

NOTA ACLARATORIA:

En el siguiente proyecto de tesis, por cuestiones de patente se omite el nombre del tercer fármaco empleado. Para mencionarlo se estableció la clave F3.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA



**“EVALUACIÓN DE LA METFORMINA Y EL F3 COMO POSIBLE TERAPIA
COADYUVANTE EN UN MODELO *in vivo* DE CÁNCER DE MAMA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

BIÓL. VERÓNICA GARCÍA CASTILLO

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR INTERNO: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.

CO-DIRECTOR EXTERNO: Dr. Carlos Pérez Plasencia.

ASESORA: Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera.

MÉXICO D.F A 13 DE JUNIO DEL 2013.

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Durante el desarrollo de este Proyecto de Tesis la Biól. VERÓNICA GARCÍA CASTILLO fue depositaria de la beca de **CONACyT No 24882** que le fue otorgada para sus estudios de Maestría durante el periodo de Septiembre 2010 a Septiembre del 2012.

El jurado designado por la Comisión del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobó la Tesis titulada:

**“EVALUACIÓN DE LA METFORMINA Y EL F3 COMO POSIBLE TERAPIA
COADYUVANTE EN UN MODELO *in vivo* DE CÁNCER DE MAMA”**

Que presentó:

Biól. Verónica García Castillo.

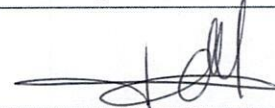
El día 13 de Junio del 2013.

JURADO:

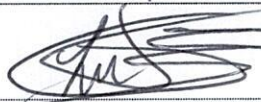
1. Dra. Nadia J. Jacobo Herrera.



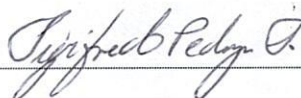
2. Dra. Yolanda Irasema Chirino López.



3. Dr. Luis E. Gómez Quiroz.



4. Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez.



COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTOR INTERNO:

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.

Profesor Investigador Titular "C" de Tiempo Completo

Departamento: Ciencias de la Salud.

Adscripción: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

e-mail: mcgr@xanum.uam.mx

CO-DIRECTOR EXTERNO:

Dr. Carlos Pérez Plasencia.

Investigador en Ciencias Médicas

Adscripción: Instituto Nacional de Cancerología (INCaN)

Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I) UNAM.

car_plas@yahoo.com

ASESORA:

Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera.

Investigadora en Ciencias Médicas

Adscripción: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y

Nutrición Salvador Zubirán INCMN SZ.

nadia.jacobo@gmail.com

INDICE

AGRADECIMIENTOS A CUERPOS ACADÉMICOS Y FINANCIAMIENTO	vi
AGRADECIMIENTOS AL COMITÉ TUTORAL.....	vii
AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES Y GRUPOS DE TRABAJO	viii
RESUMEN.....	x
BACKGROUND:	xii
ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABLAS.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Antecedentes generales del tema.....	3
1.1 Cáncer	3
1.1.2 Metástasis	3
1.1.3 Características distintivas del cáncer.....	3
1.2 Cáncer de mama.....	11
1.3 Métodos de diagnóstico de CaMa.....	13
1.4 Morbilidad y mortalidad de cáncer de mama	19
1.5 Subtipos de cáncer de mama	21
1.6 Cáncer de mama Triple Negativo	24
2. Antecedentes generales del trabajo de tesis	25
2.1 Metabolismo de la célula tumoral	25
2.2 Blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR)	31
2.3 Microfotografía emisora de positrones (mPET).....	35
2.4 Modelos murinos en cáncer	39
2.5 Fármacos propuestos para la inhibición del metabolismo tumoral en cáncer de mama triple negativo.....	42
2.5.1 Metformina	43
2.5.2 Fármaco (F3).....	46
2.5.3 Doxorubicina	48
3. JUSTIFICACIÓN	52
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52

5. HIPÓTESIS	53
6. OBJETIVOS	53
6.1.1 Objetivo General.....	53
6.1.2 Objetivos particulares	53
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	54
7.1 Ensayos <i>in vitro</i> (Figura 14):	54
7.2 Ensayos <i>in vivo</i> (Figura 15):	56
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	58
8.1 Línea celular y tratamientos	58
8.2 Análisis de la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 en respuesta a los tratamientos mediante SFR-B.....	58
8.3 Evaluación de inducción y tipo de muerte celular mediante Citometría de Flujo con doble marcaje: FITC Anexina V/IP de la línea celular MDA-MB-231 en respuesta a los tratamientos	61
8.4 Ensayo de valoración morfológica en línea celular de CMTN MDA-MB-231 en respuesta a los tratamientos	64
8.5 Ensayos <i>in vivo</i>: Establecimiento del modelo murino	65
8.6 Evaluación de la disminución de la masa tumoral a través de micro- Tomografía Emisora de Positrones (microPET)	69
8.7 Estadística.....	71
9. RESULTADOS	71
9.1 Efecto de los fármacos individuales y en sinergia en la viabilidad de las células MDA-MB-231	71
9.2 Efecto de los fármacos en la apoptosis de las células de CMTN MDA-MB-231 por citometría de flujo	77
9.3 Evaluación morfológica de las células de CMTN MDA-MB-231 después del tratamiento con los fármacos.....	84
9.4 Determinación del crecimiento tumoral mediante microPET	88
9.5. Evaluación del estado morfológico de los xenotransplantes mediante cortes histológicos.....	103
10. DISCUSIÓN.....	105
11. CONCLUSIONES.....	121
12. PERSPECTIVAS.....	123
13. BIBLIOGRAFÍA.....	124

AGRADECIMIENTOS A CUERPOS ACADÉMICOS Y FINANCIAMIENTO

El autor agradece a las siguientes Instituciones por el apoyo brindado para la culminación de este proyecto:

Agradezco el financiamiento otorgado por el proyecto **“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES EPIGENÉTICOS Y DE EXPRESIÓN ASOCIADOS AL DESARROLLO DE METÁSTASIS EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICO-UTERINO; EMPLEO DE HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS GENÓMICO BASADAS EN MICROARREGLOS”**. CONACyT No 141907.

AGRADECIMIENTOS AL COMITÉ TUTORAL

- Agradezco el apoyo fundamental de mis tutores para el desarrollo de este proyecto: **Dr. Carlos Pérez-Plasencia y Dra. Nadia J. Jacobo Herrera.**
- De manera particular agradezco al **Dr. Carlos Pérez-Plasencia** por brindarme un espacio en su grupo de trabajo, por su entera confianza y proporcionarme todas las herramientas necesarias para concretar exitosamente cada experimento. Por sus exigencias que lograron hacerme crecer profesionalmente y a la **Dra. Nadia J. Jacobo Herrera** por su apoyo, asesoría y confianza incondicional; quien siempre estuvo pendiente de mí y por proporcionarme todo lo necesario para culminar exitosamente este proyecto.
- A la **Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz** por su dirección y apoyo en los avances de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES Y GRUPOS DE TRABAJO

- A mi *alma mater* la **Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa** por el respaldo académico otorgado durante mi estancia como estudiante de Posgrado de la Maestría en Biología Experimental.
- Al **Laboratorio de Oncogenómica** del Instituto Nacional de Cancerología (INCaN).
- Al **Laboratorio de Proteómica** del Instituto Nacional de Cancerología (INCaN).
- A la **Unidad de Bioquímica** del Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición “Salvador Subirán” (INCMN SZ).
- Al **Unidad de Medicina y Biología Molecular** del Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición “Salvador Subirán” (INCMN SZ).
- Al **Dr. Octavio Villanueva** responsable del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMN SZ) por todo su apoyo y asesoría para realizar los experimentos *in vivo* de este proyecto.
- Al **Dr. Alejandro Zentella Dehesa** jefe del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Subirán (INCMN SZ) por proporcionarme un espacio en su laboratorio para realizar gran parte del desarrollo experimental de este proyecto.

- Al **Biól. Salvador Hernández** del laboratorio de Medicina y Biología Molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Subirán” (INCMN SZ) por su apoyo, asesoría y por facilitarme la infraestructura de su laboratorio para realizar parte de los ensayos *in vitro* de este proyecto.
- Al **Laboratorio de Genómica Funcional** de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I) de la UNAM.
- Al **Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez** jefe de la Unidad PET/CT ciclotrón de la Facultad de Medicina de la UNAM y a su grupo de trabajo: **M en C. Mayeli Ávila** y **Victor Lara** por su profesionalismo y apoyo para realizar los ensayos de microPET de este proyecto.

RESUMEN

El fenotipo de mayor agresividad en cáncer de mama es el triple negativo (CMTN), comprende aquellos tumores que no expresan receptores para estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP) y del receptor de factor de crecimiento epidermal 2 (HER2), denominados tumores mamarios triple negativo (TMTN). Actualmente, no existe una terapia específica para el tratamiento del CMTN, los fármacos que se utilizan son sumamente agresivos para el organismo y la recurrencia de enfermedad y metástasis son elevadas. En la presente tesis se evaluó el efecto coadyuvante de 2 fármacos la Metformina y el F3, en un modelo de tumorigénesis en ratones *in vivo*, de CMTN con la línea celular MDA-MB-231, como propuesta farmacológica alternativa para este fenotipo tumoral de glándula mamaria.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Ensayos *in vitro* con la línea celular MDA-MB-231: por medio de la técnica de sulfurodamida B (SFR-B) se obtuvieron los IC50 de la Doxorrubicina, Metformina y F3: 0.5 μ M, 25mM y 15mM, respectivamente y se observó que su efecto es dependiente de la concentración y del tiempo. Por medio de citometría de flujo (Anexina V/IP) se observó que la sinergia entre los tres fármacos (doxorrubicina/metformina/F3) incrementa la acción sobre la línea celular, induciendo significativamente ($p= 0.05$) la muerte celular por apoptosis en un 75%, con respecto al control positivo (doxorrubicina) que por el contrario induce en su mayoría muerte celular por necrosis.

Ensayos *in vivo*: diez millones de células MDA-MB-231 fueron inoculadas vía subdérmica en ratones atímicos hembras para la generación del tumor. La

administración del tratamiento farmacológico se inició una vez alcanzada una masa tumoral de 3 mm³ durante un lapso de 15 días. El seguimiento de la enfermedad se llevó a cabo mediante la adquisición de imágenes con microPET empleando el radionúclido análogo de la glucosa, la 18-fluorodesoxiglucosa ([¹⁸F]FDG), ampliamente utilizado para la evaluación del metabolismo glicolítico. La combinación de doxorrubicina/metformina/F3 inhibió la proliferación celular a partir del día 10, con una remisión completa de la masa tumoral; en contraste, en los ratones control tratados con doxorrubicina no se inhibió el crecimiento de la masa tumoral que reinició su crecimiento a partir del día 9 de tratamiento

Discusión y Conclusiones: Los resultados muestran que doxorrubicina/metformina/F3 inhibió por completo el crecimiento de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*, actuando de manera sinérgica. Por una parte se demostró *in vitro* que la combinación de los tres fármacos inducen apoptosis y disminuyen la muerte por necrosis respecto a la doxorrubicina. En el modelo *in vivo*, la adición de metformina y el F3, incrementó el efecto reductor de la doxorrubicina en la masa tumoral sin evidencia de efectos tóxicos.

Los fármacos utilizados en esta estrategia terapéutica tienen como mecanismos de acción la inhibición de la vía de mTOR y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), aunado al bloqueo de la síntesis de DNA por parte de la doxorrubicina, regulando y promoviendo dos aspectos fundamentales para la célula tumoral: la muerte por apoptosis y autofagia. Por lo tanto, el uso de compuestos inhibidores o correctores de aspectos del metabolismo energético del cáncer son un blanco terapéutico prometedor en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de esta compleja enfermedad.

BACKGROUND:

Breast Cancer is an important health issue worldwide. The most aggressive phenotype is triple negative (not expressing receptors for estrogen, progesteron and HER2). Currently, this phenotype has no specific treatment and an important number of triple negative patients tend to show recurrent disease. Here we aimed to analyze the participation of three cancer cell metabolic inhibitors: metformin (mTOR inhibitor), F3 (LDHA inhibitor) and doxorubicin (DNA intercalating agent) both in *in vitro* and *in vivo* models.

Methods: IC₅₀ values were calculated using the sulfurodamine B (SFR-B) protocol, in MDA-MB-231 triple negative cell line. Apoptosis and necrosis were evaluated by flow cytometry (Annexin V/ Propidium Iodide kit). An *in vivo* model (female nude mice) was used to analyze the effect on tumor cell growth by the proposed drugs. Ten million cells were inoculated via sub dermic and once the tumor mass reached 3 mm³ the treatment started. The tracking of the tumor mass progress was done by microPET using as radionuclide 18-fluor labeled Fluoro-Deoxiglucose; [18F] FDG.

Results: *in vitro* apoptosis assays showed a synergic behavior of the three combined drugs (doxorubicin/metformin/F3), improving significantly the apoptotic process and decreasing necrosis, as compared with conventional treatment with doxorubicin alone. In vivo, it was observed a complete remission of tumor since day 10 after treatment with the same drugs. On the contrary, the animal group treated with the standard drug, doxorubicin, presented recurrent disease after 9 days of treatment.

Conclusion: Combined drug therapy with doxorubicin/metformin/F3 inhibited cell proliferation in both models: *in vitro* as *in vivo*. Moreover, our data suggest that there is an accumulation of tumor cells in G1 phase and the proapoptotic effect caused by the synergy of the three drugs. No toxic effects were detected in the experimental group treated with doxorubicin/metformin/F3. These results suggests that the combination of mTOR inhibitors and glycolysis inhibitors are a promising therapeutic target for human breast cancer, presumably by regulating cell death mechanisms such as apoptosis and autophagy.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribnucléico

ADNmt: Ácido Desoxirribonucléico mitocondrial

Akt: Protein kinase-B

AMPK: Adenosin Monophosphate kinasa

ARN: Ácido Desoxirribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosin Trifosfato

BRCA1: Breast Cancer Type I

BRCA2: Breast Cancer Type 2

CaMa: Cáncer de mama

CMTN: Cáncer de Mama Triple Negativo

DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

¹⁸FDG: ¹⁸Fluoro-desoxiglucosa (marcado con Flúor 18, radioactivo)

FC: Falla Cardíaca

FITC: Fluoresceína 5-isotiocinato

GADPH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

GLUTs: Transportadores de Glucosa

GTP: Guanosina 5-Trifosfato

HER2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano

HIF-1 α : Factor Inductor de Hipoxia-1alpha

IC₅₀: Concentración Inhibitoria 50

IP: Ioduro de Propidio

LDH-A: Lactato Deshidrogenasa tipo A

MEC: Matriz Extra Celular

microPET: micro-Tomografía Emisora de Positrones

mM: mili Molar

mTOR: Blanco de Rapamicina de Mamíferos

mTORC1: Proteína Reguladora-1 asociada a mTOR

mTORC2: Proteína Reguladora-2 asociada a mTOR

NAD⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidrogenado

PARP: Poly ADP Ribosa Polimerasa

PBS: Buffer Salino Fosfatos

PET: Tomografía Emisora de Positrones

RE: Receptor de Estrógeno

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RP: Receptor de Progesterona

SFB: Suero Fetal Bovino

SFR-B: Sulfo Rodamina-B

ATC: Ácido Tricloro Acético

TN: Triple Negativo

μl : microlitros

μM : micro Molar

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Proliferación en célula normal y cancerígena
- Figura 2.** Proceso de Apoptosis y Necrosis
- Figura 3.** Hallmarks del cáncer
- Figura 4.** Desarrollo y anatomía de la glándula mamaria
- Figura 5.** Mortalidad por cáncer cervicouterino y mama en nuestro país
- Figura 6.** Subtipos de cáncer de mama
- Figura 7.** Fosforilación Oxidativa, Glicolisis Anaerobia y Efecto Warburg
- Figura 8.** Modelos de la ruta de señalización mTOR y sus interconexiones
- Figura 9.** Equipo microPET para estudio de animales
- Figura 10.** Inoculación, aparición de masa tumoral y administración intra peritoneal en ratones inmunosuprimidos
- Figura 11.** Estructura química de la Metformina
- Figura 12.** Estructura química del F3
- Figura 13.** Estructura química de la Doxorubicina
- Figura 14.** Diagrama de flujo de la estrategia experimental *in vitro*
- Figura 15.** Diagrama de flujo de la estrategia experimental *in vivo*

- Figura 16.** Gráficos de la Concentración mínima Inhibitoria 50 (IC₅₀) de los fármacos en estudio
- Figura 17.** Graficas de puntos; ensayos Anexina V/IP
- Figura 18.** Gráficos de apoptosis y necrosis
- Figura 19.** Valoración morfológica de la línea celular de CMTN por el efecto de los fármacos
- Figura 20.** Evaluación del crecimiento tumoral en grupos experimentales con tratamientos individuales a través de microPET
- Figura 21.** Evaluación del crecimiento tumoral en grupos experimentales con tratamientos en sinergia a través de microPET
- Figura 22.** Curvas de crecimiento tumoral con tratamientos individuales y en sinergia
- Figura 23.** Histología de xenotransplantes de grupos representativos del estudio (Control negativo, Doxorrubicina y Doxorrubicina/Metformina/F3)
- Figura 24.** Blancos terapéuticos inhibidos mediante nuestra propuesta farmacológica

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Radiofármacos con aplicaciones oncológicas empleados en PET
- Tabla 2.** Concentraciones de los tratamientos individuales y en sinergia empleados para la obtención de la IC_{50}
- Tabla 3.** Distribución de grupos experimentales y dosis de tratamientos administrados a cada animal

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) es el tumor maligno de mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial y en nuestro país. La mayor parte de los casos son diagnosticados en fases avanzadas con bajas posibilidades de curación representando un grave problema de salud pública (Rodríguez-Cuevas *et al*; 2006). El CaMa tiene una gran heterogeneidad en su biología, evolución y respuesta al tratamiento, mediante marcadores histopatológicos se han definido diferentes fenotipos, los cuales sirven como marcadores de respuesta a la terapia (Bombonati y Sgroi, 2011). El fenotipo de mayor agresividad comprende los tumores que carecen de receptores de estrógenos (RE), de receptores de progesterona (RP) y del receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) es decir, tumores mamarios triple negativos (TMTN) (Lara-Medina *et al*; 2011). En nuestro país los TMTN corresponden a más del 20% de los tumores de mama; los tratamientos disponibles para este tipo de tumores comprenden cirugía, radiación y tratamiento co-adyuvante con fármacos de los grupos de antraciclinas y taxanos (doxorubicina, gemcitabina, ciclofosfamida). A la fecha, no existe una terapia blanco para estos tumores (Chávarri-Guerra *et al*; 2012). Las tasas de recurrencia de enfermedad y metástasis son sumamente altas para este tipo de tumores, en promedio de 3 a 5 años después del tratamiento, por otra parte la supervivencia y el pronóstico de la enfermedad son sumamente pobres (Knaul *et al*; 2009).

Desde una perspectiva clásica, el cáncer es considerado como una enfermedad genética; no obstante, recientemente este concepto ha cambiado y dentro de las múltiples causas que desencadenen su desarrollo, actualmente también se aborda al

cáncer como una enfermedad metabólica (Soga, 2013). Una de las aportaciones más importantes al respecto es el denominado “efecto Warburg” o glicólisis aerobia. Este fenómeno descubierto por Otto Warburg en 1923 establece que las células tumorales presentan un incremento en su tasa glicolítica con respecto a las células normales; tal atributo le permite a la célula tumoral proliferar velozmente y mantener una fuente constante de energía mostrándolo como un blanco terapéutico prometedor.

De acuerdo con lo anterior, en este proyecto de tesis se propuso el empleo coadyuvante de dos fármacos: la Metformina y el F3; inhibidores de mTOR y glicólisis, respectivamente, en combinación con la Doxorubicina (utilizada en la quimioterapia convencional), en la línea celular de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231 en un modelo *in vivo*. Los resultados aquí presentados demuestran que el tratamiento coadyuvante con Doxorubicina, Metformina y F3 inhiben por completo la proliferación de esta línea celular tanto *in vitro* como *in vivo*.

1. Antecedentes generales del tema

1.1 Cáncer

1.1.2 Metástasis

1.1.3 Características distintivas del cáncer

El cáncer es un proceso complejo de múltiples enfermedades; involucra cambios dinámicos en el genoma que conducen a la transformación maligna de células normales debido a la falla o defectos en circuitos regulatorios que gobiernan la proliferación y homeostasis de las células normales (Shackelford y Shaw, 2009). De manera clásica, el cáncer se ha conceptualizado como una enfermedad genética, es decir, participan diferentes alteraciones genéticas que progresivamente se acumulan y heredan en cada ciclo celular a las subsecuentes poblaciones celulares (Gwinn *et al*; 2008). Sin embargo, nuestro conocimiento sobre la biología celular y molecular de las células tumorales ha cambiado significativamente desde hace algunas décadas. Un ejemplo son las modificaciones epigenéticas, es decir, cambios en los perfiles transcripcionales sin que exista modificación alguna en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (DNA). Actualmente se sabe que el desarrollo y la progresión del cáncer, desde etapas neoplásicas hasta el tumor con capacidad de invasión y metástasis, comprenden una cadena de eventos complejos y sucesivos (Mullan y Millikan, 2007). Estos eventos consisten en diversos episodios de expansión clonal de células somáticas, durante los cuales el genoma de la célula incipientemente cancerosa adquiere la capacidad autónoma de proliferación y sobrevivencia sin límites mediante la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores que controlan de forma directa o indirecta la proliferación y muerte celular.

Las mutaciones e inestabilidad genética son responsables de las características biológicas de la progresión tumoral (Valdespino-Gómez y Valdespino-Castillo, 2010). La transformación de una célula normal en tumoral, conlleva a una pérdida del control de la proliferación, es decir, si la célula pierde la capacidad de responder a factores inhibidores del crecimiento se genera como consecuencia la acumulación progresiva de defectos en el genoma que contribuye en su conjunto a la generación y progresión tumoral. La gran mayoría de los tipos celulares presentan una enorme variedad de funciones génicas alteradas, incluyendo la activación de genes promotores del crecimiento, así como el silenciamiento de genes con funciones supresoras del mismo; estas alteraciones, colaboran a la evasión de mecanismos de control de crecimiento normales, lo que conlleva a un crecimiento celular descontrolado (Alberts *et al*; 2004). **(Figura 1).**

Las células disponen de mecanismos de vigilancia o checkpoints que actúan controlando la progresión del ciclo celular. Cuando estos sistemas de vigilancia detectan alguna anomalía, detienen el ciclo celular mediante la activación de mecanismos de reparación (Wang y Green, 2012). Por el contrario, en caso de no poder mantener la homeostasis celular, se provoca un ataque contra la integridad celular, desencadenándose así la apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis es considerada como una muerte natural fisiológica controlada presente en todas las células del organismo, es un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas y desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Evan, 2008).

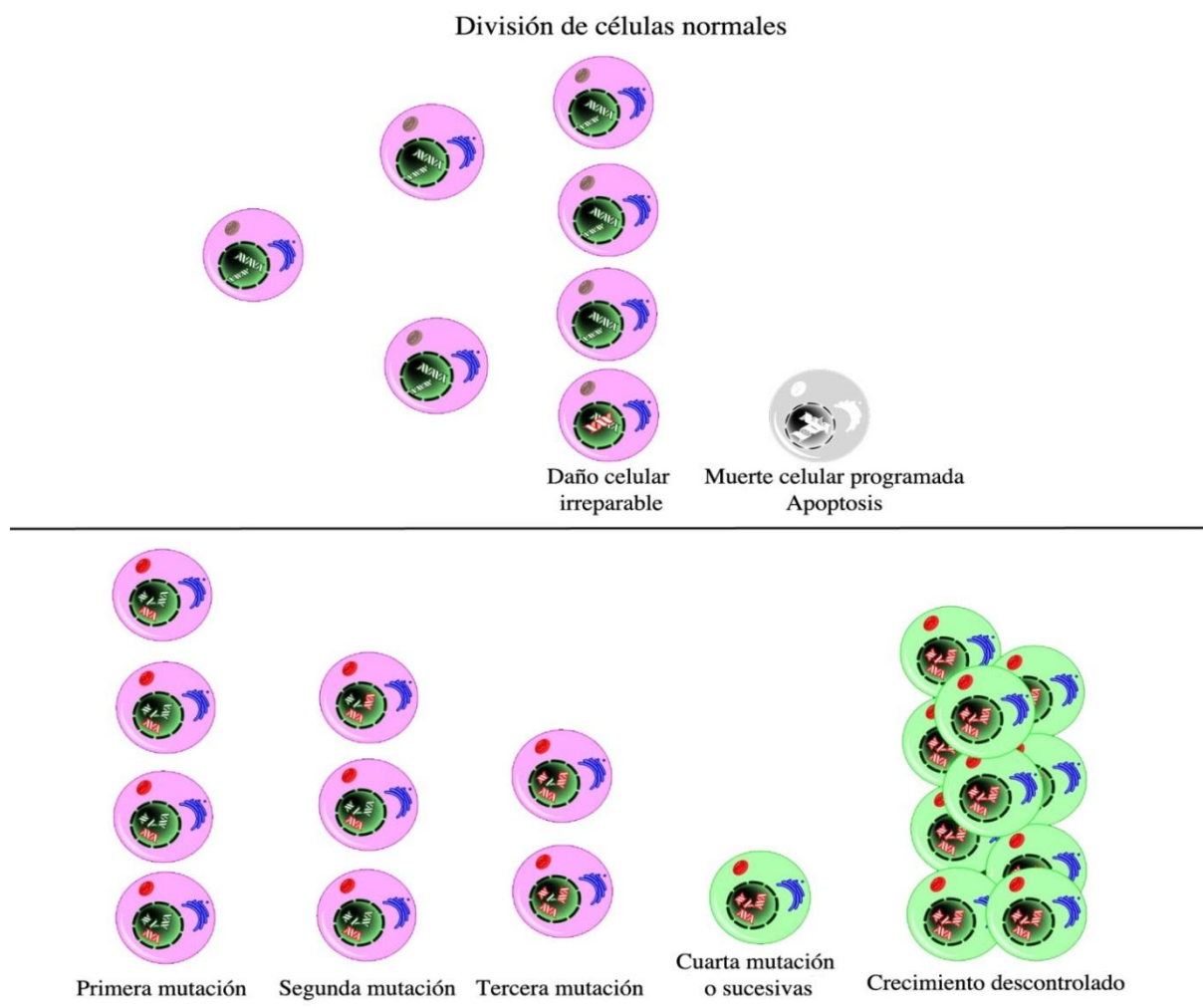


Figura 1. Proliferación en célula normal y cancerosa. La división celular controlada de una célula normal es gobernada por mecanismos de control o checkpoints que actúan controlando la normalidad de la progresión celular, cuando estos sistemas detectan una anomalía en el funcionamiento de la célula que ponga en riesgo la integridad de la misma, se desencadena el mecanismo conocido como apoptosis. La división de células cancerígenas tiene lugar cuando estas se dividen de manera descontrolada debido a la pérdida de la capacidad de responder a los factores inhibidores de crecimiento generando como consecuencia la acumulación progresiva de defectos en el genoma que contribuye en su conjunto a la generación y progresión tumoral (Modificado de: Shackelford y Shaw, 2009).

Durante la apoptosis no participan reacciones de inflamación ni se producen cicatrices en los tejidos (Abbas *et al*; 2013). La proliferación descontrolada en las células cancerosas se origina por la acumulación de mutaciones en genes clave que inducen o inhiben diferenciación, senescencia o muerte celular. En ambos eventos: la pérdida de funcionalidad de los checkpoints y de apoptosis dan lugar a la formación de tumores (Tommasi *et al*; 2013).

Otro tipo de muerte celular es la necrosis o muerte patológica, proceso provocado por traumas o agentes externos letales. La célula en necrosis se caracteriza por la pérdida de integridad de la membrana, la entrada de agua, aumento del tamaño celular y activación de fosfolipasas con ruptura de las membranas de los organelos; además, se produce de forma tardía la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA en fragmentos grandes y de tamaño irregular (Hamed *et al*; 2012). La célula al desintegrarse libera los contenidos de los organelos provocando inflamación local **(Figura 2)**.

Por otra parte las células cancerosas bajo ciertas circunstancias pueden hacer metástasis, es decir, invadir y colonizar órganos distantes al sitio original del tumor. La metástasis es un proceso multiseccional progresivo mediante el cual las células malignas adquieren capacidad invasiva viajando por el sistema circulatorio linfático para colonizar y proliferar en otros tejidos dañándolos y provocando tumores (Foubert *et al*; 2010).

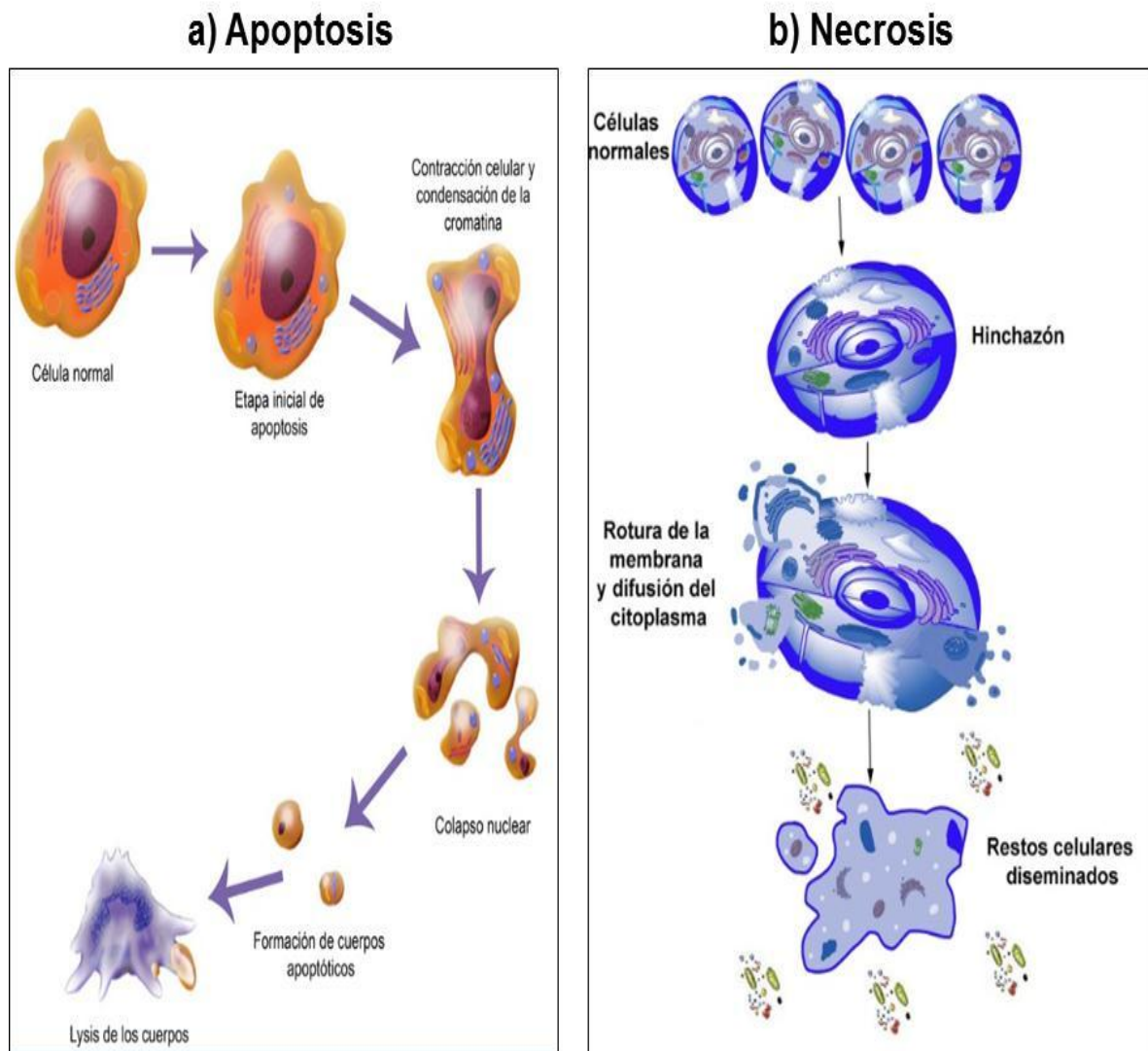


Figura 2. Proceso de Apoptosis y Necrosis. a) La apoptosis representa un tipo de muerte natural que la célula lleva a cabo ante alteraciones que es incapaz de reparar; el núcleo y el citoplasma se condensan preservando la integridad de la membrana plasmática y de los orgánulos, la cromatina se compacta hacia la membrana nuclear. La célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos produciéndose su fagocitosis, con lo que se impide la liberación de los contenidos celulares al espacio extracelular. b) En la necrosis o muerte patológica se presenta una pérdida de la integridad de la membrana, hay entrada de agua, aumento del tamaño celular y activación de fosfolipasas con rotura de las membranas de los orgánulos; se produce de forma tardía la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA. La célula libera los contenidos de los organelos y los restos celulares inducen inflamación local. Modificado de (Curtin y Szabo, 2013).

Así, la carcinogénesis puede describirse como el resultado de alteraciones biológicas que ocurren en células normales en un proceso de pasos múltiples que involucra inicialmente cambios a nivel genético, seguido por la promoción y la progresión que finalmente puede llegar a producir tumores benignos o malignos (Link *et al*; 2010).

Actualmente, se sabe que existen más de 100 tipos de cáncer y diversos subtipos de tumores que pueden encontrarse dentro de órganos específicos. La complejidad que involucra la formación de una célula cancerosa está mediada por la manifestación de 10 alteraciones o características distintivas del cáncer, esenciales en la fisiología de la célula que dictan un crecimiento maligno. Cada uno de estos cambios fisiológicos involucra nuevas capacidades adquiridas durante el desarrollo de la célula cancerosa lo que representa un escenario exitoso para el desarrollo del tumor, adquiriendo una sucesión de procesos que le permita ser maligno en última instancia (Tommasi *et al*; 2013). Las características moleculares de esta enfermedad fueron descritas por Hanahan y Weinberg en el año 2000, quienes las agruparon en 8 funciones biológicas esenciales, a las que denominaron “*hallmarks*” del cáncer. Estos comprenden diversos mecanismos altamente organizados para el desarrollo de la enfermedad neoplásica, los cuales constituyen: 1) proliferación sostenida, 2) evasión de los mecanismos supresores de crecimiento, 3) inducción de invasividad y metastásis, 4) inmortalidad replicativa, 5) angiogénesis, 6) sobrevivencia; lo que permite inmortalidad replicativa sin límites, 7) inestabilidad genómica y mutaciones e 8) inflamación. Con base en los avances conceptuales en la última década, Hanahan y Weinberg en el 2011 añadieron dos “*hallmarks*” emergentes a la lista anterior: 9) la reprogramación del metabolismo energético y 10) la evasión en los procesos de destrucción del sistema inmune en la

célula tumoral, lo que actualmente conforman 10 características distintivas que permiten el desarrollo exitoso de la célula tumoral. Lo anterior le confiere a estas células cierta dimensión de complejidad e inestabilidad en el genoma generando una diversidad génica que facilita su sobrevivencia. La heterogeneidad de estos “*hallmarks*” le confieren a la célula tumoral un “microambiente tumoral” altamente coordinado, con capacidades moleculares y bioquímicas favorables que aumenta su capacidad de sobrevivencia **(Figura 3)** (Hanahan y Weinberg, 2011).

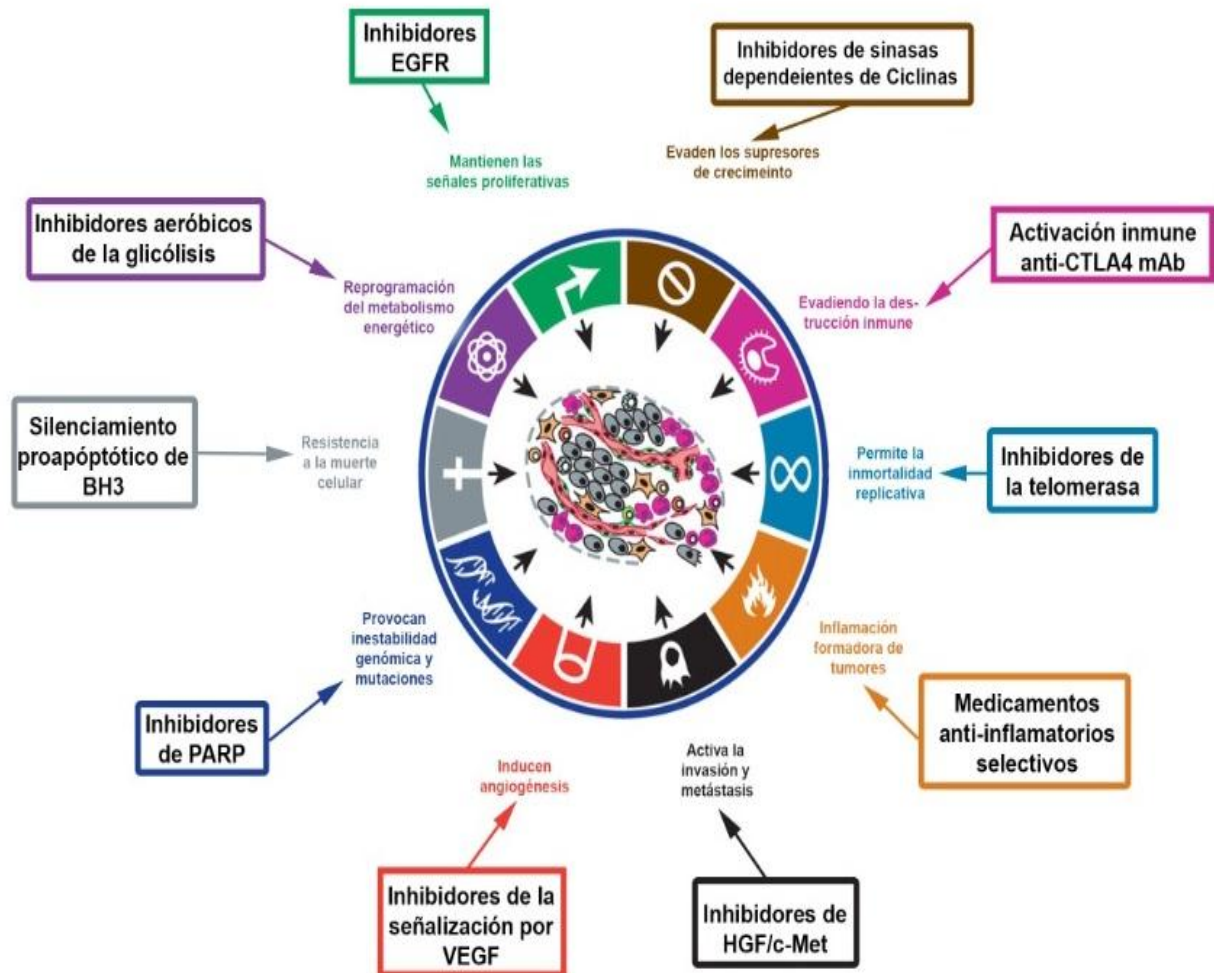


Figura 3. Características distintivas o “hallmarks” del cáncer: Estas capacidades incluyen procesos muy diversos y complejos, tales como: a) proliferación sostenida, b) evasión de los mecanismos supresores de crecimiento, c) inducción de invasividad y metástasis, d) inmortalidad replicativa, e) angiogénesis, f) supervivencia; lo que permite inmortalidad replicativa sin límites, g) inestabilidad genómica y mutaciones e h) inflamación, i) la reprogramación del metabolismo energético y j) la evasión en los procesos de destrucción del sistema inmune en la célula tumoral. (Modificado de Hallmarks of Cancer: The next generation. (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia maligna de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial y nuestro país no es la excepción, siendo un grave problema de salud pública (Rodríguez-Cuevas y Capurso-García, 2006). El CaMa es una enfermedad heterogénea en que se desarrollan células malignas en los tejidos de la mama, es causada por la interacción entre factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que producen degeneración celular, dando paso a las lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos en los tejidos de la mama. La glándula mamaria se compone de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos, y esta enfermedad afecta a una o ambas de las estructuras mencionadas (**Figura 4**).

Se sabe que el fenotipo de mayor agresividad en CaMa contiene tumores que no expresan los RE y RP y HER2, también conocidos como fenotipo TN que representa el 15% de todos los cánceres de mama infiltrantes y estos, indican en su mayoría, histologías de mal pronóstico que, en general presentan un alto grado e índice de proliferación celular. Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales y el resto lobulillares (Chávarri-Guerra *et al*; 2012). Diversos estudios sustentan que el cáncer de mama tiene una relación causal con el estado hormonal. El periodo de exposición a estrógenos es un factor crítico, por lo que una menarca temprana y menopausia tardía se asocian a carcinogénesis en mama (Rakha *et al*; 2007).

