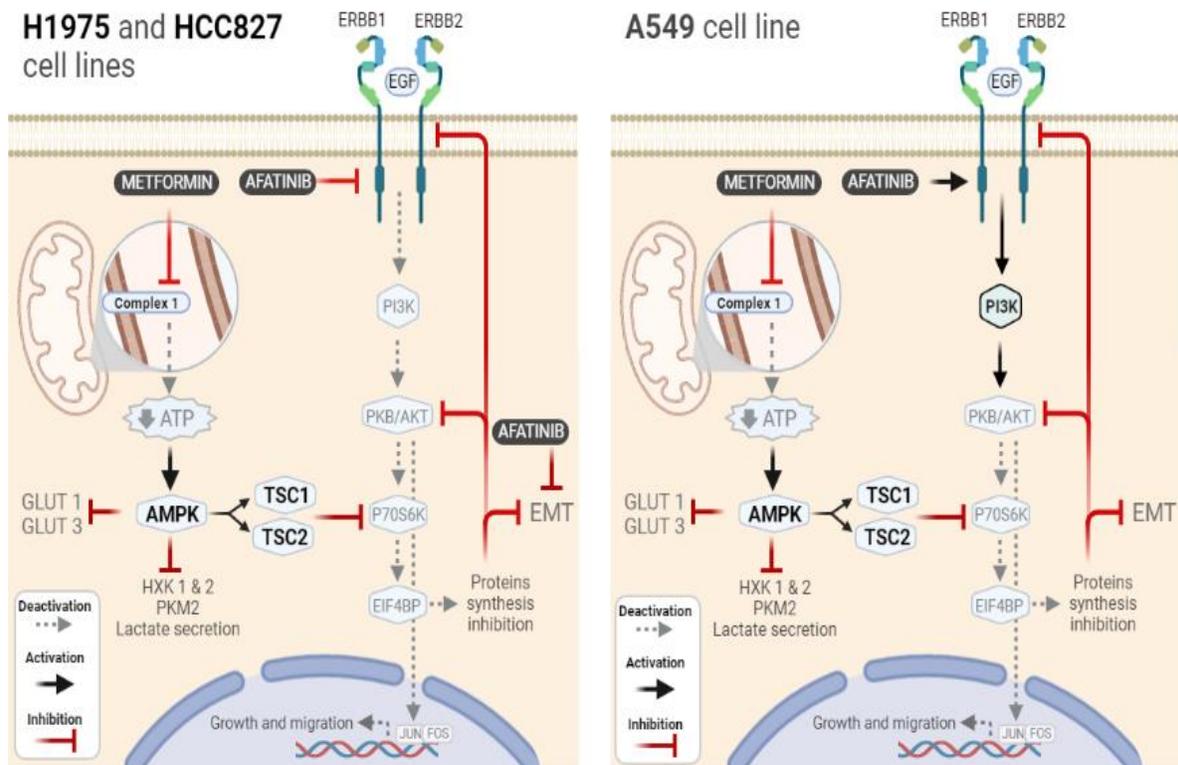


Figura 11. Posible mecanismo de acción inducido por el tratamiento afatinib-metformina. En el lado izquierdo, las líneas celulares de CP con mutaciones de EGFR (H1975 y HCC827), ven afectada la activación de dicha vía a través de los efectos inhibitorios causados por afatinib. Este efecto, impacta disminuyendo la TEM y los procesos de glicólisis, adicionalmente, esta inhibición se exagera con el efecto complementario de metformina, promoviendo la activación de AMPK y la consecuente inhibición de P70S6K, lo que provoca una disminución en la síntesis de proteínas. Por otra parte, las células con EGFR en estado nativo (A549), mostraron estimulación de la vía de señalización de EGFR, cuando afatinib se administró como monoterapia, sin embargo, utilizando la metformina de forma complementaria, la combinación puede abatir esta activación causada por afatinib, disminuyendo la síntesis de proteínas, el fenotipo glucolítico y la TEM. Debido a esto, nuestros resultados sugieren una importante sensibilización causada por metformina, al tratamiento con TKIs, inclusive cuando existe baja afinidad por el fármaco.

CONCLUSION.

Los datos de nuestro estudio, muestran el beneficio del tratamiento combinado con metformina y el TKI de segunda generación afatinib. Se pudo observar

sensibilización terapéutica de las células resistentes A549 y H1975. Reportamos un incremento en la inducción de apoptosis, así como en la inducción de citotoxicidad de forma sinérgica, utilizando bajas concentraciones de afatinib. De manera similar, la línea sensible a TKIs HCC827, exhibió un incremento en citotoxicidad cuando el tratamiento con metformina fue añadido al TKI, la vía de señalización de EGFR fue significativamente inhibida, causando una disminución de los marcadores glucolíticos y una tendencia al incremento en las subunidades de FOSFOX. Adicional a estos efectos, se comprobó la inhibición de la TEM, con inhibidores de segunda generación como monoterapia y en combinación con metformina. La evidencia obtenida en este estudio muestra ciertos mecanismos moleculares y metabólicos, que pueden ser tomados en cuenta para futuros ensayos clínicos, en la búsqueda de terapia adyuvante o de sensibilización para tumores resistentes al tratamiento con inhibidores de tirosin-cinasa.

PERSPECTIVAS.