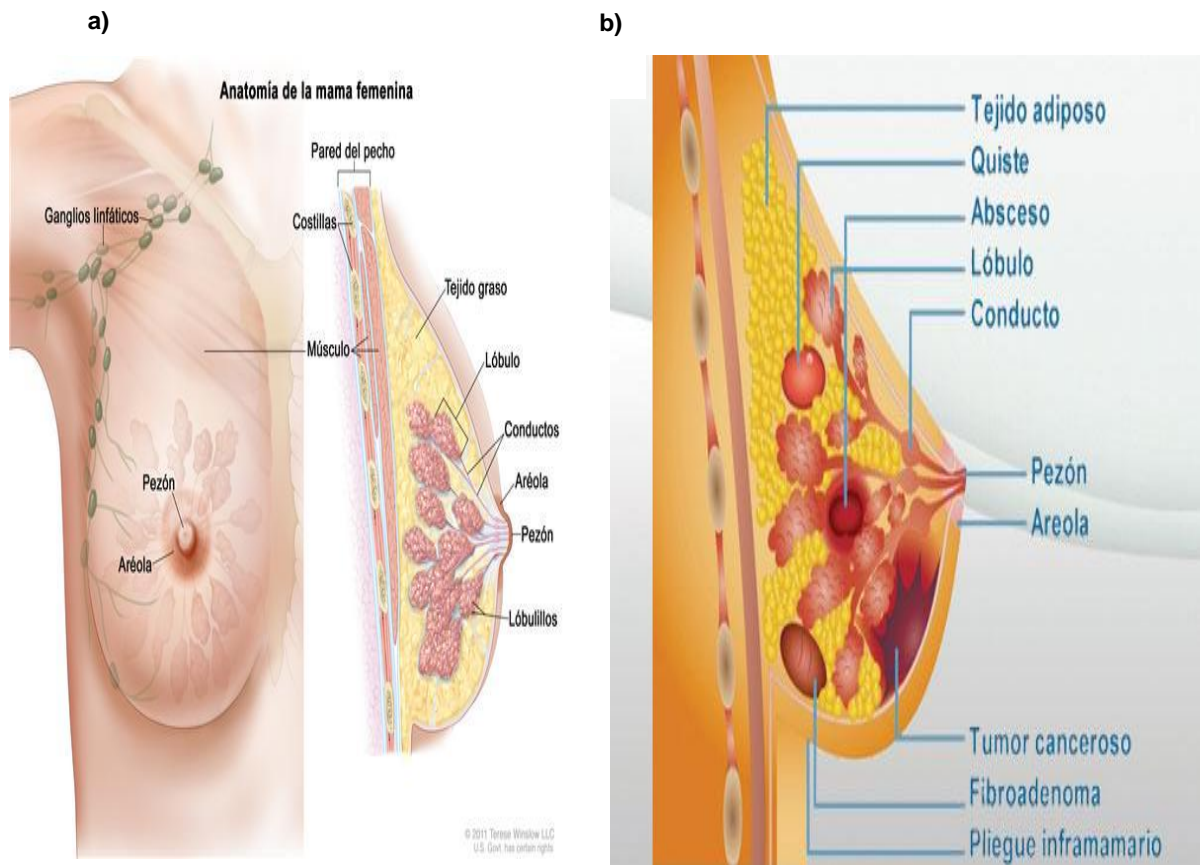


Figura 4. a) anatomía de la glándula mamaria en estadio adulto; consiste de lóbulillos (glándulas productoras de leche), conductos (tubos que llevan la leche desde los lobulillos al pezón) y estroma (el tejido adiposo y el tejido conectivo que rodean los conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos). b) El cáncer de mama es el crecimiento descontrolado de células malignas en el tejido mamario, las cuales forman tumores y pueden diseminarse a otras zonas del organismo. El carcinoma ductal; es más común y comienza en los conductos que transportan leche de la mama al pezón; el lobulillar: inicia en los lóbulos que son los encargados de producir leche. Algunos cánceres se originan en las células que recubren los ductos (cáncer ductal); otros en las células que recubren los lobulillos (cáncer lobulillar). El fibroadenoma, es el tumor benigno de las mamas que aparece con mayor frecuencia en mujeres menores de 30 años; los abscesos que son la acumulación de pus debida a infección por bacterias que se introducen a través de una herida, casi siempre en los pezones. (Modificada de Gjorevski y Nelson, 2011).

Por otro lado la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Se sabe que la historia familiar, mutaciones genéticas BRCA1 y BRCA2 (cáncer de mama tipo 1 y 2, por sus siglas en inglés, Breast Cancer 1 y 2; en aproximadamente una de cada mil mujeres), polimorfismos genéticos asociados a la síntesis de estrógenos y su metabolismo, determinan la prevalencia del cáncer mamario en una población (Lara-Medina *et al*; 2011). En el 85% de los casos de cáncer de mama no hay evidencia de historia familiar, no obstante, cuando ésta se presenta, el riesgo para la mujer con antecedentes familiares (madre, hermana, hija) es 2-3 veces mayor que en la población sin antecedentes familiares. Esta neoplasia tiene un alto potencial de extenderse a otras regiones del cuerpo tales como hueso, pulmón e hígado y las opciones para su tratamiento en estado metastásico avanzado son limitadas (Martínez-Montañez *et al*; 2009).

1.3 Métodos de diagnóstico de CaMa

La Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002 es una herramienta legal publicada en 2003 que establece criterios de operación para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del CaMa. Esta norma reconoce 3 tipos de intervenciones específicas para su detección: 1) la autoexploración, 2) el examen clínico y 3) la mastografía o mamografía. Establece que los factores de riesgo son: ser mujer mayor de 40 años, historia personal o familiar de CaMa, obesidad, patologías benignas de mama y otros asociados con factores hormonales (Brandan y Navarro, 2006).

Con base en el conocimiento que una célula de cáncer de mama generalmente se duplica cada 100-300 días; una neoplasia de mama de 1 cm realiza cerca de 30 duplicaciones antes de alcanzar este tamaño, por lo que este cáncer tiene, como mínimo, unos 7 años de evolución (Brandan y Navarro, 2006). Esta estimación sugiere la utilidad de la detección temprana, con métodos capaces de visualizar alteraciones de tamaño inferior a 1 cm. Entre los procedimientos de detección, que incluyen también la autoexploración y el examen clínico, la mamografía es la única técnica que puede ofrecer una detección suficientemente oportuna. En México los métodos de tamizaje para el diagnóstico de CaMa más utilizados son la autoexploración mamaria y la mamografía. En nuestro país donde la mayoría de los tumores malignos de mama son diagnosticados en etapa avanzada, las mamografías se han utilizado casi totalmente con fines de diagnóstico (García *et al*; 2012).

La autoexploración mamaria es una técnica de detección del cáncer mamario basada en la observación y palpación que hace la mujer en sus propias mamas. En un alto porcentaje son las mujeres las que detectan las alteraciones mamarias. La Sociedad Americana del Cáncer (ACS) recomienda la autoexploración de glándula mamaria en forma mensual a todas las mujeres a partir de la menarca, sobre todo en las mayores de 20 años. En México existen diversas publicaciones con respecto a enseñanza y prevalencia de la aplicación de autoexploración mamaria (Ortega-Altamirano y López-Cervantes, 2000) y se concluye que las mujeres son capaces de detectar lesiones de, al menos, 1 cm y, cuando son superficiales, de hasta 0.5 cm una vez que han recibido capacitación. El impacto mundial de la autoexploración mamaria muestra datos inconsistentes y no refleja disminución de la mortalidad, pero algunos

reportes refieren un mejor pronóstico para las pacientes, ya que se detectan lesiones en etapas clínicas I y II (Millar, 1993). El 90% de los casos de CaMa en nuestro país son detectados gracias a que la propia paciente detecta un abultamiento o nódulo, y en estos casos ya se trata de un estadio avanzado de la patología (López-Carrillo; *et al* 2001). Obtener una historia clínica completa es el primer paso del examen clínico mamario, y esta debe incluir antecedentes importantes tales como el estado hormonal y la historia familiar de CaMa. Se ha encontrado que la exploración física de la mama permite una detección de hasta 50% de lesiones no vistas en mamografías, con un valor predictivo positivo de 73% y negativo de 87% (Levi *et al*; 2005).

La mamografía (también llamada mastografía) es una imagen plana de la glándula mamaria obtenida con rayos X (Tabar *et al*; 2003). La imagen se forma debido a la diferente atenuación sufrida por los rayos al atravesar los medios que constituyen la mama. Así, un estudio mastográfico de escrutinio para detectar lesiones subclínicas en mujeres asintomáticas, consiste de 2 pares de imágenes: una proyección cráneo-caudal y una medio-lateral-oblicua, para cada mama. Una mamografía de escrutinio busca visualizar lesiones no-palpables (es decir, menores de 0.5 cm si se trata de nódulos), calcificaciones (nunca palpables por su reducido tamaño), asimetrías en la densidad mamaria, y/o distorsión de la arquitectura de la glándula. Los nódulos son objetos que aparecen en ambas proyecciones con densidad media y alta, sus contornos son indicadores de malignidad (van Dam *et al*; 1988). Las calcificaciones son acumulaciones cristalinas de calcio, de tamaños de cientos de micras, cuyo patrón de agrupación y morfología es indicador de malignidad. La imagen

mamográfica solo permite visualizar estos indicadores, y la severidad de la lesión en la mama (Andrieu *et al*; 2006).

Se recomienda la autoexploración mensual a partir de la menarca, el examen clínico de las mamas (realizado por médico o enfermera capacitados) en forma anual a todas las mujeres mayores de 25 años que asisten a las unidades de salud, y la toma de mastografía, anual o cada dos años a las mujeres de 40 a 49 años con dos o más factores de riesgo, y en forma anual a toda mujer de 50 años o más. Las evidencias científicas reconocen el valor de la mamografía de escrutinio como reductor de la mortalidad por CaMa para mujeres mayores de 50 años (Kerlikowske *et al*; 1995). El efecto benéfico para el grupo entre 40 y 49 es todavía una controversia, y las diferentes visiones sobre el tema se reflejan en las recomendaciones que distintos países han emitido respecto de la frecuencia recomendada del estudio. Por otro lado, el riesgo de radio-inducir un cáncer en mujeres con una predisposición genética se ha reconocido a nivel de estudios científicos.

La ACS recomienda una mamografía de escrutinio, cada año, para mujeres de 40 años o más y la Asociación Médica Estadounidense y el Instituto Nacional del Cancer (NCI) una cada 1 o 2 años para mujeres entre 40 y 49 años y una anual a partir de los 50 años (Robles-Castillo *et al*; 2011). La Sociedad Canadiense del Cáncer recomienda que mujeres entre 50 y 69 años se realicen una mamografía y un examen clínico de mama cada dos años (26). Diversos estudios refieren que gracias a la técnica de mamografía se ha logrado reducir la mortalidad de este padecimiento, logrando detectarlo en etapas iniciales; esta técnica también ha permitido observar que

del 15 al 30% de las neoplasias malignas de mama corresponden a carcinomas *in situ* y el resto a carcinomas infiltrantes y así poder emplear un tratamiento eficiente y oportuno (Ali y Coombes, 2002).

El patrón epidémico de este padecimiento sorprendió la infraestructura médica oncológica; estudios realizados por el IMSS refirieron que el recurso tecnológico de la mamografía no está disponible para uso masivo, si bien el número de detecciones realizadas se mantiene por el rango de los 2 millones; sin embargo a pesar de su eficacia para la detección temprana del padecimiento aún es insuficiente lograr coberturas adecuadas que puedan incidir sobre la mortalidad por esta causa (Miranda, *et al*; 2011). Este análisis sobre los recursos disponibles para el tratamiento del CaMa en México muestra con claridad que los recursos disponibles son insuficientes para cumplir con la demanda de atención médica que requiere el creciente número de mujeres con CaMa (Mohar *et al*; 2009).

Con el empleo de estas técnicas de detección se observado beneficios muy significativos como la reducción del tiempo en la detección del CaMa en fases más tempranas, sin embargo es necesario señalar que esto es posible mientras exista el personal entrenado para realizar el examen clínico y haya una adecuada capacitación de las mujeres para hacerse la autoexploración, lo anterior se menciona debido a que en un estudio realizado en 256 mujeres mostró que el 30% de las mujeres que se practicó la autoexploración solo un porcentaje todavía menor lo hizo de manera adecuada (Helfand *et al*, 2000) . De lo anterior se deduce que aún falta educación para mujeres sobre salud de la mama, a pesar de que existe evidencia que sugiere que las

mujeres con capacitación tienen mayor probabilidad de detectar una lesión. se ha reconocido la importancia de que el médico y el personal de enfermería plenamente capacitado realicen las actividades de prevención, así como la detección de factores de riesgo, examen clínico de mama, mamografía e información educativa a las mujeres incluyendo la enseñanza de autoexploración mamaria, de lo contrario las detecciones seguirán siendo tardías y la mortalidad seguirá aumentando. Por lo tanto, es importante implementar métodos de tamizaje y políticas públicas de salud más eficientes para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del CaMa (Cabrera-Gaytan *et al*; 2008).

Por otro lado, la malignidad del tumor solo se determina a través del análisis patológico de la muestra citológica o histológica. Esta prueba de rutina actualmente empleada es la técnica de inmunohistoquímica, la cual se enfoca en la búsqueda de la expresión de marcadores moleculares característicos de la célula tumoral. En el CaMa, la presencia en el tumor del RE, RP y del HER2 indican en su mayoría histologías de mal pronóstico. Estos receptores que se emplean como marcadores pronósticos representados como indicadores de respuesta al tratamiento permiten identificar diferentes subtipos histológicos (Knaul *et al* 2009).

1.4 Morbilidad y mortalidad de cáncer de mama

El CaMa es la manifestación oncológica con mayor incidencia y mortalidad en mujeres en todo el mundo, afecta principalmente a mujeres entre 30 y 59 años de edad. En 2008, se reportaron 1,384,155 nuevos casos y la mortalidad fue de 458,503 (Ferlay *et al*; 2010). Los principales factores de riesgo para el CaMa incluyen la edad, la historia familiar de CaMa, la predisposición genética (por ejemplo, mutaciones en los genes BRCA), menarquia temprana y menopausia tardía (55 años de edad o más), primer embarazo a término después de 30 años de edad, corto período de lactancia, mala alimentación (dieta baja en fibra), la adiposidad (índice de masa corporal >30), el consumo de alcohol, baja o nula actividad física, terapias de remplazo hormonal en la menopausia, entre otros (Cabrera-Gaytán *et al* 2008). En los últimos veinte años, la incidencia y mortalidad por cáncer de mama ha aumentado en los países en desarrollo, especialmente entre las mujeres más jóvenes. En México, se registraron 13,939 nuevos casos y 4,500 casos de muertes por CaMa en 2008 (Jemal *et al*; 2010). Estudios realizados por la Fundación Mexicana de Salud, reportaron que a partir del 2006, en mujeres, el riesgo de morir por CaMa en nuestro país excedió el riesgo de morir por cáncer cérvico-uterino posicionando al CaMa como la principal causa de muerte por enfermedades oncológicas en México (Figura 5) (Knaul *et al*; 2009).

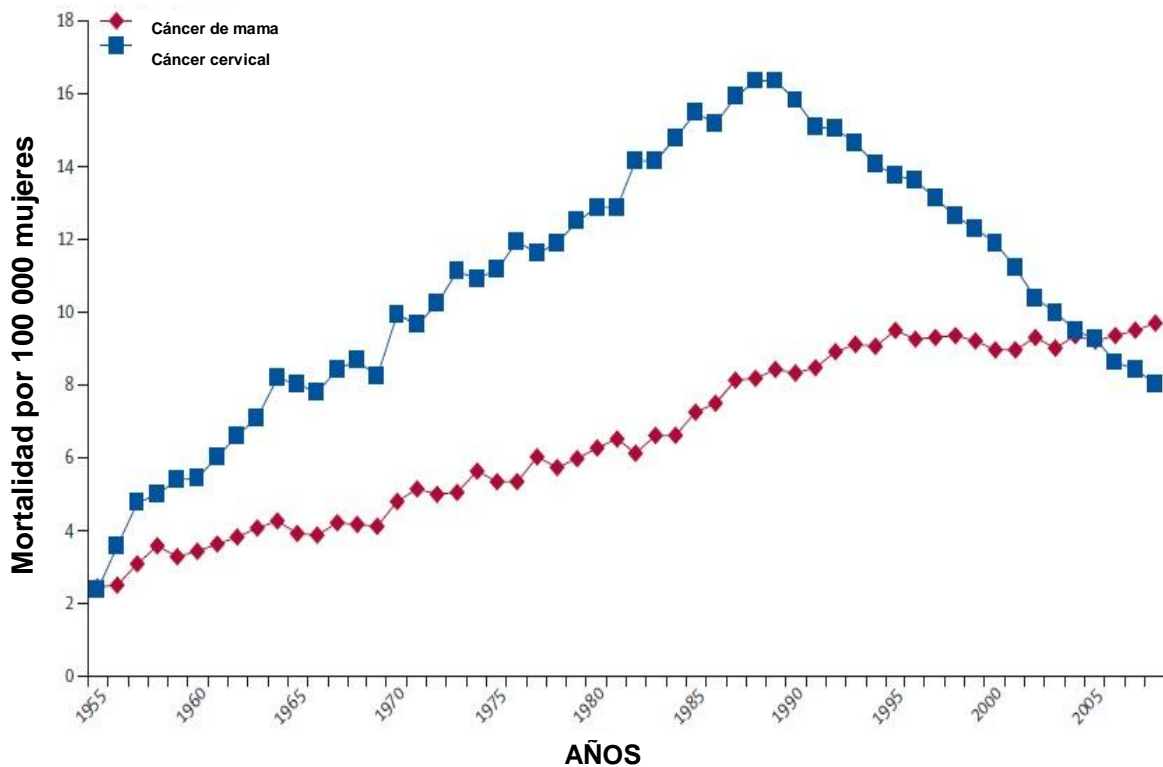


Figura 5. Mortalidad por cáncer cérvico-uterino y mama en nuestro país: En el año 2005 la mortalidad por cáncer cérvico-uterino supero la mortalidad por cáncer de mama en el periodo de 1995-2005 en mujeres mexicanas, colocándose en la primera causa de muerte en nuestro país. Tomado de Chávarri-Guerra *et al*; 2012.

Por otra parte, México en una escala a nivel mundial tiene una incidencia y mortalidad por CaMa baja, la incidencia se ha triplicado en los últimos 6 años y se espera que esta tendencia continúe en el futuro (Cabrera-Gaytán *et al*; 2008). Según el INEGI, datos reportados en el 2010, 19 de cada 100 mujeres que ingresan a la atención hospitalaria lo hacen debido a neoplasias malignas mamarias (INEGI, 2010). Casi la mitad de los casos (45.5%) ocurren en mujeres menores de 50 años de edad, en contraste con la incidencia de CaMa de Estados Unidos, donde sólo el 25% de los casos son mujeres pre-menopáusicas (Martínez-Montañez *et al*; 2009). Existen evidencias de que la edad promedio de inicio de la enfermedad es menor en los países

en desarrollo que en los más desarrollados; sin embargo en la actualidad se ha reportado que esta enfermedad afecta a todos los grupos poblacionales (Calderón-Garcidueñas *et al*; 2000). Este aumento en la incidencia del CaMa se ha asociado a la consecuencia de la adquisición del tipo de vida “occidental” (dieta alta en calorías, la falta de ejercicio físico, alto consumo de grasa animal). Estas observaciones sugieren que los factores ambientales y el estilo de vida, particularmente la alimentación, juegan un papel fundamental en la evolución de ésta neoplasia (Ortiz-Rodríguez *et al*; 2008).

1.5 Subtipos de cáncer de mama

La clasificación de subtipo de CaMa se basa en las alteraciones en la expresión de marcadores histopatológicos, moleculares y epigenéticos, así como diversas mutaciones genéticas. Todas estas características participan en combinación en el desarrollo, promoción, recurrencia, la respuesta al tratamiento y el comportamiento metastásico de CaMa (Cummings *et al*; 2011). Los tumores aunque aparentemente sean de morfología homogénea, tienen características biológicas que afectan la respuesta al tratamiento y los perfiles genéticos de cáncer de mama. Esta heterogeneidad ha hecho necesaria la identificación de los tumores mediante su agrupamiento en diferentes clases, que varían tanto por las características biológicas del tumor, como por la respuesta a tratamientos específicos (Badve *et al*; 2011). Mediante el uso de perfiles de expresión génica y el análisis de expresión de biomarcadores por inmunohistoquímica en tumores de mama, se han definido diferentes fenotipos moleculares con valor predictivo y pronóstico que incluyen

receptores hormonales (HR, por sus siglas en inglés; hormonal receptors) de RE y RP respectivamente y del receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano-2 (HER2, por sus siglas en inglés; Human Epidermal Growth Factor-2). Con base en la presencia o ausencia de estos marcadores moleculares se han establecido diferentes subtipos de CaMa: luminal A, luminal B, tumores que sobre-expresan el HER2, bajos en claudina y de células tipo normales (normal-like) y de células tipo basales (basal-like) (Reddy, 2011). Los fenotipos tumorales normal-like y basal-like se distinguen por la expresión de citoqueratinas (CK 5/6/14/17) vimentina, p-caderina, caveolinas 1 y 2, un alto índice de proliferación y la presencia o ausencia del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, por sus siglas en inglés; epidermal growth factor receptor) (Perou *et al*; 2000). Tanto las citoqueratinas como el EGFR son marcadores asociados a un pobre pronóstico que caracteriza a este tipo de cáncer. Se ha estimado que el 91% de los TMTN pertenecen al subtipo basal-like (expresan CK 5/6/14/17 y EGFR) y solo el 9% al fenotipo normal-like (expresan CK 5/6/14/17 pero no EGFR). Cabe mencionar que los términos basal-like y CMTN no son sinónimos aunque ambos subtipos se caracterizan por la falta de expresión de ER, PR y HER2 (Prat y Perou; 2009). En el caso de los tumores de mama basal-like expresan bajos niveles de ER, y sobreexpresan HER2; mientras que del 16 al 44% de los cánceres de mama TN son negativos para todos los marcadores basales, y 71% son positivos para al menos un marcador basal. Se especula que los subtipos de tumores de mama hasta ahora conocidos son definidos genómicamente porque pueden representar la transformación de células madre con arresto en estados específicos del desarrollo o alternativamente una transformación directa de varios tipos de células maduras. Para entender el origen celular de varios subtipos moleculares del CaMa, Lim *et al*; 2012 jerarquizaron el

epitelio humano mamario estableciendo un vínculo directo entre el desarrollo mamario y el perfil de los tumores. Sin embargo aunque esta clasificación molecular de los diferentes fenotipos tumorales de CaMa permita evaluar la respuesta a la quimioterapia en el CMTN, aún no existen blancos terapéuticos que cambien el manejo clínico agresivo o aumenten la supervivencia para las pacientes (**Figura 6**).

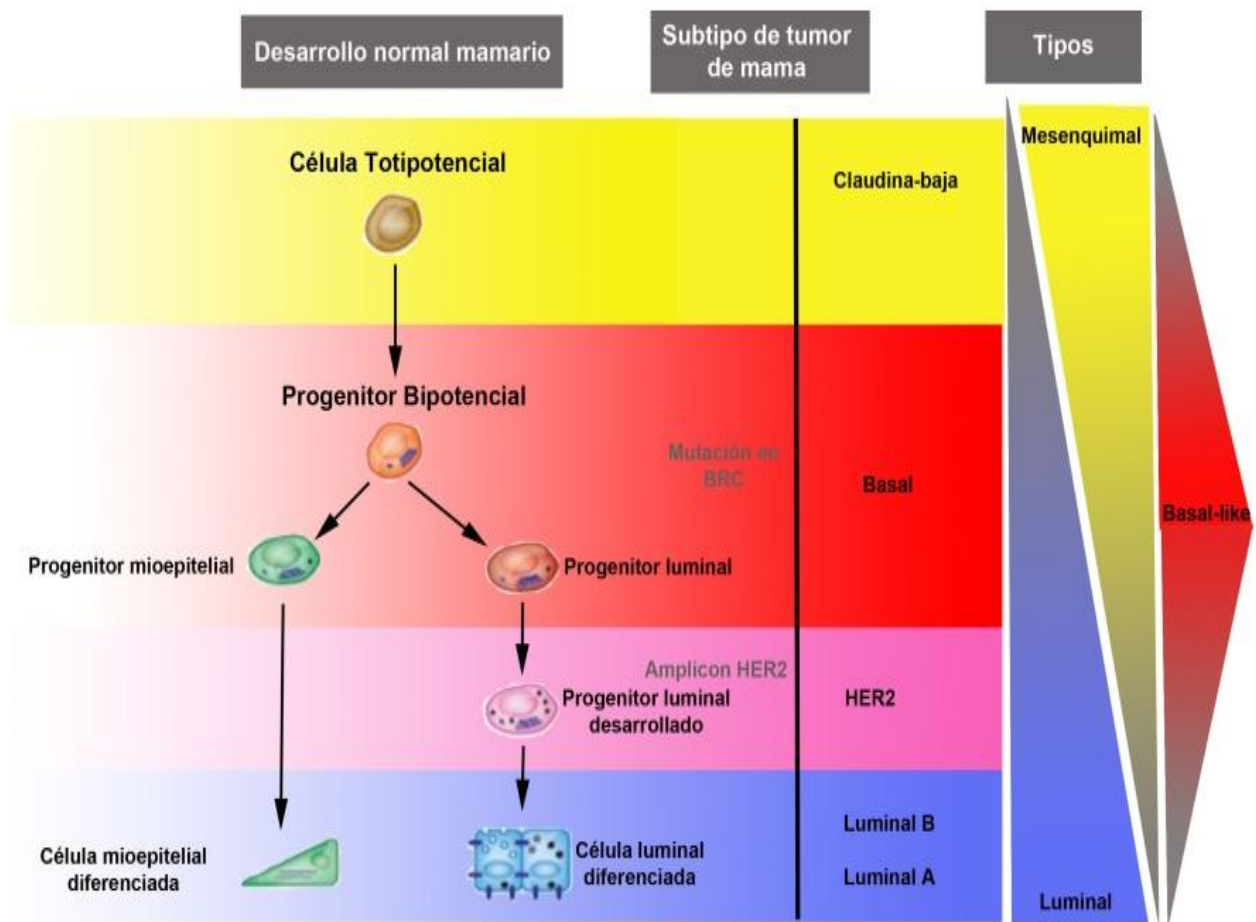


Figura 6. Subtipos de cáncer de mama: Desarrollo del epitelio mamario normal y sus posibles desarrollos a diferentes fenotipos moleculares de cáncer de mama (bajo en Claudina, basal, HER-2, luminal A y B). Del subtipo basal-like, que se caracterizan por ser TN se sabe que tiene pronóstico poco favorable en este padecimiento. Tomado de Prat y Perou 2009.

1.6 Cáncer de mama Triple Negativo

De manera particular, los fenotipos de tumores de mama con ausencia de ER, PR y HER2, son clínicamente referidos como tumores de mama TN. Los fenotipos tumorales TN tienen el peor pronóstico en términos de supervivencia y periodo libre de enfermedad (McCarthy *et al*; 2012). Los tumores TN se caracterizan por que alcanzan un gran tamaño en comparación con los otros subtipos tumorales, producen metástasis e invaden ganglios linfáticos con mayor facilidad; además están asociados con pobre pronóstico y baja supervivencia en quienes lo desarrollan. La mayoría de los tumores TN son de tipo basal, presentan una historia clínica agresiva con un alto grado patológico a diferencia de otros tipos de cáncer y, son altamente metastásicos (Chen *et al*; 2012). El método más utilizado para su identificación es el análisis de tinción inmunohistoquímica, basándose principalmente en la ausencia de expresión de receptores hormonales tanto de RE como del RP y la negatividad a la sobreexpresión de la proteína HER2. Sin embargo, dada la heterogeneidad de los tumores, es deseable la evaluación de sus características a nivel molecular mediante el análisis de la expresión génica por medio de microarreglos (Jemal *et al*; 2010); sin embargo la proporción de los TMTN puede variar entre diferentes grupos étnicos, en nuestro país en un estudio reciente se ha demostrado que los CMTN representan el 23% de la población con cáncer de mama infiltrante; además, también se ha observado que la edad promedio al momento del diagnóstico es 11 años más joven que lo reportado en otros países (Lara-Medina, 2011). Se estima que un millón de casos de cáncer de mama sean diagnosticados cada año en el mundo, de estos, más de 170 000 son descritos como TN. Los tumores TN suelen ser de grado 3, con un alto índice mitótico,

infiltrado celular y centro necrótico (de Ruijter *et al*; 2011). Los pacientes que lo presentan tienen un alto riesgo de recurrencia temprana que va de entre 1-3 años después de la cirugía y culmina con una mayor tasa de mortalidad a los 5 años después de la quimio y radioterapia (Young *et al*; 2009). En un estudio con 10,519 pacientes, Dent *et al*; 2007 observaron que este incremento en la tasa de mortalidad después del tratamiento con doxorubicina es debido a la metástasis visceral que se desarrolla. Actualmente, no hay ningún tratamiento específico contra estas entidades. Los enfoques terapéuticos están basados en pruebas empíricas y comprenden principalmente esquemas de quimioterapia fuertes con agentes citotóxicos tales como doxorubicina, ciclofosfamida, docetaxel, gemcitabina, entre otros fármacos altamente tóxicos para los pacientes (Cleator *et al*; 2007). Por otra parte, recientemente se ha observado que alrededor del 20% de los TMTN esporádicos tienen mutaciones en el gen *BRCA1*, un hecho que ha suscitado un gran interés debido a la posible sensibilidad de estas neoplasias a inhibidores de Poli-ADP-Ribosa-Polimerasa (PARP), y por lo tanto un blanco alternativo como terapia para el tratamiento del CMTN (González-Angulo *et al*; 2011 y Lehmann *et al*; 2011).

2. Antecedentes generales del trabajo de tesis

2.1 Metabolismo de la célula tumoral

El cáncer ha sido considerado en general como una enfermedad genética, en la que se acumulan diversas mutaciones durante varios años y se heredan progresivamente en cada ciclo celular a las subsecuentes poblaciones de células hijas

hasta que se presentara un factor que desencadenará este mecanismo. Sin embargo, el conocimiento de la biología celular y molecular de las células tumorales ha cambiado significativamente desde hace algunas décadas (Tubiana, 2008). Por ejemplo, se ha propuesto que las modificaciones epigenéticas intervienen en el proceso de la carcinogénesis, es decir, se producen cambios en los perfiles transcripcionales sin que se modifique la secuencia del DNA (Pérez-Plasencia y Dueñas-González, 2006). De igual forma, se ha entendido que la célula tumoral puede ser vista desde la perspectiva de las alteraciones metabólicas presentes (García, 2010), observación hecha hace casi un siglo por Otto Warburg en 1923. En general, se ha establecido que la mayoría de las células tumorales presentan un metabolismo significativamente alterado en comparación al de sus contrapartes normales, estas características les permite mantener altas sus tasas proliferativas, resistiendo así a las señales de muerte celular, al mantenimiento de una fuente constante de energía con una tasa glicolítica mucho mayor que las células normales (Vander *et al*; 2009). La alta tasa proliferativa de una célula tumoral exige incrementar tanto la masa celular como duplicar su DNA (Hanahan y Weinberg, 2011). En ambos procesos se requiere sintetizar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, así como energía en forma de adenosin-trifosfato (ATP). De esta manera, la alta demanda energética y metabólica es resuelta en parte por un incremento en la absorción tanto de glucosa como de aminoácidos, principalmente glutamina **(Figura 7)** (Svensson y Shaw, 2012).

El metabolismo de la célula tumoral depende de la glicolisis aerobia o efecto Warburg en distintas vías biosintéticas; por ejemplo, la glicólisis genera intermediarios necesarios para la síntesis de ribosa-5-fosfato y glicina, empleados en la biosíntesis de

nucleótidos; además de glicerol, fundamental en el proceso biosintético de lípidos (Brown *et al*; 2013).

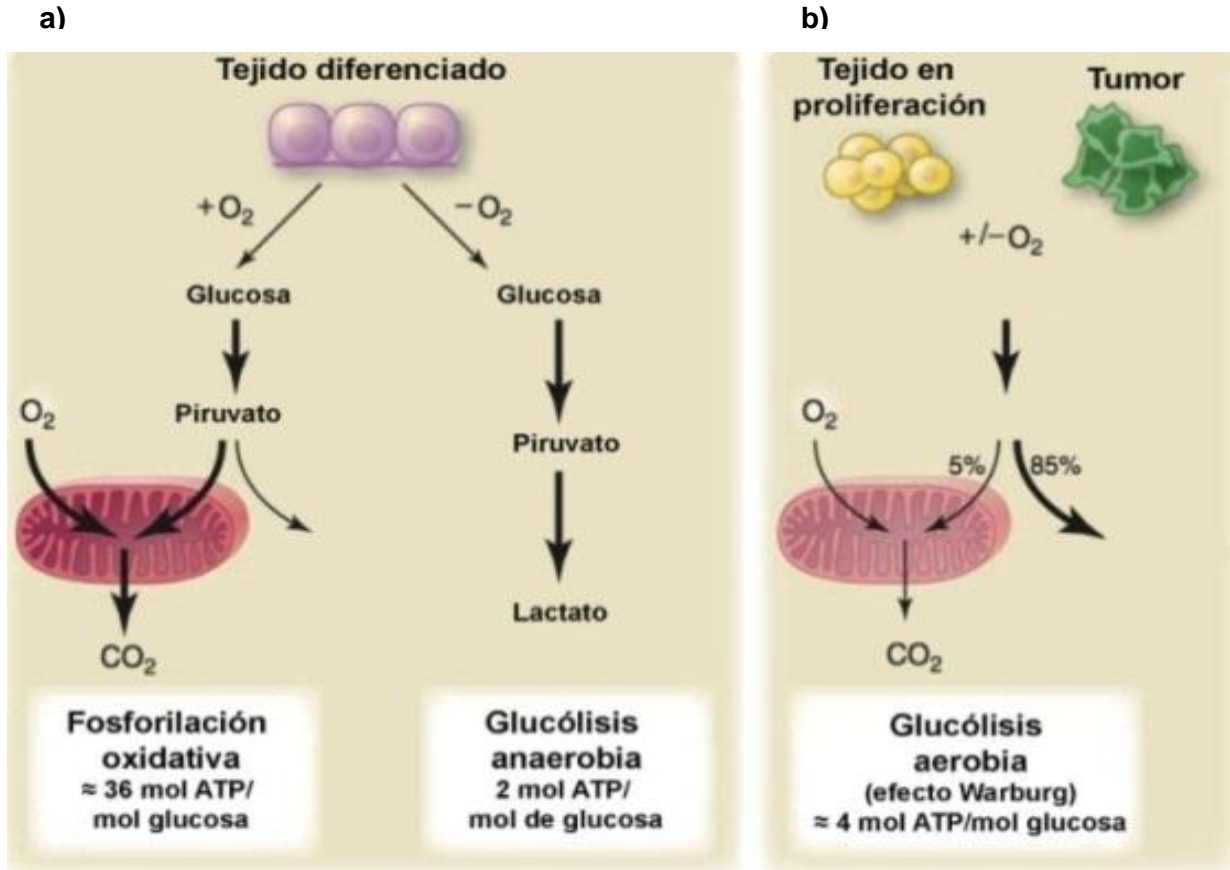


Figura 7. Diferencias entre fosforilación Oxidativa, glicolisis anaerobia y glicolisis aerobia o efecto Warburg. La glicólisis es un mecanismo de obtención de energía utilizado por células normales y la mayoría de las células tumorales. a) Las células normales metabolizan la glucosa a piruvato mediante 10 reacciones catalizadas por sus enzimas correspondientes, una vez que la glucosa es degradada a piruvato sigue 2 vías distintas: en condiciones anaeróbicas el piruvato se convierte a lactato y en condiciones aeróbicas ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y finalmente a fosforilación oxidativa para obtener 36 moléculas de ATP. b) La mayoría de las células cancerígenas toman la vía anaeróbica de conversión de piruvato a lactato oxidando la glucosa en presencia de O₂ a lo que se le denomina efecto Warburg. Tomado de Vander *et al*; 2009.

En el efecto Warburg o glicólisis aerobia el piruvato no es oxidado hasta CO_2 y agua con la subsecuente producción de ATP, en donde la mayor parte de la glucosa es degradada hasta lactato. Por lo tanto se ha sugerido que una de las funciones de este efecto es mantener altos los niveles de los intermediarios requeridos en el ciclo proliferativo de la célula maligna (Matthew y Heiden, 2011). El efecto Warburg está ampliamente documentado en tumores y líneas celulares mostrando la sobre-expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, como por ejemplo glicoproteínas integrales de membrana (GLUTs), involucradas en el transporte de glucosa (Noguchi *et al*, 2008; Chen *et al*, 2008; Chen *et al*; 2010), y diferentes enzimas involucradas en glicólisis tales como la glucosa-fosfato isomerasa, la aldolasa A, la GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), entre otras. Una de las enzimas clave en el efecto Warburg es la isoforma A de la lactato deshidrogenasa (LDH-A), enzima tetramérica con dos subunidades (A o B). la LDH-A se clasifica en cinco isoformas (A4, A3B1, A2B2, A1B3 y B4) que catalizan con diferente eficiencia la conversión de lactato a piruvato y viceversa (Altenberg y Greulich, 2004). La LDHA también llamada M-LDH o LDHA4, tiene mayor afinidad por el piruvato el cual es reducido a lactato, el cual una vez que se produce es liberado al espacio extracelular alcanzando los niveles tan altos como 10-20 mM (Schmid *et al*; 2007). El lactato es un metabolito importante y ha sido relacionado con distintos procesos del desarrollo tumoral. Por ejemplo, se ha estudiado la relación entre el incremento en la producción de lactato con la motilidad e invasividad celular por medio de la activación de metalo-proteasas (Lee *et al*; 2010); así mismo, el lactato también es capaz de inhibir la activación, diferenciación y expresión de antígenos en células dendríticas (Gottfried *et al*; 2006) y se ha asociado la presencia de niveles altos de lactato como un marcador

de metástasis en diferentes neoplasias (Brizel *et al*, 2001; Walenta *et al*; 2000). El “efecto Warburg”, es uno de los fundamentos conceptuales para entender el metabolismo de las células tumorales, en donde la fosforilación oxidativa es favorecida por el incremento en la actividad metabólica de la (LDHA), la que cataliza la conversión de piruvato a lactato oxidando también a la (nicotinamida adenin dinucleótido hidrogenado, NADH) a (nicotinamida adenin dinucleótido, NAD⁺) disminuyendo de esta manera la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y por ende la fosforilación oxidativa (Brand, 1985 y Forbes *et al*; 2006). Este fenómeno es explicado en gran medida por el ambiente hipóxico en el que se desarrollan las células tumorales. Sin embargo, la masa tumoral angiogénica puede tener una tensión de oxígeno similar al de las células normales (Khron *et al*; 2008); un ejemplo, son las leucemias, las cuales presentan una alta tasa glicolítica, aun cuando estas células se encuentran en el torrente sanguíneo, con tensiones de oxígeno incluso mayores que los tejidos normales. De igual manera, los tumores pulmonares presentan glucólisis aerobia, aun cuando su desarrollo ocurre en presencia de altas concentraciones de oxígeno (Christofk *et al*, 2008; Nolop *et al*, 1987). De este modo a pesar de que el choque hipóxico es un fenómeno importante para el desarrollo de la masa tumoral, es claro que la glicólisis aerobia no depende necesariamente de la hipoxia y puede llevarse a cabo en las etapas iniciales de la transformación maligna.

Una explicación posible para este fenómeno metabólico son las alteraciones en la membrana mitocondrial que desacoplan el gradiente protónico necesario para la síntesis de ATP (producido en la cadena respiratoria mitocondrial). Por lo que, la reducción de la fosforilación oxidativa y el incremento de la tasa glicolítica podría

deberse en parte a alteraciones en el gradiente protónico mitocondrial (Pecqueur *et al*, 2008; Derdak *et al*, 2008).

Diferentes estudios han demostrado que el DNA mitocondrial (DNAMt) de las células tumorales tiene una alta frecuencia de mutaciones (Singh, 2004). Las mutaciones tienen origen diferente como puede ser una estrecha cercanía física del DNAMt a los sitios de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) la ausencia de histonas en la mitocondria que pudieran proteger de daño al DNAMt, y mecanismos de reparación al DNA prácticamente ausentes en la mitocondria. Dado que el DNAMt codifica 13 genes importantes en la cadena respiratoria, es posible que mutaciones en éste afecten la función y sean suficientes para desacoplar la fosforilación oxidativa (Jin y Robertson, 2013). El desacoplamiento de la cadena respiratoria debida a la alta frecuencia de mutaciones observada en tumores, forzaría el metabolismo tumoral al incremento en la glicólisis, en donde solo sería necesaria una ligera disfunción de la cadena respiratoria para que el rendimiento de los 36 ATP por molécula de glucosa decayera (Gupta, 2012). Esto explicaría el alto consumo de glucosa y la producción de ATP por medio de glicólisis. Este conocimiento ha sido empleado exitosamente para desarrollar herramientas clínicas útiles en la detección de masas tumorales in vivo, como la tomografía de positrones (por sus siglas en inglés, positron emisor tomography, PET) empleando [¹⁸F]fluoro-desoxiglucosa (¹⁸FDG) el cual es un radionúclido análogo de la glucosa (FDG-PET) (Hawkins y Phelps 1998; Gambhir, 2002).

2.2 Blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR)

En 1990 estudios en levaduras y mamíferos permitieron el descubrimiento de una proteína de 250 kD que funciona como blanco celular en mamíferos (por sus siglas en inglés, mammalian Target of Rapamycin, mTOR) (Cidado y Park, 2012). mTOR es una cinasa serina treonina conformada por un complejo multiproteico que participa en la regulación del inicio de la transcripción del ácido ribonucleico-mensajero (RNAm) y la traducción a proteína en respuesta a concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales y factores de crecimiento en la célula, además de ser una molécula clave de la vía de señalización de insulina (Yang y Guan, 2007). mTOR juega un papel importante en el crecimiento celular ya que interviene en la biogénesis de ribosomas y mitocondria, en la organización del citoesqueleto de actina, el tráfico de membrana, síntesis de lípidos, organogénesis, síntesis de proteínas, autofagia y metabolismo celular; como resultado de todo lo anterior ocurre la acumulación de biomasa y por lo tanto el crecimiento celular (Laplante y Sabatini, 2009). mTOR regula rutas de señalización esenciales y está implicada en el acoplamiento del estímulo de crecimiento y la progresión del ciclo celular. En respuesta a la abundancia de glucosa mTOR se encuentra activo en la mayoría de los tipos tumorales existentes. Al igual que mTOR, la glicólisis se encuentra sobreactivada en las células de adenocarcinoma de mama en relación con las células normales adyacentes aún en presencia de oxígeno (Moestue *et al*; 2013). Además mTOR ha sido relacionada con varios fenómenos celulares incluyendo la transición G0/ G1-S. La proteína mTOR está constituida de varios dominios que forman complejos con otras proteínas. Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (también llamado

complejo mTOR-1 o mTORC1), que se define por su interacción con la proteína Raptor ("regulatory-associated protein of mTOR"), y un complejo insensible a rapamicina (también llamado complejo mTOR2 o mTORC2), que se define por su interacción con Rictor ("rapamycin-insensitive companion of mTOR") (Grunt y Mariani, 2012). Al contrario que mTORC1, que fosforila los efectores de mTOR como la quinasa S6K1 y el factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1 (4EBP1), mTORC2 controla el citoesqueleto de actina así como Akt/PKB. Raptor participa en la respuesta de señalización cuyo control es sensible a rapamicina, como la de la proteína S6K y el factor de unión al eIF4E (eIF4E-BP1). Río abajo de este complejo se encuentran dos cascadas que controlan la transcripción génica: la vía de la cinasa p70S6 (p70S6K) y la vía de la proteína 1 de unión a eIF4E (4EBP1) (LoRusso, 2013). Por otro lado el complejo ternario FKBP12/rapamicina/mTOR inactiva a la cinasa de mTOR, produciéndose la inhibición de las señales río abajo constitutivamente activadas por esta proteína. En lo que a respecta al complejo raptor-mTOR, éste regula de forma positiva el crecimiento celular, y su inhibición causa una disminución de la masa tumoral. La rama raptor de la ruta mTOR modula la traducción de RNAm, la biogénesis del ribosoma, el metabolismo de los nutrientes y autofagia (Korse et al; 2012). El heterodímero formado por TSC1 (hamartina) y TSC2 (tiberina) regula la ruta raptor mTOR. TSC1/TSC2 es la proteasa activadora de GTPasa (GAP) para la proteína rheb de unión a GTP, perteneciente a la familia ras, que se une directamente y activa al complejo raptor-mTOR (Bartholomeusz y González-Angulo, 2012). Raptor-mTOR responde a dos señales relacionadas con el metabolismo a través de TSC1/2; en condiciones de escasez de energía provoca un incremento en la relación adenosin monofosfato (AMP/ATP), adenosin monofosfato cinasa (AMPK) se vuelve activa y

fosforila TSC2 para estimular su actividad GAP, inhibiendo Rheb (por sus siglas en inglés, Ras homolog enriched in brain) y presumiblemente raptor-mTOR (Guertin y Sabatini, 2007). La presencia de oxígeno en la ruta raptor-mTOR requiere del complejo TSC1/2, pero funciona a través de un mecanismo diferente que implica al factor inducible de hipoxia (HIF). Akt/PKB, RSK1 y ERK se encargan de unir a raptor-mTOR con las señales de crecimiento por fosforilación e inhibición de la función de TSC2 (Inoki *et al*; 2003). La inactivación de mTOR es una de las vías que pueden conducir a la activación de la autofagia y a la inhibición de la síntesis de los genes de las enzimas que participan en la glucólisis. Ambas rutas metabólicas, glucólisis y mTOR, regulan la apoptosis y autofagia, encontrándose dichas vías de muerte celular desreguladas en el CMTN y en la mayoría de los tumores (Fang *et al*; 2011). Los defectos en las vías de muerte celular son una característica típica del cáncer que pueden ser manipuladas para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, siendo la vía mTOR, un blanco prometedor por su función en la inhibición de la proliferación celular tumoral **(Figura 8)** (Bartlett, 2010).

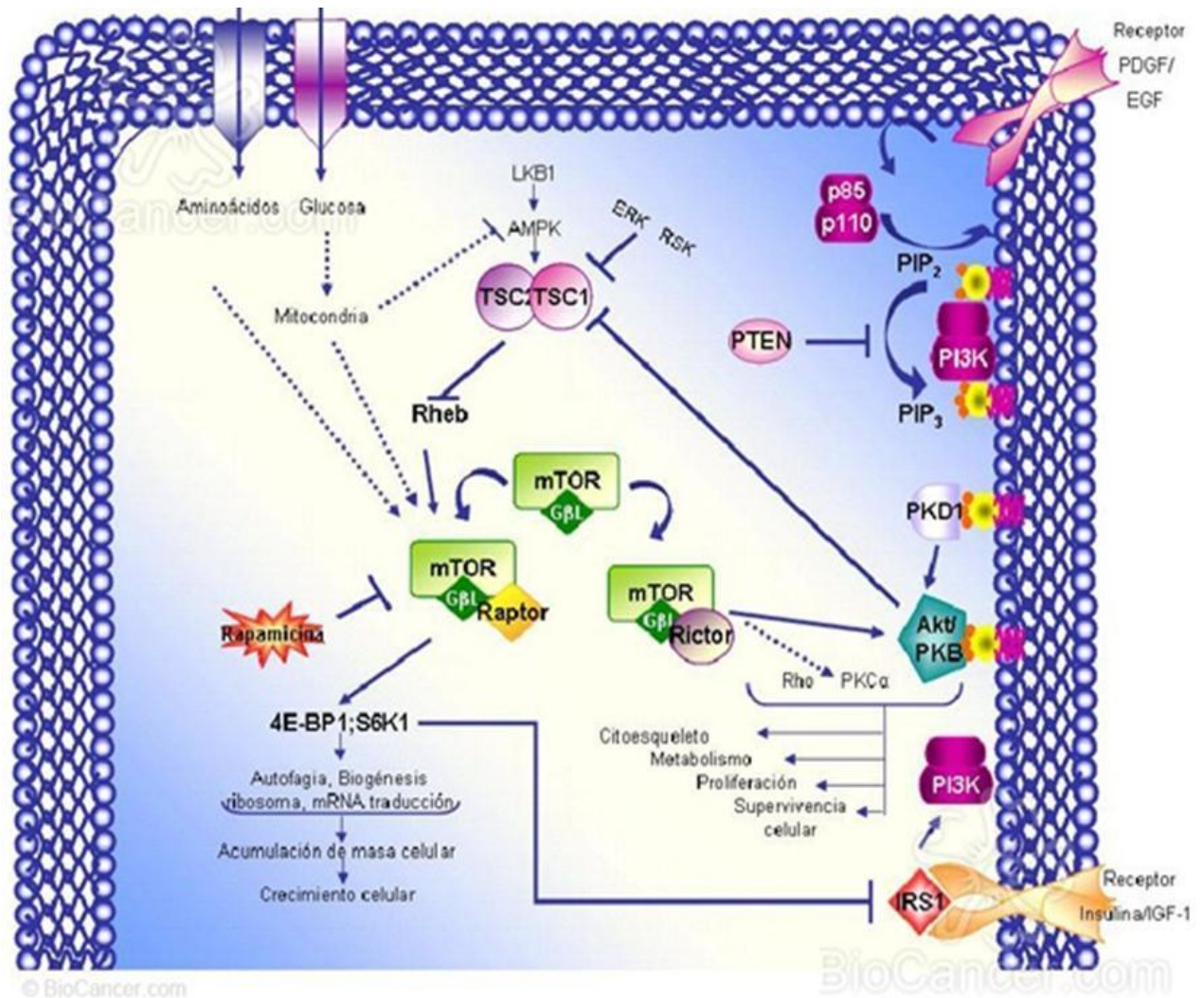


Figura 8. Modelo de la ruta de señalización de mTOR y sus interconexiones. Las dos proteínas que interaccionan con mTOR, raptor y rictor, definen las distintas vías de la ruta de mTOR. La ruta raptor-mTOR regula el crecimiento celular (acumulación de masa celular) a través de S6K1 y 4E-BP1. Responde a nutrientes y factores de crecimiento, en parte debidos a reguladores como TSC1/TSC2 y Rheb. El complejo rictor-mTOR regula Akt/PKB, PKC α , Rho/rac, para controlar la supervivencia celular, proliferación, metabolismo y citoesqueleto. La unión de factores de crecimiento a receptores en la superficie celular activa PI3K, para generar PIP₃, que recluta a la quinasa PKD1 y Akt/PKB a la membrana. Akt/PKB es activado por fosforilación en dos lugares diferentes. mTOR es un blanco terapéutico para el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas debido a que su bloqueo juega un papel fundamental en la inhibición de la proliferación celular tumoral. Tomado de Bartlett, 2010.

2.3 Microfotografía emisora de positrones (mPET)

El conocimiento básico del efecto Warburg ha servido para llevarlo a una de las herramientas clínicas diagnósticas más importantes, la tomografía por emisión de positrones (PET; por sus siglas en inglés). Es una técnica no invasiva de imagenología molecular empleada para el manejo y diagnóstico de enfermedades (Ojeda-Flores, 2010). Actualmente, el PET juega un papel esencial en la oncología, neurología y cardiología clínica (Mankoff *et al*; 2005). El radiofármaco más utilizado para PET es el análogo a la glucosa la 18- fluorodeoxiglucosa (por sus siglas en inglés, [¹⁸F]FDG), con una vida media de aproximadamente 110 minutos. Este radionúclido se emplea para la evaluación del metabolismo glicolítico, que se encuentra más elevado en células neoplásicas comparada con células normales, sin embargo, debido a que el uso de la [¹⁸F]FDG está limitado a estudios de procesos relacionados con el metabolismo glicolítico existe la necesidad de contar con radiofármacos adicionales para el estudio de otros procesos fisiológicos de interés clínico que permiten aprovechar al máximo el potencial de esta técnica de diagnóstico (Ávila-Rodríguez y Alva-Sánchez, 2010) **(Tabla 1).**

Mediante un estudio PET se obtienen imágenes funcionales que reflejan la concentración de un radiofármaco específico proporcionando información de procesos biológicos a nivel molecular. La PET representa hoy en día la técnica más avanzada de diagnóstico médico por imagen, ya que provee información metabólica o bioquímica de los procesos bajo estudio, en comparación con las técnicas de imagen por rayos X, ultrasonido y resonancia magnética, que ofrecen principalmente información estructural o anatómica (Koolen *et al*; 2012).

Radiofármacos para PET con aplicaciones oncológicas.

Radiofármaco	Aplicación común
[¹⁸ F]Fluorotimidina	Estudios de proliferación celular
[¹⁸ F]Fluoromisonidazol	Procesos de hipoxia
[¹⁸ F]FAZA*	Procesos de hipoxia
[¹⁸ F]Anexina V	Procesos de apoptosis (externalización de fosfatidilserina)
[¹⁸ F]RGD	Procesos de angiogénesis (expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$)
[¹⁸ F]Octreótido	Tumores de origen neuroendocrino
[¹⁸ F]-Fluorodopamina	Tumores de origen neuroendocrino
[¹⁸ F]-Fluoroestradiol	Receptores estrogénicos en tumores
[¹¹ C]Colina	Síntesis de acetilcolina, actividad tumoral
[¹¹ C]Metionina	Transporte de aminoácidos, actividad tumoral
[¹¹ C]Acetato	Cáncer de próstata y carcinoma hepatocelular
*Fluoroazomycin arabinoside	

Tabla 1. Radiofármacos existentes con aplicaciones oncológicas para el estudio y diagnóstico de otros procesos fisiológicos de interés clínico. Tomado de Ávila-Rodríguez y Alva-Sánchez, 2010.

Esto permite la detección temprana de procesos patológicos, inclusive antes de que se manifiesten los primeros síntomas de la enfermedad, ya que generalmente los cambios fisiológicos anteceden a los cambios anatómicos. Los radiofármacos para PET tienen la característica de estar marcados con un radionúclido emisor de positrones que permite la detección externa de la biodistribución del radiofármaco dentro del organismo (Iagaru *et al*; 2009). La sensibilidad, resolución espacial y precisión de cuantificación del PET, hacen de esta la técnica de diagnóstico de medicina nuclear molecular por excelencia. Al igual que en estudios de PET en pacientes, el reto en los sistemas de micro-tomografía por emisión de positrones (microPET) para estudiar animales pequeños es el conseguir imágenes de alta calidad administrando al sujeto la menor cantidad del radiofármaco (Phelps, 2000).

Esto constituye una dificultad adicional en cuanto a la diferencia tan grande en tamaño y peso entre los sujetos a estudiar; mientras que la masa de un ser humano típico es 70 kg, la de una rata es de 250 g y la de un ratón de aproximadamente 30 g (Jensen *et al*; 2008) (**Figura 9**). Para obtener datos funcionales de utilidad existen los sistemas microPET los cuales proporcionan imágenes ideales con una resolución espacial de fracciones de milímetros. Con los estudios microPET es posible realizar pruebas de los nuevos radiofármacos así como de agentes terapéuticos *in vivo* en modelos animales antes de su aplicación en la clínica. Es una técnica útil en la exploración de rutas metabólicas y tiempos de biodistribución, de especificidad y, de evaluación de los efectos negativos o contraproducentes de los radiofármacos y fármacos con implicaciones terapéuticas (Gatenby y Gillies, 2004). Así mismo, estos ensayos permiten realizar proyectos de investigación relacionados con el seguimiento de las enfermedades en modelos animales e investigar nuevas estrategias de tratamiento. Por todo lo anterior el PET es una herramienta de diagnóstico que permite visualizar pequeños crecimientos tumorales en el cuerpo humano, gracias a una característica de la célula tumoral: su adicción por la glucosa.

A la fecha no se conocen los factores específicos que participan en la transformación de células normales a células malignas que terminan generando algún tipo de tumor cancerígeno. Sin embargo, la información que se tiene actualmente sobre los procesos biológicos del cáncer mencionados anteriormente nos han permitido conocer aquellos mecanismos involucrados en el éxito o fracaso de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Iagaru *et al*; 2009).

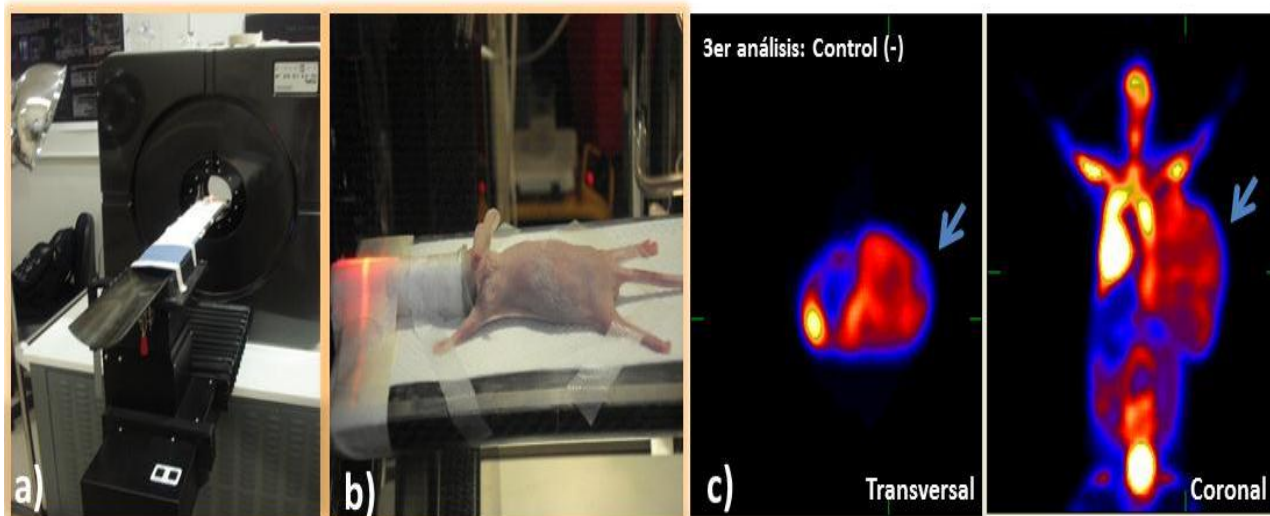


Figura 9. a) Equipo microPET Focus 120 Concorde Microsystems Siemens para estudios de animales pequeños de la Unidad PET/CT-Ciclotrón. Facultad de Medicina de la UNAM. b) Fotografía de roedor Foxn1nu/Foxn1nu sobre la camilla del microPET. c) Corte transversal y coronal de estudios microPET de ratón Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}: control (-) con 15 días de seguimiento de la enfermedad empleando el radio trazador [18F] FDG; una intensidad de color mayor refleja una concentración de actividad glicolítica alta. (Fotografías tomadas durante la realización de este proyecto de tesis en la unidad PET/CT ciclotrón de la Facultad de Medicina de la UNAM, Julio del 2011).

La posibilidad de cuantificar estos procesos de manera no invasiva permitiría no sólo la detección temprana y la evaluación del estado de los tumores, sino también permitiría la selección de los tratamientos apropiados para cada paciente, así como la verificación de su eficacia durante el transcurso del mismo. Aunado a esto, las imágenes de estos procesos biológicos obtenidas por PET, pueden ser usadas para definir el volumen blanco a tratar en radioterapia o para dar un incremento de dosis en áreas del tumor que así lo requieran (Alva-Sánchez *et al*; 2012).

2.4 Modelos murinos en cáncer

Los modelos animales para el estudio de cáncer son una herramienta útil para comprender los mecanismos moleculares involucrados en el inicio y progresión de neoplasmas, así como para evaluar la eficiencia de nuevos fármacos (Weyden y Adams 2013). El uso de animales para el estudio de cáncer tomó su auge hace más de cuarenta años, y han sido de gran importancia en la investigación de la biología, bioquímica, fisiología, factores genéticos y ambientales que participan en la carcinogénesis. Su uso se ha convertido en una herramienta fundamental en la búsqueda de fármacos y terapias blanco en la clínica (Benavides y Guenet, 2008). Hasta el momento, no se ha encontrado modelo *in vivo* alguno que sea capaz de imitar todo el proceso de carcinogénesis en humanos, sin embargo con el uso de animales experimentales se ha logrado un acercamiento más real a lo que podría estar sucediendo en un paciente y con ello la investigación de terapias alternativas y nuevas formas de tratamiento más eficientes (Anisimov *et al*; 2005). En general, los roedores son los animales más empleados en este tipo de estudios ya que presentan características favorables como tamaño manejable, alta tasa de reproducción, facilidad para ser modificados genéticamente y un costo de mantenimiento accesible. Gracias a su corto periodo de gestación y esperanza de vida facilitan la viabilidad y el número de animales por experimentación mínimo requerido para tener resultados estadísticamente significativos y con un impacto preclínico real (Bennett y Green, 2010). Los modelos más utilizados en la actualidad pueden ser clasificados y empleados de acuerdo al evento específico que se quiere estudiar o reproducir dentro del proceso de la carcinogénesis, por ejemplo: a) inducción química de tumor, b)

ratones manipulados genéticamente con susceptibilidad para desarrollar cáncer de manera espontánea, c) evaluación del impacto del estrés ambiental y la promoción de crecimiento tumoral, d) modelos farmacológicos para desarrollo y evaluación de nuevos fármacos, e) técnicas de imagenología molecular en ratones para observar el desarrollo del cáncer y f) transplante de tumores a través de inoculación de células cancerosas de origen humano en ratones inmunodeprimidos (el cual es un método ampliamente utilizado para monitorear los procesos de formación tumoral así como para identificar a aquellos genes que se encuentran relacionados al proceso de carcinogénesis (Benavides y Guenet, 2008). El xeno-transplante consiste en la inoculación de células cancerosas humanas por diferentes vías: intravenosa (IV), intraperitoneal (IP), subcutánea u ortotópica (Kim y Baek, 2010), siendo la subcutánea la más comúnmente empleada. Los ratones transgénicos y la combinación de inducción química con animales modificados genéticamente son los dos modelos que han tenido mejores resultados en el estudio del cáncer ya que presentan la posibilidad de recrear el evento del desarrollo del cáncer desde el inicio hasta su etapa más progresiva. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de modelos *in vivo* del cáncer, ninguno es completamente satisfactorio. Por ejemplo, los ratones inmunosuprimidos utilizados para estudios preclínicos, tienen la desventaja de no presentar un sistema inmunológico competitivo, lo cual se ve reflejado en la falta de interacción entre las células tumorales y el microambiente que las rodea, así como su relación directa con el órgano u órganos afectados (Ursini-Siegel *et al*; 2007). Por otra parte, de acuerdo a la literatura reportada, una combinación entre ratones modificados genéticamente para la generación espontánea de tumores y la inducción química por algún agente que genera la formación de tumores, ha resultado sumamente eficiente, tanto en la

representación inicial del evento, como en su desarrollo (Naumov *et al*; 2006). La inducción artificial de cáncer en ratones constituye la principal herramienta preclínica para la evaluación de nuevos fármacos antes de ser introducidos a la clínica en humanos. La importancia e impacto de estos modelos preclínicos son fuertemente cuestionados, ya que existen diferencias evidentes entre ratones y humanos y, deben ser consideradas antes de planear los experimentos (Kuperwasser *et al*; 2005). Dentro de éstas diferencias se pueden resaltar el tamaño de los organismos, ritmo cardiaco, el metabolismo y fisiología de los mismos, todos ellos son factores que limitan el estudio y pruebas farmacológicas. Dichas características explican por qué los animales pequeños pueden llegar a tolerar dosis más altas de fármacos, ya que al tener un metabolismo más rápido los químicos son eliminados más rápidamente (Howe *et al*; 2005). Sin embargo, los modelos animales siguen siendo una fuente única de información sobre el conocimiento del cáncer y un vínculo insustituible entre estudios *in vivo* y los pacientes **(Figura 10)**.

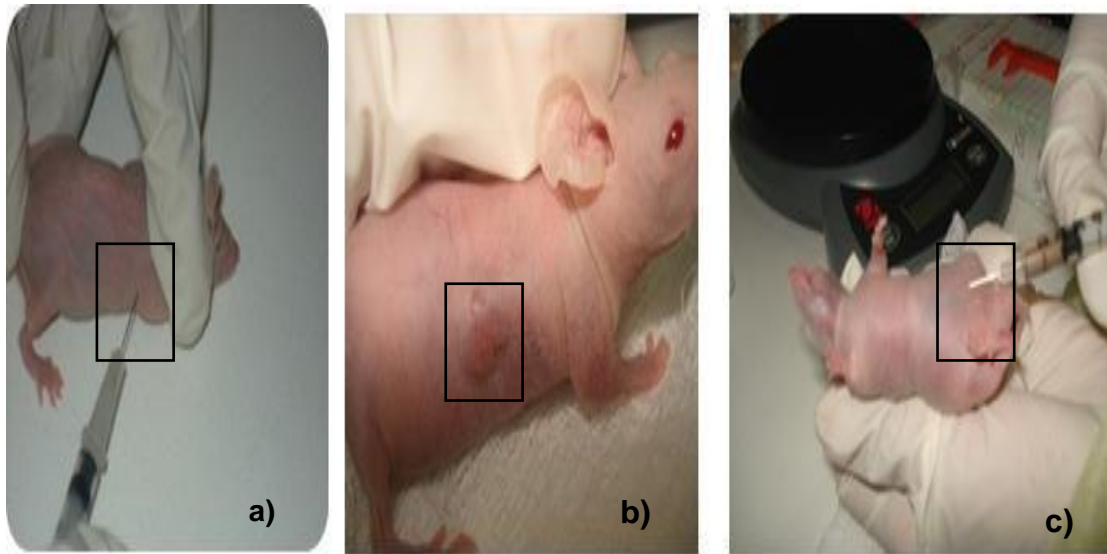


Figura 10. Ratón inmunosuprimido de la cepa (Foxn1nu/Foxn1nu). a) inoculación subcutánea de línea celular TNCM en el flanco derecho del animal. b) aparición de masa tumoral después de 4 semanas post-inoculación. Al observarse la generación del xenotransplante se procede a la administración IP de los tratamientos durante 20 días. Fotografías tomadas durante la realización de este proyecto de tesis en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMN SZ), Julio del 2011.

2.5 Fármacos propuestos para la inhibición del metabolismo tumoral en cáncer de mama triple negativo

Actualmente, el tratamiento del cáncer consiste en el empleo de quimio- y radioterapia junto con procedimientos quirúrgicos, los cuales generalmente tienen resultados favorables en la mayoría de los casos con estadios tempranos (I y II). Desafortunadamente, estos pierden su eficacia con estadios avanzados (III) y son difícilmente curables en el caso de formas metastásicas (estadios IV) (Medina-Franco y Suárez-Bobadilla, 2012).

La búsqueda de nuevos fármacos para tratamiento del cáncer involucra minimizar en tiempo los mecanismos para probar su eficacia; lo anterior se ve beneficiado con el uso de modelos *in vivo*, que puedan reproducir el diagnóstico de una enfermedad y que nos permitan experimentar nuevas drogas, o combinaciones de diferentes fármacos en un tiempo menor utilizando herramientas altamente sensibles y específicas (Robles-Castillo *et al*; 2011). Con el objetivo de atacar el metabolismo energético de la célula tumoral como blanco terapéutico, proponemos para este proyecto dos fármacos: la Metformina utilizada para tratar diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y el F3, el cual es un inhibidor de la LDH, y su posible efecto coadyuvante, actuando sobre dos de las principales características de la célula tumoral: disminución del consumo de glucosa e inhibición de la proliferación y crecimiento celular a través de la vía mTOR.

2.5.1 Metformina

La metformina es un agente hipoglucemiante oral ampliamente utilizado para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2). Es una biguanidina obtenida de galegina, compuesto aislado de la planta *Galega officinalis* (**Figura 11**) (Chong y Chabner, 2009). Se sabe que este glucófago reduce elevados niveles de glucosa en sangre en pacientes con diabetes, su administración en altas dosis en humanos es inocua y teratogénica en muchas de las especies estudiadas. Se ha demostrado que las biguanidinas inhiben el complejo I de la cadena respiratoria, disminuyendo la síntesis de ATP, lo que lleva a un incremento en la actividad de la cinasa activada por la AMPK (Graham *et al*; 2011).

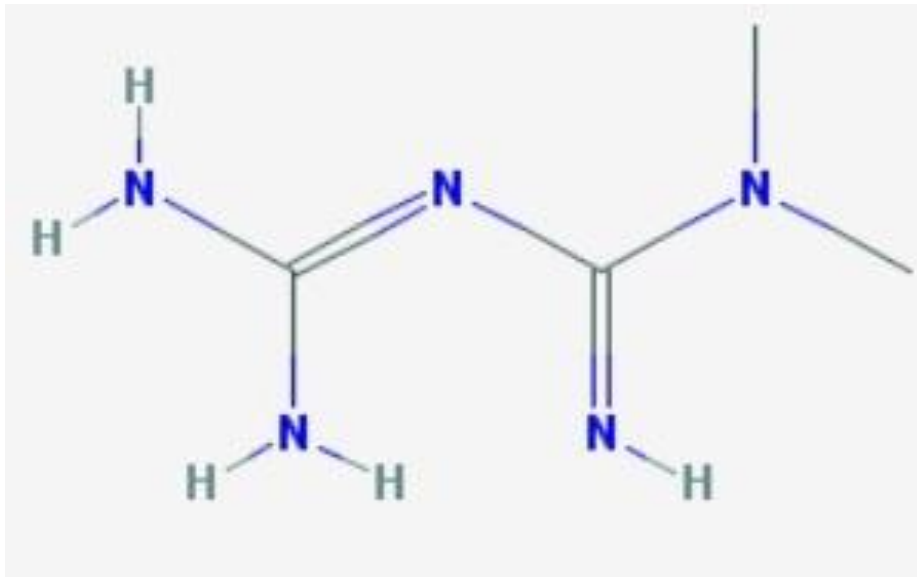


Figura 11. Estructura química de la Metformina: C₄H₁₂N₅ 3-(diaminomethylidene)-1,1-dimethylguanidine; hydrochloride. (PubMed Compound. CID 14219. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>).

El principal mecanismo de acción de la metformina en el tratamiento de la DMT2 es a través de la disminución de la secreción de glucosa del tejido hepático e incrementar la captación de la glucosa en musculo esquelético (Pollak, 2010) y bajando los niveles y la resistencia a la insulina. A nivel de señalización celular la metformina también disminuye la AMPK, la cual es una enzima clave en la regulación de lípidos y glucosa, en respuesta a alteraciones de nutrientes y niveles intracelulares de ATP (Ibarra-Dendrall *et al*; 2011). La vía AMPK juega un papel fundamental en la homeostasis energética celular, su activación bajo condiciones de estrés conlleva a una regulación río debajo de procesos que requieren alto consumo de energía tales como: síntesis de proteínas, ácidos grasos y regulación de niveles de ATP. Este sistema homeostático es conservado en levaduras y humanos (Del Barco *et al*; 2011). La participación de LKB1 se ha identificado recientemente como un gen supresor de

tumores; en organismos multicelulares la vía LKB1-AMPK ha adquirido un papel fundamental en el metabolismo energético celular; su activación regula río abajo la gluconeogénesis.

La gluconeogénesis representa el transporte de energía de hepatocitos al organismo en forma de glucosa, este efecto a la inversa reduce la concentración de glucosa en sangre (Dowling *et al*; 2011). Existen evidencias *in vitro* que muestran que mientras la metformina activa la vía LKB1-AMPK para inhibir la gluconeogénesis en hepatocitos, esta activación conlleva a la inhibición de la vía de señalización de mTOR y síntesis de biomoléculas. En estos estudios se concluyó que la metformina actúa como sensibilizador energético disminuyendo los niveles energéticos en la célula, estimulando a activación de mTOR inhibiendo la proliferación celular de una manera dependiente de AMPK (Shackelford y Shaw, 2009). Otros estudios han conferido a la metformina actividad antineoplásica empleándolo como agente único o de manera combinada ya que se ha observado que la acción de la reducción de la insulina a nivel sistémico puede inhibir la proliferación de las células cancerígenas mediante la restricción calórica inhibiendo el crecimiento de ciertos cánceres (González-Angulo y Meric-Bernstam, 2010). Existe evidencia que indica que la mayoría de los cánceres son estimulados por la insulina (Azar y Lyons, 2010). Estudios retrospectivos en mujeres diabéticas muestran que las pacientes tuvieron un incremento de mortalidad por CaMa comparados con las no diabéticas, y que las pacientes diabéticas tratadas con metformina tuvieron sustancialmente un 40% de reducción de CaMa a diferencia de las pacientes diabéticas con otros tratamientos. Este mecanismo es relevante tanto para la prevención como para el tratamiento de la enfermedad (Hirsch *et al*; 2009).

2.5.2 Fármaco (F3)

El F3 es conocido como un potente inhibidor de la LDH, enzima que regula el flujo glicolítico en la conversión de piruvato a lactato; específicamente es un inhibidor competitivo de la LDH-A por tener una alta homología con el piruvato (Simpson, 2012) (**Figura 12**). Sin embargo, inicialmente el F3 se empleaba en humanos como agente atiparasitario, pero se discontinuó su uso con el advenimiento de fármacos más eficaces (Fiume, 1959).

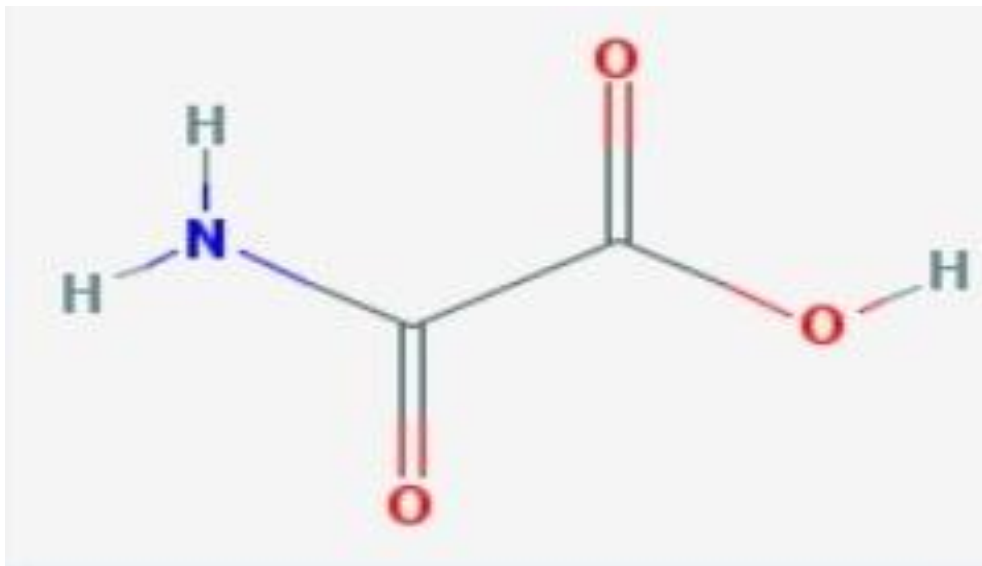


Figura 12. Estructura química del F3: C₂H₂NNaO₃. (PubChem Compound. CID 5242. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>).

La LDH-A es una enzima reversible que convierte el piruvato (producto final de la glucólisis) en lactato mediante la oxidación de NADH a su forma reducida NAD⁺ (Draoui y Feron, 2011). La actividad y sobreexpresión de la LDH-A es característica de diversos desordenes tales como cáncer, falla cardiaca, daño en hígado, neumonía y otros (Ward *et al*; 2012). La célula tumoral para satisfacer su demanda de energía,

dependen en gran parte de la glicolisis aerobia, proceso que puede ser inhibido mediante el bloqueo de la LDH (Lee *et al*; 2010). La LDH constituye el principal punto de control del “switch metabólico” de generación de energía de la glicolisis aerobia a anaerobia, catalizada por la reducción de piruvato a lactato. La sobreexpresión de la LDH-A es mediada por la sobre regulación del HIF-1 α , el cual es un regulador central de la respuesta metabólica a hipoxia y está asociado a proliferación celular, se ha observado que este se encuentra sobreexpresado en CaMa, posiblemente es un marcador molecular de pronostico pobre en CaMa y otros tipos de cáncer (Thornburg *et al*; 2008). La sobre expresión de HIF-1a conlleva a la inducción de oncogenes tales como Ras, Scr y HER-2/Neu, esto en conjunto conduce a la sobre expresión de las enzimas que participan en la glicólisis incluyendo a la LDHA y a los transportadores GLUT-1 y GLUT-3; esta sobreexpresión se ha evidenciado en aproximadamente el 70% de los casos de cáncer en humanos sugiriendo que la mayoría de las células tumorales adquieren ventajas selectivas mediante la alteración del metabolismo produciendo una mayor cantidad de ácido láctico, incluso en condiciones de normoxia, lo que conlleva a lo que se le conoce como “switch metabólico” o efecto Warburg (Fiume *et al*; 2011). Diversos estudios sustentan que el F3 puede ser un blanco molecular en el bloqueo del metabolismo y crecimiento de las células tumorales además de que es un fármaco no toxico que puede administrarse en animales de laboratorio hasta en 3g/kg (Papacostantinou y Colowick, 1961). Estudios realizados en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 evidenciaron que el F3 produce un efecto anti-metabólico, específicamente inhibe la producción de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (tricarboxylic acid cycle, TCA por sus siglas en inglés) y disminuye el flujo glicolítico y la actividad de la cadena de transporte de electrones

(Hamilton *et al*; 1995). En otros trabajos se demuestra que selectivamente suprime la proliferación celular en xenotransplantes inducidos con la línea celular MDA-MB-231 en ratones atímicos (Migneco *et al*, 2010). Por otro lado, estudios *in vitro* con la línea celular de hepatoma PLCPRF/5, se observó que el F3 produce un efecto anti-proliferativo mediante la inhibición de la LDH y la disminución de los niveles de ATP (Liu *et al*; 2001). Así mismo se ha demostrado que el F3 inhibe el consumo de la glucosa por las células tumorales HeLa además de inhibir del flujo glicolítico y crecimiento celular (Ward *et al*, 2012). Este fármaco ha sido empleado con éxito en diferentes estudios *in vitro* con el objetivo de analizar la inhibición del crecimiento en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 y se ha observado la disminución de la LDH-A e inhibición de la proliferación celular. Estos resultados evidenciaron que el F3 tiene un efecto anti-proliferativo en células de CaMa. (Zhao *et al*; 2009). En trabajos con animales, se demostró que al administrar el F3 vía i.p en ratones Balb/c, se suprime el crecimiento tumoral de la línea hepatocelular PLC/PRF/5 y HepG2 dentro de las primeras 48 horas de tratamiento (Fiume *et al*; 2011).

2.5.3 Doxorubicina

La doxorubicina es un fármaco antineoplásico de amplio espectro, comercialmente se le conoce como Adriamicina y fue la primera antraciclina (ANT) aislada de *Streptomyces peucetius* en 1960; es un antibiótico ampliamente utilizado en la clínica y tiene un alto efecto anti-tumoral (**Figura 13**). No obstante, su inespecificidad conlleva a padecer numerosos efectos adversos en los pacientes que la reciben (Escudero-Ortíz *et al*; 2011).

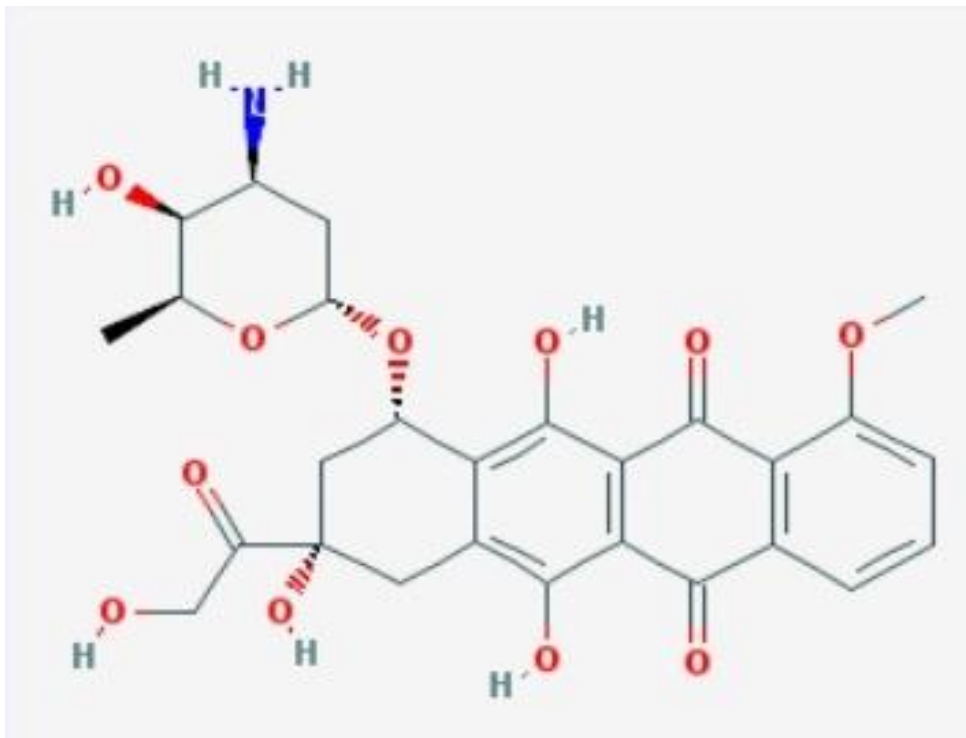


Figura 13. Estructura química de la doxorribicina: Adriamicina (C₂₇H₂₉NO₁₁).
PubChem Compound. CID 31703.1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

El mecanismo exacto de la actividad antitumoral de ésta ANT aún no se conoce, pero estudios independientes sugieren que presenta una actividad potencialmente dañina multifactorial y compleja que afecta diversos órganos y mecanismos celulares (Adel *et al*; 2012).

La doxorribicina actúa intercalándose entre las pares de bases inhibiendo la replicación y la acción de las polimerasas de los ácidos nucleicos (RNA y ADN); induce la ruptura de las cadenas de ADN a través de la inhibición de la topoisomerasa II y su oxidación lleva a la formación de ROS y radicales libres hidroxilo (OH[•]), generados por una variedad de oxidasas, reductasas y deshidrogenasas. (Swift *et al*; 2006).

La doxorubicina está indicada para el tratamiento de diferentes tumores sólidos como CaMa, de pulmón, carcinoma gástrico y tumores ginecológicos. Es metabolizada ampliamente en el hígado por la enzima aldoceto reductasa que origina su metabolito principal, el doxorubicinol. Es sustrato de la isoforma 3A4 del citocromo P450 y el metabolito que origina es la doxotubicina-7-desoxiaglicona; ambos considerados como los principales responsables de la toxicidad de la doxorubicina (Tekedereli *et al*; 2012). Entre los efectos adversos que limitan el uso clínico de la doxorubicina se encuentran la toxicidad cardíaca y hematológica; también se ha documentado toxicidad gastrointestinal, dermatológica, hepática, renal y necrosis severa local. Además ocasiona una severa toxicidad miocárdica lo que conlleva a falla de cardíaca (FC), la cual puede manifestarse durante la terapia, en meses o años después de haber terminado el tratamiento (Roca-Alonso *et al*, 2012). Estudios *in vitro* han demostrado que la doxorubicina inhibe la contractilidad del músculo cardíaco de ratón, observando que a concentraciones de 350ug/ml de doxorubicina se produce un 69% de la reducción de contractilidad. Por otro lado, estudios retrospectivos demostraron que aquellos pacientes tratados con doxorubicina tuvieron FC sin que estos presentaran historia clínica de este padecimiento (Sishi *et al*, 2013). En otro estudio se observó una afección del 4% de pacientes tratados con 500-550 mg/m² de doxorubicina; 18% tratados con 551-600 mg/m² de doxorubicina y el 36% de afección en los pacientes tratados con dosis mayores a las arriba mencionadas, por tanto la dosis total no debe exceder de 550 mg/m². Por lo tanto en la clínica, se ha establecido que la dosis máxima de seguridad recomendada es de 500-550 mg/m² debido a la presencia de los eventos cardíacos que se manifiestan con este tratamiento (Akyurec *et al*; 2012).