El presente trabajo intenta asentar bases moleculares y metabólicas de respuesta al tratamiento combinado de metformina con TKIs de segunda generación, este tratamiento comienza a evaluarse clínicamente por lo que dilucidar sus posibles mecanismos de acción, puede dar la pauta a continuar con la investigación de los mismos para la determinación de marcadores de señalización y metabólicos que pudieran utilizarse como blancos de tratamiento. De igual forma, la sinergia entre metformina y el TKI, tanto en citotoxicidad como en respuesta molecular y metabólica, refuerza la iniciativa del uso de este tratamiento combinado en CP.

BIBLIOGRAFÍA.

- (Juliette A G C Laisney Characterisation and regulation of the Egfr/Egfr ligand system in fish models for melanoma. (n.d.). Retrieved August 18, 2021, from https://www.researchgate.net/publication/46283360_Characterisation_and_regulation_of_the_EgfrEgfr_ligand_system_in_fish_models_for_melanoma.
- A, P., T, B., & J, C. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature Cell Biology*, 16(6), 488–494. <https://doi.org/10.1038/NCB2976>
- A, U., L, C., JS, H., TJ, D., A, G., AW, T., ... J, S. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309(5967), 418–425. <https://doi.org/10.1038/309418A0>
- AF, G. (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28 Suppl 1(Suppl 1), S24–S31. <https://doi.org/10.1038/ONC.2009.198>
- Altenberg, B., & Greulich, K. O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*, 84(6). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.010>
- Andrzejewski, S., Gravel, S.-P., Pollak, M., & St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & Metabolism*. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-12>
- Arrieta, O., Barrón, F., Padilla, M. Á. S., Avilés-Salas, A., Ramírez-Tirado, L. A., Arguelles Jiménez, M. J., ... Rosell, R. (2019a). Effect of Metformin Plus Tyrosine Kinase Inhibitors Compared with Tyrosine Kinase Inhibitors Alone in Patients with Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Lung Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 5(11). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2553>
- Arrieta, O., Barrón, F., Padilla, M. Á. S., Avilés-Salas, A., Ramírez-Tirado, L. A., Arguelles Jiménez, M. J., ... Rosell, R. (2019b). Effect of Metformin Plus

Tyrosine Kinase Inhibitors Compared with Tyrosine Kinase Inhibitors Alone in Patients with Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Lung Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 5(11), e192553. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2553>

Arrieta, O., Cardona, A. F., Martín, C., Más-López, L., Corrales-Rodríguez, L., Bramuglia, G., ... Cuello, M. (2015). Updated frequency of EGFR and KRAS mutations in NonSmall-cell lung cancer in Latin America: The Latin-American consortium for the investigation of lung cancer (CLICaP). *Journal of Thoracic Oncology*, 10(5), 838–843. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000481>

Arrieta, O., Varela-Santoyo, E., Soto-Perez-de-Celis, E., Sánchez-Reyes, R., De la Torre-Vallejo, M., Muñoz-Hernández, S., & Cardona, A. F. (2016a). Metformin use and its effect on survival in diabetic patients with advanced non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2658-6>

Arrieta, O., Varela-Santoyo, E., Soto-Perez-de-Celis, E., Sánchez-Reyes, R., De la Torre-Vallejo, M., Muñoz-Hernández, S., & Cardona, A. F. (2016b). Metformin use and its effect on survival in diabetic patients with advanced non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2658-6>

Ashinuma, H., Takiguchi, Y., Kitazono, S., Kitazono-Saitoh, M., Kitamura, A., Chiba, T., ... Tatsumi, K. (2012). Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncology Reports*, 28(1), 8–14. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1763>

Barrios-Bernal, P., Zatarain-Barrón, Z. L., Hernández-Pedro, N., Orozco-Morales, M., Olivera-Ramírez, A., Ávila-Moreno, F., ... Arrieta, O. (2022). Will We Unlock the Benefit of Metformin for Patients with Lung Cancer? Lessons from Current Evidence and New Hypotheses. *Pharmaceuticals 2022*, Vol. 15, Page 786, 15(7), 786. <https://doi.org/10.3390/PH15070786>

Bethune, G., Bethune, D., Ridgway, N., & Xu, Z. (2010). Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: An overview and update. *Journal of Thoracic Disease*.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Carling, D. (2017). AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005>
- CH, W., LY, C., YC, L., JY, S., YC, L., RY, T., ... CC, C. (2019). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene*, *38*(4), 455–468. <https://doi.org/10.1038/S41388-018-0454-2>
- CH, Y., KE, M., AV, T., MS, W., H, G., KK, W., ... MJ, E. (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(6), 2070–2075. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0709662105>
- Chao, T. T., Wang, C. Y., Chen, Y. L., Lai, C. C., Chang, F. Y., Tsai, Y. T., ... Chen, K. F. (2015). Afatinib induces apoptosis in NSCLC without EGFR mutation through Elk-1-mediated suppression of CIP2A. *Oncotarget*, *6*(4), 2164–2179. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2941>
- Chen, H., Yao, W., Chu, Q., Han, R., Wang, Y., Sun, J., ... He, Y. (2015). Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.08.024>
- Chun, S. G., Liao, Z., Jeter, M. D., Chang, J. Y., Lin, S. H., Komaki, R. U., ... Skinner, H. D. (2020). Metabolic Responses to Metformin in Inoperable Early-stage Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Stereotactic Radiotherapy: Results of a Randomized Phase II Clinical Trial. *American Journal of Clinical Oncology*, *43*(4), 231–235. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000632>
- Chung, C. T., Yeh, K. C., Lee, C. H., Chen, Y. Y., Ho, P. J., Chang, K. Y., ... Chen, C. T. (2020). Molecular profiling of afatinib-resistant non-small cell lung cancer