El diagnóstico temprano de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina es importante, ya que una vez que los pacientes la desarrollan en una fase avanzada, su pronóstico es poco favorable debido a que actualmente no existe ninguna terapia que pueda revertir estos efectos (Kugawa *et al*; 2012). Estos efectos secundarios se desencadenan debido a la falta de especificidad en los tratamientos actualmente empleados, es decir, que no están diseñadas para dirigirse específicamente a células cancerígenas y preservar células normales sino que por el contrario, existe una lesión generalizada (Joensuu y Gligorov, 2013). Algunos investigadores sugieren que la doxorubicina no solo genera daño por ROS sino que también contribuye a la disminución de los niveles de antioxidantes endógenos lo que conlleva a estrés oxidativo que podría estar ocasionando citotoxicidad a través de múltiples mecanismos (Doublier *et al*; 2012). Existen evidencias que indican que la mitocondria es altamente susceptible a daño por la generación de radicales superóxido, después de la oxidación de doxorubicina en la mitocondria, ocasionando daño al DNA, alteración de la expresión génica, degradación del sarcómero con desregulación de niveles de calcio (Ca^{2+}) y disfunción mitocondrial (Sishi *et al*; 2013). Otros estudios *in vitro* han mostrado que hay disfunción mitocondrial después del tratamiento con doxorubicina liberando al citocromo c que conduce a la activación de la caspasa 3 mediada por caspasa 9 dando como resultado la apoptosis (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=443939&loc=ec_rcs).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de los fármacos metformina y F3, inhibidores de la rutas metabólicas de mTOR y glicolisis aerobia, respectivamente, actuarán de manera concomitante con la Doxorubicina, disminuyendo el tamaño de la masa tumoral en un modelo *in vivo*. Resultados preliminares *in vitro* han demostrado que el empleo de la metformina y el F3 en cultivos tumorales disminuyen de manera considerable la viabilidad en líneas celulares de CMTN.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es la neoplasia de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial y en nuestro país. El fenotipo de mayor agresividad comprende los tumores que no expresan los RE, RP y HER2; es decir los TMTN (Lara-Medina *et al*; 2011). En nuestro país los TMTN corresponden a más del 20% de los tumores de mama. A la fecha, no existe una terapia blanco para estos tumores, en general, la guía de tratamiento comprende cirugía, radiación y tratamiento co-adyuvante basado en fármacos cito-tóxicos como doxorubicina, gemcitabina y ciclofosfamida. Sin embargo las tasas de recurrencia de la enfermedad y metástasis son sumamente altas; por otra parte la supervivencia y el pronóstico de enfermedad son sumamente pobres (Chávarri-Guerra *et al*; 2012). Es por ello que la propuesta de este proyecto de tesis fue desarrollar nuevos enfoques de terapias que permitan emplear de manera co-adyuvante fármacos que inhiban a nivel molecular puntos clave de la vía metabólica de la célula tumoral que han sido implicadas en este tipo de cáncer. Para ello se requiere como primer paso pre-clínico estudios *in vivo* de tumorigénesis en modelos murinos.

5. HIPÓTESIS

Dada la alta dependencia de los tumores sólidos por el metabolismo de la glucosa y el lactato, la combinación de fármacos inhibidores de la glicólisis, inhibidores de la LDH-A y en combinación con doxorubicina, causarán una disminución de la proliferación celular en xenotransplantes inducidos con la línea tumoral celular de CMTN: MDA-MB-231 en un modelo murino.

6. OBJETIVOS

6.1.1 Objetivo General.

Determinar el efecto co-adyuvante de la metformina y el F3 sobre el crecimiento tumoral en combinación con doxorubicina, en un modelo de tumorigénesis de CaMa *in vivo*.

6.1.2 Objetivos particulares

1. Determinar *in vitro* la IC₅₀ para metformina, F3 y doxorubicina en línea celular de CMTN MDA-MB-231 a través de Sulforrodamida-B (SFR-B).
2. Demostrar *in vitro* a través de citometría de flujo el tipo de muerte celular inducido por metformina, F3 y doxorubicina en línea celular de CMTN MDA-MB-231.
3. Demostrar en un modelo *in vivo* de CaMa la inhibición del crecimiento tumoral a través de microPET.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina y Biología Molecular y en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMN SZ) así como también en el laboratorio de Genómica del Instituto Nacional de Cancerología (INCaN). Para cumplir con los objetivos planteados en este estudio se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental:

7.1 Ensayos *in vitro* (Figura 14):

El propósito de los ensayos *in vitro* en este trabajo de tesis fue evaluar la eficacia de los fármacos utilizados: doxorrubicina, metformina y del F3 de manera individual y combinada. Mediante la siguiente metodología se determinó su IC_{50} y el mecanismo de muerte inducida sobre la línea celular MDA-MB-231.

- a) Determinación de IC_{50} de los fármacos: doxorrubicina, metformina y F3 sobre la línea celular MDA-MB-231 por medio de la técnica de SRF-B.
- b) Determinación del tipo de muerte celular inducida por los fármacos: doxorrubicina, metformina y F3 de manera individual y sinérgica sobre la línea celular MDA-MB-231 a través de Anexina V/IP (Ioduro de Propidio).
- c) Estudio de valoración morfológica del efecto citotóxico inducido por los fármacos: doxorrubicina, metformina y F3 de manera individual y sinérgica sobre la línea celular MDA-MB-231.

1. Ensayos *in vitro*

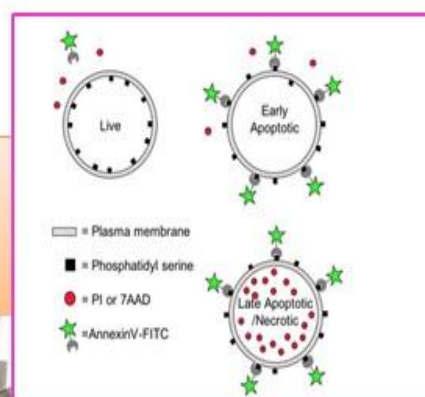
a) Obtención de IC₅₀ los fármacos en estudio (individual y sinergia por SFR-B en 4, 24, 48 y 72 horas.



1. doxorubicina = 5 μ M
2. metformina = 25mM
3. F3 = 10mM
4. doxorubicina/metformina
5. doxorubicina/F3
6. metformina/F3
7. doxorubicina/metformina/F3

b) Evaluación de muerte inducida por los fármacos en estudio (individual y sinergia) por citometría de flujo con Anexina V/IP en línea celular MDA-MB-231 en 4, 24, 48 y 72 horas.

- AnexinaV: proteína con alta afinidad a fosfolípidos (-)
- IP: intercalante e indicador de viabilidad celular.



c) Estudio de valoración morfológica para observar daño citotóxico causado por los fármacos en estudio de manera individual y sinergia sobre la línea celular MDA-MB-231 en 4, 24, 48 y 72 horas.



Figura 14. Diagrama de flujo de la estrategia experimental (*in vitro*) para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo de tesis. a) Se utilizaron células MDA-MB-231 de CMTN. Para evaluar la viabilidad celular de los fármacos de manera individual y en sinergia mediante SFR-B y determinar su IC₅₀ en 4 tiempos de incubación (4, 24, 48 y 72 horas), la línea celular fue tratada con 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 μ M de doxorubicina; 15, 20, 25, 30 y 40 mM de metformina y 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mM del F3. b) Para evaluar el tipo de muerte que los fármacos de manera individual y en sinergia inducen sobre la línea celular MDA-Mb-231 las células fueron teñidas con Anexina V/IP y c) Para el estudio de valoración morfológica la línea celular MDA-MB-231 fue expuesta a los fármacos en estudio a 4, 24, 48 y 72 horas. Para observar los cambios morfológicos las células fueron teñidas con SFR-B.

7.2 Ensayos *in vivo* (Figura 15):

El propósito de los ensayos *in vitro* en este trabajo de tesis, fue evaluar la eficacia de los fármacos empleados (doxorrubicina, metformina y el F3) de manera individual y en sinergia, sobre el crecimiento o inhibición de tumores en un modelo en ratones. Mediante la siguiente metodología se evaluó la eficacia de los tratamientos.

- a) Establecimiento del modelo murino: formación de grupos experimentales (tratamientos individuales y sinergia).
- b) Realización del xenotransplante con la línea celular MDA-MB-231.
- c) Desarrollo de masa tumoral de 3mm³: de 3-4 semanas post-inoculación.
- d) Administración i.p. de tratamientos individuales y en sinergia durante 15 días.
- e) Análisis en microPET con [¹⁸F]FDG para la evaluación del crecimiento tumoral.
- f) Punto final de experimentación: extracción de masa tumoral.

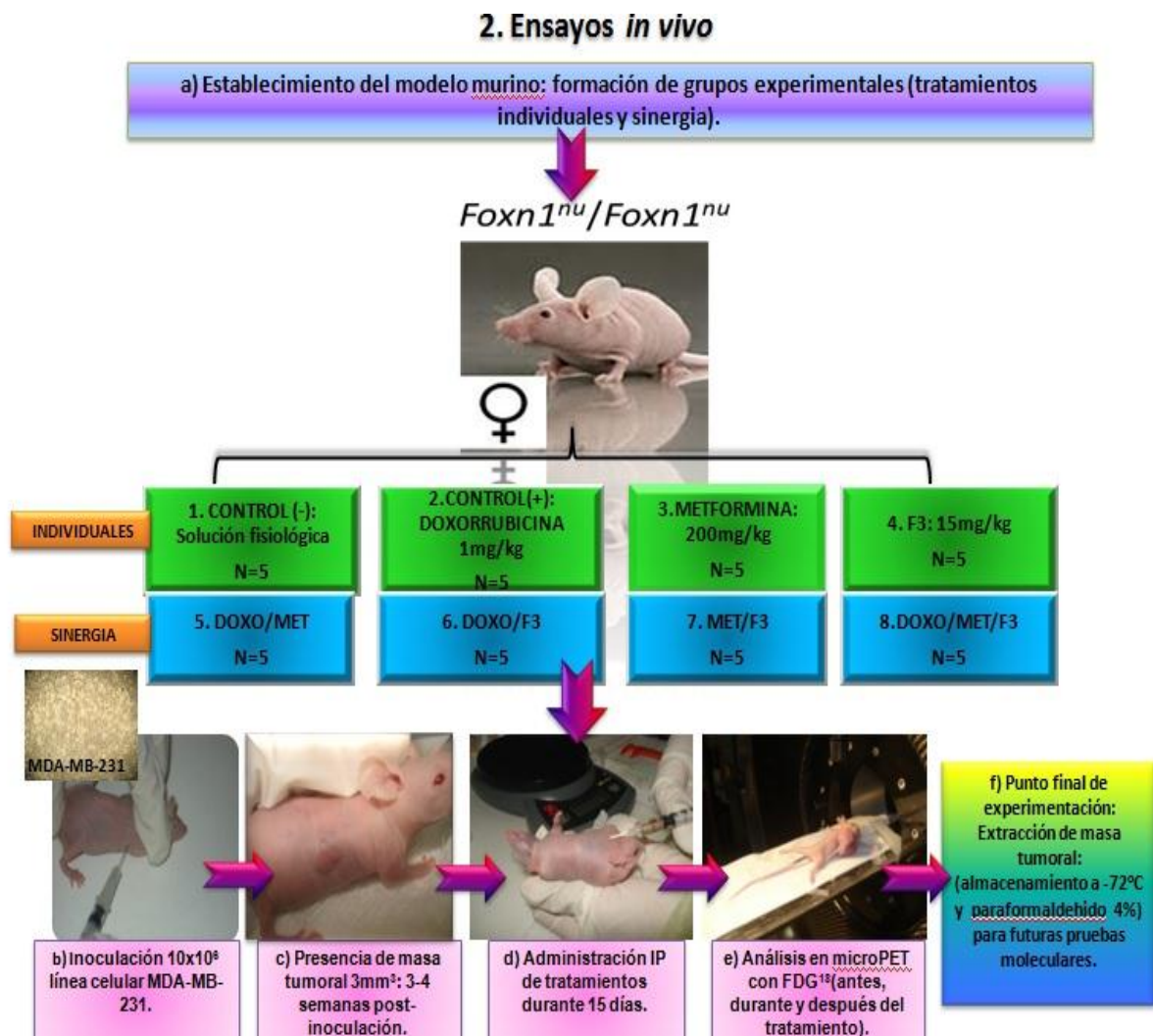


Figura 15. Diagrama de flujo de la estrategia experimental *in vivo* para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo de tesis. a) Para establecer el modelo murino se utilizaron ratones $Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}$ los cuales fueron distribuidos en 8 grupos experimentales con una n=5 para cada grupo. b) Los animales fueron inoculados vía subcutánea con la línea celular de CMTN MDA-MB-231; c) cuando se observó la presencia de la masa tumoral (3mm³), c) se inició con la administración de los tratamientos vía i.p durante 15 días. e) La progresión de la enfermedad se evaluó mediante microPET, empleando la [¹⁸F]FDG; en 3 ocasiones (basal, 7 y 15 días). f) Al llegar al punto final de experimentación se realizó la eutanasia de los animales; la masa tumoral extraída, fue almacenada a -72°C y en paraformaldehído al 4% para futuras pruebas moleculares.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Línea celular y tratamientos

Se emplearon células adherentes de morfología epitelial de la línea celular metastásica de CMTN MDA-MB-231 de la American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea celular fue crecida en botellas de cultivo de 75 cm² con 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 GIBCO® suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) biowest®, penicilina y estreptomina GIBCO® y bicarbonato de sodio Sigma-Aldrich®. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora REVCO Technologies® con una atmósfera de 5% CO²-5% aire a 37°C. Cada tercer día las células eran lavadas con PBS-1x para crecerlas en condiciones óptimas y cuando alcanzaban una confluencia del 80 al 90% eran cosechadas con una solución de tripsina al 0.05% durante 5 minutos a 37° C para ser separadas a cantidades iguales en 2 botellas de cultivo hasta obtener la densidad celular necesaria para los ensayos requeridos.

8.2 Análisis de la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 en respuesta a los tratamientos mediante SFR-B

Para cuantificar la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 expuesta a los fármacos en estudio, se empleó el método colorimétrico de SFR-B establecido por Vichai y Kirtikara (2006), el cual está basado en la capacidad de medir el contenido de proteína celular en células adherentes en un formato de placas de 96 pozos. La SFR-B es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, posee dos grupos sulfónicos -SO₃⁻ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes.

En condiciones ácidas (disuelta en ácido acético) la SFR-B aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a estos proporcionando un índice del contenido de proteína celular. Las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético al 10% (TCA) Sigma-Aldrich® y después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (solución de Tris pH 10.5) Sigma-Aldrich® y se lee a una absorbancia de 564 nm. En nuestros ensayos se sembraron células de la línea MDA-MB-231 en placas de 96 pozos con una densidad de 7, 000 células por pozo contenidas en 200 µl de medio RPMI-1640 suplementado con 1% de SFB. Se utilizó una placa cero (control) y 7 placas experimentales: 3 para los tratamientos individuales y 4 para las sinergias (Tabla 2). Todas las placas fueron incubadas a 37°C, en una atmósfera húmeda de 95% y 5% de CO₂ durante 24 horas en lo que respecta a la placa 0 y 4, 24, 48 y 72 horas para las placas experimentales. Después de 24 horas a la placa cero se le retiró el medio y se le realizó la técnica de SFR-B con base en las instrucciones del fabricante. En lo que respecta a las placas experimentales con los tratamientos individuales y en sinergia fueron expuestas a los fármacos durante 4 tiempos de incubación: 4, 24, 48 y 72 horas, cada 24 horas en cultivo se aspiró el medio y se añadió medio con diferentes concentraciones de doxorrubina: 0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 µM; metformina: 10, 15, 20, 25, 30, y 40 mM; y F3: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mM. En lo que refiere a las sinergias doxorrubicina/metformina; doxorrubicina /F3; metformina/F3 y doxorrubicina/metformina/F3 se realizaron todas las combinaciones posibles de concentraciones con base en las establecidas para los fármacos individuales. Todas las placas se mantuvieron en cultivo bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad que la placa 0.

Los tratamientos fueron renovados cada 24 horas desde su inicio; concluido este periodo de incubación se procedió a la fijación de las células. Para ello se eliminó a cada pozo se le agregaron 100 μ l de TCA al 10% frío dejándose incubar a 4°C por 1 hora, al finalizar este periodo de incubación se retiró el TCA y se lavó cuatro veces con agua corriente y se dejó secar la placa a temperatura ambiente. Al finalizar, se agregaron 100 μ l de SFR-B Sigma-Aldrich® al 1% a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente se eliminó la SFR-B y se enjuagó cuatro veces con ácido acético al 1% (JT Baker®) dejándose secar a temperatura ambiente. La tinción formada por la proteína se disolvió en una solución de Tris a un pH 10.5 y se dejó en agitación constante por 5 minutos. Las lecturas de citotoxicidad fueron tomadas a 4, 24, 48 y 72 horas de tratamiento (**Tabla 2**). La densidad óptica (DO) se midió en un espectrofotómetro Opsys MR Dynex technologies, como lectura de referencia se utilizó una longitud de 490 nm a través del programa Revelation Quicklink. La DO fue proporcional al número de células viables. Cada experimento se realizó por triplicado en tres ocasiones independientes. En cada experimento se calculó la fracción de supervivencia como el cociente de DO entre las células tratadas y la DO de las células control o placa cero (no tratadas). Se obtuvo la recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados que representa un coeficiente r^2 superior a 0.95. A partir de la línea resultante se calculó la pendiente m y la DL_{50} (concentración que inhibe el 50% de crecimiento celular). Se empleó el paquete estadístico Prisma 5.0 para crear la base de datos y efectuar los cálculos estadísticos.

PLACAS	TRATAMIENTOS []	INCUBACIÓN (HORAS)
0	Control (sin tratamiento)	24 horas
1	Doxorrubicina: 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 μ M	
2	Metformina: 10, 15, 20, 25, 30 y 40 mM	
3	F3: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mM	4, 24, 48 y 72 horas
4	Doxorrubicina 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 μ M /Metformina 10, 15, 20, 25, 30 y 40 mM	
5	Doxorrubicina 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 μ M /F3 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mM	
6	Metformina 10, 15, 20, 25, 30 y 40 mM/F3: 15mM	
7	Doxorrubicina 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 μ M /Metformina 10, 15, 20, 25, 30 y 40 mM/F3: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mM	

Tabla 2. Tratamientos individuales y en sinergia para la evaluación de citotoxicidad mediante SFR-B y las diversas concentración empleadas para la determinación de la IC₅₀ en todas las placas así como el tiempo de incubación empleado en cada una de ellas.

8.3 Evaluación de inducción y tipo de muerte celular mediante

Citometría de Flujo con doble marcaje: FITC Anexina V/IP de la línea celular MDA-MB-231 en respuesta a los tratamientos

Con el objetivo de evaluar el tipo de muerte celular inducida por los fármacos de manera individual y en sinergia se identificaron células apoptóticas y necróticas en la línea celular MDA-MB-231, sometidas al tratamiento con los diferentes fármacos utilizados. Éste método permitió detectar el proceso de translocación de la fosfatidil

serina hacia la cara externa de la membrana celular que se produce durante los estadios tempranos de la apoptosis.

El procedimiento consistió en una doble tinción Anexina V/IP. La Anexina V es una proteína que se une a los fosfolípidos de la membrana celular y es dependiente de Ca^{++} con gran afinidad por la fosfatidilserina. La Anexina V lleva conjugada una molécula de fluoresceína que emite en la zona verde del espectro y que al unirse a la membrana celular permite cuantificar el porcentaje de células apoptóticas presentes en un cultivo. Por otra parte, el IP (emisión en la luz roja del espectro) es un colorante vital que entra únicamente en células muertas y permite calcular el porcentaje de células necróticas presentes en el cultivo (Coxon *et al*; 2011). Todas las muestras se analizaron en un citómetro FACS-Canto II (Becton-Dickinson ®) con el software FACSDIVA® de la misma casa comercial. Las distintas poblaciones celulares se centraron atendiendo al tamaño y complejidad celular (Forward Scatter, por sus siglas en inglés FSC: volumen de la partícula/Side Scatter, por sus siglas en inglés SSC: complejidad interna de la partícula). El protocolo de tinción utilizado para este ensayo fue el del kit comercial Annexin V-FITC apoptosis detection Kit BD Pharmingen®. Las células MDA-MB-231 fueron plaqueadas en una caja de 6 pozos a una densidad celular de 3×10^5 células por pozo en 2000 μl de medio RPM-I suplementado con SFB al 10%. Se utilizaron los siguientes controles: como control negativo, células viables y sanas, teñidas con Anexina V/IP; control de apoptosis, células en apoptosis inducida por luz UV y células teñidas con IP como control de necrosis. Los grupos experimentales consistieron en: doxorrubicina al 0.5 μM ; 2 pozos con metformina 25 mM y 2 pozos con F3 15 mM, doxorrubicina/metformina, doxorrubicina/F3 y doxorrubicina/metformina/F3. Los tratamientos fueron renovados cada 24 horas desde

su inicio; todos se llevaron a cabo por triplicado en tres ocasiones de manera independiente y en 3 tiempos de incubación 24, 48 y 72 horas.

El buffer de unión a Anexina 1X se preparó mezclando 1 ml de 10X annexin-binding buffer + 4 ml de PBS 1X; el IP se utilizó a una concentración de 100 mg/ml y se obtuvo diluyendo 5 μ l de la solución stock de IP en 45 μ l del buffer de unión a Anexina 1X. Ambas soluciones fueron incubadas en oscuridad para protegerlas de la luz. Concluidos los tiempos de incubación, las células fueron tripsinizadas para despegarlas de la superficie, esto se llevó a cabo retirando el medio de los pozos para lavarlos con PBS1X, agregando 1.5 mL de PBS1X-EDTA + 64 μ l de tripsina al 0.05% a cada pozo. Se incubaron durante 3 minutos a 37° C. La tripsina se inactivó con 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% (1mL/pozo). Las células se despegaron con movimientos suaves y la suspensión celular se recuperó en tubos de clitómetro y fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 4° C. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante para obtener el pellet, se lavaron las células con PBS y nuevamente se centrifugaron bajo las condiciones anteriores; se retiró el sobrenadante y se adicionó al pellet el buffer de unión a Anexina 1X (100 μ L por cada 1×10^6 células). Posteriormente, se agregaron 5 μ L de Anexina FITC-V + 1 μ L de IP por cada 100 μ L de suspensión celular, las células fueron incubadas a temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos. Después de la incubación, se agregaron 400 μ L de buffer de unión a Anexina 1X, se homogeneizaron perfectamente y se conservaron en hielo previo y durante el análisis por citometría de flujo. Este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Proteómica del Instituto Nacional de Cancerología (INCaN).

8.4 Ensayo de valoración morfológica en línea celular de CMTN MDA-MB-231 en respuesta a los tratamientos

Este ensayo se realizó en el laboratorio de Genómica del Instituto Nacional de Cancerología (INCaN) con el objetivo de observar algún posible daño sobre la morfología de la línea celular MDA-MB-231 provocado por los fármacos.

Las células MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad celular de 3×10^6 células por pozo en 2000 μ l de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%. Se manejó una placa para cada tratamiento (doxorrubicina al 0.5 μ M; metformina 25 mM y F3 15 mM) en 4 tiempos de incubación: 4, 24, 48 y 72 horas respectivamente; de igual manera se requirió de una placa para cada tratamiento en sinergia bajo los mismos tiempos de incubación que los tratamientos individuales. Las concentraciones establecidas en cada tratamiento se obtuvieron con los IC_{50} obtenidos por SFR-B. Los grupos experimentales consistieron en: 1. Control negativo, células sin tratamiento, 2. Control positivo, doxorrubicina, a 0.5 μ M; 3. células tratadas con metformina 25 mM; 4. células tratadas con F3 15 mM; 5. Células tratadas con doxorrubicina/metformina; 6. células tratadas con doxorrubicina/F3 y 7. Células tratadas con doxorrubicina/metformina/F3. Los tratamientos fueron renovados cada 24 horas desde su inicio; todos se llevaron a cabo por triplicado de manera independiente. Concluidos los tiempos de incubación correspondientes para cada tratamiento se llevó a cabo la fijación de las células, para ello se eliminó el medio de cultivo y a cada pozo se le agregaron 100 μ l de TCA al 10% frío dejándose incubar a 4°C por 1 hora, se retiró el TCA y se lavó cuatro veces con agua corriente dejando secar la placa a temperatura ambiente. Al finalizar, para la tinción de las células se agregaron 200 μ l de

SFR-B Sigma-Aldrich® al 1% a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente y en agitación constante durante 30 minutos, posteriormente se eliminó lo más posible el colorante emitido por la SFR-B, se lavó cada pozo con ácido acético al 1% JT Baker®. Finalmente se agregaron 100 µl de PBSX frío para realizar el escaneo en el microscopio óptico Nikon® a 100X y se tomaron las imágenes correspondientes.

8.5 Ensayos *in vivo*: Establecimiento del modelo murino

El protocolo de experimentación *in vivo* se llevó a cabo en el Bioterio del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INNCM SZ).

Para el establecimiento del modelo murino se requirieron ratones hembra atímicos de la cepa ($Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}$) de 4 semanas de edad los cuales fueron proporcionados por dicha Institución. Los ratones atímicos ($Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}$) presentan una mutación en el gen Fox1, se caracterizan por la ausencia o deterioro del timo con el objetivo de inducir una inhibición del sistema inmunológico (inmunidad celular) debido a la ausencia total de linfocitos T. Se les llama “ratón desnudo” por la ausencia de pelo corporal y tienen un gran valor en la investigación oncológica porque permiten el trasplante de células tumorales humanas.

Los animales fueron mantenidos en la sala de trabajo No. 10 del mismo bioterio, lugar donde se realizaron todos los procedimientos de inoculación y quirúrgicos. Los animales se mantuvieron en microaisladores estáticos para ratón con un máximo de cinco individuos por caja. Se mantuvieron libres de patógenos con ciclos de luz y

obscuridad 12/12 con agua y alimento *ad libitum* y de acuerdo a las normas de cuidado establecidas por el comité de Bioética de esta Institución.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 8 grupos experimentales: grupo control (-) con solución fisiológica; tratamientos individuales: doxorrubicina, metformina y F3; tratamientos en sinergia: doxorrubicina/metformina, doxorrubicina/F3, metformina/F3 y metformina/doxorrubicina/F3. Todos con una n=5 respectivamente. Para generar los xenotransplantes los animales fueron inoculados vía subcutánea en el flanco derecho con 10×10^6 de células de CMTN MDA-MB-231. La suspensión celular fue preparada el mismo día en que se practicó la inoculación y previo a ello las células fueron mantenidas en botellas de cultivo de 175 cm² con 15 ml de medio de cultivo RPMI-1640 GIBCO® suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) biowest®, penicilina 10,000 U/mL y estreptomina 10,000 ug/mL GIBCO® y bicarbonato de sodio Sigma-Aldrich®. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora REVCO Technologies® con una atmósfera de 5% CO²-95% aire a 37°. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% y la densidad necesaria para la inoculación de todos los animales de los grupos experimentales se retiró el medio y las cajas se lavaron con PBS 1X estéril y frío. Las células se cosecharon agregando 1 mL de tripsina al 0.05% durante 5 minutos a temperatura ambiente con movimientos suaves para ser despegadas. La suspensión celular fue cosechada en tubos falcon estériles de 15 ml, se agregaron 5 ml de PBS 1X estéril y frío y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue retirado y el pellet lavado nuevamente con 10 mL de PBS 1X estéril y frío y centrifugado bajo las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y el pellet fue re-suspendido en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. La adición de medio se hizo con la finalidad de

facilitar el recuento y mantener la viabilidad. La suspensión celular fue mantenida en baño de hielo hasta el momento del recuento de células y el análisis de la viabilidad, para ello de la suspensión celular en stock se tomó una alícuota de 10 μL a la cual se le adicionaron 10 μL del colorante azul de tripano GIBCO® para su recuento en una cámara hemocitométrica de Neubauer MARIENFELD®. La cuantificación de las células viables y no viables fue realizada mediante la técnica de exclusión vital, es decir, exclusión de las células no teñidas con respecto a las teñidas por el azul de tripano. El procedimiento se realizó en referencia al protocolo establecido por GIBCO®: <http://www.invitrogen.com/cell-culture-protocols/trypan-blue-exclusion>. Con base en lo anterior se realizaron las diluciones correspondientes para obtener 10×10^6 de células viables para cada ratón de los 8 grupos experimentales. La suspensión celular se colocó en tubos eppendorff estériles de 0.6 mL, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4° C se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 200 μL de solución fisiológica estéril PISA®. Dicha suspensión celular fue inoculada con una jeringa de insulina de 1^{cc}/mL. La inoculación de animales se llevó a cabo vía subcutánea en el flanco derecho del animal. Previo a esto, los animales fueron pesados diariamente y monitoreados para la detección oportuna de la aparición de la masa tumoral la cual fue evaluada durante un periodo máximo de 4 semanas. En el momento de la detección del tumor, cuando éste presentó un volumen de aproximadamente 3 mm³ se hizo un seguimiento con el objetivo de establecer su tasa de crecimiento durante la fase de tratamiento. La medición del tumor se llevó a cabo con un vernier mediante la fórmula establecida por Hedley *et al*; 2011; la cual establece que el volumen, expresado en mm es= (0.52) X (largo)² X (ancho), donde 0.52 es el factor que incluye la proporción de piel; al mismo tiempo de la aparición del

tumor se procedió a la administración de los fármacos vía intra-peritoneal (i.p.) a la misma hora cada 24 horas. Las concentraciones de los tratamientos fueron establecidas con base en las IC₅₀ que se obtuvieron en los ensayos de SFR-B *in vitro*: 1) control (+) doxorubicina: 1 mg/Kg; 2) metformina: 200 mg/Kg y 3) F3: 15 mg/Kg. Para los tratamientos en sinergia: 4) doxorubicina/metformina: 1mg/Kg:200mg/Kg; 5) doxorubicina/F3: 1mg/Kg:15mg/Kg; 6) Metformina/F3: 200mg/Kg:15mg/Kg y 7) doxorubicina/metformina/F3: 1 mg/Kg/200mg/Kg:15mg/Kg (**Tabla 3**). En lo que se refiere al grupo control (-) fue inoculado con 200 µl de solución salina. De igual manera durante esta fase de tratamiento los animales fueron pesados y monitoreados diariamente. El punto final de experimentación culminó dentro de los 15 días de tratamiento establecidos. Dentro de esta fase no se reportó ninguna de las siguientes características: disminución del peso corporal en un 20%, falta de movilidad y/o cambios de comportamiento que obligará a sacrificar a los animales antes de finalizar con su tratamiento.

Grupo	Tratamiento	[] Fármaco en 200 μ l	# de animales
1.	Control (-) solución fisiológica		N=5
2.	Control (+) doxorubicina	1 mg/Kg	N=5
3.	metformina	200 mg/Kg	N=5
4.	F3	15 mg/Kg	N=5
5.	doxorubicina/metformina	1 mg/Kg:200mg/Kg	N=5
6.	doxorubicina/F3	1 mg/Kg:15 mg/Kg	N=5
7.	metformina/F3	200 mg/Kg: 15 mg/Kg	N=5
8.	doxorubicina/metformina/F3	1 mg/Kg: 200 mg/Kg: 15 mg/Kg	N=5

Tabla 3. Distribución de grupos experimentales y dosis de tratamientos administradas en 200 μ l de PBS 1X a cada uno de los animales. Las concentraciones de los tratamientos administradas a cada grupo de animales fueron establecidas con base en las IC₅₀ obtenidas en los ensayos *in vitro*.

8.6 Evaluación de la disminución de la masa tumoral a través de micro-Tomografía Emisora de Positrones (microPET)

Este estudio se llevó a cabo en la Unidad PET/CT Ciclotrón de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La micro tomografía emisora de positrones (microPET) es una técnica no invasiva de imagenología molecular cuyo objetivo es proporcionar información de procesos biológicos a nivel molecular y/o metabólico mostrando imágenes funcionales que reflejan la concentración de un fármaco específico proporcionando información de

procesos bioquímicos o biológicos a nivel molecular. La evaluación y seguimiento del crecimiento tumoral en los animales con la línea celular MDA-MB-231 y el efecto reductor del tumor por el nuevo tratamiento, se llevó a cabo mediante este estudio empleando el radiotrazador fluorodesoxiglucosa ($[^{18}\text{F}]$ FDG). Este es un radiofármaco análogo de la glucosa (glucosa marcada con flúor 18) que permite evaluar la actividad glicolítica en células neoplásicas (Ávila-Rodríguez y Alva-Sánchez, 2010), que como ya se mencionó anteriormente se encuentra más elevada en células tumorales a diferencia de las células normales.

El análisis se llevó a cabo bajo el siguiente protocolo de adquisición establecido por la Unidad PET/CT ciclotrón UNAM a través del equipo MicroPET Focus 120 Concorde Microsystem, Siemens: Los ratones fueron anestesiados en una cámara de inducción con isofluorano/oxígeno (0.5 L/min) durante 5 minutos y canalizados vía vena caudal con 200 mCi de $[^{18}\text{F}]$ FDG en un volumen de 200 μL con un tiempo de biodistribución del radiotrazador de 45 minutos, periodo en el cual el animal se mantuvo en un microaislador con temperatura constante para su pronta recuperación después de haber sido anestesiado. Concluido el tiempo de biodistribución el animal nuevamente fue colocado en la cámara de isofluorano para ser anestesiado vía vena caudal para mantenerlo estático en la plancha del microPET para la adquisición de las imágenes con el programa de reconstrucción OSEM3D Siemens® de la misma casa comercial del equipo microPET. El protocolo de adquisición fue de manera estática durante 30 minutos, en este periodo de tiempo de adquisición de imágenes el animal permaneció anestesiado con una dosis baja y constante de isofluorano a través de una mascarilla, se mantuvo a 37°C bajo luz incandescente con el objetivo de mantener su temperatura corporal constante. La evaluación y evolución de la enfermedad se hizo en tres

ocasiones: 1) estado basal, 2) punto medio del tratamiento (7 días) y 3) al final del tratamiento (15 días). Los ensayos se realizaron por triplicado y de manera independiente.

8.7 Estadística

Para evaluar si existen o no diferencias significativas, a los resultados se les aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), utilizando en método de Dunnett para comparaciones múltiples. La significancia estadística fue aceptable con una $p < 0.05$ empleando el programa estadístico GraphPad PRISMA versión 5.0.

9. RESULTADOS

9.1 Efecto de los fármacos individuales y en sinergia en la viabilidad de las células MDA-MB-231

En esta sección del trabajo experimental se evaluó el efecto citotóxico de los fármacos en forma individual y combinados sobre la línea celular de CMTN MDA-MB-231 mediante el uso del colorante SFR-B tal como se describe en materiales y métodos. Los resultados muestran que los valores de absorbancia obtenidos en este ensayo disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de los fármacos y el tiempo de exposición a estos; se manejaron 4 tiempos de incubación con el objetivo

de observar su efecto a corto y largo plazo. En la **Figura 16 a-g** se observa que en los tratamientos individuales y en sinergia el valor de IC_{50} es dependiente tanto de la dosis como del tiempo. En lo que refiere a los tratamientos individuales, se observa de manera significativa (* $p=0.05$) que la doxorrubicina tiene un efecto dependiente de dosis-tiempo, obteniendo su IC_{50} a una dosis baja ($0.5 \mu M$) y en un tiempo corto (4 horas); con respecto a otras concentraciones y tiempos de incubación, su efecto permaneció constante a esta dosis en tiempos de incubación más largos, lo cual nos hace suponer que bajo estas condiciones las células están desarrollando cierta resistencia a doxorrubicina. Su citotoxicidad fue en aumento conforme el tiempo de exposición. En metformina se obtuvo un IC_{50} a 25 mM (* $p=0.05$) a las 24 horas; su efecto inhibitorio aumenta conforme el tiempo, tiene un comportamiento dependiente del tiempo y no de la dosis ya que se ha observado que a menores o más altas concentraciones la metformina ejerce la misma acción; además, se conoce que este fármaco es inocuo aún en altas concentraciones (**Figura 16-b**). El F3 ejerció su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de 50% en un tiempo más largo con respecto a doxorrubicina y metformina, se obtuvo su IC_{50} a 15 mM a las 48 horas (* $p=0.05$) (**Figura 16-c**).

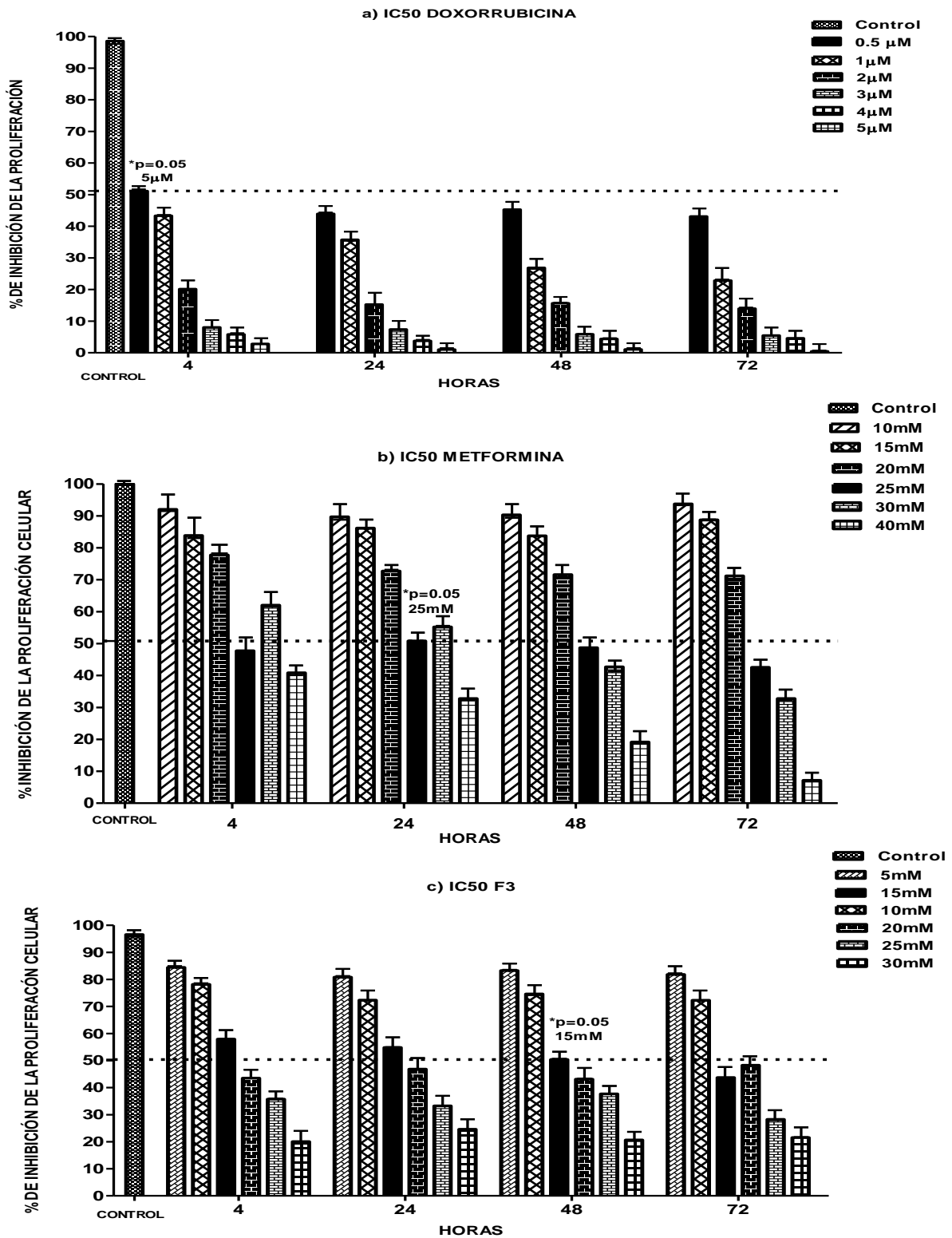


Figura 16 a-c. Viabilidad de las células de CMTN MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de los fármacos en estudio, de manera individual. Las gráficas muestran el porcentaje de células que sobrevivieron a los tratamientos. a) doxorubicina $IC_{50}=0.5 \mu M$; b) metformina=25 mM y c) F3=15 mM.

En lo que respecta a las combinaciones farmacológicas, la sinergia entre los fármacos se ve potencializada en tiempos más cortos y a bajas concentraciones en relación con los tratamientos individuales. En el caso de Metformina/F3 se observa su efecto en un plazo más largo y una dosis más alta en referencia a las demás combinaciones, obteniendo a las 48 horas una IC_{50} de 30 mM; se observa que las combinaciones farmacológicas con doxorubicina potencializan su acción en tiempos más cortos en comparación con las que no la tienen, tal y como lo podemos observar en la **(Figura 16-e)**, el IC_{50} de esta combinación fue obtenida en un tiempo más largo y por tanto dosis más altas en comparación con doxorubicina/F3. La combinación doxorubicina/F3 **(Figura 16-f)** muestra un 50% de la inhibición de la proliferación sobre la línea celular en corto tiempo (24 horas) y dosis baja (15 mM); en relación a lo que se obtuvo con doxorubicina de manera individual, lo que sugiere que probablemente la combinación con doxorubicina potencializa la acción de los fármacos combinados con ella. Finalmente nuestra estrategia farmacológica, la mezcla de los tres fármacos, doxorubicina/metformina/F3, tiene un comportamiento sinérgico obteniendo una respuesta considerablemente significativa (* $p=0.05$) sobre la inhibición del 50% de la proliferación celular en un tiempos más corto (4 horas) y dosis baja (10 mM) con respecto a otras combinaciones. Demostramos que probablemente la combinación con doxorubicina puede estar potencializando el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular en combinación con metformina/F3 **(Figura 16g)**.

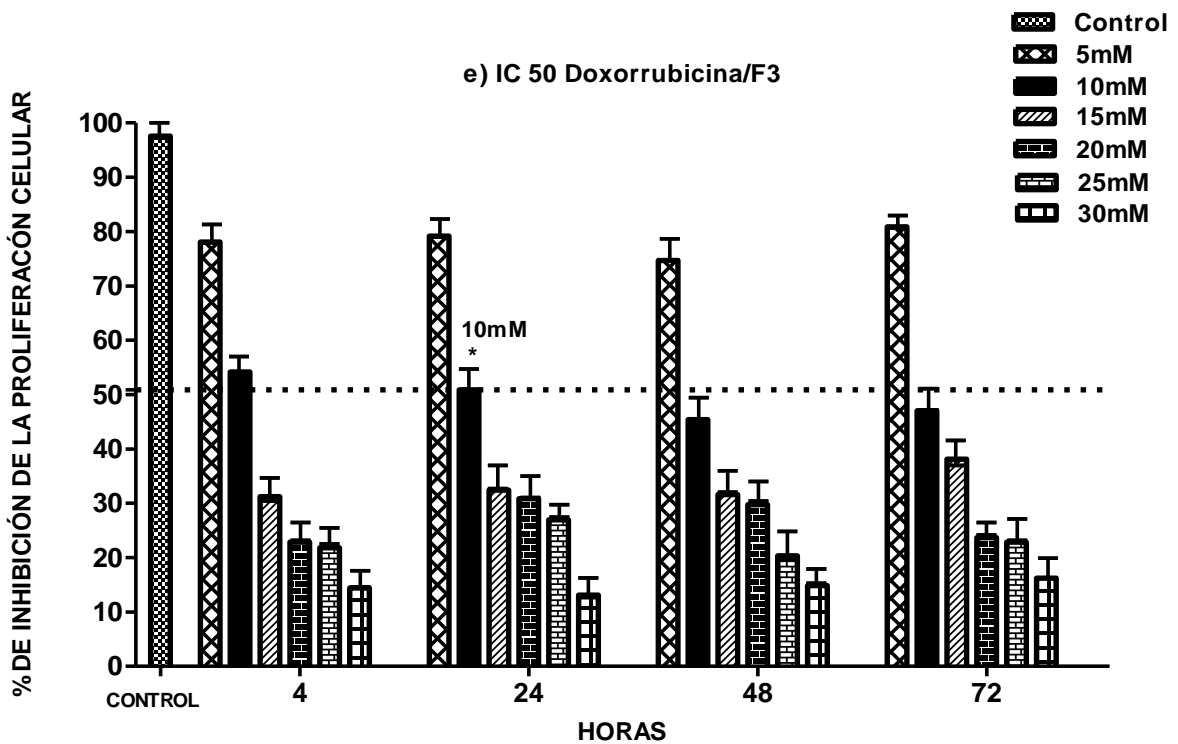
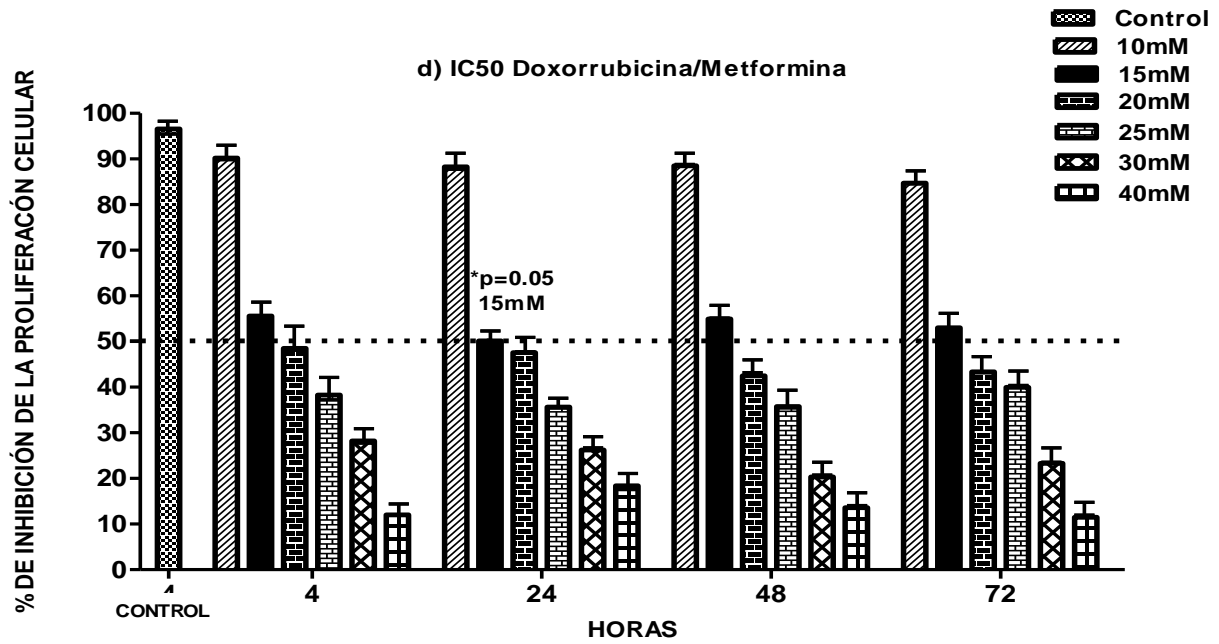


Figura 16 d y e. Viabilidad de las células de CMTN MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de los fármacos en sinergia en cuatro tiempos de incubación. Las gráficas muestran el porcentaje de células que sobrevivieron a los tratamientos con d) doxorubicina/metformina y e) doxorubicina/F3 presentando una IC₅₀ de 15 y 10 mM respectivamente.

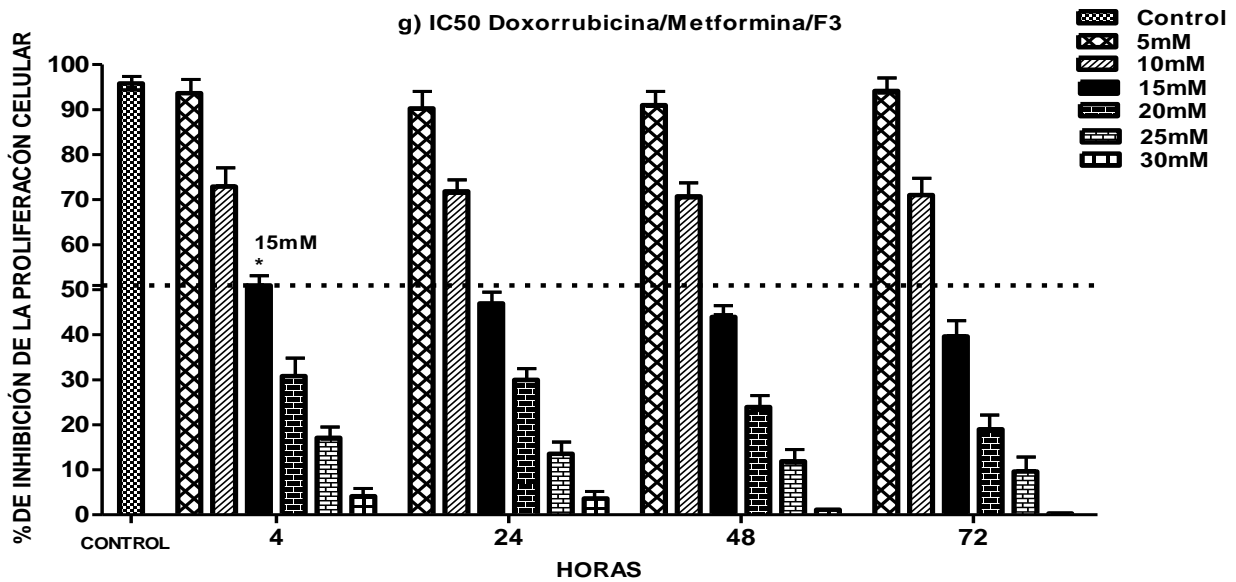
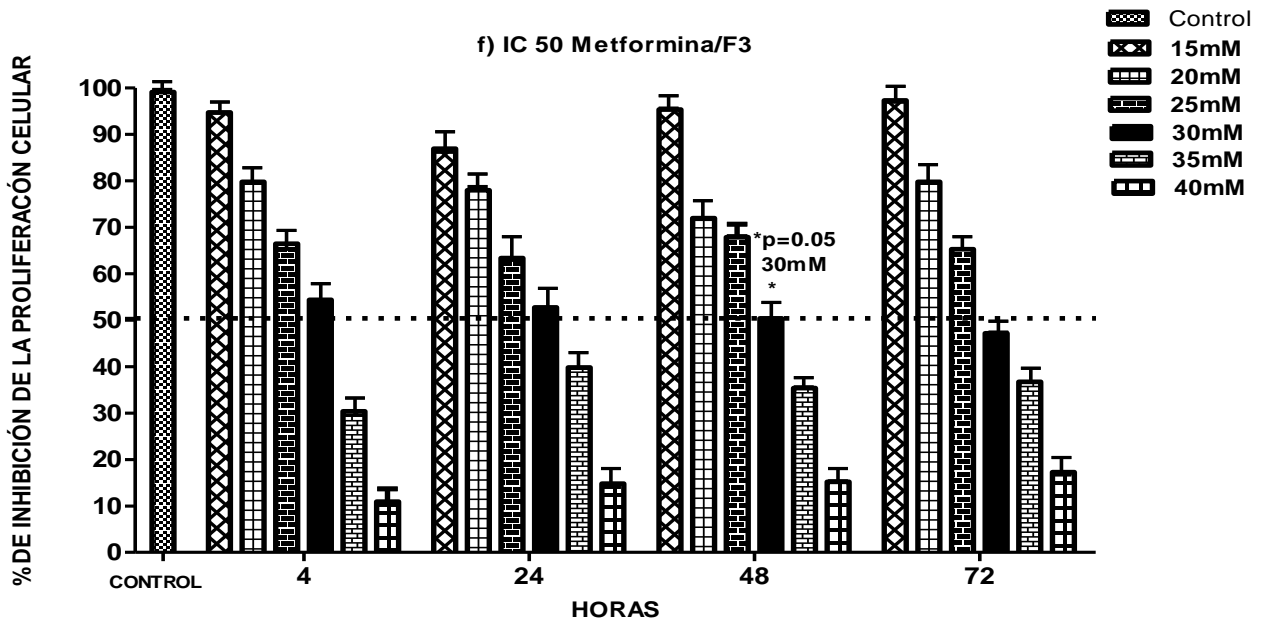
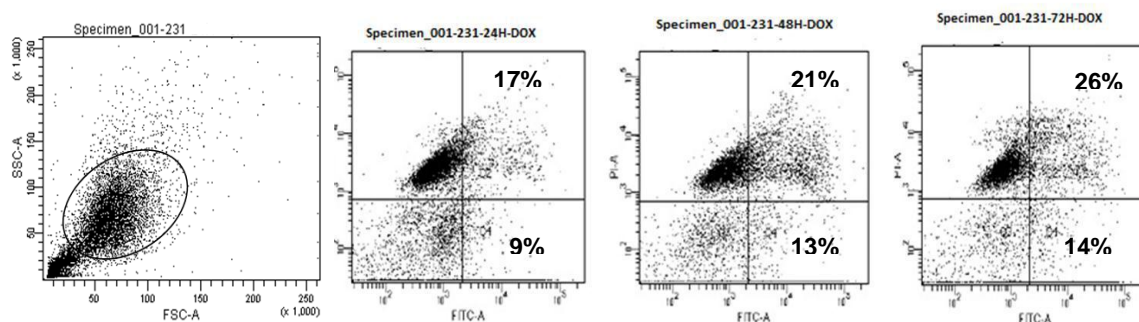


Figura 16 f y g. Viabilidad de las células de CMTN MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de los fármacos en sinergia en cuatro tiempos de incubación. Las gráficas muestran el porcentaje de células que sobrevivieron a los tratamientos con f) metformina/F3 y g) doxorrubicina/metformina/F3 presentando una IC₅₀ de 30 y 15 mM respectivamente. La estrategia farmacológica de la combinación de los tres fármacos muestra de manera significativa incremento en el efecto sobre la inhibición de la proliferación celular con respecto a las demás combinaciones. En ambas gráficas, se observa que el efecto de los tratamientos es dependiente de la dosis.

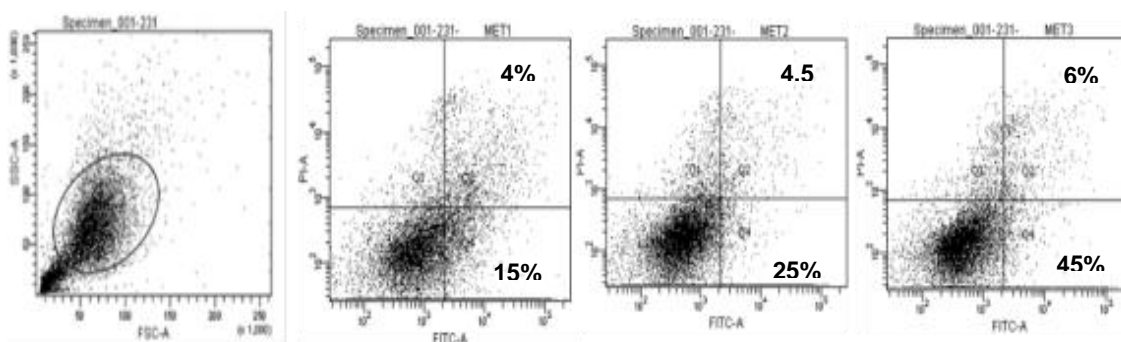
9.2 Efecto de los fármacos en la apoptosis de las células de CMTN MDA-MB-231 por citometría de flujo

Con la finalidad de evaluar el tipo de muerte celular inducida por los fármacos, se utilizó el método de Anexina V/IP para citometría de flujo. En referencia a la Doxorubicina (**Figura 17a**) a una concentración de 0.5 μ M, las gráficas de puntos obtenidas mostraron que su efecto sobre la inducción de muerte por apoptosis es mínimo; se obtuvo un 9% de muerte por apoptosis dentro de las primeras 24 horas y este efecto se incrementó ligeramente a las 72 horas con un 14% de apoptosis; sin embargo de manera significativa se observaron más células teñidas con IP en células tratadas con doxorubicina (0.5 μ M), lo que indica que su efecto indujo un 17% de muerte celular por necrosis dentro de las primeras 24 horas y que dicho efecto va en aumento conforme transcurre el tiempo de incubación presentando un 26% total de muerte por necrosis a las 72 horas (**Figura 18 a-d**). En la **Figura 17b**, se muestra que la metformina a una concentración de 25mM, tiene un efecto de inducción de muerte por apoptosis sobre la línea celular del 18% en las primeras horas (*p=0.05) este efecto va en aumento en las siguientes 72 horas hasta terminar con un total de 45% de apoptosis. Por el contrario, hubo una disminución significativa de necrosis con respecto a doxorubicina y F3, mostrando 4.5 % de necrosis en las primeras 24 horas, manteniendo este efecto relativamente constante, con 4 y 6 % de necrosis, respectivamente. El F3 a 15mM produce un efecto mínimo de apoptosis (4%) dentro de las primeras 24 horas, el cual es significativamente menor (*p=0.05) en comparación con doxorubicina y metformina (**Figura 17 a-c; Figura 18 a-d**).

a) Doxorrubicina



b) Metformina



c) F3

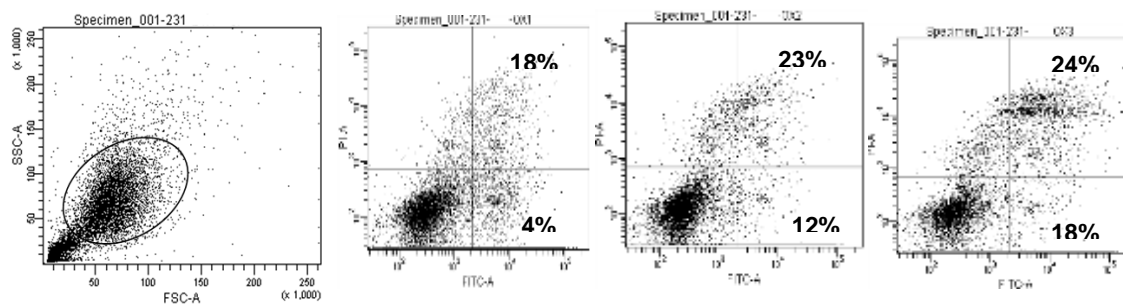
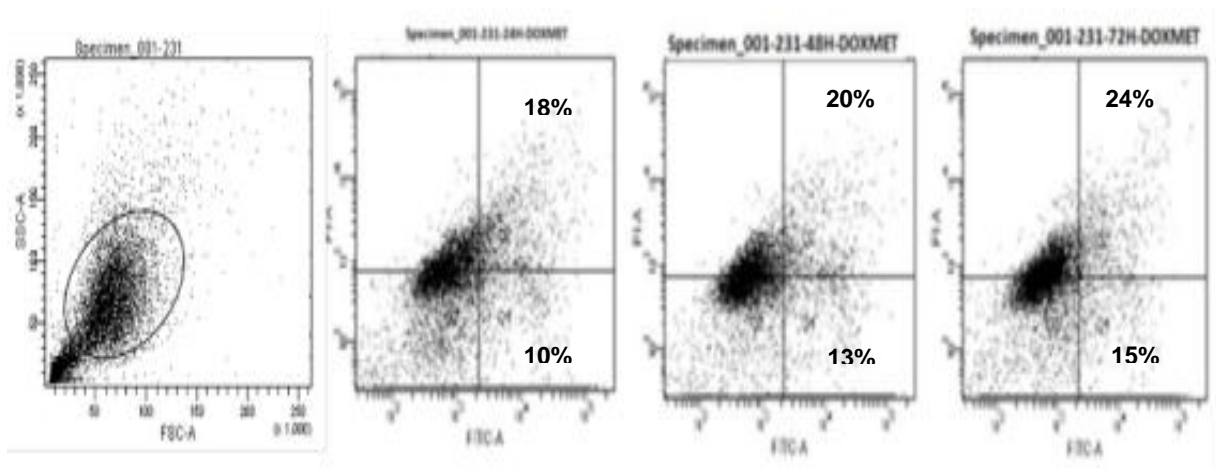


Figura 17 a-c. Gráficas de puntos obtenidas de citometria de flujo; el eje de las X grafica para Anexina V mientras que el de las Y para IP. Mediante ANEXINA V/IP se determinó el tipo de muerte que los fármacos individuales en estudio indujeron sobre la línea celular de CMTN MDA-MB-231 a) doxorubicina control (+), b) metformina y c) F3. Todos los ensayos se realizaron en 3 tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) y por triplicado.

La inducción de apoptosis por el F3 aumento transcurridas 72 horas, hasta alcanzar 18% de apoptosis; efecto significativamente más alto en comparación con doxorubicina y metformina en ese mismo periodo de tiempo (**Figura 17-c**).

Por otra parte, en la **Figura 17d** observamos que doxorubicina/metformina tienen un efecto inductor de muerte por apoptosis del 18% a las 24 horas y un total de 64% a las 72 horas; de manera importante se observa que el efecto inductor de necrosis es inversamente proporcional en los tres tiempos de incubación. El complejo de doxorubicina/F3 generó una inducción de muerte por apoptosis del 9% en las primeras 24 horas, tal efecto se mantiene relativamente constante a las 48 y 72 horas con un 11 y 13% respectivamente; por otro lado su efecto por inducción de necrosis es considerablemente significativo ($*p=0.05$) en los 3 tiempos de incubación 24, 48 y 72 horas mostrando un 19, 21 y 30% de necrosis respectivamente. En metformina/F3 se observó una inducción de muerte por apoptosis del 7% a las 24 horas el cual permaneció constante a las 48 y 72 horas con un 6%; sin embargo la muerte por necrosis se vio considerablemente incrementada ($*p=0.05$) en los tres tiempos de incubación 24, 48 y 72 horas con un 14, 29 y 37 % de necrosis, respectivamente. Finalmente, el efecto proapoptótico que nuestra estrategia farmacológica doxorubicina/metformina/F3, ejerce sobre la línea celular es considerablemente significativa ($*p=0.05$) en referencia a las demás combinaciones (**Figura 17-g; Figura 18 a-d**). Dicha acción es mayor a las otras alternativas en las primeras 24 horas con un 19% de apoptosis; este fenómeno fue en aumento llegando a un total de 75% de apoptosis a las 72 horas. Por otra parte la toxicidad se ve disminuida notoriamente, obteniendo 5% de necrosis a las 24 horas, incrementando hasta un total de 26% a las 72 horas (**Figura 18 a-d**).

d) Doxorubicina/Metformina



e) Doxorubicina/F3

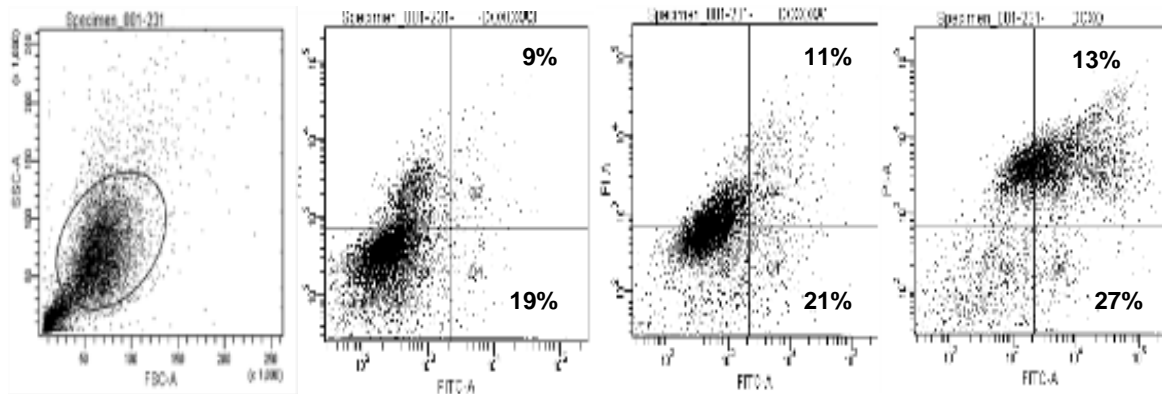
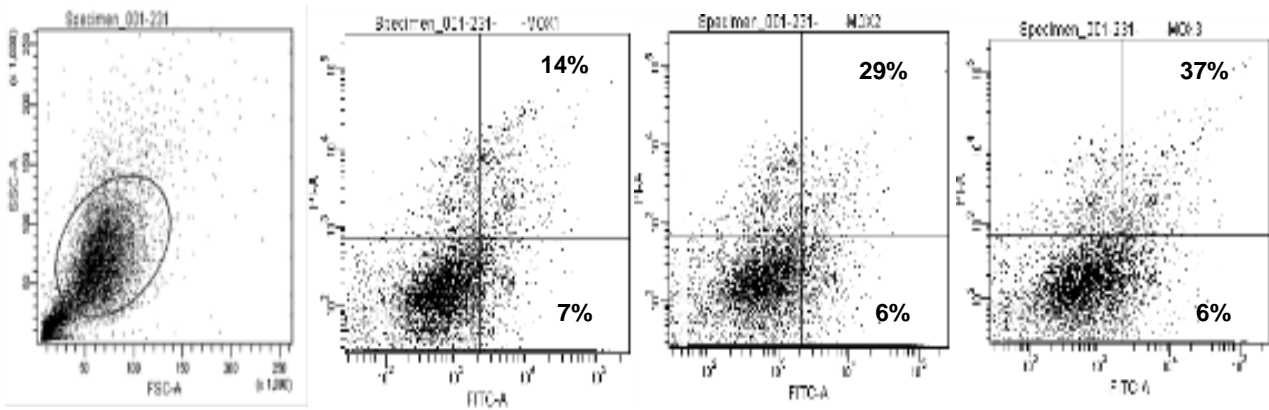


Figura 17 d y e. Gráficas de puntos obtenidas de citometria de flujo; el eje de las X corresponde a células marcadas con Anexina V, mientras que el de las Y, células marcadas con IP. Mediante ANEXINA V/IP se determinó el tipo de muerte que los fármacos en sinergia indujeron sobre la línea celular de CMTN MDA-MB-231: d) Doxorubicina/Metformina, e) Doxorubicina/F3. Se observa que el efecto de estos tratamientos induce de manera significativa, muerte por necrosis más que por apoptosis. Todos los ensayos se realizaron en 3 tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) y por triplicado.

f) Metformina/F3



g) Metformina/Doxorrubicina/F3

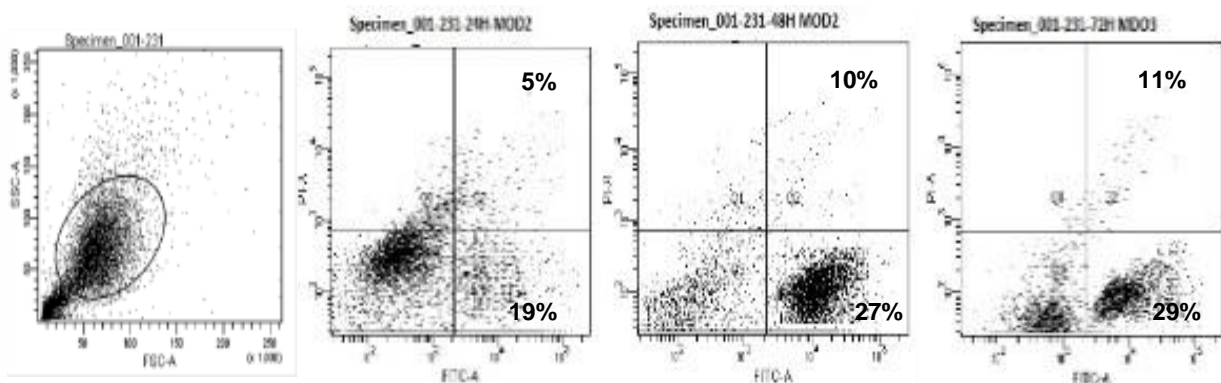
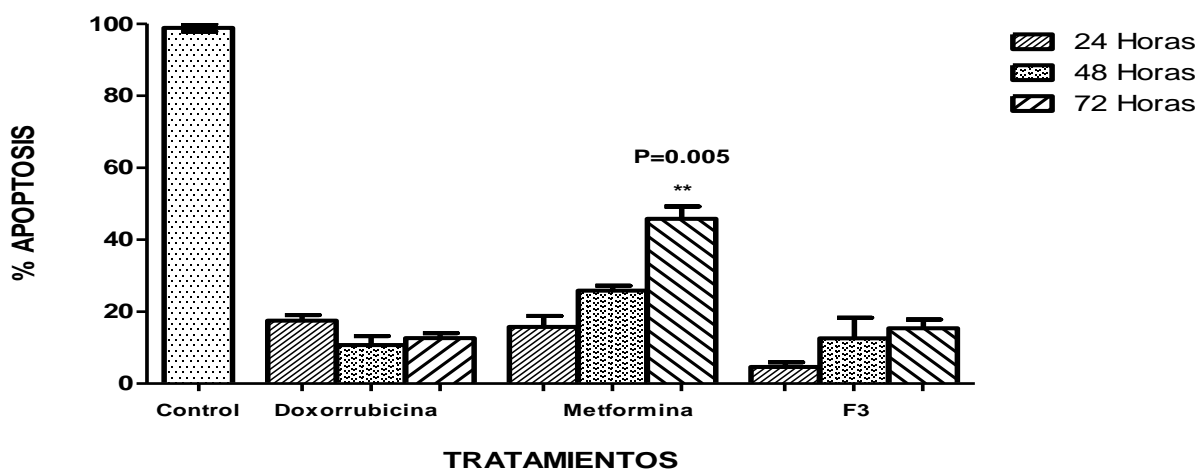


Figura 17 f y g. Gráficas de puntos obtenidas de citometría de flujo; el eje de las X corresponde a células marcadas con Anexina V, mientras que el de las Y a células marcadas con IP. Mediante ANEXINA V/IP se determinó el tipo de muerte que los fármacos en sinergia indujeron sobre la línea celular de CMTN MDA-MB-231: f) Metformina/F3 muestran mayor efecto de muerte por necrosis y g) Doxorrubicina/Metformina /F3 muestra un efecto significativo de inducción de muerte por apoptosis a diferencia de los demás tratamientos. Todos los ensayos se realizaron en 3 tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) y por triplicado.

a) APOPTOSIS EN TRATAMIENTOS INDIVIDUALES



b) NECROSIS EN TRATAMIENTOS INDIVIDUALES

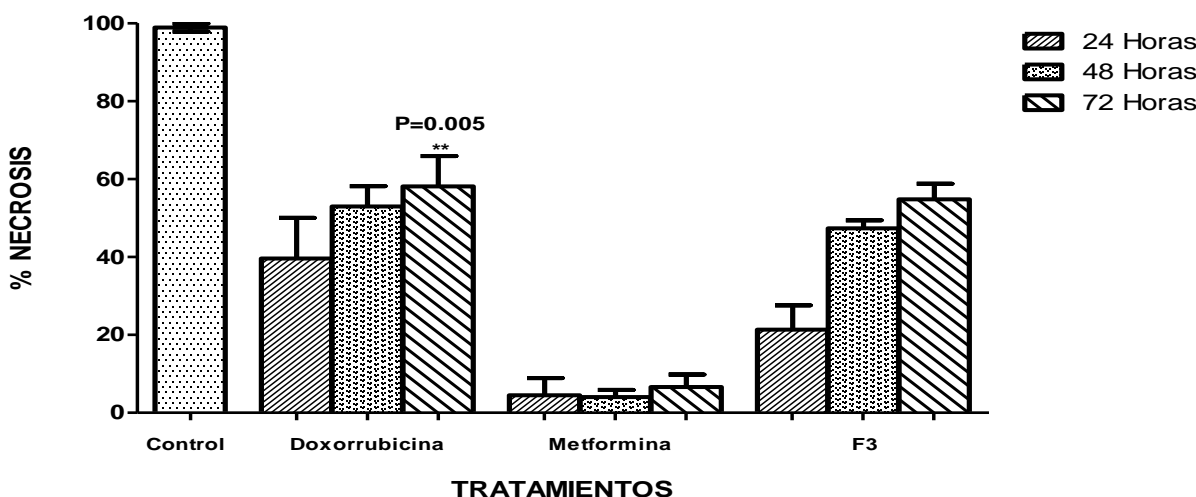
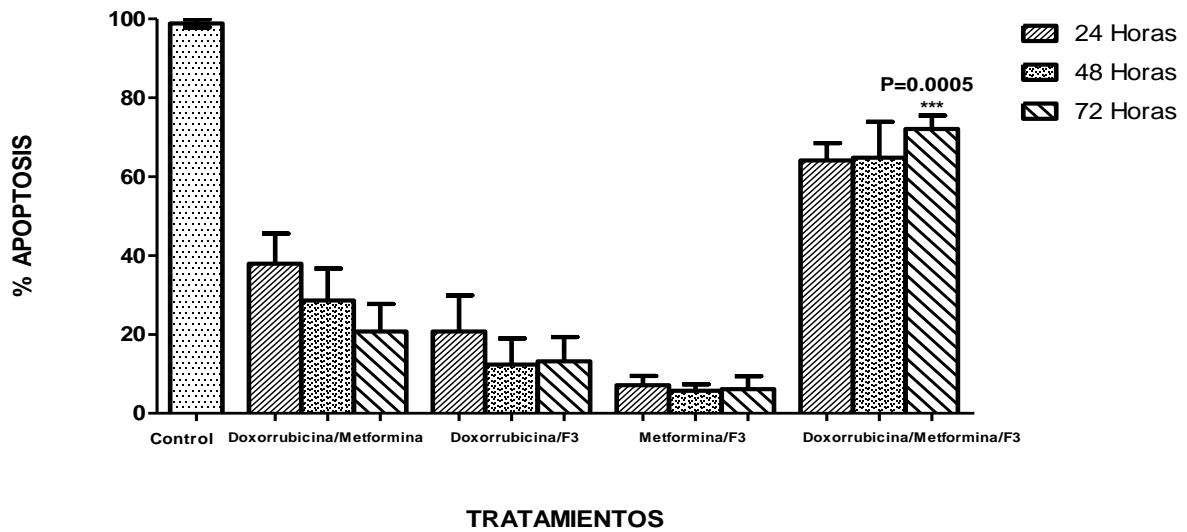


Figura 18 a-b. Porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis inducida por los fármacos de manera individual: doxorubicina, metformina y F3. a) De manera significativa doxorubicina y F3 muestran un menor porcentaje de muerte por apoptosis. Metformina muestra de manera significativa (*p=0.05) inducción de apoptosis lo que refiere su bajo efecto tóxico en comparación con doxorubicina y el F3. b) Porcentaje de necrosis inducida por los fármacos de manera individual: doxorubicina, metformina y F3; se observa que doxorubicina y F3 ejercen efecto tóxico al inducir de manera significativa (*p=0.05) muerte por necrosis en comparación con metformina. Los ensayos se realizaron por triplicado y en tres tiempos de incubación: 24, 48 y 72 horas.

c) APOPTOSIS EN TRATAMIENTOS COMBINADOS



d) NECROSIS EN TRATAMIENTOS COMBINADOS

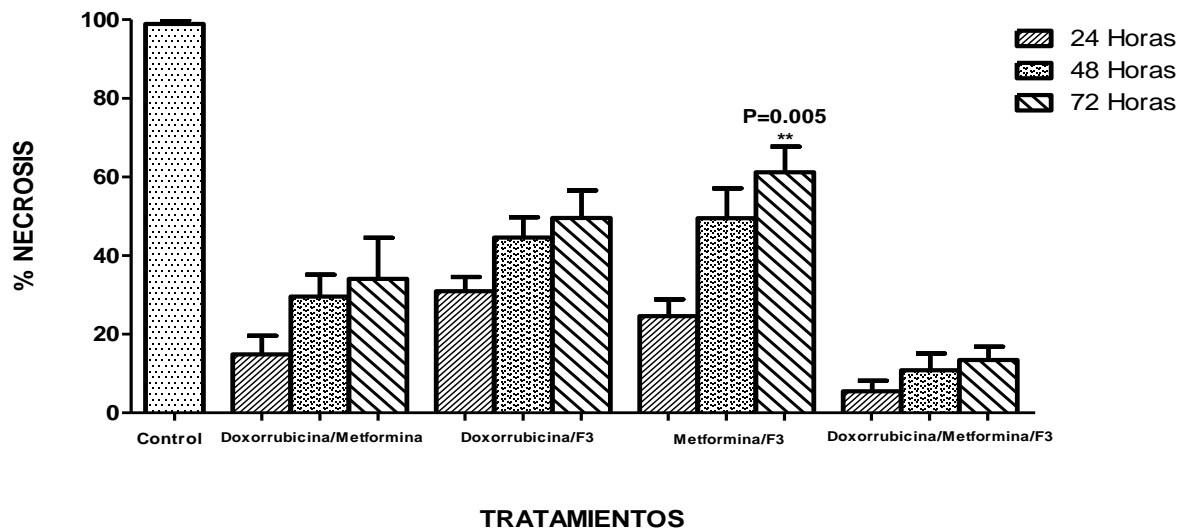


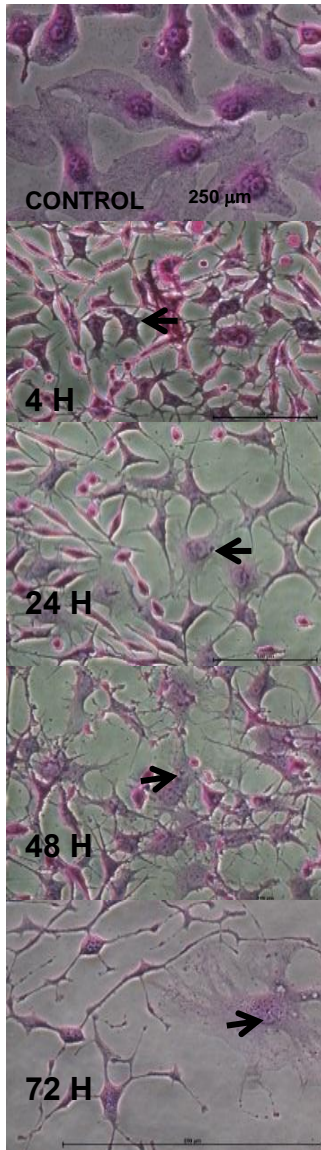
Figura 18 c-d. Porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis inducida por los fármacos en sinergia: doxorubicina/metformina, doxorubicina/F3, metformina/F3 y doxorubicina/metformina/F3. c) se observa de manera significativa (* $p=0.05$) que nuestra estrategia experimental (doxorubicina/metformina/F3) induce 75% de apoptosis a diferencia de las demás combinaciones: doxorubicina/metformina, doxorubicina/F3, metformina/F3 y d) se observa que el efecto de muerte por necrosis en doxorubicina/metformina/F3 es inversamente proporcional a lo obtenido en apoptosis. Los ensayos se realizaron por triplicado y en tres tiempos de incubación: 24, 48 y 72 horas.

9.3 Evaluación morfológica de las células de CMTN MDA-MB-231 después del tratamiento con los fármacos

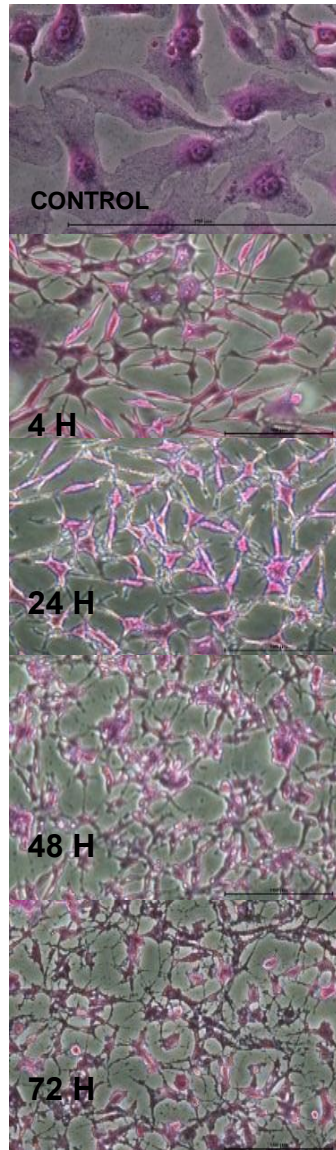
Con el objetivo de tener más evidencia sobre el efecto tóxico de los fármacos se realizó un ensayo de valoración morfológica cosechando 7000 células en placas de 24 pozos en 5 tiempos de incubación: 4, 24, 48 y 72 horas y por triplicado, tal y como se describe en material y métodos; empleando las concentraciones de los IC50 obtenidas en el ensayo de SFR-B. Los resultados obtenidos muestran el cambio morfológico que sufrieron las células al ser tratadas con cada uno de los fármacos en los 5 tiempos de incubación. En la **Figura 19** se presentan las imágenes de las células con tratamientos individuales y en sinergia; las células control se encuentran en estado proliferativo con forma regular, núcleo definido y con integridad de la membrana celular y volumen citoplasmático. Las células que recibieron los tratamientos (**Figura 19 a-g**) se observa que las células presentaron cambios morfológicos en proporción directa al tiempo que estuvieron expuestas a los fármacos mientras transcurren los tiempos de incubación. En lo que respecta a metformina (**Figura 19a**), las células muestran características propias de apoptosis, es decir, el citoplasma y los orgánulos celulares están condensados. En las imágenes las células presentan ligeros poros o evaginaciones en su membrana, lo que refiere la exposición de los fosfolípidos al exterior de la membrana, agrandamiento nuclear y una consecuente reducción del volumen citoplasmático a partir de las 4 horas; estas características se hacen más prominentes en los siguientes tiempos de incubación. Caso contrario a doxorubicina y F3 (**Figura 19 b y c**), a partir de las 4 horas la célula presenta significativos cambios morfológicos en comparación con metformina, ambos fármacos propician muerte por necrosis, es

decir, reducción del volumen citoplasmático y considerable pérdida de la interacción célula-célula. Estas características se hacen más prominentes conforme incrementa el tiempo de exposición a estos fármacos hasta observar características que tienden inducción de muerte por necrosis. De igual manera, estos resultados concuerdan con los ensayos de citotoxicidad anteriores y demuestran morfológicamente el alto potencial tóxico de doxorubicina y F3. En lo que refiere a las combinaciones farmacológicas, en la **Figura 19 d-g**; las células con tratamiento presentan cambios morfológicos a partir de las 4 horas, haciéndose más prominentes conforme incrementan los tiempos de incubación; En los tratamientos: doxorubicina/metformina, doxorubicina/F3 y metformina/F3 (**Figura 19 d, e y f respectivamente**), las células presentan una morfología característica de muerte por necrosis, (reducción del volumen citoplasmático y considerable pérdida de la interacción célula-célula). Finalmente, la estrategia experimental: doxorubicina/metformina/F3, refiere cambios morfológicos característicos de inducción de muerte por apoptosis (**Figura 19 g**). A partir de las 4 horas de estímulo se observa la presencia de células granulares con los cuerpos apoptóticos e hinchamiento celular, de manera importante se observa que a las 72 horas hay una disminución de la proliferación celular además de la presencia de restos celulares; tales observaciones son propias de muerte por apoptosis. Lo anterior nos permite inferir que el empleo de esta estrategia farmacológica no da muestras morfológicas de toxicidad en comparación con los demás tratamientos.

a) Metformina



b) Doxorrubicina



c) F3

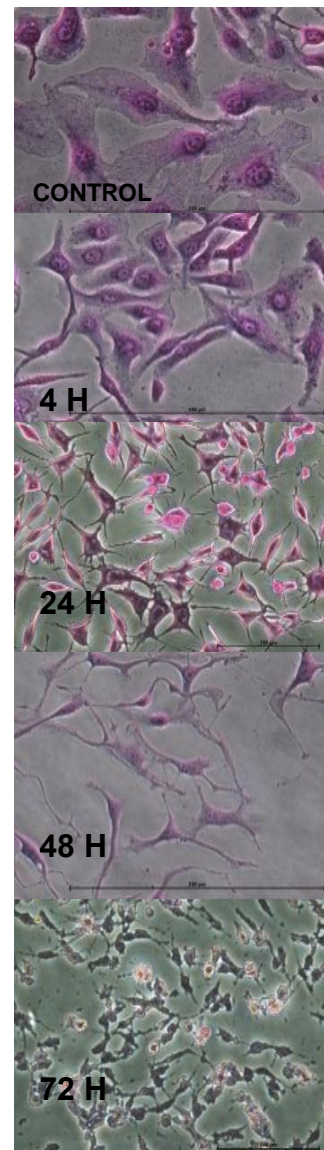


Figura 19 a-c: Valoración morfológica del tipo de muerte inducida sobre la línea celular de CMTN MDA-MB-231 por el efecto de los fármacos de manera individual a 4, 24, 48 y 72 horas de incubación. Tratamientos individuales: as células control se observan en estado proliferativo con forma regular, núcleo definido y buena integridad de la membrana celular y volumen citoplasmático. a-c) en las células con tratamientos a partir de las 4 horas se observan cambios en su estructura; a) metformina presenta cambios característicos que tienden a la apoptosis; b) doxorrubicina y c) F3 cambios característicos de muerte por necrosis. Las flechas indican zonas donde se presentan cambios morfológicos.