- cells in vivo derived from mice. *Pharmacological Research*, 161, 105183.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105183>
- Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. (2014). *Nature*, 511(7511), 543–550. <https://doi.org/10.1038/NATURE13385>
- CR, L., V, F., S, M., E, P., F, F., D, O., ... F, F. (2017). A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(7), 1523–1531.
<https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX156>
- D, L., L, A., T, S., S, K., M, T., LR, C., ... KK, W. (2008). BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene*, 27(34), 4702–4711. <https://doi.org/10.1038/ONC.2008.109>
- DA, C., SE, A., S, G., C, E., CA, N., PJ, S., ... W, P. (2014). AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discovery*, 4(9), 1046–1061.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0337>
- DA, S., R, H., & K, S. (2020). Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(10), 815–834.
<https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>
- Davidson, S. M., Papagiannakopoulos, T., Olenchock, B. A., Heyman, J. E., Keibler, M. A., Luengo, A., ... Van Der Heiden, M. G. (2016). Environment impacts the metabolic dependencies of ras-driven non-small cell lung cancer. *Cell Metabolism*, 23(3), 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.007>
- De Rosa, V., Iommelli, F., Monti, M., Fonti, R., Votta, G., Stoppelli, M. P., & Del Vecchio, S. (2015a). Reversal of warburg effect and reactivation of oxidative phosphorylation by differential inhibition of EGFR signaling pathways in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(22), 5110–5120.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0375>

- De Rosa, V., Iommelli, F., Monti, M., Fonti, R., Votta, G., Stoppelli, M. P., & Del Vecchio, S. (2015b). Reversal of warburg effect and reactivation of oxidative phosphorylation by differential inhibition of EGFR signaling pathways in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(22), 5110–5120. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0375>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2020). We need to talk about the Warburg effect. *Nature Metabolism* 2020 2:2, 2(2), 127–129. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- Dyrstad, S. E., Lotsberg, M. L., Tan, T. Z., Pettersen, I. K. N., Hjellbrekke, S., Tusubira, D., ... Røslund, G. V. (2021). Blocking aerobic glycolysis by targeting pyruvate dehydrogenase kinase in combination with egfr tki and ionizing radiation increases therapeutic effect in non-small cell lung cancer cells. *Cancers*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/cancers13050941>
- Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R., & Morris, A. D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *British Medical Journal*, 330(7503), 1304–1305. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7>
- Fan, T. W., Lane, A. N., Higashi, R. M., Farag, M. A., Gao, H., Bousamra, M., & Miller, D. M. (2009). Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by ¹³C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Molecular Cancer* 2009 8:1, 8(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-41>
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., & Viollet, B. (2014). Metformin: From mechanisms of action to therapies. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., ... Viollet, B. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI40671>

- Groenendijk, F. H., Mellema, W. W., Van Der Burg, E., Schut, E., Hauptmann, M., Horlings, H. M., ... Bernards, R. (2015). Sorafenib synergizes with metformin in NSCLC through AMPK pathway activation. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.29113>
- Gunton, J. E., Delhanty, P. J. D., Takahashi, S. I., & Baxter, R. C. (2003). Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021394>
- Guo, L., Cui, J., Wang, H., Medina, R., Zhang, S., Zhang, X., ... Lin, Y. (2021). Metformin enhances anti-cancer effects of cisplatin in meningioma through AMPK-mTOR signaling pathways. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 20, 119–131. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2020.11.004>
- Guo, Q., Liu, Z., Jiang, L., Liu, M., Ma, J., Yang, C., ... Liang, X. (2016). Metformin inhibits growth of human non-small cell lung cancer cells via liver kinase B-1-independent activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2590–2596. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4830>
- H, W., M, Y., & X, H. (2016). Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget*, 7(26), 40621–40629. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9746>
- Harrison, P. T., Vyse, S., & Huang, P. H. (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 61, 167–179. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.09.015>
- Higashi, K., Ueda, Y., Sakurai, A., MingWang, X., Xu, L., Murakami, M., ... Yamamoto, I. (2000). Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with [18F]FDG uptake in non-small cell lung cancer. *European Journal of Nuclear Medicine*, 27(12). <https://doi.org/10.1007/s002590000367>
- Hirpara, J., Eu, J. Q., Tan, J. K. M., Wong, A. L., Clement, M. V., Kong, L. R., ... Pervaiz, S. (2019). Metabolic reprogramming of oncogene-addicted cancer

cells to OXPHOS as a mechanism of drug resistance. *Redox Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101076>

Huang, C. Y., Hsu, L. H., Chen, C. Y., Chang, G. C., Chang, H. W., Hung, Y. M., ... Kao, S. H. (2020). Inhibition of alternative cancer cell metabolism of egfr mutated non-small cell lung cancer serves as a potential therapeutic strategy. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers12010181>