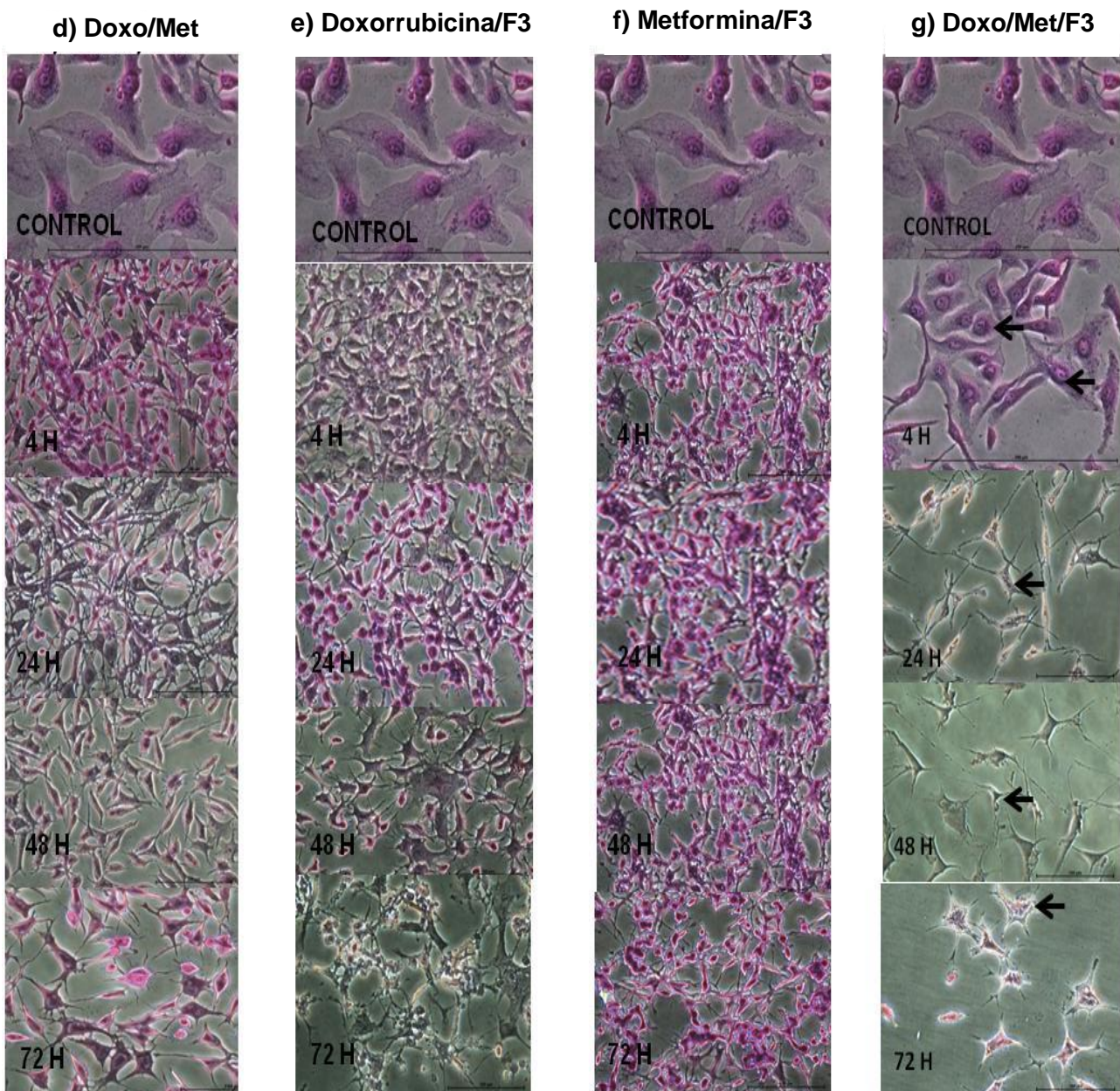


Figura 19 d-g: Valoración morfológica del tipo de muerte inducida sobre la línea celular de CMTN MDA-MB-231 por el efecto de los fármacos en sinergia a 4, 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Las células control se observan en estado proliferativo con forma regular, núcleo definido y buena integridad de la membrana celular y volumen citoplasmático. g) En Doxo/Met/F3 a las 72 horas se observa reducción considerable de la proliferación celular y apariencia característica de células apoptóticas en comparación con las otras combinaciones que muestra características de muerte por necrosis. Las flechas indican las zonas donde se presentan cambios morfológicos.

9.4 Determinación del crecimiento tumoral mediante microPET

Con el objetivo de evaluar la eficacia de los tratamientos empleados en este estudio se recurrió a utilizar como herramienta de seguimiento de enfermedad al microPET con el radionúclido [18F]FDG (**Figura 20 y 21 a y b**). La medición de la masa tumoral se llevó a cabo con vernier, dichas medidas fueron tomadas diariamente y con ellas se establecieron las curvas de inhibición del crecimiento tumoral desde el día cero (basal) hasta el final del tratamiento (15 días) (**Figura 22 a y b**), tal y como se describe en material y métodos, respectivamente. De acuerdo a las Figuras 20 y 21 La biodistribución del radionúclido se aprecia en las zonas de color rojo con mayor intensidad, es decir, la [18F]FDG como otros radionúclidos tienen la capacidad de absorberse donde hay mayor demanda energética por tanto este se bio-distribuirá en mayor intensidad en la masa tumoral. Los órganos como los ojos, la vejiga (por ser la zona de eliminación del fármaco) y cerebro por su naturaleza fisiología son zonas de alta demanda energética por tanto la acumulación de la [18F]FDG también se verá acumulada en esta zonas.

En las **figuras 20 y 21** se muestran la biodistribución de la [18F]FDG, la cual fue determinada 1 hora después de su administración, su biodistribución se aprecia en las zonas de color rojo con mayor intensidad. Se observan 3 cortes: (transversal, coronal y sagital) de los estudios de microPET realizados en los ratones. En el corte transversal se observa la zona apical del corazón, el cerebro y la masa tumoral. En el corte sagital se aprecia que por su función fisiología el corazón, el cerebro y la vejiga obtuvieron la mayor captación de la [18F]FDG. Cabe mencionar que en estudios con [18F]FDG la vejiga presenta la más alta concentración de actividad debido a que su eliminación es

por vía renal. A diferencia de la glucosa que sigue toda la ruta bioquímica de la glucólisis, la [18F]FDG se queda atrapada en la célula después de la acción de la hexocinasa, esto permite evaluar la actividad glicolítica que es más elevada en células neoplásicas comparada con células normales. Este proceso es el que nos permite apreciar el crecimiento o disminución de la masa tumoral durante el tratamiento.

De manera particular la **Figura 20** muestra las tres imágenes correspondientes de respuesta al tratamiento de manera individual. La **Figura 20a** corresponde al control negativo, el crecimiento del tumor es progresivo conforme al tiempo; en el 1er análisis la masa tumoral tiene un volumen de 3 mm^3 , el 2º análisis: 8 días post-tratamiento con un volumen 6.6 mm^3 y 3er análisis con un volumen de 18 mm^3 . La curva de inhibición del crecimiento tumoral (**Figura 22a**) muestra que a partir del día 8 se incrementa de manera considerable el crecimiento significativo de la masa tumoral con respecto al día cero; el grupo control se utilizó para todos los grupos experimentales (individuales y en sinergia) como referencia de progresión de enfermedad. En la **Figura 20 b** se muestra la imagen correspondiente al control positivo Doxorrubicina. 1er análisis con una masa tumoral inicial de 3 mm^3 , en el 2º análisis el tumor es tres veces mayor al inicial con un volumen de 8.7 mm^3 y en el 3er análisis el volumen de masa tumoral incremento a 18.11 mm^3 , seis veces más al volumen con el cual se inició el tratamiento; la **Figura 22a** muestra que la curva de crecimiento tiende a bajar de manera significativa (* $p=0.05$) después de una semana de tratamiento, sin embargo las células probablemente desarrollan quimioresistencia y nuevamente se inicia la proliferación celular cinco días antes de finalizar el tratamiento. En la **Figura 20c** se muestra el animal correspondiente al grupo experimental tratado con metformina. Se inició el tratamiento con una masa tumoral de 3 mm^3 , a los 8 días de tratamiento hubo un

incremento significativo del crecimiento tumoral hasta de 23.63 mm³ y, al finalizar los 15 días de tratamiento, el volumen tumoral disminuye a 19.18mm³ (**Figura 22a**); lo anterior muestra la eficacia del fármaco después de los 8 días post-tratamiento al disminuir el crecimiento de la masa tumoral al día 15. En la **Figura 20d** se muestra la imagen del animal tratado con F3. Al igual que los otros grupos experimentales, la masa tumoral fue de 3mm³, en el 2º análisis a los 8 días post-tratamiento incrementó a 18.30 mm³ y en el 3er análisis 15 días post-tratamiento, con respecto al control negativo se observa un aumento importante del crecimiento de la masa tumoral al presentar un volumen de 32.83 mm³ (**Figura 22a**); más de 10 veces el tamaño inicial. En la **Figura 21**, se muestran los grupos experimentales correspondientes a los tratamientos en sinergia; todos los individuos iniciaron tratamiento cuando el volumen del tumor alcanzo los 3 mm³. En la **Figura 21a** se observa el ratón que pertenece al grupo doxorubicina/metformina, después de ocho días de tratamiento, se observa un incremento en el crecimiento tumoral con un volumen de 21 mm³ y al 3er análisis disminuye notoriamente a 13.77 mm³ (*p=0.05) (**Figura 22b**). En La **Figura 21b**, se muestra el ratón correspondiente al grupo doxorubicina/F3, después de ocho días de tratamiento, se duplica el volumen del tumor a 6.3 mm³; en el tercer análisis se muestra un incremento de la masa tumoral de 9.85 mm³ (**Figura 22b**). Lo anterior refiere que a pesar de que probablemente al inicio del tratamiento la doxorubicina intensifica su acción en combinación con otros fármacos después de cierto tiempo genera resistencia en las células lo que conlleva a una recurrencia de la enfermedad. En la **Figura 21c** se muestra el animal correspondiente al grupo experimental metformina/F3, el tumor tiene un comportamiento de crecimiento exponencial, igual que el control negativo, aumentando de manera considerable hasta el día 15 en donde

alcanzó un volumen final de 35 mm³ (**Figura 22b**). Finalmente en la **Figura 21c** se muestra el efecto de la doxorrubicina/metformina/F3; en el 1er análisis la masa tumoral tiene un volumen de 3mm³, a partir del 2º estudio (8 días de tratamiento), se observa de manera considerablemente significativa (**p=0.0005) que la combinación de estos fármacos produce una remisión total de la masa tumoral con respecto a las demás propuestas farmacológicas (**Figura 22b**). En la imagen del microPET se puede observar que en el 2º y 3er estudio no hay captación de la [18F]FDG en la zona de inoculación, es decir, no hay actividad metabólica. Así mismo, la medición del tumor no fue posible ya que no había evidencia física palpable. En la **Figura 22c** se muestran los tumores correspondientes a los grupos experimentales extraídos después de la eutanasia. Es importante mencionar que el grupo experimental correspondiente a la combinación de los tres fármacos, tuvo seguimiento por tres meses más, con el objetivo de observar la posible recurrencia de la enfermedad y sobrevida. Después de este periodo de sobrevida no se observó crecimiento tumoral recurrente ni síntoma de toxicidad.

Análisis en microPET 18FDG: Tratamientos individuales

a) Control (-)

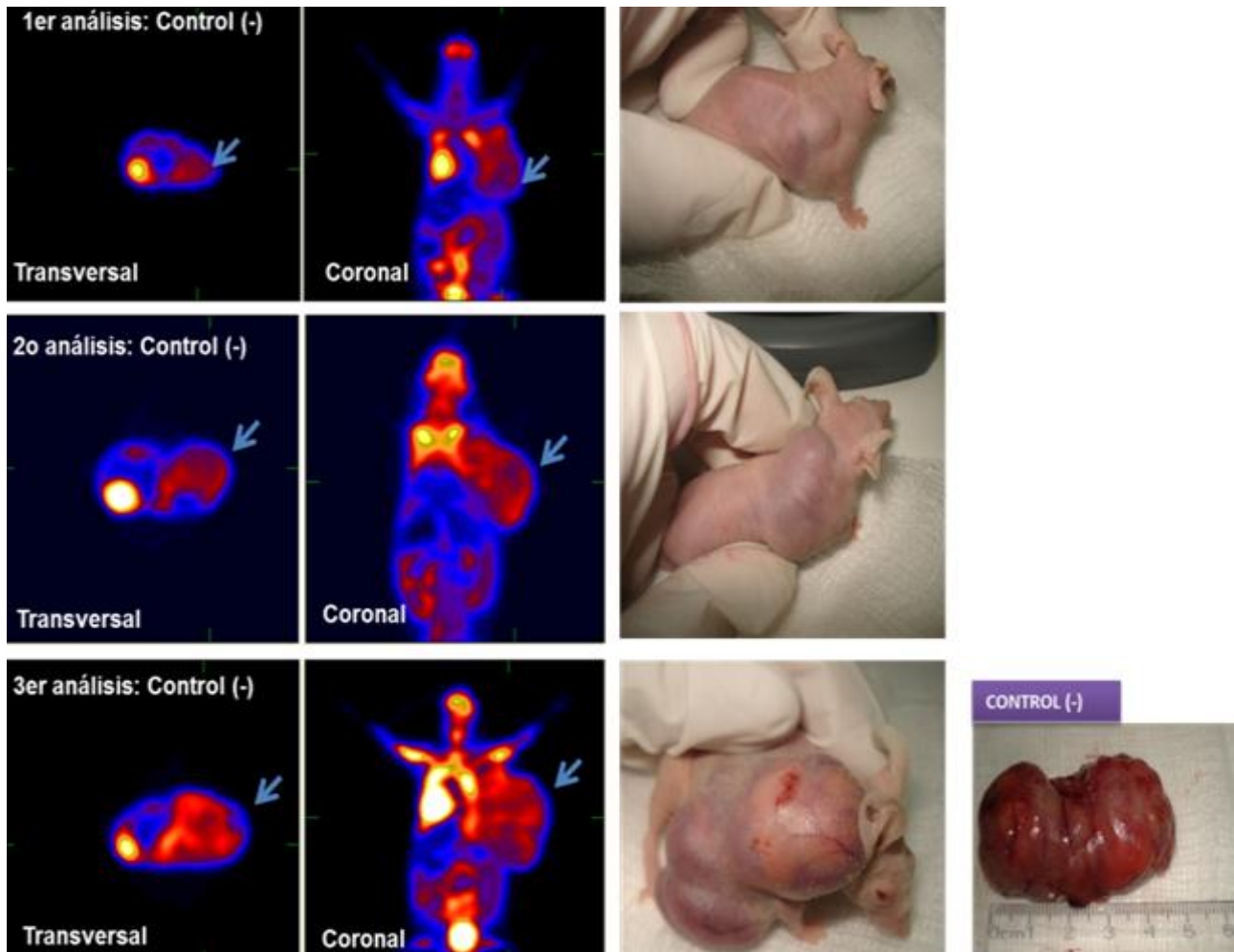


Figura 20 a. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral del grupo experimental control (-), animales sin tratamiento (tratado con solución salina). Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando el radionúclido ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días). Se observó crecimiento significativo de la masa tumoral al día 7. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la FDG es excretada a través de la orina.

b) Doxorrubicina (+)

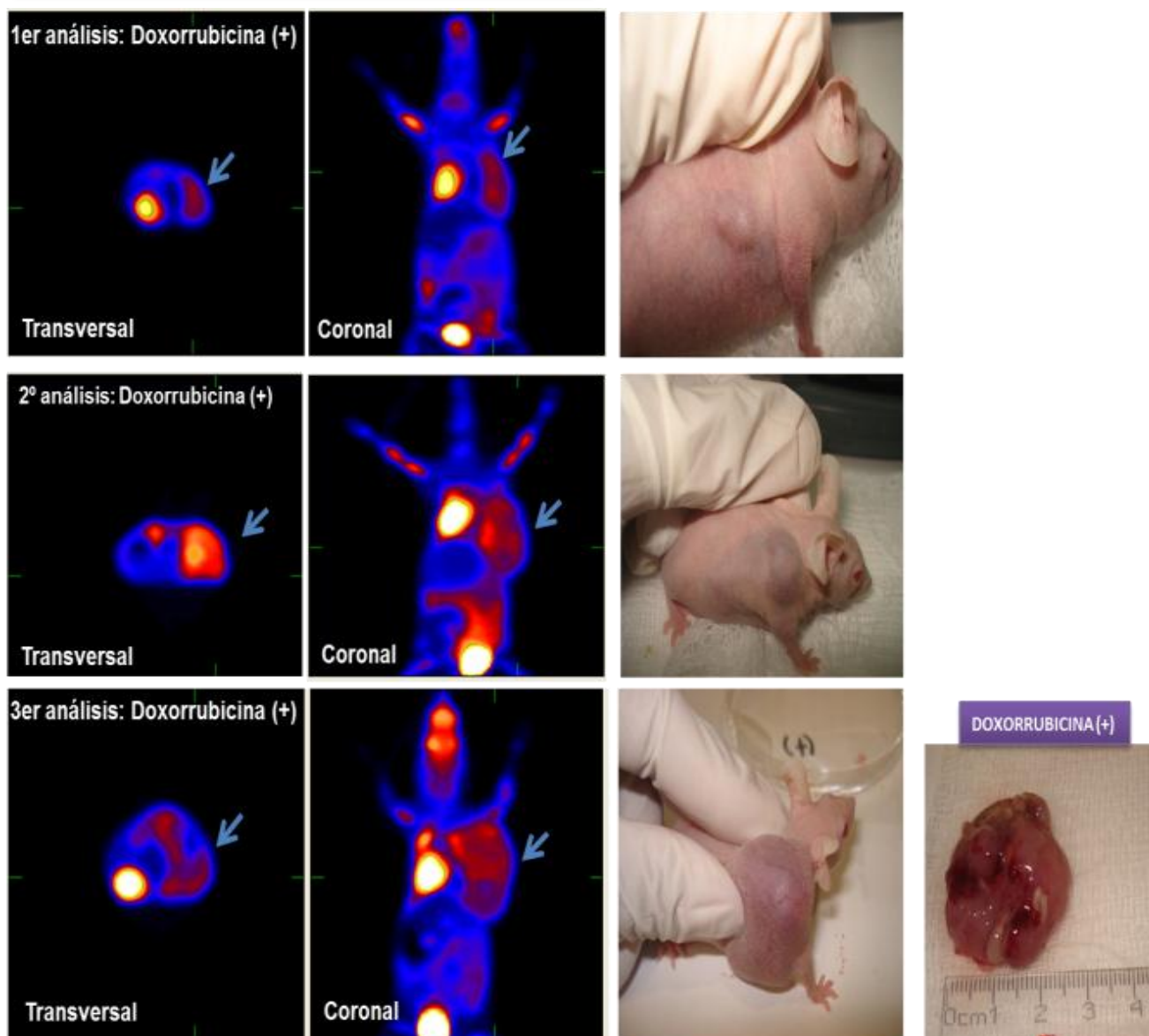


Figura 20 b. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral del grupo experimental tratado con Doxorrubicina (control +). Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando el radionúclido ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días). se observó crecimiento significativo de la masa tumoral y recurrencia de la enfermedad al día 7 de tratamiento. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la FDG es excretada a través de la orina.

c) Metformina

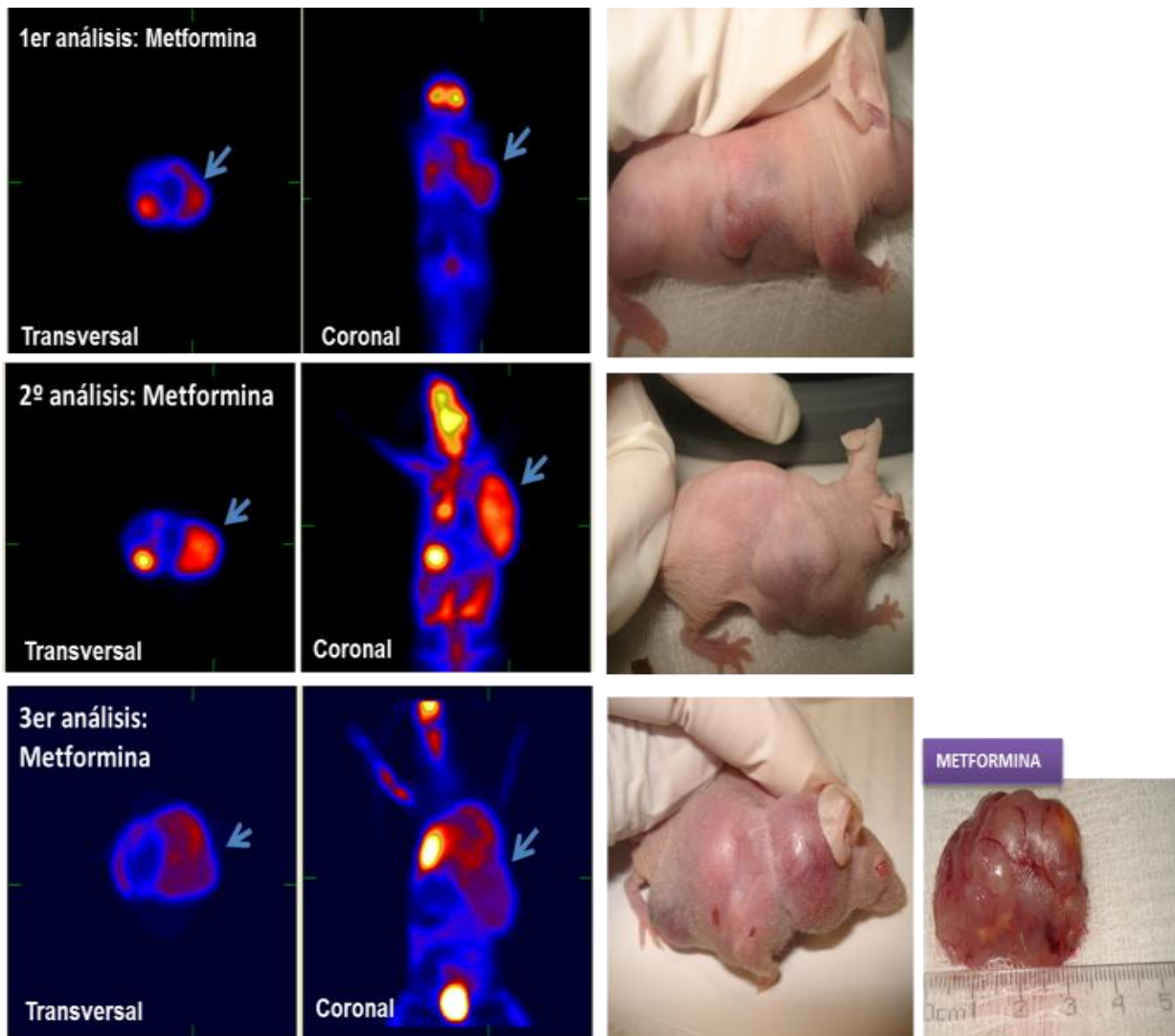


Figura 20 c. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral del grupo experimental tratado con metformina. Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días. Se observó disminución poco significativa del crecimiento de la masa tumoral con respecto a lo obtenido con doxorubicina y F3. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la FDG es excretada a través de la orina.

d) F3

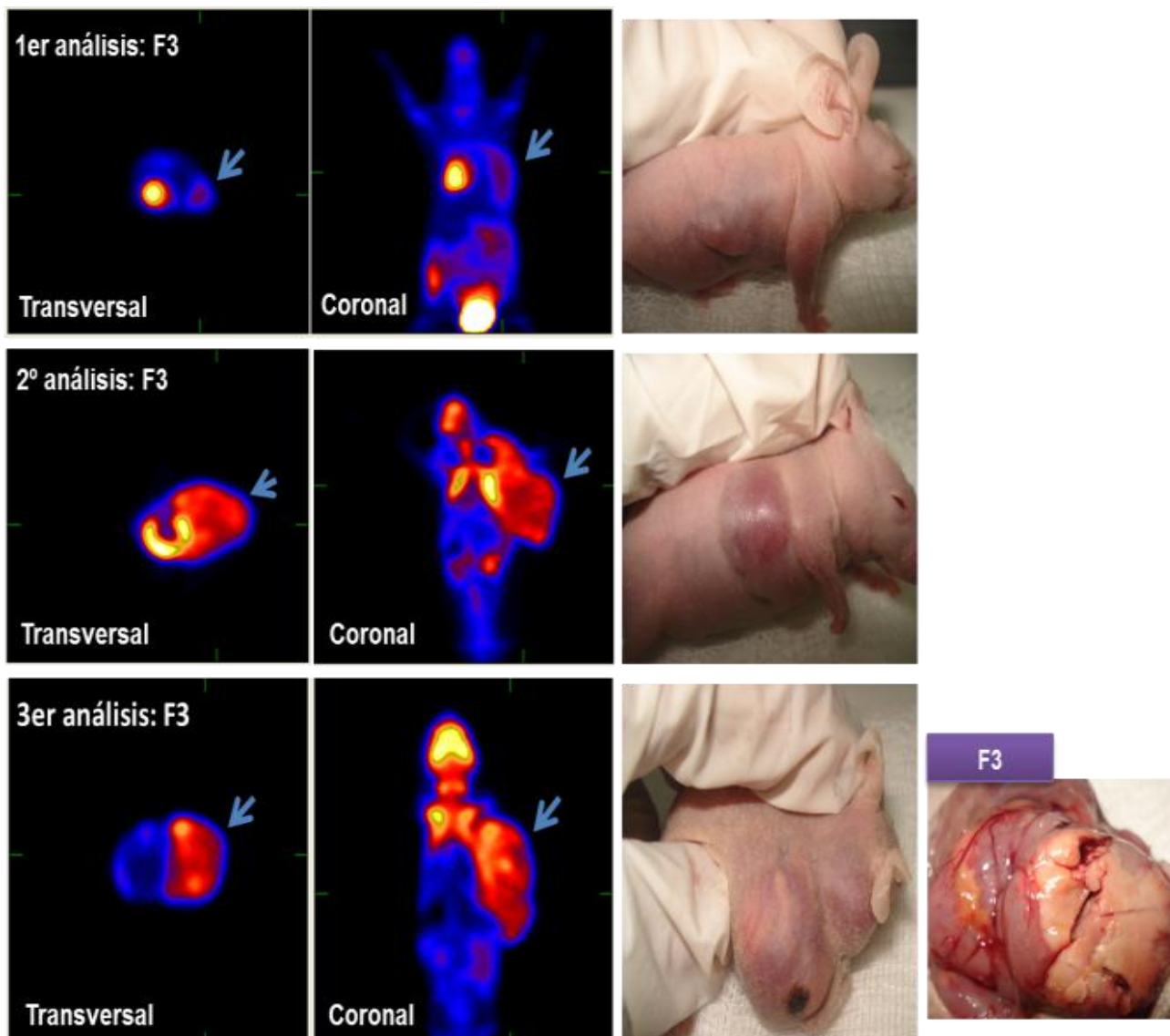


Figura 20 d. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral del grupo experimental tratados con el F3. Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando el radionúclido ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días). Se observó crecimiento significativo de la masa tumoral y presencia de necrosis, lo que refiere la baja efectividad del tratamiento de manera adyuvante. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la FDG es excretada a través de la orina.

Análisis en microPET 18FDG: Tratamientos en sinergia

a) Doxorrubicina/Metformina

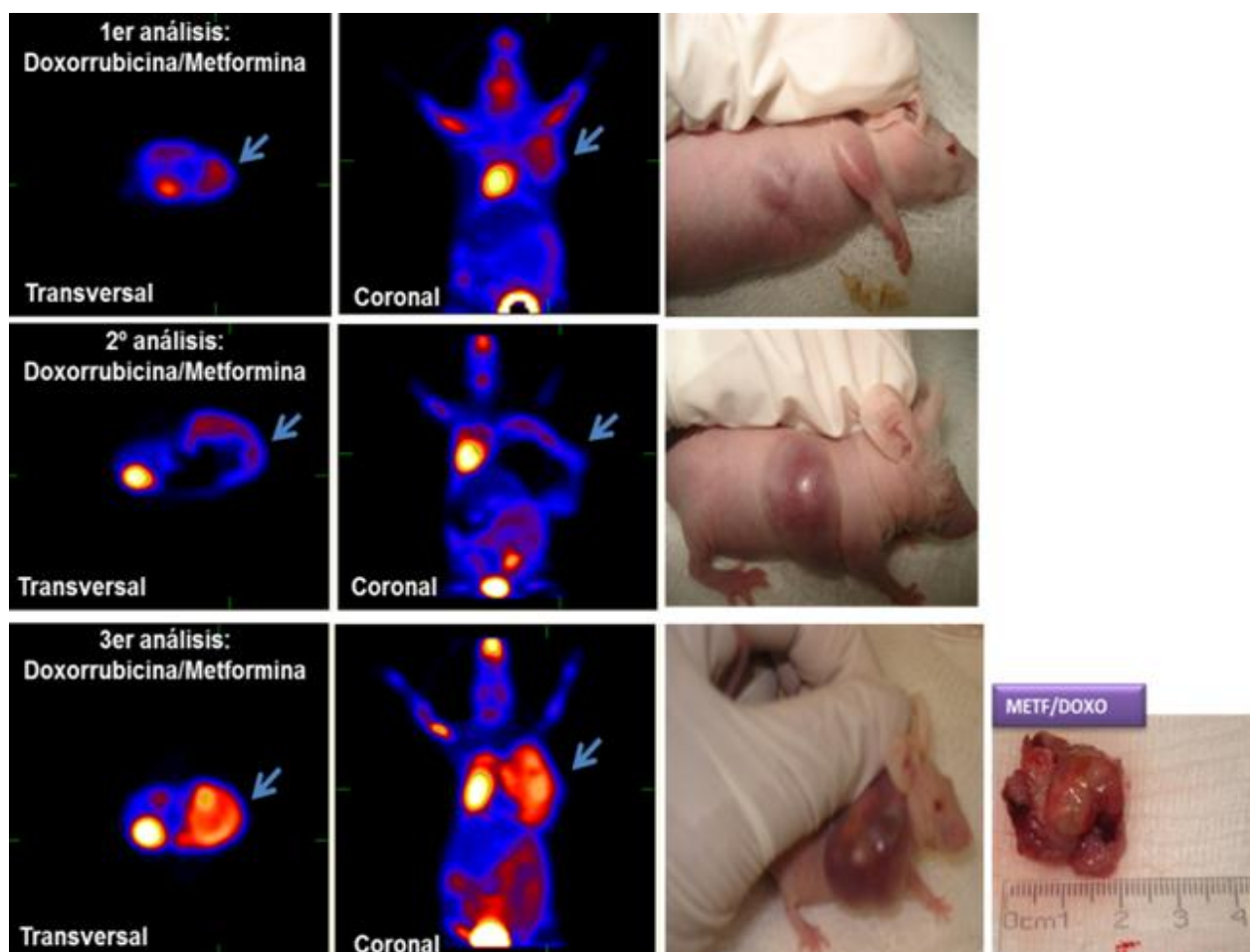


Figura 21 a. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral de los grupos experimentales tratados con los fármacos en sinergia. Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando el radionúclido ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días). a) grupo metformina/F3 se observó crecimiento significativo con respecto a la masa tumoral inicial. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la ^{18}F FDG es excretada a través de la orina.

b) Doxorubicina/F3

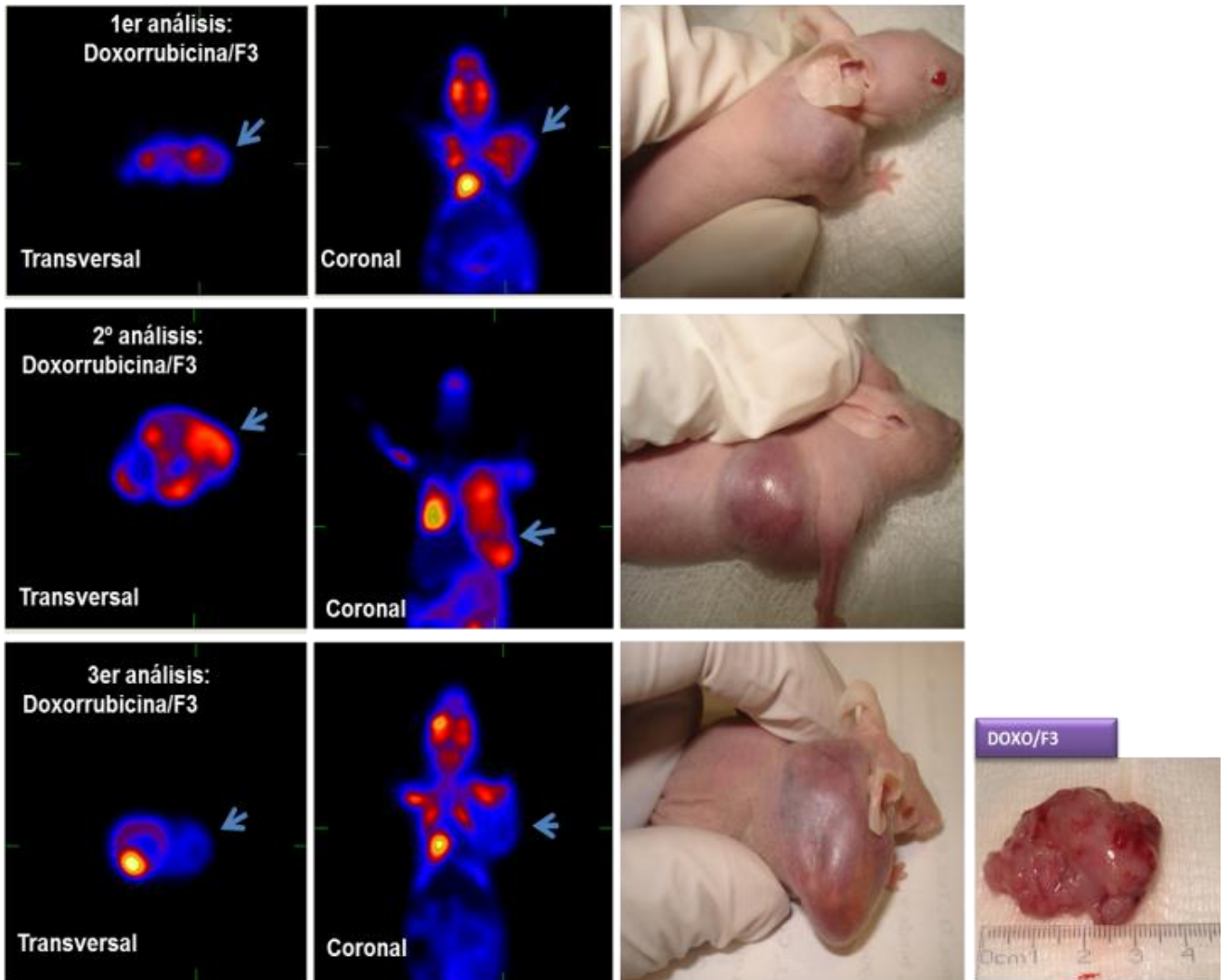


Figura 21 b. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral de los grupos experimentales tratados con los fármacos en sinergia. Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando el radionúclido ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días). b) grupo Doxorubicina/F3 se observó disminución considerable con respecto a la masa tumoral a la mitad del tratamiento. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la ^{18}F FDG es excretada a través de la orina.

c) Metformina/F3

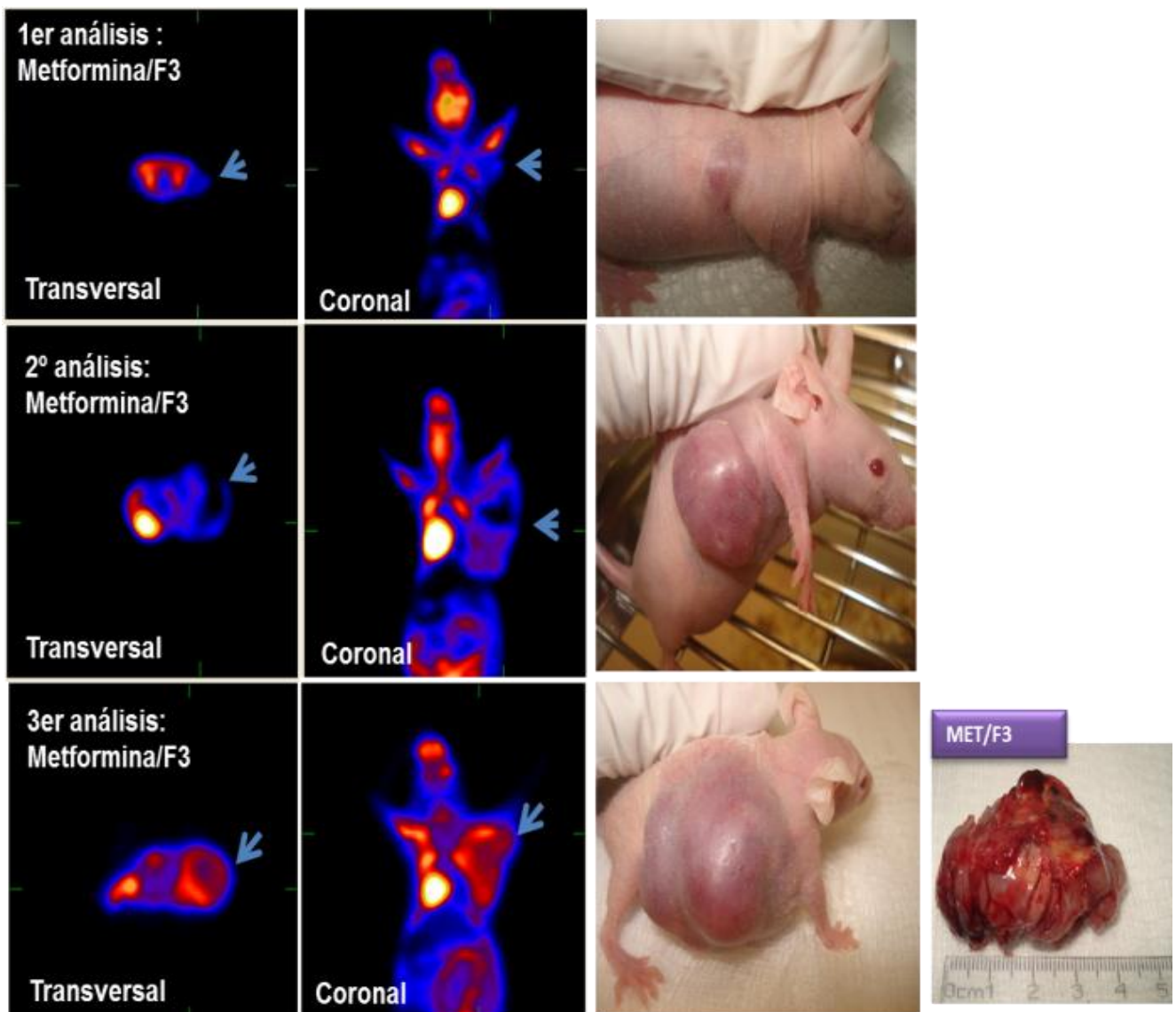


Figura 21 c. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral de los grupos experimentales tratados con los fármacos en sinergia. Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días). c) grupo metformina/F3 se observó crecimiento significativo con respecto a la masa tumoral inicial. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la ^{18}F FDG es excretada a través de la orina.

d) Doxorubicina/Metformina/F3

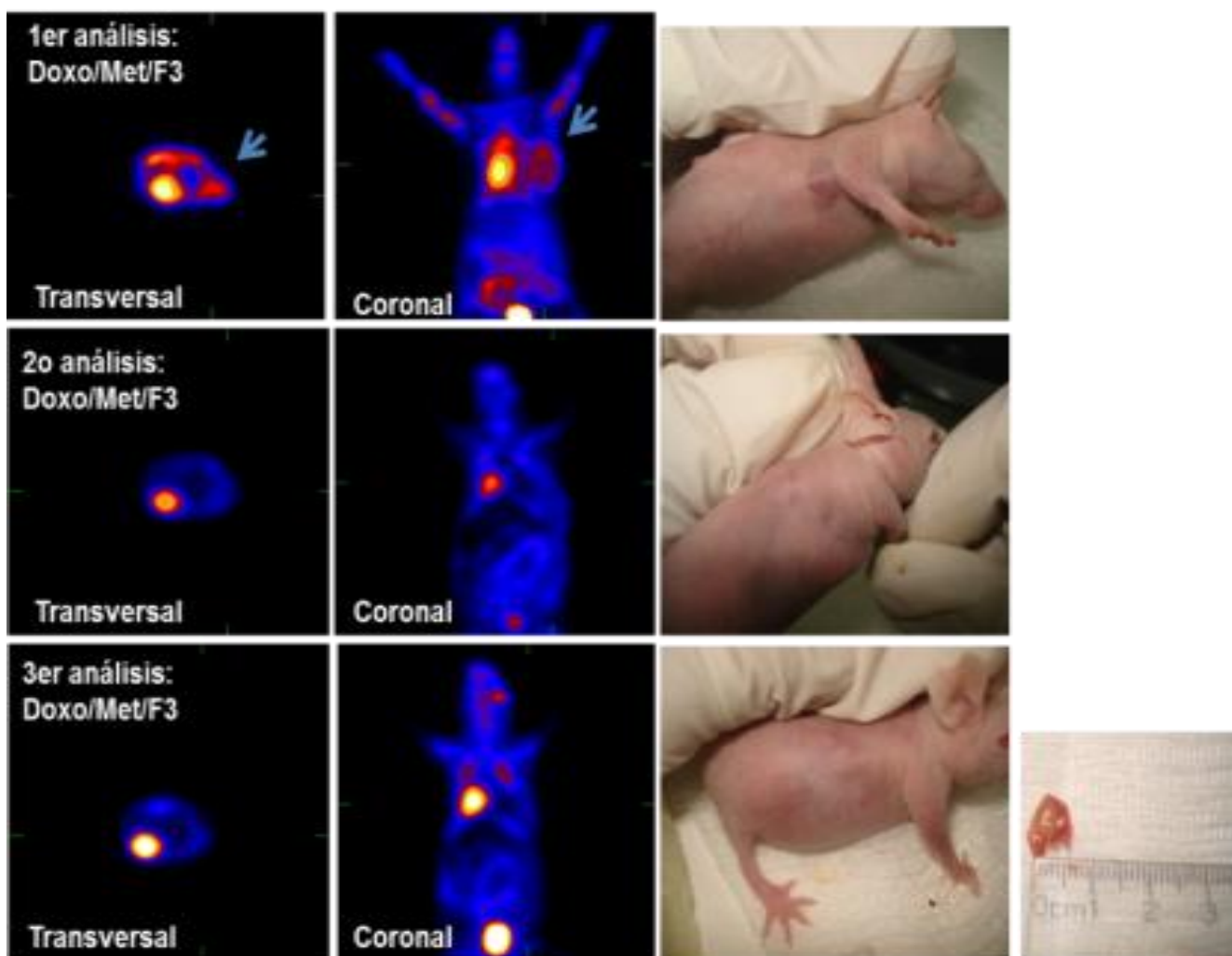


Figura 21 d. Muestra la evaluación del crecimiento tumoral de los grupos experimentales tratados con la estrategia experimental de la combinación de los tres os fármacos. Este análisis se llevó a cabo mediante microPET empleando el radionúclido ^{18}F FDG. El seguimiento de la enfermedad se evaluó mediante 3 análisis (basal, 7 y 15 días). d) grupo doxorubicina/metformina/F3; a partir del 2º análisis (7 días de tratamiento) se observa de manera considerablemente significativa ($***p=0.0005$) la remisión total de masa tumoral, sin observar recurrencia de la enfermedad. A la derecha se muestran los animales que se utilizaron durante los 15 días del seguimiento de este análisis y la masa tumoral extraída al finalizar el estudio. Las flechas indican la zona de mayor captación de la ^{18}F FDG; la cual se biodistribuye en la zona de mayor demanda energética. Por su naturaleza fisiológica, en los órganos corazón y cerebro se observa mayor captación del radionúclido; en la vejiga se observa captación debido a que la ^{18}F FDG es excretada a través de la orina.

a) TRATAMIENTOS INDIVIDUALES

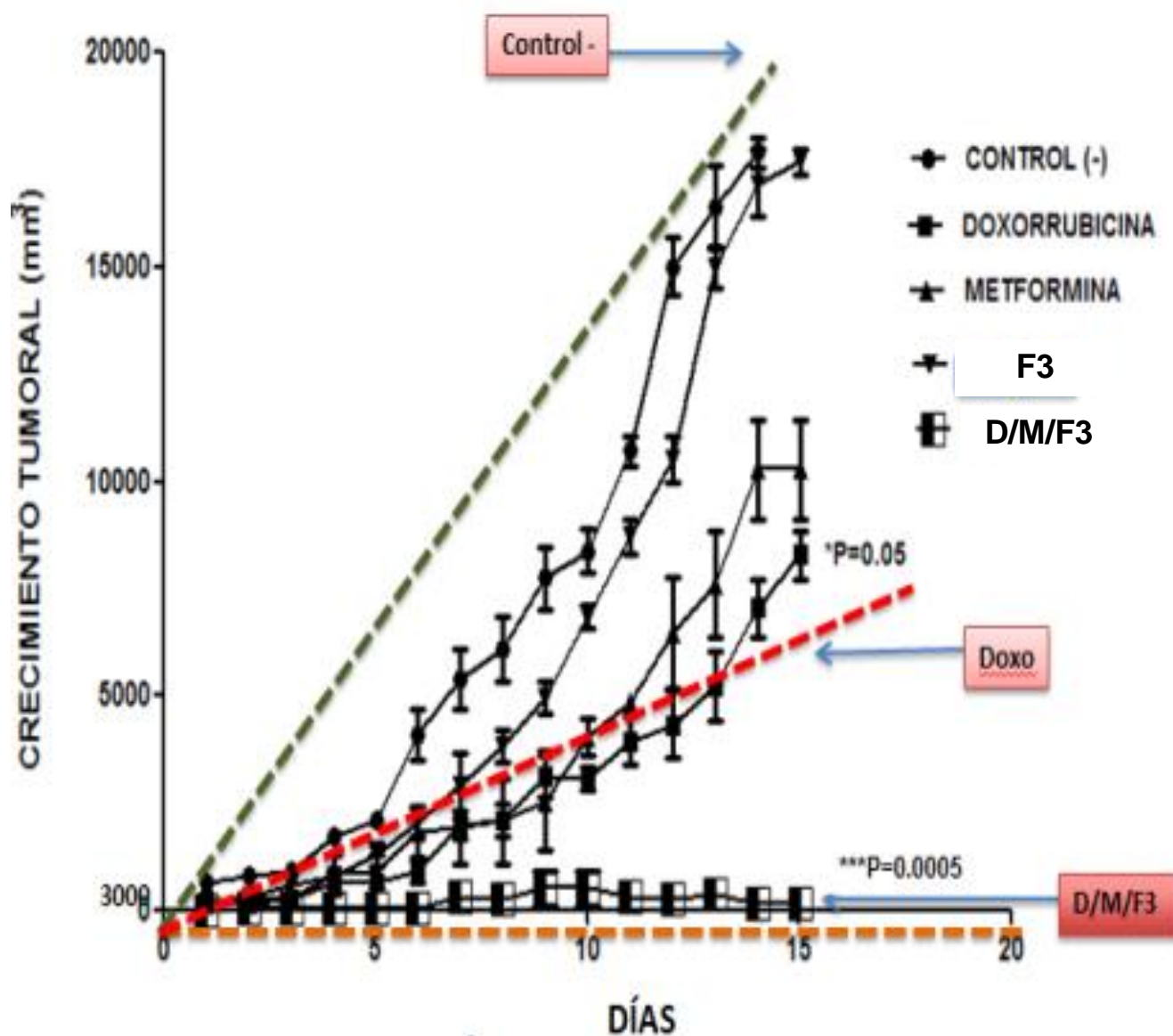


Figura 22a. Curva de inhibición de crecimiento tumoral con los tratamientos individuales durante 15 días de seguimiento de la enfermedad. La gráfica corresponde al crecimiento tumoral con respecto al tiempo, empleando los fármacos individuales; se observa que la doxorubicina remonta su crecimiento al día 8 del tratamiento a pesar de presentar disminución significativa (* $p=0.05$) del crecimiento tumoral con respecto a metformina y F3.

b) TRATAMIENTOS COMBINADOS

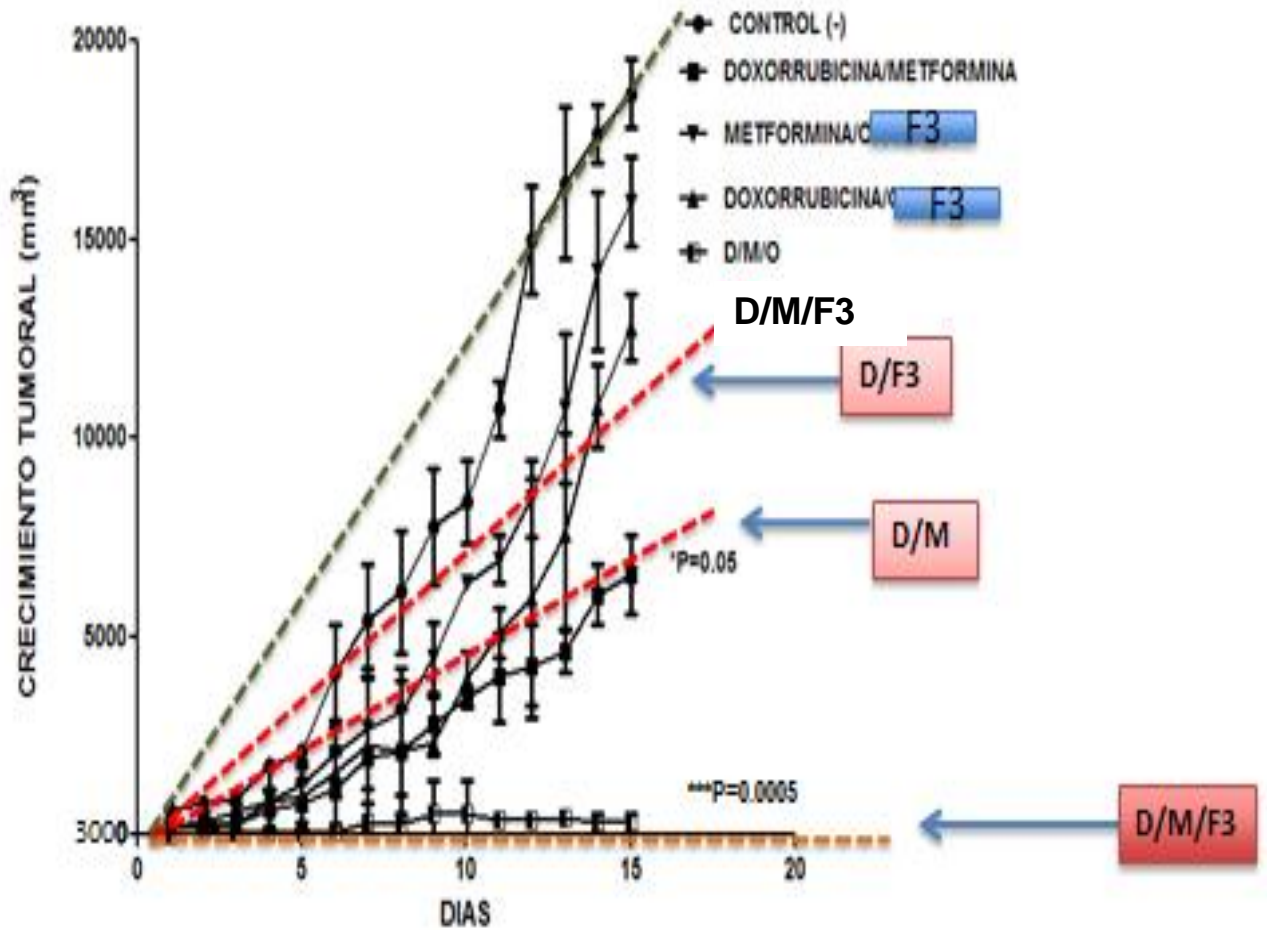


Figura 22b. Curva de inhibición de crecimiento tumoral con los tratamientos en sinergia durante 15 días de seguimiento de la enfermedad. La gráfica corresponde al crecimiento tumoral con respecto al tiempo, empleando los fármacos en sinergia; se observa de manera considerablemente significativa ($***p=0.0005$) que doxorubicina/metformina/F3 induce remisión total del crecimiento tumoral a los 7 días de tratamiento. No se observó recurrencia de la enfermedad al final del estudio.

c) Masas tumorales extraídas al final del tratamiento

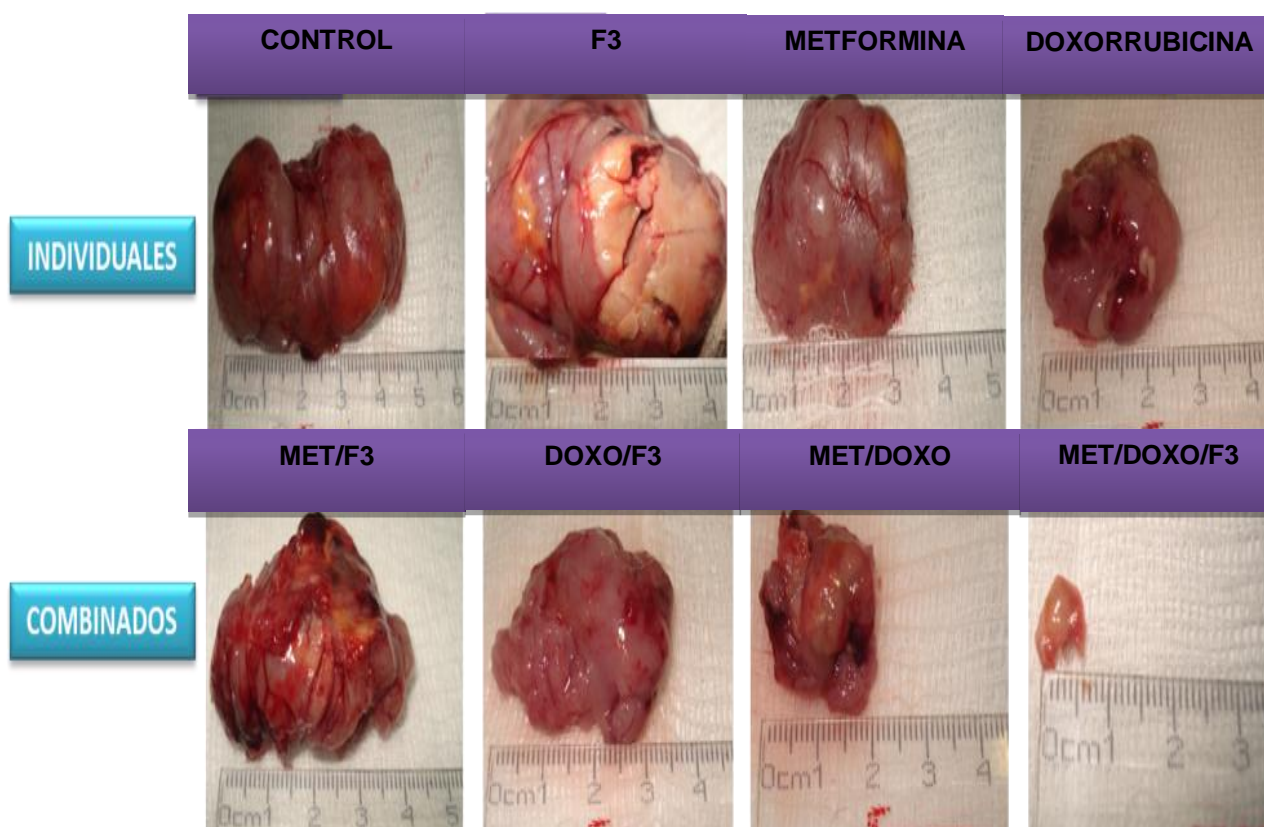


Figura 22c. Extracciones de masas tumorales correspondientes a los animales sometidos al análisis con microPET durante 15 días de tratamiento. En el panel superior se observan los tumores de los grupos tratados con los fármacos individuales. La masa tumoral correspondiente al tratamiento con doxorubicina es de menor tamaño en comparación con el control (-), metformina y F3. En el panel inferior se observan los tumores correspondientes a los grupos experimentales tratados con las terapias coadyuvantes. Se observa que el tumor correspondiente a la terapia metformina/doxorubicina es de menor tamaño con respecto a metformina/F3 y doxorubicina/F3; mientras que, de manera importante el tejido extraído de doxorubicina/metformina/F3 es significativamente menor a diferencia de todos los grupos experimentales. El tejido obtenido de doxorubicina/metformina/F3 no muestra características propias de masa tumoral, tal y como se observa en las terapias individuales y en sinergia

9.5. Evaluación del estado morfológico de los xenotransplantes mediante cortes histológicos

Con el objetivo de conocer si los fármacos provocaban cambios histológicos en la masa tumoral, se llevaron a cabo tinciones mediante el protocolo de ematosilina-eosina en muestras del control negativo, positivo y del complejo doxorubicina/metformina/F3. En la **Figura 23 a y b** se muestran los cortes histológicos del control negativo y control (+) doxorubicina, respectivamente; después de 15 días de tratamiento en ambos grupos se observan células de aspecto irregular, núcleos grandes y difusos. Las células presentan una evidente pérdida de la integridad o deformación de la membrana plasmática y una pérdida de adhesión célula-célula; se observan espacios infiltrados lo que sugiere un estadio avanzado de la enfermedad. Dichos cambios morfológicos son más prominentes en el grupo control negativo que en el grupo tratado con doxorubicina. Con base en lo anterior podemos observar el bajo efecto terapéutico que doxorubicina ejerció en este grupo experimental en los 15 días de tratamiento en comparación con la combinación de los tres fármacos. En la **Figura 23c** se observan escasas células dispuestas de forma aislada con una morfología que sugiere muerte por apoptosis, lo que se debería al probable efecto de la sinergia de los tres fármacos.

Histología de xenotransplantes

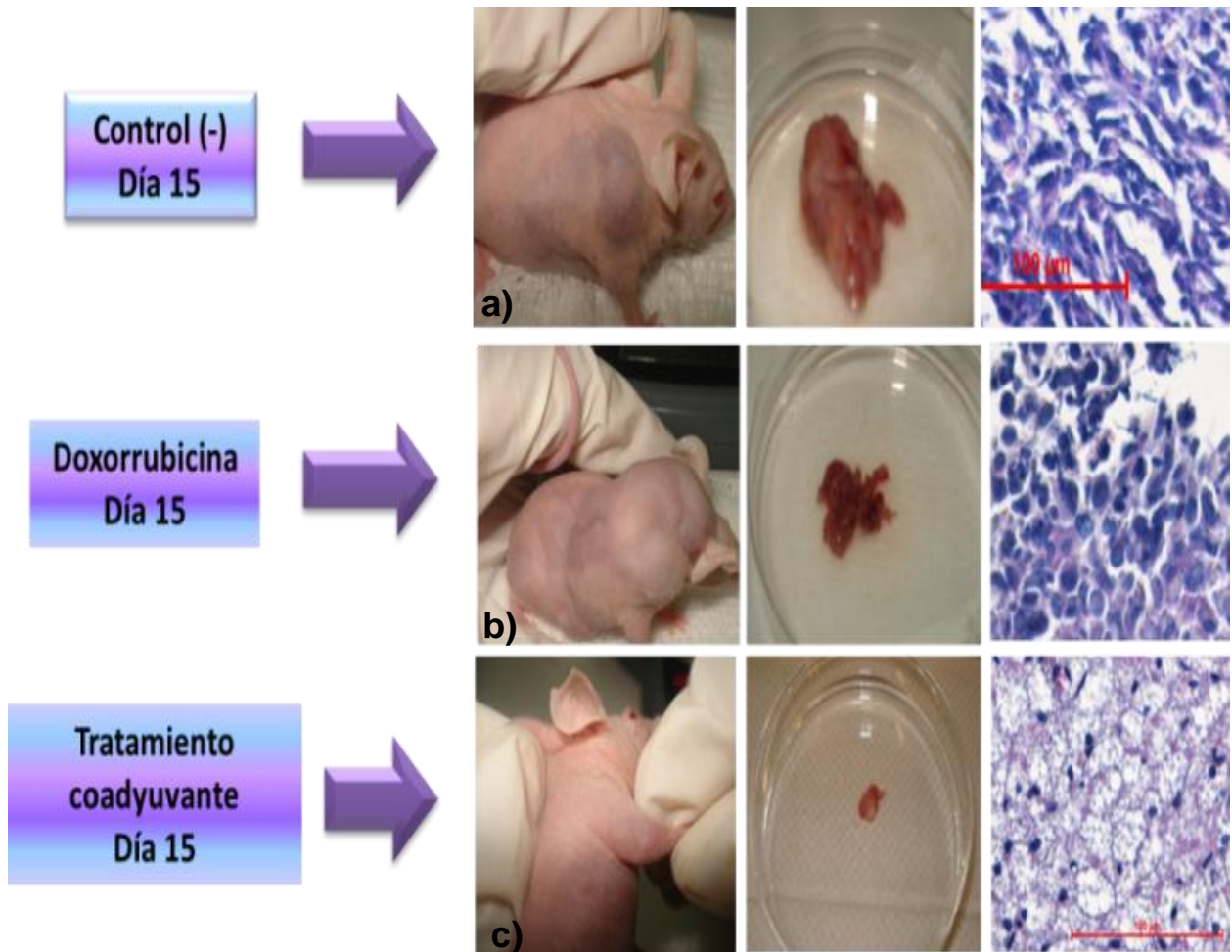


Figura 23. Corte histológico de grupo control (-), (+) y doxorubicina/metformina/F3. En (a y b) se observan células de aspecto irregular: núcleos grandes y difusos; espacios infiltrados, pérdida de la integridad o deformación de la membrana plasmática y pérdida de adhesión célula-célula. Todas estas características nos sugieren un estadio avanzado de la enfermedad. c) La estrategia experimental doxorubicina/metformina/F3, muestra células dispuestas de forma aislada lo que sugiere un tipo de muerte inducida por necrosis.

10. DISCUSIÓN

Con base en los avances conceptuales en la última década Hanahan y Weinberg en el 2011 añadieron dos “*hallmarks*” o marcas biológicas emergentes a la lista de los 8 ya existentes: la evasión en los procesos de destrucción del sistema inmune y la reprogramación del metabolismo energético de la célula tumoral. (Pérez-Plasencia y Dueñas-González, 2006). Sin embargo, el conocimiento de la biología celular y molecular de las células tumorales ha cambiado significativamente. A pesar de que el descubrimiento se estableció hace casi un siglo por Otto Warburg en 1923, recientemente su trabajo ha sido recuperado, donde se postula que el cáncer puede ser visto desde la perspectiva de una enfermedad con aberraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa (García, 2010). En general se ha observado que la mayoría de las células tumorales presentan un metabolismo significativamente alterado; esto significa que su tasa glicolítica es mucho mayor que el de sus contrapartes normales, permitiendo a estas células mantener altas sus tasas proliferativas resistiendo a las señales de muerte celular, lo que les permite cumplir con dos objetivos: proliferar y mantener una fuente constante de energía (Vander *et al*; 2009). Este incremento en la tasa proliferativa de la célula tumoral, exige incrementar su masa celular así como duplicar su DNA. En ambos procesos se requiere sintetizar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, así como energía en forma de ATP (Hanahan y Weinberg, 2011). Diversos estudios demuestran que el resultado de esta aberración metabólica, es la sobreexpresión de genes que codifican para las enzimas que intervienen en ésta ruta metabólica tales como la LDH y G3PDH. Además, este efecto ha sido directamente relacionado con la activación de oncogenes tales como MYC, Ras y Akt y la pérdida de

genes supresores de tumores los cuales conllevan a una desregulación de la conversión de piruvato a lactato (Lee *et al*; 2010). Por todo lo anterior, la inhibición del metabolismo de la célula tumoral actualmente se conceptualiza y se propone como un blanco terapéutico prometedor para el tratamiento de esta enfermedad.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la doxorrubicina *in vitro* no induce la muerte celular por apoptosis, sino por necrosis, el cual probablemente se debe a la fragmentación del DNA sobre la línea celular, induciendo mínimamente muerte por apoptosis, caso contrario observamos de manera considerablemente significativa inducción de muerte por necrosis probablemente mediante la fragmentación del DNA sobre la línea celular (figura 17a) En los ensayos de citotoxicidad y valoración morfológica, la doxorrubicina inhibió la proliferación celular en un 95%. Dicho fenómeno se corroboró por medio de Anexina V/IP, en donde el fármaco fue evaluado en tres tiempos diferentes (24, 48 y 72 horas) (Figura 17a). En las primeras 24 horas de tratamiento, la doxorrubicina indujo principalmente, muerte por necrosis; tal efecto fue en aumento en las siguientes 72 horas de tratamiento. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de SFR-B; donde el efecto sobre la inhibición del 50% de la proliferación celular permaneció relativamente constante, lo cual sugiere que las células desarrollaron cierta resistencia al fármaco a esta concentración. La valoración morfológica correspondiente a doxorrubicina, a 5 μ M las células tratadas comienzan a presentar cambios morfológicos desde las primeras 4 horas de tratamiento; mostrando cambios característicos de muerte por necrosis al final del periodo de tratamiento (72 horas) en comparación con las células control negativo y metformina. Los resultados anteriores confirman que el tipo de muerte inducido por la doxorrubicina en la línea celular MDA-MB-231 es por necrosis, a tiempos

cortos de exposición y dosis bajas, su acción es dosis y tiempo dependientes. Dichos resultados concuerdan con el trabajo de Ghebeh *et al*; 2010 en líneas celulares MDA-MB-231, T47D y SKBR3. Los autores, observaron una inhibición de la proliferación celular en tiempos cortos y baja dosis y la inducción del 90% de muerte por necrosis a las 72 horas a una concentración de doxorubicina de 0.4 μ M. En el trabajo citado, los autores concluyeron que dentro de las drogas quimioterapéuticas disponibles hoy en día, la doxorubicina es uno de los fármacos más efectivos, la cual actúa por toxicidad directa sobre la célula.

Por otra parte, en cuanto al efecto de doxorubicina en el modelo en ratones, su efectividad es baja. Sin embargo, es superior en comparación al efecto de la metformina y el F3. A pesar de la efectividad que la doxorubicina mostró al inhibir el crecimiento tumoral a los 8 días de tratamiento, a partir del día 10 la masa tumoral reinició su crecimiento (Figura 22a). Dicho evento es confirmatorio a los resultados de toxicidad (Figura 16a) y citometría de flujo (Figura 17a), lo que nos hace suponer que probablemente las células desarrollaron cierta quimioresistencia al fármaco a la mitad del periodo de tratamiento y por lo tanto hubo recurrencia de enfermedad. Estudios demuestran que doxorubicina también puede inducir muerte por autofagia debido al estrés genotóxico que ocasiona, ya que promueve la hiperactivación de (poli-ADP-ribosa) polimerasa-1, (por sus siglas en inglés, PARP) una importante enzima nuclear que promueve la inducción de otro tipo de muerte celular como la autofagia lo que a su vez agota los niveles de NAD^+ y ATP conllevando a la célula a experimentar irreversiblemente un fallo de energía resultando en la muerte celular. Lo anterior se encuentra referenciado en estudios realizados en células deficientes de PARP-1 aun en concentraciones altas de doxorubicina fueron incapaces de inducir muerte celular.

La forma específica de muerte celular que doxorubicina induzca sobre el sistema biológico (apoptosis, autofagia o necrosis) varía dependiendo de las concentraciones del fármaco. Lo anterior sustenta que a pesar de la eficacia que se observó en nuestros resultados *in vitro*; *in vivo* no se obtuvo una respuesta eficiente de doxorubicina, probablemente a que *in vivo* se requiera emplear dosis más altas para demostrar su efectividad en la disminución de la masa tumoral, a pesar de la toxicidad que este fármaco pueda ejercer en los animales.

Con respecto al F3 (Draouil y Feron, 2011) *in vitro*, su IC₅₀ se encontró a tiempos más largos (48 horas) y concentraciones relativamente bajas (15 mM), a diferencia de doxorubicina y metformina. Este resultado coincide con lo que se obtuvo en citometría de flujo: el F3 ejerce un efecto significativo (*p=0.05) a las 48 horas de tratamiento, al inducir principalmente muerte celular por necrosis (23%), e incrementando este valor transcurridas 72 horas de tratamiento (Figura 17c). Por el contrario, el efecto proapoptótico fue de 18% total, después de 72 horas de exposición. En los estudios de valoración morfológica, el F3 a 15 mM, indujo cambios evidentes en la morfología de las células después de 24 horas de tratamiento, causando muerte por necrosis (Figura (Figura 19c). Al término de las 72 horas de exposición al fármaco, se presentaron, principalmente, características de muerte por necrosis, en comparación con las células control negativo y metformina. El efecto del F3 en los ensayos *in vitro*, puede explicarse por su acción en la disminución en la síntesis o sobreexpresión de la LDH-A, lo que produce una reducción del flujo glicolítico y por tanto a una disminución o inhibición de la síntesis del oncogen c-myc, el cual juega un papel fundamental en el crecimiento y la proliferación de las células tumorales en el paso de la fase G0/G1 (Ward *et al*; 2012). Así mismo se infiere que hubo una disminución o inhibición del HIF-

1, provocando la disminución o inhibición de la sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas que participan en la glicolisis, incluyendo la LDH-A la cual convierte el piruvato a lactato con el reciclaje de NAD^+ (Thornburg *et al*; 2008). Por otro lado, en cuanto al efecto proapoptótico del F3, éste puede ser debido a una reducción de la LDHA, lo que causó estrés bioenergético y oxidativo, y que condujo a la muerte de la célula tumoral por apoptosis.

El F3 es un potente inhibidor de la LDHA en lo que a esta línea respecta. En otro estudio, se determinó mediante siRNAs el mecanismo de la muerte celular mediante la reducción de la expresión de la LDHA en células cancerígenas linfoides (P493) empleando el F3 (Lee *et al*; 2010). Así mismo observaron un aumento en el consumo de oxígeno, por lo que concluyeron que el F3 promueve la entrada de piruvato a la mitocondria mediante fosforilación oxidativa, lo que conlleva a una disminución de la LDHA y por tanto a la muerte de las células cancerígenas. Nuestros resultados demuestran que a dosis más bajas (5 y 10 mM) y tiempos cortos: 4 y 24 horas, no se observan diferencias significativas en la inhibición de la proliferación celular, por el contrario a dosis más altas (20, 25 y 30 mM) y tiempos largos: 48 y 72 horas, se induce un efecto potencialmente tóxico sobre la línea celular. Lo anterior se sustenta con un estudio realizado igualmente por Lee *et al*; 2010 con la línea celular P493, donde observaron mediante citometría de flujo con ANEXINA V, que la adición diaria (cada 24 horas) del F3 de 5mM hasta 20mM durante 72 horas induce muerte por necrosis.

Actualmente, diversos estudios *in vivo* han documentado que la disminución de la síntesis de la LDHA retrasa el desarrollo del tumor, indicando que la LDHA es

importante para la iniciación del tumor (Lee *et al*; 2010). El efecto del F3 en los animales no fue significativo en comparación a la doxorubicina y metformina. El crecimiento de la masa tumoral del grupo tratado por 15 días con el F3 fue en aumento del día 0 al 15; de una masa inicial del xenotransplante de 3 mm³, al final del tratamiento se observó un patrón de crecimiento descontrolado de la masa tumoral similar al control negativo con un volumen de 32.83 mm³. De manera particular, en este grupo experimental, los animales desarrollaron necrosis en el sitio de inoculación al finalizar el tratamiento, esta reacción probablemente sea una característica particular del F3 debido a su prolongado tiempo de exposición en los animales. Lo anterior muestra la baja eficacia del fármaco de manera individual al no presentar una disminución considerable de la masa tumoral. Los resultados anteriores son comparables con el trabajo de Thornburg *et al*; 2008, ya que sus resultados *in vivo* mostraron que en ratones BALB/c tratados con el F3 con una dosis de 15 mg/Kg no se observó una disminución significativa del xenotrasplante a los 40 días de tratamiento, sin embargo, aumentando la dosis a 120 mg/Kg, observaron una reducción considerable del xenotransplante. Probablemente en nuestros resultados no hubo una respuesta favorable al F3 debido a la dosis utilizada. Sin embargo, de acuerdo a la literatura, la inhibición de la LDHA es un importante blanco terapéutico para la supresión de tumores, siendo el F3 una excelente opción para la regulación del flujo glicolítico en la conversión del piruvato a lactato (Draouil y Feron, 2011).

El último fármaco evaluado fue la metformina, el cual es empleado a nivel mundial para el tratamiento de pacientes con DMT2. Su principal mecanismo de acción consiste en disminuir la secreción de glucosa del tejido hepático e incrementar la glucólisis intestinal, así como disminuir la resistencia a la insulina (Bailey y Turner,

1996). Existe una diversidad de publicaciones relevantes de estudios en animales y humanos que demuestran el efecto antineoplásico de la Metformina, incluyendo la inhibición de la proliferación e inducción de muerte celular (Lee *et al*; 2010). Se ha documentado ampliamente que los pacientes diabéticos son susceptibles de padecer cáncer debido a las altas concentraciones de glucosa sistémica que presenta; sin embargo, se ha demostrado que los pacientes diabéticos tratados con metformina, tienen incidencia reducida y menores probabilidades de padecer cáncer a diferencia de los que no son tratados con ella (Hirsch *et al*; 2009). En nuestro trabajo, encontramos que la metformina tiene un IC_{50} en la línea celular MDA-MB-231 a una concentración de 25 mM a las 24 horas. El efecto sobre la inhibición de la proliferación celular se mantiene relativamente constante en las siguientes horas de tratamiento (48 y 72 horas), sin observar una disminución significativa de muerte celular a dosis más altas (40 mM), en periodos largos de tiempo (72 horas), a diferencia del comportamiento de la doxorrubicina y el F3. Por otra parte los ensayos por citometria de flujo concuerdan con las pruebas de toxicidad (SFR-B), observando de manera significativa que a las 24 horas se obtuvo un %15 de células marcadas con Anexina lo que refiere muerte celular por apoptosis. Este efecto fue en aumento en las siguientes horas, llegando a un total de un 75% de apoptosis al final del tratamiento (72 horas). El efecto de la metformina en la inducción de muerte por necrosis fue inversamente proporcional a lo obtenido por apoptosis, debido a su bajo potencial tóxico aún a altas concentraciones y largos periodos de tiempo de incubación (72 horas). Nuevamente, nuestros resultados demuestran la inocuidad de la metformina en comparación con doxorrubicina y el F3. En los resultados de valoración morfológica, las células expuestas a una concentración de 25 mM de metformina, a partir de las 4 horas de incubación existe la presencia de

evaginaciones en su membrana plasmática, lo que refiere a la exposición de los fosfolípidos al exterior de la membrana, agrandamiento nuclear y una consecuente reducción del volumen citoplasmático. Estos resultados son similares a lo reportado por Zhuang y Miskimins, (2011) en la línea celular MDA-MB-231, correspondientes a muerte por apoptosis. Cabe mencionar que en nuestros resultados, estos cambios fueron más evidentes al final del periodo de tratamiento (72 horas). La inhibición de la proliferación y crecimiento celular por parte de la metformina, se debe a su capacidad de inhibición de la vía mTOR. La privación de nutrientes inducida por la metformina, provoca una disminución de los niveles de ATP, lo que conduce a la activación del sensor energético AMPK; esta cinasa al detectar esta baja energética activó río abajo la cascada de señalización para inhibir la actividad de mTOR, particularmente el complejo mTORC1. De manera directa, esta cascada promueve a la inhibición del complejo eIF4E, el cual es requerido para la eficiente transcripción de los RNAs de genes que sintetizan las proteínas que participan en la glicólisis y otros tipos de proteínas (Dowling *et al*; 2011). Por tanto la bioenergética de la célula tumoral se ve comprometida, inhibiendo los procesos de biogénesis que ésta requiere para obtener la biomasa necesaria y, así cumplir con funciones como: proliferación constante y el mantenimiento de una fuente de energía disponible para su crecimiento; al ser inhibidos estos procesos de vital importancia en la célula tumoral inevitablemente la célula muere.

Otro mecanismo de acción de la metformina es su asociación a mitogénesis, es decir, la disminución de ciclina D1, dicho fenómeno conlleva al arresto del ciclo celular en la fase G1, lo anterior también como consecuencia de la activación de AMPK

(Alimova *et al*; 2009). Dichos procesos vinculados a la metformina, pueden explicar el efecto proapoptótico encontrados en las evaluaciones *in vitro*.

Sin embargo, a pesar de la alta efectividad que la metformina demostró en los ensayos *in vitro*, hubo un efecto contrario *in vivo*. De acuerdo con la gráfica de crecimiento tumoral, podemos observar que los resultados *in vivo* (22a) sustentan de manera poco significativa la inhibición del crecimiento de los xenotransplantes por metformina en comparación a la doxorubicina, pero a diferencia de ésta, no se observó recurrencia de la enfermedad. En nuestro estudio, la metformina demostró baja eficiencia en la disminución de la masa tumoral a largo plazo (Figura 22a); probablemente se requieran de dosis mucho más altas y tiempos más prolongados para un efecto inhibitorio. Zhuang y Mismkimins, (2011) reportaron que en modelos *in vivo* de cáncer de mama con ratas, la metformina a dosis de 200 y 400 mg/Kg no produce efectos significativos sobre la reducción tumoral, y que, por el contrario, después de cierto tiempo, hay un incremento de la masa tumoral, seguramente debido al desarrollo de quimioresistencia. Los mecanismos mediante los cuales la metformina no produce efectos inhibitorios sobre el crecimiento tumoral no se conocen con exactitud, sin embargo, se cree que su ineffectividad se debe a efectos indirectos sobre los niveles sistémicos de insulina o glucosa o, a través de efectos directos sobre el crecimiento celular y sobrevivencia (Dowling *et al*; 2011). De manera contraria Liu *et al*; 2009, demostraron en ratones atímicos xenotransplantados con 5×10^6 células tumorales MDA-MB-231, que con una dosis de 2 mg/Kg vía i.p y 2 mg/ml vía oral de metformina, hubo inhibición y prevención de manera significativa del crecimiento tumoral (*p=0.01) a los 60 días de tratamiento. Así mismo, Iliopolous *et al*; 2011, encontraron en xenotransplante en ratón atímico con la misma línea celular, que

aquellos animales tratados con la metformina a una dosis de 20 mg/Kg de metformina vía i.p y 20 mg/mL vía oral, tenían una disminución de la masa tumoral a los 45 días de tratamiento. De manera importante, cabe destacar que en los trabajos previamente citados utilizaron dos vías de administración y la dosis que emplearon, es mucho menor a la nuestra, no obstante, observaron un efecto significativo en la reducción de la masa tumoral. En el grupo experimental tratado con metformina, encontramos un patrón de crecimiento similar a doxorubicina, es por ello que no descartamos el potencial inhibitorio de la metformina.

En lo que se refiere a los grupos tratados con terapia coadyuvante (Figura 26b), observamos que en aquellas combinaciones con el F3, no hubo respuesta favorable en cuanto a la reducción de la masa tumoral o proliferación celular.

Los resultados de citometría de flujo, en la combinación metformina/F3 refieren de manera significativa, inducción de muerte por necrosis; este efecto fue en aumento al inducir un total del 80% de células en necrosis a las 72 horas y 19% de apoptosis. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de SFR-B, donde se observa que la combinación de metformina/F3 a dosis más altas y tiempos largos induce una inhibición significativa de la proliferación de la línea celular. En cuanto al cambio morfológico, según nuestras observaciones, hubo efecto tóxico de la terapia metformina/F3 en los 4 tiempos de incubación, con una significativa pérdida del volumen citoplasmático y de la interacción célula-célula, hasta mostrar cambios característicos de muerte por necrosis, este efecto se hizo más prominente al final del periodo de tratamiento (72 horas) en comparación con las células control negativo (Figura 19f). Lo anterior nos permite inferir que esta sinergia no está ejerciendo su

acción al actuar sobre sus blancos terapéuticos, sino que por el contrario, muestra citotoxicidad, manteniéndola en un ambiente agresivo que la conlleva a sufrir muerte por necrosis.