Hung, M. S., Chuang, M. C., Chen, Y. C., Lee, C. P., Yang, T. M., Chen, P. C., ... Yang, Y. H. (2019). Metformin Prolongs Survival in Type 2 Diabetes Lung Cancer Patients With EGFR-TKIs. *Integrative Cancer Therapies*, 18.
<https://doi.org/10.1177/1534735419869491>

Janjetovic, K., Harhaji-Trajkovic, L., Misirkic-Marjanovic, M., Vucicevic, L., Stevanovic, D., Zogovic, N., ... Trajkovic, V. (2011). In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *European Journal of Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.004>

JC, S., Y, O., J, V., T, R., B, C., KH, L., ... SS, R. (2018). Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 378(2), 113–125.
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA1713137>

JH, S., D, H., CP, B., C, L., A, S., J, K., ... DH, J. (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 346(2), 92–98.
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA011954>

K, P., EH, T., K, O., L, Z., M, B., T, M., ... L, P.-A. (2016). Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 17(5), 577–589. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30033-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30033-X)

K, Y., N, I., Y, I., & F, T. (2019). Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with EGFR-mutations. *Journal of UOEH*, 41(2), 153–163.

<https://doi.org/10.7888/JUOEH.41.153>

Kim, S. M., Kwon, O. J., Hong, Y. K., Kim, J. H., Solca, F., Ha, S. J., ... Cho, B. C. (2012). Activation of IL-6R/JAK1/STAT3 signaling induces De Novo resistance to irreversible EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer with T790M resistance mutation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(10), 2254–2264. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0311>

Kourelis, T. V., & Siegel, R. D. (2012). Metformin and cancer: New applications for an old drug. *Medical Oncology*, Vol. 29. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9846-7>

L, L., T, W., M, H., Y, Z., H, C., & L, X. (2020). Metformin Overcomes Acquired Resistance to EGFR TKIs in EGFR-Mutant Lung Cancer via AMPK/ERK/NF- κ B Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01605>

Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.037>

Landman, G. W. D., Kleefstra, N., Van Hateren, K. J. J., Groenier, K. H., Gans, R. O. B., & Bilo, H. J. G. (2010). Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: Zodiac-16. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc09-1380>

Lee, S. O., Yang, X., Duan, S., Tsai, Y., Strojny, L. R., Keng, P., & Chen, Y. (2016). IL-6 promotes growth and epithelial-mesenchymal transition of CD133+ cells of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6570>

Li, C., Xue, Y., Xi, Y. R., & Xie, K. E. (2017). Progress in the application and mechanism of metformin in treating non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5862>

Li, Li, Han, R., Xiao, H., Lin, C., Wang, Y., Liu, H., ... He, Y. (2014). Metformin

sensitizes EGFR-TKI-Resistant human lung cancer cells in vitro and in vivo through inhibition of IL-6 signaling and EMT reversal. *Clinical Cancer Research*, 20(10), 2714–2726. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2613>

Li, Li, Jiang, L., Wang, Y., Zhao, Y., Zhang, X. J., Wu, G., ... He, Y. (2019). Combination of metformin and gefitinib as first-line therapy for nondiabetic advanced NSCLC patients with EGFR mutations: A randomized, double-blind phase II trial. *Clinical Cancer Research*, 25(23), 6967–6975. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0437>

Li, Ling, Wang, T., Hu, M., Zhang, Y., Chen, H., & Xu, L. (2020). Metformin Overcomes Acquired Resistance to EGFR TKIs in EGFR-Mutant Lung Cancer via AMPK/ERK/NF-κB Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01605>

Liu, P., Cleveland, T. E., Bouyain, S., Byrne, P. O., Longo, P. A., & Leahy, D. J. (2012). A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 10861–10866. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1201114109>

Liu, Y., He, C., & Huang, X. (2017). Metformin partially reverses the carboplatin-resistance in NSCLC by inhibiting glucose metabolism. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20663>

Liu, Z., & Gao, W. (2019). Overcoming acquired resistance of gefitinib in lung cancer cells without T790M by AZD9291 or Twist1 knockdown in vitro and in vivo. *Archives of Toxicology*, 93(6). <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02453-2>

Louis, E., Adriaensens, P., Guedens, W., Bigirimurame, T., Baeten, K., Vanhove, K., ... Thomeer, M. (2016). Detection of lung cancer through metabolic changes measured in blood plasma. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(4). <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.01.011>

Luengo, A., Sullivan, L. B., & Heiden, V. G. V. (2014). Understanding the complex-

- I-ty of metformin action: Limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0082-4>
- Luo, L., Jiang, S., Huang, D., Lu, N., & Luo, Z. (2015). MLK3 Phosphorylates AMPK Independently of LKB1. *PLoS ONE*, *10*(4).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123927>
- Luo, Z., Chen, W., Wu, W., Luo, W., Zhu, T., Guo, G., ... Shi, S. (2019). Metformin promotes survivin degradation through AMPK/PKA/GSK-3 β -axis in non-small cell lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1002/jcb.28470>
- M, H., DS, L., & KA, A. (2016). Covalent EGFR Inhibitors: Binding Mechanisms, Synthetic Approaches, and Clinical Profiles. *Archiv Der Pharmazie*, *349*(8), 573–593. <https://doi.org/10.1002/ARDP.201600063>
- Maher, E. A., Marin-Valencia, I., Bachoo, R. M., Mashimo, T., Raisanen, J., Hatanpaa, K. J., ... DeBerardinis, R. J. (2012). Metabolism of [U-13C]glucose in Human Brain Tumors In Vivo. *NMR in Biomedicine*, *25*(11), 1234.
<https://doi.org/10.1002/NBM.2794>
- Majem, B., Nadal, E., & Muñoz-Pinedo, C. (2020, February 1). Exploiting metabolic vulnerabilities of Non small cell lung carcinoma. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Vol. 98, pp. 54–62.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.06.004>
- Makinoshima, H., Takita, M., Matsumoto, S., Yagishita, A., Owada, S., Esumi, H., & Tsuchihara, K. (2014). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling regulates global metabolic pathways in EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(30), 20813–20823.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.575464>
- Makinoshima, H., Takita, M., Saruwatari, K., Umemura, S., Obata, Y., Ishii, G., ... Tsuchihara, K. (2015). Signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) axis is responsible for aerobic glycolysis mediated by glucose transporter in epidermal growth factor receptor

- (EGFR)-mutated lung adenocarcinoma. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660498>
- Malek, M., Aghili, R., Emami, Z., & Khamseh, M. E. (2013). Risk of Cancer in Diabetes: The Effect of Metformin. *ISRN Endocrinology*, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/636927>
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*.
<https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- Martin, M. J., Eberlein, C., Taylor, M., Ashton, S., Robinson, D., & Cross, D. (2016). Inhibition of oxidative phosphorylation suppresses the development of osimertinib resistance in a preclinical model of EGFR-driven lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7(52), 86313–86325.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.13388>
- Mok, T. S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., ... Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa0810699*, 361(10), 947–957. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>
- Morgillo, F., Della Corte, C. M., Fasano, M., & Ciardiello, F. (2016). Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: Lung cancer. *ESMO Open*.
<https://doi.org/10.1136/esmooopen-2016-000060>
- Morgillo, F., Sasso, F. C., Della Corte, C. M., Vitagliano, D., D'Aiuto, E., Troiani, T., ... Ciardiello, F. (2013). Synergistic effects of metformin treatment in combination with gefitinib, a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, in LKB1 wild-type NSCLC cell lines. *Clinical Cancer Research*, 19(13), 3508–3519.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2777>
- N, K., S, A., K, G., T, H., T, H., A, I., ... N, Y. (2013). LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*,

31(27), 3335–3342. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.0981>

Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., & Thiery, J. P. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.06.028>

O, A., E, G. A., LF, A.-L., A, A.-E., J, A.-A., JF, A.-M., ... JW, Z.-S. (2013). [National consensus of diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer]. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, 65 Suppl 1(SUPPL. 1), S5-84. Retrieved from <https://europepmc.org/article/med/24459776>

Pernicova, I., & Korbonits, M. (2014). Metformin-Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>

Poh, M.-E., Liam, C.-K., Rajadurai, P., & Chai, C.-S. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) causing acquired resistance to afatinib in a patient with epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutant lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Disease*, 10(7), E560. <https://doi.org/10.21037/JTD.2018.06.122>

Prado-Garcia, H., Campa-Higareda, A., & Romero-Garcia, S. (2020). Lactic Acidosis in the Presence of Glucose Diminishes Warburg Effect in Lung Adenocarcinoma Cells. *Frontiers in Oncology*, 0, 807. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00807>

Rosell, R., & Karachaliou, N. (2019, April 1). Co-mutations in EGFR driven non-small cell lung cancer. *EBioMedicine*, Vol. 42, pp. 18–19. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.037>

Ross, F. A., Hawley, S. A., Auciello, F. R., Gowans, G. J., Atrih, A., Lamont, D. J., & Hardie, D. G. (2017). Mechanisms of Paradoxical Activation of AMPK by the Kinase Inhibitors SU6656 and Sorafenib. *Cell Chemical Biology*, 24(7), 813-824.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2017.05.021>

RS, H., JV, H., & SM, L. (2008). Lung cancer. *The New England Journal of*

- Medicine*, 359(13), 1367–1380. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0802714>
- S, K., TJ, B., T, D., PA, J., O, K., M, M., ... B, H. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 352(8), 786–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A044238>
- S, W., & WF, M.-K. (2004). Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Seminars in Radiation Oncology*, 14(3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/J.SEMRADONC.2004.04.004>
- Sahra, I. Ben, Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Le Marchand-Brustel, Y., Auberger, P., ... Bost, F. (2011). Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1769>
- Salani, B., Marini, C., Del Rio, A., Ravera, S., Massollo, M., Orengo, A. M., ... Sambuceti, G. (2013). Metformin impairs glucose consumption and survival in Calu-1 cells by Direct Inhibition of Hexokinase-II. *Scientific Reports*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep02070>
- Saraei, P., Asadi, I., Kakar, M. A., & Moradi-Kor, N. (2019). The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: a comprehensive review of recent advances. *Cancer Management and Research*, 11, 3295. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S200059>
- Shaw, R. J. (2009). LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiologica*, 196(1), 65–80. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01972.x>
- Stewart, E. L., Tan, S. Z., Liu, G., & Tsao, M. S. (2015). Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Translational Lung Cancer Research*. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.06>
- Suda, K., Tomizawa, K., Fujii, M., Murakami, H., Osada, H., Maehara, Y., ... Mitsudomi, T. (2011). Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal

growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology*.

<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318216ee52>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.

<https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>

T, B., R, K., MA, N., & RA, W. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1038/NRC.2017.118>

T, M., S, M., Y, Y., S, N., I, O., J, T., ... M, F. (2010). Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 11(2), 121–128.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70364-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70364-X)

TS, M., Y-L, W., M-J, A., MC, G., HR, K., SS, R., ... VA, P. (2017). Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 376(7), 629–640.

<https://doi.org/10.1056/NEJMOA1612674>

Tulchinsky, E., Demidov, O., Kriajevskaja, M., Barlev, N. A., & Imyanitov, E. (2019). EMT: A mechanism for escape from EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.10.003>

VA, M., V, H., J, C., YM, C., K, P., SW, K., ... JC, Y. (2012). Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *The Lancet. Oncology*, 13(5), 528–538. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70087-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70087-6)

Vanhove, K., Graulus, G. J., Mesotten, L., Thomeer, M., Derveaux, E., Noben, J.

- P., ... Adriaensens, P. (2019). The Metabolic Landscape of Lung Cancer: New Insights in a Disturbed Glucose Metabolism. *Frontiers in Oncology*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01215>
- Vazquez, A. (2018). A Historical View of Overflow Metabolism. In *Overflow Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812208-2.00001-9>
- Wang, H., Yang, X., Sun, Y., Li, Y., Dong, Y., Shan, D., & Yu, Z. (2020, January 1). Synergistic effect of metformin and EGFR-TKI in the treatment of non-small cell lung cancer. *Translational Cancer Research*, Vol. 9, pp. 372–381. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.11.09>
- WH, H., JC, Y., TS, M., & HH, L. (2018). Overview of current systemic management of EGFR-mutant NSCLC. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(suppl_1), i3–i9. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX702>
- WH, K., PL, B., & CV, D. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 11(5), 325–337. <https://doi.org/10.1038/NRC3038>
- Xiao, D., & He, J. (2010). Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2010.02.03.7>
- Xiao, Z., Sperl, B., Ullrich, A., & Knyazev, P. (2014). Metformin and salinomycin as the best combination for the eradication of NSCLC monolayer cells and their alveospheres (cancer stem cells) irrespective of EGFR, KRAS, EML4/ALK and LKB1 status. *Oncotarget*, 5(24), 12877. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2657>
- Y, O., Y, O., K, K., T, T., K, N., S, N., ... M, F. (2007). Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 18(2), 317–323.

<https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDL377>

- Y, S., JS, A., S, T., S, S., CM, T., MT, K., ... PC, Y. (2014). A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9(2), 154–162. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000033>
- YL, W., C, Z., CK, L., G, W., X, L., Z, Z., ... Y, Z. (2015). First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(9), 1883–1889. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDV270>
- Zhang, S., Hu, B., Lv, X., Chen, S., Liu, W., & Shao, Z. (2019). The Prognostic Role of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 Pathway in Patients With Solid Tumors: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 390. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00390>
- Zhang, Z., Stiegler, A. L., Boggon, T. J., Kobayashi, S., & Halmos, B. (2010). EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget*, 1(7), 497–514. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.186>
- Zhao, Z., Cheng, X., Wang, Y., Han, R., Li, L., Xiang, T., ... He, Y. (2014). Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095884>
- Zhu, X., Chen, L., Liu, L., & Niu, X. (2019). EMT-Mediated Acquired EGFR-TKI Resistance in NSCLC: Mechanisms and Strategies. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01044>

INFORMACION SUPLEMENTARIA.

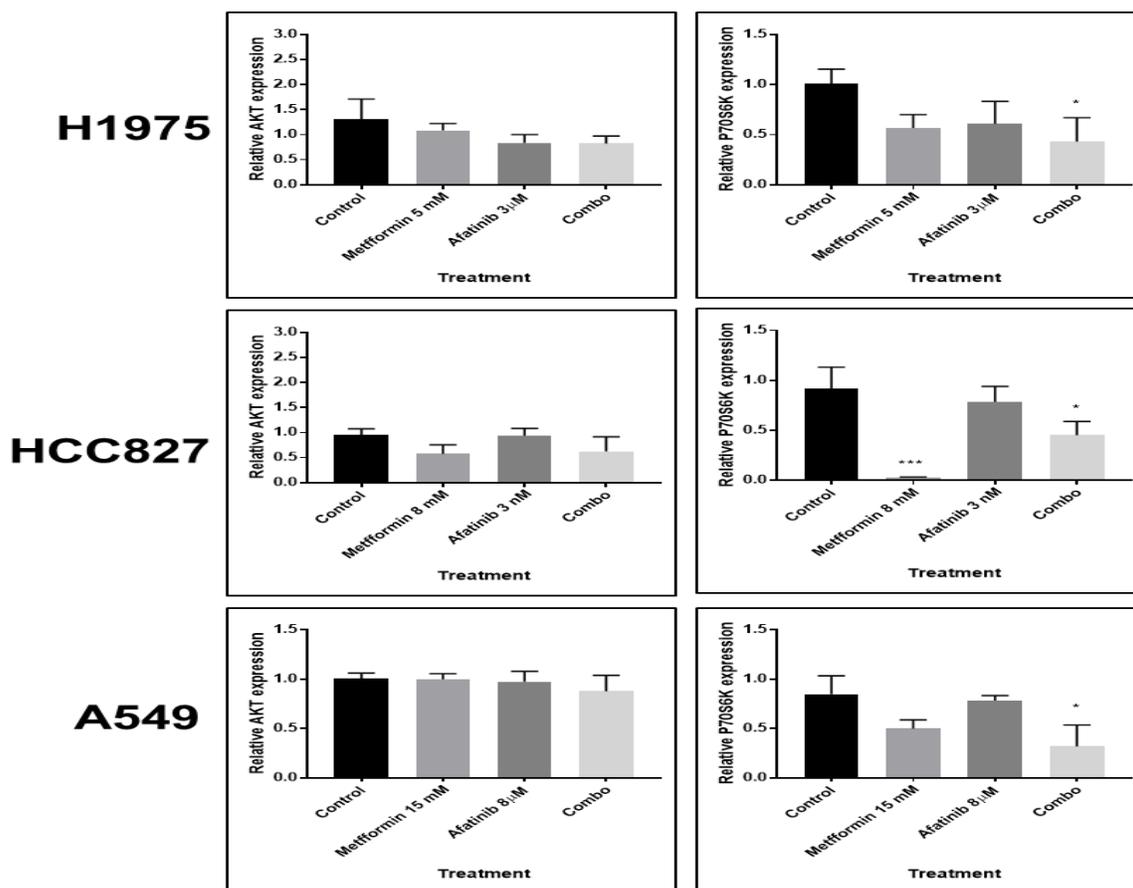


Figura 1 suplementaria. Efecto del tratamiento combinado afatinib-metformina sobre la vía de señalización de EGFR. Las células se sembraron y trataron durante 72 horas con sus respectivas concentraciones de metformina-afatinib. Se utilizó GAPDH como control constitutivo, las imágenes se analizaron mediante Image (NIH) y se representaron como barras. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y los resultados del área se presentan como media \pm desviación estándar de estos tres experimentos. Los datos se normalizaron con respecto al control endógeno y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

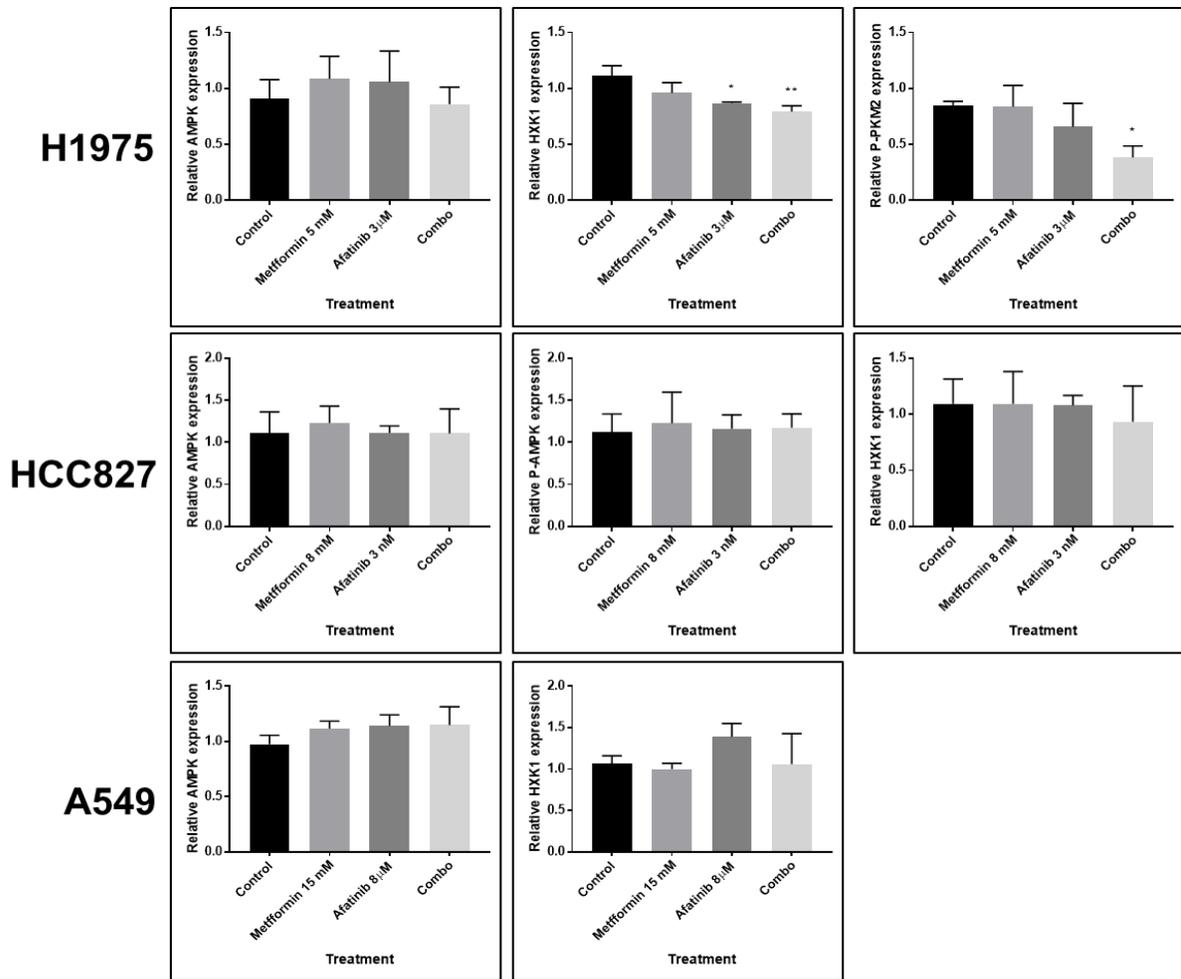


Figura 2 suplementaria. Efecto del tratamiento combinado afatinib-metformina sobre enzimas y proteínas de la vía glucolítica. Las células se sembraron y trataron durante 72 horas con sus respectivas concentraciones de metformina-afatinib. Se utilizó GAPDH como control constitutivo, las imágenes se analizaron mediante Image (NIH) y se representaron como barras. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y los resultados del área se presentan como media \pm desviación estándar de estos tres experimentos. Los datos se normalizaron con respecto al control endógeno y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

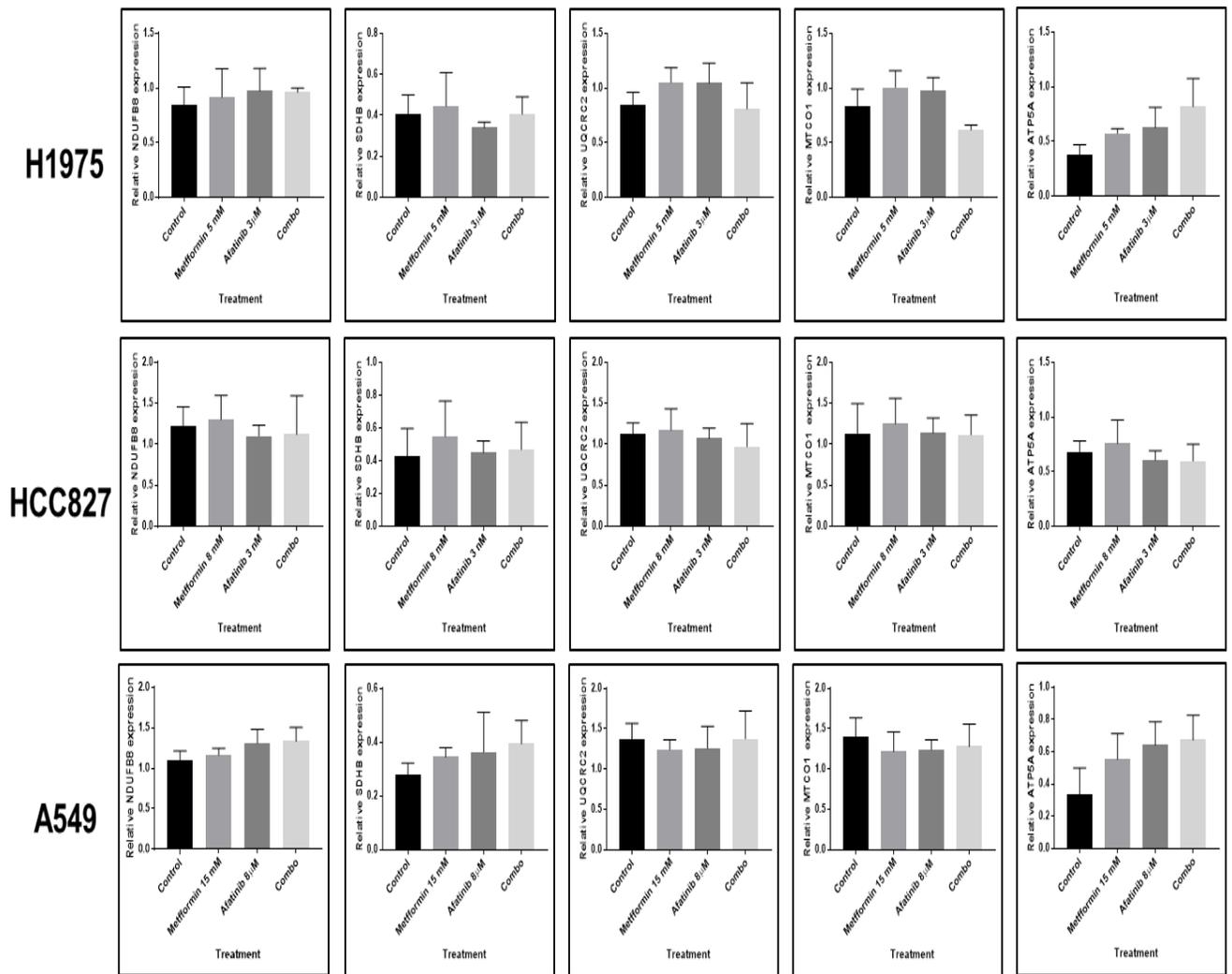


Figura 3 suplementaria. Regulación al alza de 5 subunidades de FOSFOX mediante el tratamiento con afatinib-metformina. Se sembraron las líneas celulares, y durante 72 horas fueron tratadas con las dosis respectivas de afatinib-metformina y se evaluaron cambios en expresión de proteínas. Se utilizó GAPDH como control constitutivo, las imágenes se analizaron mediante Image (NIH) y se representaron como barras. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y los resultados del área se presentan como media \pm desviación estándar de estos tres experimentos. Los datos se normalizaron con respecto al control endógeno y se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.