La ineficacia de esta terapia se demostró en los ensayos *in vivo* al observar una vez más la baja efectividad de terapia coadyuvante (metformina/F3) sobre los animales de este grupo experimental, en comparación con los grupos conformados por doxorrubicina/metformina, doxorrubicina/F3 y doxorrubicina/metformina/F3 al finalizar el tratamiento (Figura 22b). Los resultados obtenidos en este proyecto de tesis con esta sinergia, no pueden ser sustentados bibliográficamente ya que hasta el momento no se encuentran referenciados estudios que demuestren científicamente el uso de esta terapia *in vitro* e *in vivo* y mucho menos en humanos para comprobar su efecto eficiente y/o ineficiente. Con base en los resultados podemos decir que a pesar del alto potencial sobre la inhibición de la proliferación celular que se le atribuye a metformina, en esta sinergia con el F3 suprime su efectividad al observar que no demuestra de manera efectiva su potencial, sin embargo, probablemente la metformina logra atenuar el efecto citotóxico del F3, en comparación con su acción individual. De igual modo, aunque se encuentra referenciado que el F3 es un potente inhibidor de la LDHA observamos que en combinación con metformina se suprime el efecto inhibidor sobre la línea celular y sobre la disminución del crecimiento tumoral.

En este trabajo, encontramos que la combinación doxorrubicina/F3 no muestra un efecto significativo sobre la inhibición de la proliferación celular en la línea celular MDA-MB-231 en el primer tiempo de incubación (24 horas); su IC_{50} se obtuvo a las 48 horas, sin embargo se observó a las 72 horas una considerable inhibición de la

proliferación celular lo que probablemente refiere que a tiempos más prolongados induce de manera importante muerte celular por toxicidad debido a la combinación con doxorubicina. Los resultados de citometría de flujo indican un 19% de necrosis en las primeras 24 horas; este efecto fue en aumento al mostrar un total de 67% después de 72 horas, mientras que las células que murieron por apoptosis fueron de 9% y 33% después de 24 y 72 horas, respectivamente. Estos resultados son reforzados por los obtenidos en SFR-B en los que se observó que a dosis más altas y tiempos largos induce una inhibición significativa de proliferación, siendo una combinación altamente tóxica. En los resultados de valoración morfológica, se puede observar en el panel correspondiente a doxorubicina/F3 en los 4 periodos de tratamiento (Figura 19e). Las células comienzan a presentar, de manera significativa, cambios estructurales como pérdida del volumen citoplasmático y de la interacción célula-célula, hasta mostrar cambios característicos de muerte por necrosis. La ineficacia de esta terapia en la inhibición del crecimiento de los xenotransplantes, se demostró en los ensayos *in vivo* al observar la baja efectividad de doxorubicina/F3. El crecimiento de la masa tumoral del grupo tratado por 15 días con doxorubicina/F3 fue relativamente en aumento del día 0 al 15, iniciando con un volumen de 3 mm³ hasta alcanzar 11.3 mm³ al término del tratamiento. De manera particular se puede observar que no se generó crecimiento descontrolado del tumor en comparación con lo que se obtuvo en la terapia metformina/F3, lo anterior probablemente se deba a que la doxorubicina potenció su efecto en combinación con el F3. De igual manera que con metformina/F3, los resultados anteriores no pueden ser sustentados bibliográficamente ya que hasta el momento no se encuentran referenciados estudios que demuestren científicamente *in*

vitro, *in vivo* y en humanos la eficacia de esta terapia. Con base en los resultados, el F3 no incrementa significativamente la acción de la doxorubicina en células tumorales.

De manera importante, la terapia coadyuvante con los fármacos de primera línea para el tratamiento de cáncer de mama y DMT2: (doxorubicina/metformina) muestra un comportamiento efectivo sobre la inhibición de la proliferación celular en los ensayos *in vitro* e *in vivo* en comparación con el control negativo, doxorubicina/F3 y metformina/F3 (Figuras 16d-f; 17d-f; 19d-f; 21a-c y 22b-c). No obstante las células desarrollaron quimioresistencia a esta combinación farmacológica. Este fenómeno de resistencia puede ser atribuido a la doxorubicina, debido a que de manera adyuvante ejerció resistencia en los cuatro tiempos de tratamiento a 5 μ M; en el caso de dosis más altas y tiempos prolongados se observa una significativa inhibición de la proliferación celular; probablemente el responsable de este efecto potencial se deba a la presencia de la doxorubicina. En lo que refiere al tipo de muerte que se indujo con esta terapia coadyuvante, los resultados de citometría de flujo refieren de manera significativa que induce 10% de muerte por apoptosis en las primeras horas. Este efecto fue relativamente en aumento al mostrar un total de 38% de células en necrosis a las 72 horas, probablemente este efecto de inducción de necrosis no fue atenuado por la presencia de metformina; de manera contraria, se observó un efecto significativo de inducción de apoptosis, obteniendo a las 24 horas un 18% de células marcadas con Anexina V, este evento incremento hasta lograr un total de 62% de células marcadas con Anexina V al final del tratamiento (72 horas). El efecto significativo sobre la inducción de apoptosis nos sugiere que probablemente la metformina atenúa la toxicidad de la doxorubicina dentro de las primeras horas, pero que posteriormente

este efecto se reduce debido a la resistencia que las células contra la doxorrubicina conforme transcurre el tiempo de tratamiento.

Los resultados de valoración morfológica evidenciaron el potencial tóxico de esta terapia, en ellos se puede observar en el panel correspondiente a doxorrubicina/metformina en las primeras 4 y 24 horas de tratamiento que las células comienzan a presentar poros en su membrana plasmática, agrandamiento nuclear y una consecuente reducción del volumen citoplasmático, todos ellos, cambios característicos propios de inducción de muerte por apoptosis. Los cambios morfológicos más evidentes ocurren después de 48 y 72 horas de tratamiento, se observa pérdida del volumen citoplasmático y de la interacción célula-célula, hasta mostrar cambios característicos de muerte por necrosis, este efecto se hizo más prominente al final del periodo de tratamiento, en comparación con las células del control negativo, doxorrubicina/F3 y metformina/F3. Esto sugiere, que el efecto apoptótico en las primeras horas de tratamiento, puede estar asociado a la metformina, la cual atenúa la toxicidad que la doxorrubicina pueda inducir. Sin embargo, de manera contraria, en las siguientes 48 y 72 horas este efecto se reduce, probablemente debido a la resistencia que desarrollan las células contra la doxorrubicina. La eficacia de la combinación de los 3 fármacos *in vivo* fue superior a las combinaciones de metformina/F3 y doxorrubicina/F3 al finalizar el tratamiento. De manera importante como sucedió en los ensayos *in vitro*, los animales desarrollaron resistencia y recurrencia de la enfermedad, es decir, se observó una disminución importante del xenotransplante a los 8 días de tratamiento, sin embargo, al día 11 la curva de crecimiento muestra una recurrencia de la masa tumoral por quimioresistencia. La combinación de doxorrubicina/metformina había sido previamente reportada (Iliopoulos

et al; 2011) demuestran una reducción de la masa tumoral en un 90% en ratones atímicos después de 40 días de tratamiento. Iliopoulos sugiere que la metformina ataca a las células troncales, retrasando así la recurrencia de enfermedad. Esto fue demostrado midiendo la afinidad de la doxorubicina/metformina por atacar selectivamente a las CSC mediante microRNA-200.

Finalmente, la estrategia farmacológica, doxorubicina/metformina/F3, mostró una capacidad de remisión de masa tumoral total (Figuras 21d y 22b y c). Los resultados *in vitro* muestran que a tiempos cortos y bajas concentraciones, la combinación farmacológica es muy efectiva sin daño citotóxico, observando un 5% de células macadas con IP en las primeras 24 horas y de un 26% de células en apoptosis en el mismo tiempo, hasta obtener un 75% total de muerte por apoptosis después de 72 horas de tratamiento (Figura 17g). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de SFR-B, donde se observó que a dosis más altas y tiempos largos induce una inhibición significativa de la proliferación sobre la línea celular. En los ensayos de valoración morfológica, se puede observar que las células tratadas con doxorubicina/metformina/F3, comenzaron a presentar de manera significativa la presencia de poros en su membrana plasmática a partir de las 4 horas hasta las 72 horas de tratamiento; dichos cambios morfológicos refieren el agrandamiento nuclear y una consecuente reducción del volumen citoplasmático; cambios indicadores de muerte por apoptosis.

Este complejo farmacológico abatió *in vivo* por completo el crecimiento tumoral en comparación con los otros grupos experimentales. Cabe mencionar que los animales de los otros grupos experimentales fueron sacrificados por cuestiones éticas, sin

embargo, el grupo experimental de los 3 fármacos, tuvo seguimiento por más de tres meses para observar recurrencia de enfermedad y sobrevida. Al término de éste periodo, en ningún animal hubo recurrencia de enfermedad o signos de toxicidad. Al término de este periodo, en ningún animal hubo recurrencia de enfermedad o signos de toxicidad.

Con base en los resultados obtenidos, se puede inferir que la remisión de la masa tumoral inducida por el complejo doxorubicin/metformina/F3, se deba a una sinergia atacando por una parte la glicolisis, disminuyendo el consumo de glucosa e inhibiendo las señales de proliferación y crecimiento celular por parte del bloqueo de la vía de mTOR, induciendo finalmente una reparación de muerte celular recuperando autofagia y apoptosis.

Finalmente los ensayos de inmunohistoquímica en nuestros grupos control negativo, doxorubicina y doxorubicina/metformina/F3 muestran resultados evidentes en relación a la efectividad de nuestra estrategia farmacológica; la combinación de los 3 fármacos refiere células con características propias de inducción de muerte celular por apoptosis. Por el contrario, la doxorubicina, el fármaco de excelencia para tratamiento de cáncer de mama, refleja su baja efectividad al mostrar células con características que refleja un estadio avanzado de la enfermedad. Para sustentar si evidentemente la combinación de fármacos ejerce muerte por apoptosis y demostrar su bajo potencial tóxico es importante mencionar que se realizarán las pruebas inmunohistoquímicas correspondientes para la búsqueda de marcadores moleculares que nos indiquen más específicamente sobre las proteínas y genes involucrados en la muerte celular por apoptosis inducida por la combinación farmacológicas.

11. CONCLUSIONES

- ✚ El uso y la combinación de estas drogas (doxorrubicina/metformina/F3) fue efectivo, observando la remisión total de la masa tumoral en este modelo de tumorigénesis.
- ✚ Se demostró *in vitro* e *in vivo* el potencial terapéutico de esta combinación de fármacos mostrando una mejor eficacia sobre las terapias existentes (doxorrubicina).
- ✚ El modelo de CaMa *in vivo* es una herramienta para reproducir, bajo condiciones controladas, el crecimiento tumoral con células humanas en ratones, permitiendo la evaluación de nuevas terapias farmacológicas.
- ✚ Con base en los resultados obtenidos, se observó que el metabolismo energético tumoral representa una buena estrategia tanto para el entendimiento del comportamiento de la célula cancerígena, así como en la búsqueda de alternativas terapéuticas.
- ✚ A través de SFR-B se observó que el efecto citotóxico del tratamiento experimental doxorrubicina/metformina/F3 sobre la línea celular MDA-MB-231 es dependiente de tiempo y dosis, obteniendo su IC₅₀ a bajas concentraciones en tiempos cortos.
- ✚ A través de citometría de flujo, se observó que la combinación de los fármacos doxorrubicina/metformina/F3 induce la muerte celular por apoptosis en la línea

MDA-MB-231, reduciendo significativamente la necrosis provocada por la doxorubicina.

- ✚ En el modelo *in vivo*, la combinación de los tres fármacos mostraron un alto potencial en la reducción del tumor derivado de la línea celular MDA-MB-231.
- ✚ No se encontró recurrencia de la enfermedad ni respuesta tóxica en los animales correspondientes a esta estrategia experimental después de 3 meses post-tratamiento.
- ✚ Los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados permitieron alcanzar satisfactoriamente los objetivos establecidos en este proyecto de tesis.

12. PERSPECTIVAS

- ✚ Sobre la masa tumoral extraída de los ensayos *in vivo* es necesario llevar a cabo las pruebas moleculares que refieran las vías de señalización que se activan o inhiben con el empleo de esta terapia coadyuvante.
- ✚ Es de suma importancia determinar mediante Western Blot, citometria de flujo, RT-PCR y análisis inmunohistoquímicos la expresión o inhibición de marcadores moleculares específicos que determinen el tipo de muerte que está induciendo esta terapia coadyuvante: apoptosis o autofagia.
- ✚ Es importante medir la expresión, sobreexpresión o inhibición de las enzimas que juegan un papel fundamental en la glicolisis aerobia: G6PDH3, LDHA, ATP, NAD, NADH⁺.
- ✚ Es importante determinar que complejos proteínicos de la vía mTOR se están activando o suprimiendo con el empleo de esta terapia farmacológica.
- ✚ Es importante probar esta combinación farmacológica en otros modelos de tumorigenesis, empleando diversas líneas celulares de cáncer para determinar si el mecanismo de acción de estos fármacos es el mismo que en el modelo de CaMa.
- ✚ Es importante llevar esta estrategia experimental a la clínica ya que probablemente mejorare el tratamiento de pacientes con cáncer de mama y posiblemente otros tipos de cáncer.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abbas T**, Keaton MA and Dutta A. Genomic Instability in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;(5):129-37.
2. **Adel A**, Mahmoud BM, Aly MM, Wakil EI and Ibrahem SO. Impact of Breast Cancer and Combination Chemotherapy on Oxidative Stress, Hepatic and Cardiac Markers. *Journal Breast Cancer*. 2012;15(3):306-12.
3. **Akyurek N**, Uner A, Benekli M and Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 2012;118(17):4173-83.
4. **Alberts B**, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. *Biología Molecular de la Célula*. Cuarta Edición. Ediciones Omega. 2004.
5. **Ali S and Coombes RC**. Endocrine-Responsive Breast Cancer and Strategies for Combating Resistance. *Nature Reviews. Cancer*. 2002;13(22):102-15.
6. **Alimova I**, Liu B, Fan Z, Edgerton S, Dillon T, Lind S and Thor A. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle*. 2009;8(6):909-15.
7. **Altenberg B and Greulich K**. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. 2004;84(6):1014-20.
8. **Alva-Sánchez H**, Rodríguez-Balderas CA, Trejo-Ballado F, Lara-Camacho V, Ávila-Rodríguez MA y Robles-Díaz G. Investigación preclínica por microPET en la UNAM. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2012;55(3):4-10.

9. **Andrieu N.** Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study: A report from the EMBRACE, GENESPO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborator's Group. *Journal. Clinical Oncology.* 2006;6(24):3361-66.
10. **Anisimov VA,** Ukraintseva SV and Yashin AI. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? *Nature Review Cancer.* 2005;5(67):807-819.
11. **Ávila-Rodríguez MA y Alva-Sánchez H.** Radiofármacos para PET, una nueva perspectiva de la medicina nuclear molecular en México. En: <http://www.medigraphic.com/elresidente>. 2010;5(3):103-10.
12. **Azar M and Lyons T.** Diabetes, insulin treatment and cancer risk: what is the evidence? *Medicine Reports.* 2010; 2(4):1-4.
13. **Badve S,** Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt1F, Puay-Hoon T, Tse GM, Ellis IO and Reis-Filho JS. Review Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology.* 2011;7(24):157–67.
14. **Bailey CJ and Turner RC.** Metformin. *The New England Journal Medicine.* 1996;9(29):574-79.
15. **Bartholomeusz C and González-Angulo AM.** Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2012;16(1):121-30.
16. **Bartlett JM.** Biomarkers and patient selection for PI3K/Akt/mTOR targeted therapies: current status and future directions. *Clinical Breast Cancer.* 2010; Suppl 3:S86-95.

17. **Benavides F y Guenet JL.** Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina.* 2008;13(61):215-31.
18. **Bennett CN and Green JE.** Genomic analyses as a guide to target identification and preclinical testing of mouse models of breast cancer. *Toxicologic Pathology.* 2010;14(38):88-95.
19. **Bissell MJ and Bilder D.** Polarity determination in breast tissue: desmosomal adhesion, myoepithelial cells, and laminin. *Breast Cancer Research* 2003;2(5):117-29.
20. **Brand K.** Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochemical Journal.* 1985;2(228):353-61.
21. **Brizel DM,** Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW and Mueller-Klieser W. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* 2001;51(2):349-53.
22. **Brown NJ,** Higham SE, Perunovic B, Arafa M, Balasubramanian S and Rehman I. Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter methylation in a high frequency of human breast cancers. *PloS One.* 2013;8(2):e57697-e57697.
23. **Cabrera-Gaytán DA,** De La Rosa-Montaña BM and Kuri-Morales PA. Breast cancer in Mexico: Epidemiological profile from information systems and epidemiological surveillance, 1998-2006. *Gaceta Mexicana de Oncología.* 2008;7(5):161-68.
24. **Calderón-Garcidueñas AL,** Parás-Barrientos FU, Cárdenas-Ibarra L, González-Guerrero JF, Villarreal-Ríos E, Staines-Boone T and Barrera-Saldaña HA. Risk

factors of breast cancer in Mexican women. *Salud Pública de México*. 2000;42(1):26-33.

25. **Chávarri-Guerra Y**, Villarreal-Garza C, Liedke P, Knaul F, Mohar A, Finkelstein D y Goss P. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Review: Oncology*. 2012;11(13):335-43.
26. **Chen JL**, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J, Dewhirst M, West M and Chi JT. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS One Genetic*. 2008;4(12):100-13.
27. **Chen QR**, Song YK, Yu LR, Wei JS, Chung JY, Hewitt SM, Veenstra TD and Khan J. Global genomic and proteomic analysis identifies biological pathways related to high-risk neuroblastoma. *Journal Proteome Research*. 2010;9(1):373-82.
28. **Chen X**, Li J, Gray WH, Lehmann BD, Bauer JA, Shyr Y and Pietenpol JA. TNBC type: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Informatics*. 2012; 3(11):147–56.
29. **Chong CR and Chabner BA**. Mysterious Metformin. *The Oncology Journal*. 2009;8(14):1178–81.
30. **Christofk HR**, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL and Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature Cancer*. 2008;452(7184):230-33.
31. **Cidado J and Park BH**. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy. *Journal Mammary Gland Biology Neoplasia*. 2012;17(3-4):205-16.
32. **Cleator S, Heller W and Coombes RC**. Triple-negative breast cancer: therapeutic

options. *Lancet Oncology*. 2007;8(3):235-44.

33. **Coxon KM**, Duggan J, Cordeiro MF and Moss SE. Purification of annexin V and its use in the detection of apoptotic cells. *Methods in Molecular Biology*. 2011;12(731):293-308.
34. **Cummings MC**, Chambers R, Simpson PT and Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer: is it time to pack up our microscopes? *Pathology*. 2011;43(1):1-8.
35. **Curtin NJ and Szabo C**. Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013;13(15):2997-2013.
36. **de Ruijter TC**, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M and Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*. 2011;137(2):183-92.
37. **Del Barco S**, Vazquez-Martin A, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Bosch-Barrera J, Joven J, Martin-Castillo B and Menendez JA. Metformin: Multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget*. 2011;2(12):896-917.
38. **Derdak Z**, Mark NM, Beldi G, Robson SC, Wands JR and Baffy G. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Research*. 2008;68(8):2813-19.
39. **Doublier S**, Belisario DC, Polimeni M, Annaratone L, Riganti Ch, Allia E, Ghigo D, Bosia A and Sapino A. HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemoresistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer*. 2012;12(4):1-15.

40. **Dowling RJ**, Goodwin PJ and Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Medicine*. 2011;9(33):2-6.
41. **Draoui N and Feron O**. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Disease Models & Mechanisms*. 2011;12(4):727-32.
42. **Escudero-Ortiza, A**, Ramón-López M, Duarte J, Pérez-Ruixoc J and Valenzuela V. Farmacocinética poblacional de doxorubicina aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farmacia Hospitalaria*. 2011;7(23):213-25
43. **Evan GI**. The Ever-Lengthening Arm of p53. *Cancer Cell*. 2008;12(7):1-17.
44. **Fang L**, Barekati Z, Zhang B, Liu Z and Zhong X. Targeted therapy in breast cancer: what's new? *Swiss Medical Weekly*. 2011;12(141):1-9.
45. **Ferlay J**, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No.10. Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer*; 2010.
46. **Fiume L**, Vettraino M, Manerba M, Di and Stefano G. Inhibition of lactic dehydrogenase as a way to increase the anti-proliferative effect of multi-targeted kinase inhibitors. *Pharmacological Research*. 2011;63(4):328-34.
47. **Fiume L**. Effect of inhibition of lactic dehydrogenase by the action of oxamic acid on the development of Yoshida's ascites hepatoma. *Bolletino Societta Italiana Biologia Sperimentale*. 1959;35(5):236-40.
48. **Forbes NS**, Meadows AL, Clark DS and Blanch HW. Estradiol stimulates the biosynthetic pathways of breast cancer cells: detection by metabolic flux analysis. *Journal Metabolic Engineering*. 2006;8(6):639-52.

49. **Foubert E**, Craene BD and Berx G. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Research*. 2010;12(206):3067-88.
50. **Gambhir SS**. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature Review Cancer*. 2002;2(9):683-93.
51. **García GA**. El Nobel en Medicina y Fisiología 1931 -Otto Heinrich Warburg-, el Efecto Warburg, y el metabolismo de las células cancerosas. *Revista Médica Sanitas*. 2010;13(4):40-6.
52. **Garcia RZ**, Carvajal SC, Wilkinson AV, Thompson PA, Nodora JN, Komenaka IK, Brewster A, Cruz GI, Wertheim BC, Bondy ML and Martínez ME. Factors that influence mammography use and breast cancer detection among Mexican-American and African-American women. *Cancer Causes and Control*. 2012;23(1):165-73.
53. **Gatenby RA and Gillies RJ**. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*. 2004;19(4):891-99.
54. **Gelfand DE**, Parzuchowski J, Rivero-Perry M and Shernoff N. Work-site cancer screening: a Latino case study. *Oncology Nursing Forum*. 2000;27(4):659-66.
55. **Ghebeh H**, Lehe C, Barhoush E, Al-Romaih K, Tulbah A, Al-Alwan M, Hendrayani SF, Manogaran P, Alaiya A, Al-Tweigeri T, Aboussekhra A and Dermime S. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Research*. 2010;12(4):2648-2705.
56. **Gjorevski N and Nelson MC**. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 2011;23(12):581-93.

57. **González-Angulo AM and Meric-Bernstam F.** Metformin: A Therapeutic Opportunity in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;7(16):1695-1700.
58. **González-Angulo AM,** Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stemke-Hale K, Hennessy BT, Arun BK, Hortobagyi GN, Do KA, Mills GB and Meric-Bernstam F. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(5):1082-9.
59. **Gottfried E,** Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A and Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*. 2006;107(5):1-17.
60. **Graham GG,** Punt J, Arora M, Day O, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM and Ray JE, Timmins P and Williams KM. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clinic Pharmacokinet*. 2011;50(2):81-98.
61. **Grunt TW and Mariani GL.** Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Breast Cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 2012;13(1):250-59.
62. **Guertin DA and Sabatini DM.** Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*. 2007;1(12):9-22.
63. **Gupta GS.** LDH-C4: a target with therapeutic potential for cancer and contraception. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012;21(2)14-28.
64. **Gwinn DM,** Shackelfor DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE and Shaw RJ. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*. 2008;12(30):214–26.

65. **Hamed EA**, Zakhary MM and Maximous DW. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. *Journal Cancer Research and Clinical Oncology*. 2012;138(6):999-1009.
66. **Hamilton E**, Fennell M and Stafford DM. Modification of tumor glucose metabolism for therapeutic benefit. *Acta Oncologica*. 1995;34(3):429-33.
67. **Hanahan D and Weinberg RA**. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell Press*. 2011;13(2):34-9.
68. **Hanahan D and Weinberg RA**. The Hallmarks of Cancer. *Cell Press*. 2000; 23(100):57-70.
69. **Hawkins RA and Phelps ME**. PET in clinical oncology. *Cancer Metastasis Review*. 1998;13(2):119-42.
70. **Hedley BD**, Chu JE and Ormond GE. Recombinant Human Erythropoietin in combination with Chemotherapy Increases Breast Cancer Metastasis in Preclinical Mouse Models. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(19):OF1-OF12.
71. **Hirsch HA**, Iliopoulos D, Tsihchlis PN and Struhl K. Metformin Selectively Targets Cancer Stem Cells, and Acts Together with Chemotherapy to Block Tumor Growth and Prolong Remission. *Cancer Research*. 2009;19(69):7507-11.
72. **Howe LR**, Sung-Hee Ch and Tolle KC. HER2/neu-Induced Mammary Tumorigenesis and Angiogenesis are Reduced in Cyclooxygenase-2 Knockout Mice. *Cancer Research*. 2005;14(65):10113-19.
73. <http://pubchem.ncbi.nlm.gov/serch/>
74. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>

75. **Iagaru A**, Mitra E, Shahriar S, Dick DW, Quon A, Goris ML and Gambhir SS. Novel Strategy for a Cocktail 18F-Fluoride and 18F-FDG PET/CT Scan for Evaluation of Malignancy: Results of the Pilot-Phase Study. *Journal of Nuclear Medicine*. 2009;11(50):501–5.
76. **Ibarra-Drendall C**, Dietze EC and Seewaldt VL. Metabolic Syndrome and Breast Cancer Risk: Is There a Role for Metformin? *Current Breast Cancer Reports*. 2011;12(3):142–50.
77. **Iliopoulos D**, Hirsch HA and Struhl K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Research*. 2011;71(9):3196-3201.
78. **Inoki K**, Zhu T and Liang GK. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell Press*. 2003;7(115): 577–90.
79. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (**INEGI**): Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx>
80. **Jemal A**, Siegel R, Xu J and Ward E. Cancer Statistics, 2010. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*. 2010;15(60):277–87.
81. **Jensen MM**, Jorgensen JT, Binderup T and Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Medical Imaging*. 2008;13(16):8-16.
82. **Jin B and Robertson KD**. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;12(754):3-29.
83. **Joensuu H and Gligorov J**. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Annals of Oncology*. 2013;23(6):1093-99.

84. **Kerlikowske K**, Grady D, Rubin SM, Sandrock C and Ernster VL, Efficacy of screening mammography. A meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*. 1995;273(2):149-54.
85. **Kim IS and Baek SH**. Mouse models for breast cancer metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;12(394):443–47.
86. **Knaul FM**, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A and Frenk J. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reproductive Health Matters*. 2009;16(32):113-23.
87. **Koolen BB**, Voge WV, Vrancken Peeters MJ, Loo CE, Rutgers EJ and Valdes-Olmos RA. Molecular Imaging in Breast Cancer: From Whole-Body PET/CT to Dedicated Breast PET. *Journal of Oncology*. 2012;3(32)1-8.
88. **Korsse SE**, Peppelenbosch MP and van Veelen W. Targeting LKB1 signaling in cancer. *Biochemical and Biophysical Acta*. 2012;1835(2):194-210.
89. **Krohn KA**, Link JM and Mason RP. Molecular imaging of hypoxia. *Journal of Nuclear of Medicine*. 2008;13(2):129S-48S.
90. **Kugawa F**, Dalkhuren SO, Ueno A and Yamashita K. Novel morphological features in the death of MCF-7 human breast cancer cells after exposure to anticancer drugs. *Die Pharmazie*. 2012;67(10):862-69.
91. **Kuperwasser Ch**, Dessain S and Bierbaum BE. A Mouse Model of Human Breast Cancer Metastasis to human bone. *Cancer Research*. 2005;12(65):6130-38.
92. **Laplante M and Sabatini DM**. mTOR signaling at a Glance. *Journal of Cell Science*. 2009;16(122):3589-94.
93. **Lara-Medina F**, Pérez-Sánchez V, Saavedra-Pérez D, Blake-Cerda M, Arce C, Motola-Kuba D, Villarreal-Garza C, González-Angulo A, Bargallo E, Aguilar JL,

- Mohar A, and Arrieta O. Triple-Negative Breast Cancer in Hispanic Patients High Prevalence, Poor Prognosis, and Association With Menopausal Status, Body Mass Index and Parity. *Cancer Research*. 2011;16(117):1-18.
94. **Lea A**, Coopera ChR, Gouwb AM, Dinavahia R, Maitrab A, Deckd LM, Royere RE, Vander DL, Semenzac GL and Danga CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 2010;5(107):2037–42.
95. **Lee GH**, Yan C, Shin SJ, Hong SC, Ahn T, Moon A, Park SJ, Lee YC, Yoo WH, Kim HT, Kim DS, Chae SW, Kim HR and Chae HJ. BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function. *Oncogene*. 2010;29(14):2130-41.
96. **Lehmann BD**, Bauer JA, Chen C, Sanders ME, Chakravarthy B, Shyr Y and Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;7(121):2750-67.
97. **Levi F**, Bosetti C, Lucchini F, Negri E and La Vecchia C, Monitoring the decrease in breast cancer mortality in Europe. *European Journal. Cancer Prevention*. 2005;14(6):497-502.
98. **Lim E**, Metzger-Filho O y Winer EP. The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology* .2012;8(26):688-94.
99. **Link A**, Balaguer F and Goel A. Cancer Chemoprevention by Dietary Polyphenols: Promising Role for Epigenetics. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 12(80):345-57.
100. **Liu H**, Hu YP, Savaraj N, Priebe W and Lampidis TJ. Hypersensitization of tumor

- cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry*. 2001;18(40):5542-47.
101. **Liu H**, Savaraj N, Priebe W and Lampidis TJ. Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors: a strategy for solid tumor therapy (Model C). *Biochemical Pharmacology*. 2009;12(64):1745-51.
102. **Lopez-Carrillo L**, Torres-Sanchez L, Lopez-Cervantes M y Rueda-Neria C, Identificación de lesiones mamarias malignas en México. *Salud Pública de México*. 2001;13(43):199-202.
103. **LoRusso PM**. Mammalian Target of Rapamycin as a Rational Therapeutic Target for Breast Cancer Treatment. *Oncology*. 2013;1(84):43-56.
104. **Mankoff DA**, Shields AF y Krohn KA. Diagnóstico por imagen de la proliferación celular con PET. *Radiologic Clinics of North America*. 2005;25(43):153–67.
105. **Martínez-Montañez OG**, Uribe-Zúñiga P y Hernández-Ávila M. Políticas públicas para la detección del cáncer de mama en México. *Salud Pública de México*. 2009;2(51):S350-S360.
106. **Matthew G and Heiden V**. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews: Drug Discovery*. 2011;9(10):671-84.
107. **Mccarthy N**, Mitchell G, Bilous M, Wil cken N and Lindeman GJ. Triple-negative breast cancer: making the most of a misnomer. *Asia–Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2012;17(8):145–55.
108. **Medina-Franco H y Suárez-Bobadilla YL**. Role of surgery in metastatic breast cáncer. *Revista de Investigación Clínica*. 2012;64(1):81-8.
109. **Migneco G**, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, Flomenberg N, Tsirigos A, Howell A, Martinez-Outschoorn

- UE, Sotgia F and Lisanti MP. Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromal-epithelial metabolic coupling. *Cell Cycle*. 2010;9(12):2412-22.
110. **Millar AB**. What is the role of early detection and screening in cancer control? *Journal Public Health Policy*. 1993; 34(21):403-11.
111. **Miranda PY**, Wilkinson AV, Etzel CJ, Zhou R, Jones LA, Thompson P and Bondy ML. Policy implications of early onset breast cancer among Mexican-origin women. *Cancer*. 2011;117(2):390-97.
112. **Moestue SA**, Dam CG, Gorad SS, Kristian A, Bofin A, Maelandsmo GM, Engebraten O, Gribbestad IS and Bjorkoy G. Metabolic biomarkers for response to PI3K inhibition in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2013;15(1):16-22.
113. **Mohar A, and Arrieta O**. Triple-Negative Breast Cancer in Hispanic Patients High Prevalence, Poor Prognosis, and Association with Menopausal Status, Body Mass Index and Parity. *Cancer*. 2011;117(16):3658-69.
114. **Mullan PB and Millikan RC**. Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64(24):76-87.
115. **Naumov GN**, Akslen LA and Folkman J. Role of Angiogenesis in Human Tumor Dormancy Animal Models of the Angiogenic Switch. *Cell Cycle*. 2006;5(16):1779-87.
116. **Noguchi Y**, Okamoto T, Marat D, Yoshikawa T, Saitoh A, Doi C, Fukuzawa K, Tsuburaya A, Satoh S and Ito T. Expression of facilitative glucose transporter 1 mRNA in colon cancer was not regulated by k-ras. *Cancer Letters*.

2008;154(2):137-42.

117. **Nolop KB**, Rhodes CG, Brudin LH, Beaney RP, Krausz T, Jones T and Hughes JM. Glucose utilization in vivo by human pulmonary neoplasms. *Cancer*. 1987;60(11):2682-89.
118. **NOM-041-SSA2-2002**; Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Diario Oficial. 17 septiembre 2003.
119. **Ojeda-Flores R**, Ortega-López N, Ávila-Rodríguez MA, Trejo-Ballado F and Alexánder-Rosas E. Cardiac metabolism and perfusion evaluation in a rat model using ¹⁸F-FDG, ¹¹C-acetate, ¹³NH₃ and micro-positron emission tomography (microPET). *Archivos de Cardiología de México*. 2010;80(4):215-28.
120. **Ortega-Altamirano D y Lopez-Cervantes M**, Estrategias de la enseñanza de auto examen del seno en mujeres en edad reproductiva. *Salud Pública de México*. 2000;(42):17-25
121. **Ortiz-Rodríguez SP**, Torres-Mejía G, Mainero-Ratchelous F, Angeles-Llerenas A, López-Caudana AE, Lazcano-Ponce E and Romieu I. Physical activity and breast cancer risk in Mexican women. *Salud Pública de México*. 2008;50(2):126-35.
122. **Papacostantinou J and Colowick SP**. The role of glycolysis in the growth of tumor cells. II. The effect of oxamic acid on the growth of HeLa cells in tissue culture. *The Journal of Biological Chemistry*. 1961;14(236):285–88.
123. **Pecqueur C**, Bui T, Gelly C, Hauchard J, Barbot C, Bouillaud F, Ricquier D, Miroux B and Thompson CB. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 2008;22(1):9-18.

124. **Pérez-Plasencia C and Dueñas-González A.** Can the state of cancer chemotherapy resistance be reverted by epigenetic therapy? *Molecular Cancer*. 2006;5(27):1-5.
125. **Perou CM,** Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature Cancer*. 2000;406(6797):747-52.
126. **Phelps ME.** Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(16):9226-33.
127. **Pollak M.** Metformin and Other Biguanides in Oncology: Advancing the Research Agenda. *Cancer Prevention Research*. 2010;(3):1060-65.
128. **Prat A and Perou CM.** Mammary development meets cancer genomics. *Nature Medicine*. 2009;17(8):842-44.
129. **Rakha EA,** El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007;109(1):25-32.
130. **Reddy KB.** Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Current Oncology*. 2011;18(4):173-79.
131. **Roca-Alonso L,** Pellegrino L, Castellano L and Stebbing. Treatment and Adverse Cardiac Events: What Are the Molecular Mechanisms? *Journal Breast Cancer*. 2012;16(122):253–59.
132. **Rodríguez-Cuevas SA and Capurso-García M.** Epidemiology of breast cancer. *Ginecología y Obstetricia de México*. 2006;74(11):2890-99.
133. **Santos R and Cascales AM.** Physiopathologic implications of telomerase. *Anales*

de la Real Academia Nacional de Medicina. 2000;117(2):56-63.

134. **Schmid SA**, Gaumann A, Wondrak M, Eckermann C, Schulte S, Mueller-Klieser W, Wheatley DN and Kunz-Schughart LA. Lactate adversely affects the *in vitro* formation of endothelial cell tubular structures through the action of TGF-beta1. *Experimental Cell Research*. 2007;313(12):2531-49.
135. **Shackelford DB and Shaw RJ**. The LKB1–AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(8):563-75.
136. **Simpson NE**, Tryndyak VP, Beland FA and Pogribny IP. An *in vitro* investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012;133(3):959-68.
137. **Singh KK**. Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer. *Annals of the New York Academic Sciences*. 2004;10(19):260-64.
138. **Sishi BJ**, Loos B, van Rooyen and Engelbrecht AM. Autophagy upregulation promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 2013;85(1):124-34.
139. **Soga T**. Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming. *Cancer Science*. 2013;17(104):33-43.
140. **Svensson RU and Shaw RJ**. Tumour friend or foe. *Nature Cancer*. 2012;4(85):590-59.
141. **Swift LP**, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR and Cutts SM. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Research*. 2006;66(9):4863-71.

142. **Tabar L**, Yen MF, Vitak B, Chen HHT, Smith RA and Duffy SW, Mamography service screening and mortality in breast cancer patients: 20-year follow-up before and after introduction and screening. *The Lancet Oncology*. 2003;17(361):1405-10.
143. **Tekedereli I**, Alpay SN, Tavares CDJ, Cobanoglu ZE, KaoudTS, Sahin I, Sood AK, Lopez-Berestein G, Dalby KN and Ozpolat B. Targeted Silencing of Elongation Factor 2 Kinase Suppresses Growth and Sensitizes Tumors to Doxorubicin in an Orthotopic Model of Breast Cancer. *PloS One*. 2012;41(117):1-12.
144. **Thornburg JM**, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, Eaton JW, Telang S and Chesney J. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2008;10(5):1-12.
145. **Tommasi S**, Zheng A, Weninger A, Bates SE, Li XA, Wu X, Hollstein M and Besaratinia A. Mammalian cells acquire epigenetic hallmarks of human cancer during immortalization. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(1):182-195.
146. **Tubiana M**. Generalities about carcinogenesis. *Comptes Rendus Biologies*. 2008;2(331):114-25.
147. **Ursini-Siegel J**, Schade B, Cardiff RD and Muller WJ. Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nature Cancer Reviews*. 2007;11(7): 389-97.
148. **Valdespino-Gómez VM y Valdespino-Castillo VE**. Alteraciones celulares y moleculares no clásicas en el desarrollo del cáncer. *Gaceta Médica de México*. 2010;146(3):4756-71.
149. **van Dam PA**, Van Goethem ML, Kersschot E, Vervliet J, Van den Veyver IB, De Schepper A, and Buytaert P, Palpable solid breast masses: retrospective single- and multimodality evaluation of 201 lesions. *Radiology*. 1988;18(166):435-39.

150. **Vander MG**, Cantley LC and Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029–33.
151. **Vichai V and Kirtikara K**. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. 2006;3(1):1112-116.
152. **Walenta S**, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK y Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Research*. 2000;60(4):916-21.
153. **Wang R and Green DR**. Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nature Immunology*. 2012;13(10):907-15.
154. **Ward RA**, Brassington C, Breeze AL, Caputo A, Critchlow S, Davies G, Goodwin L, Hassall G, Greenwood R, Holdgate GA, Mrosek M, Norman RA, Pearson S, Tart J, Tucker JA, Vogtherr M, Whittaker D, Wingfield J, Winter J and Hudson K. Design and synthesis of novel lactate dehydrogenase A inhibitors by fragment-based lead generation. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012;55(7):3285-306.
155. **Weyden L and Adams DJ**. Cancer of mice and men: Old twists and new tails. *The Journal Pathology*. 2013;23(436):574-87.
156. **Wullschleger S**, Loewith R and Hall MN. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *The Cell*. 2003;115(10):577–90.
157. **Yang Q and Guan KL**. Expanding mTOR signaling. *Cell Research*. 2007;17(8):666-81.
158. **Zhuang Y and Miskimins WK**. Metformin Induces Both Caspase-Dependent and Poly(ADP-ribose) Polymerase-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells.

Molecular Cancer Research. 2011;9(23):603-15.

159. **Young SR**, Pilarski RT, Donenberg T, Shapiro C, Hammond LS, Miller J, Brooks KA, Cohen S, Tenenholz B, Desai D, Zandvakili I, Royer R, Li S and Narod SA. The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2009;9(19):86-97.
160. **Zhao YH**, Zhou M, Liu H, Ding Y, Khong HT, Yu D, Fodstad O and Tan M. Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth. *Oncogene*. 2009;28(42):3689-701.
161. **Zhuang Y and Miskimins WK**. Metformin induces both caspase-dependent and poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*. 2011;9(5):603-15.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00110

Matrícula: 210380640

EVALUACION DE LA METFORMINA Y EL F3 COMO POSIBLE TERAPIA COADYUVANTE EN UN MODELO *in vivo* DE CANCER DE MAMA

En México, D.F., se presentaron a las 9:00 horas del día 13 del mes de junio del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
- DR. SIGIFREDO PEDRAZA SANCHEZ
- DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LOPEZ
- DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA




VERONICA GARCIA CASTILLO
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

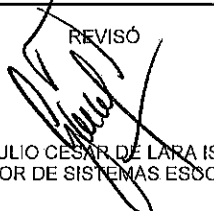
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: VERONICA GARCIA CASTILLO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

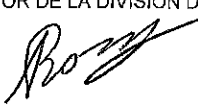
REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

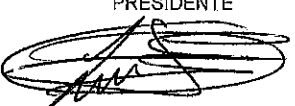
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE



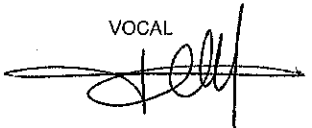
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL




DR. SIGIFREDO PEDRAZA SANCHEZ

VOCAL



DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LOPEZ

SECRETARIA



DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA