



A 100 AÑOS DE LA REFORMA UNIVERSITARIA:
SABER TE HACE LIBRE

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

17, 18 y 19 de octubre de 2018

32. Salud Humana

“Reposicionamiento de drogas: efectos de la combinación de Metformina y Propranolol sobre modelos de cáncer colorrectal”

^{1,2}Anselmino LE, ^{1,3}Baglioni MV, ^{1,3}Rico MJ, ³Rozados VR, ^{1,3}Scharovsky OG, ^{1,2}Fernández CO, ^{1,4}Martínez-Marignac V, ^{1,2}Menacho-Márquez M.

¹ CONICET ; ² Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario (MPLbioR, UNR-MPIbpC) and Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (IIDEFAR, UNR-CONICET), Universidad Nacional de Rosario, Ocampo y Esmeralda, S2002LRK Rosario, Argentina; ³Instituto de Genética Experimental, Universidad Nacional de Rosario ; ⁴CICYTTP-CONICET, Diamante, Entre Ríos.

Resumen

El reposicionamiento de drogas en oncología se refiere al uso de fármacos originalmente formulados para otras indicaciones que mostraron potencial antitumoral. En este trabajo, se seleccionó un grupo de drogas en reposicionamiento que incluyen metformina (M, utilizada en el tratamiento de la diabetes), propranolol (P, indicado para tratar la hipertensión), cloroquina (CQ, se usa en el tratamiento o prevención de la malaria), DHEA (un precursor de hormonas sexuales), orlistat (empleado en el tratamiento de la obesidad), atorvastatina (utilizado para tratar niveles altos de colesterol) y dicloroacetato (un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa cinasa). El potencial antitumoral de estos fármacos se evaluó *in vitro* en células de cáncer de colon humano HCT116 y HT29 a través de ensayos de viabilidad estándar, individualmente o de forma combinada. Todos los fármacos probados inhibieron significativamente la proliferación de células HCT116 y HT29 de una manera dependiente de la dosis. De las combinaciones probadas, M+P resultó la más atractiva en ambas líneas celulares, ya que mostró una fuerte inhibición del crecimiento incluso combinando dosis bajas de ambos fármacos ($P < 0,001$). Adicionalmente, el tratamiento mostro efectos significativos tanto sobre la capacidad migratoria celular, aumentando el número de adhesiones focales en células tratadas, como en los niveles de apoptosis que también se vieron incrementados por el tratamiento. Los datos preliminares de un modelo *in vivo* con ratones BALB/c bajo un protocolo de carcinogénesis estándar de azoximetano (carcinógeno iniciador)/sulfato de dextrano (agente promotor) indicaron un beneficio potencial de la combinación M+P en la prevención del desarrollo de tumores de colon, sin síntomas asociados

de toxicidad. A través de la tinción inmunohistoquímica para el antígeno Ki67 se detectó un menor número de células proliferativas en tumores tratados, lo que confirmó el efecto del tratamiento *in vivo*. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la terapia con medicamentos reposicionados podría ser de interés para el tratamiento del cáncer de colon y, en particular, la combinación de M+P podría inhibir su desarrollo y potencialmente el desarrollo de metástasis.

Palabras clave: reposicionamiento de drogas, cáncer de colon, metformina, propranolol.

Introducción

El proceso por el cual un medicamento se desarrolla, prueba, valida como seguro y finalmente se utiliza en clínica es largo y costoso. Además el 90% de los medicamentos en desarrollo falla en alguna etapa debido a problemas de seguridad o falta de eficacia (Grainger, 2015; Mohs *et al.*, 2017). El reposicionamiento de drogas permite expandir el rango terapéutico de un medicamento ya aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) a través de la identificación de nuevos usos para drogas conocidas, diferentes a los que fueron originalmente prescritas. Las principales ventajas del reposicionamiento de fármacos son, primero que se parte de compuestos con perfiles de seguridad y farmacología bien caracterizados y segundo, que son medicamentos de bajos costos y de fácil acceso.

En la actualidad el número de muertes en el mundo a manos del cáncer no ha retrocedido. Los esfuerzos en la comprensión de los procesos que manejan el desarrollo tumoral y el progreso en estrategias de prevención y tratamientos aún siguen siendo puntos de inflexión en el ámbito científico-médico. En nuestro país el cáncer colorrectal es el segundo cáncer con más índice de muertes anuales (Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer, año 2012); esto se debe principalmente a que en la gran mayoría de los casos los tumores son detectados en etapas avanzadas de desarrollo debido a la falta de controles periódicos (Gualdrini *et al.*, 2011). Los cánceres avanzados tienen más probabilidades de desarrollar resistencia a las quimioterapias convencionales (Housman *et al.*, 2014; Raguz *et al.*, 2008) y a generar metástasis.

Durante mucho tiempo el estudio del cáncer se direccionó al entendimiento de las bases genéticas de la enfermedad. En la actualidad ya se han identificado millones de tipos de modificaciones genéticas en las células cancerígenas con respecto a las células normales, como mutaciones puntuales, rearrreglos genómicos, fusiones y deleciones génicas, entre muchas otras (Wishart, 2015). Toda esta información ha complicado el abordaje de la enfermedad desde una única perspectiva. Sin embargo, estudios en los últimos años, determinaron que la mayoría de

estas diferencias genéticas afectan la forma en que las células cancerígenas toman y procesan los nutrientes del medio externo. En el metabolismo celular modificado de las células cancerígenas existen reorganizaciones de las vías de captación y procesamiento de glucosa y otros nutrientes claves en la obtención de energía, como la glutamina. Todas estas variaciones están orientadas al mejoramiento de la síntesis de los más importantes bloques de construcción de nuevas células, proteínas, nucleótidos y lípidos y tienen crucial importancia no sólo durante el desarrollo tumoral, sino también durante el desarrollo de resistencia a las quimioterapias convencionales (Soga, 2013).

En este trabajo se propone que las reorganizaciones metabólicas que afectan las vías de utilización de nutrientes en células de CCR pueden ser utilizadas para la implementación de terapias blancas que permitan el reposicionamiento de drogas que actúen específicamente sobre estas diferencias. Para probar esto, se seleccionó un grupo de drogas conocidas con efectos sobre el metabolismo celular y se evaluó su impacto sobre la proliferación de líneas celulares de CCR.

Entre las drogas seleccionadas se encuentran: la metformina (M), un fármaco antidiabético del tipo biguanida que se utiliza comúnmente en el tratamiento y prevención de la diabetes tipo 2, cuyos mecanismos moleculares incluyen la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Salani *et al.*, 2014); el propanolol (P) se utiliza en el tratamiento de la hipertensión, es un beta bloqueante que afecta la actividad de la PKA (Pantziarka *et al.*, 2016); la cloroquina (CQ), una droga comúnmente utilizada para el tratamiento de la malaria, aunque su mecanismo de acción aún no ha sido totalmente dilucidado se ha registrado actividad antiautofágica en células cancerígenas (Kimura *et al.*, 2013); dehidroepiandrosterona (DHEA), un precursor de hormonas sexuales inhibidor de la ruta pentosa fosfato (Lai *et al.*, 1991); orlistat (ORL) un fármaco antiobesidad que afecta la ruta de biosíntesis de ácidos grasos (Zhao *et al.*, 2013); atrovastatina (ATOR), usada para el tratamiento de los niveles altos de colesterol, inhibe la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (Yang *et al.*, 2010); y ácido dicloroacético (DCA), un inhibidor de la PDK utilizado en el tratamiento de la acidosis láctica (Cairns *et al.*, 2011).

Objetivos

- Evaluar el potencial antitumoral de un grupo de medicamentos en reposicionamiento que afectan el metabolismo celular en líneas celulares de CCR.

- Estudiar el efecto “*in vitro*” de la combinación de propranolol y metformina.

-Determinar el efecto de la combinación de propranolol y metformina sobre el desarrollo tumoral en un modelo murino de CCR inducido químicamente.

Materiales y Métodos

In vitro:

- Se realizaron ensayos de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción de sales de tetrazolio (MTT) en líneas celulares de CCR.

Se sembraron 5×10^3 células de la línea celular de CCR HCT116 en placas de 96 pocillos que fueron incubadas por 36 h a 37°C a una atmósfera de 5% de CO₂ con dosis crecientes de las drogas seleccionadas (**Tabla 1**). Al finalizar el tiempo de incubación se retiró el tratamiento y se agregó el MTT durante 40 minutos. Posteriormente las células fueron lisadas con DMSO y la cantidad de MTT metabolizado se midió por espectrofotometría a una absorbancia de 570 nm.

El mismo ensayo se realizó sobre la línea celular HT29 utilizando como tratamientos las drogas propranolol, cloroquina, metformina y combinaciones de las mismas a concentraciones crecientes (**Tabla 1**, Izquierda).

Fármacos individuales	Dosis ensayadas
Metformina	1 a 10 mM
Propranolol	1 a 10 μ M
Cloroquina	0,5 a 10 μ M
DHEA	1 a 20 μ M
Orlistat	1 a 20 μ M
Atorvastatina	1 a 20 μ M
DCA	1 a 50 μ M

Combinaciones	Dosis ensayadas
M+P	M(1mM)+ P(1 μ M)
	M(2,5mM)+ P(2,5 μ M)
M+CQ	M(1mM)+ CQ(1 μ M)
	M(2,5mM)+ CQ(2,5 μ M)
P+CQ	(1 μ M)+ CQ(1 μ M)
	M(2,5 μ M)+ CQ(2,5 μ M)

Tabla1. Derecha, dosis de los tratamientos individuales utilizados en los ensayos de viabilidad celular.

Izquierda, combinaciones de dosis entre M, P y CQ.

- Se

realizó un ensayo

TUNEL para evaluar el efecto apoptótico de la combinación M+P sobre la línea celular HCT116. Para ello se sembraron tres grupos de células sobre cubreobjetos, un grupo tratadas con M+P a dosis 2,5mM y 2,5 μ M respectivamente, un grupo control negativo sin tratamiento y un grupo control positivo tratado con 5-FU 5 μ M. El ensayo se realizó utilizando el kit “*In Situ Cell Death Detection*” de Roche de acuerdo al protocolo del proveedor. Las células TUNEL-positivas se

cuantificaron visualmente con un microscopio de inmunofluorescencia estándar. Se realizó una prueba t para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para complementar el análisis el grupo control y los grupos tratados (con M, P o M+P) fueron colectados, lavados y tenidos con Anexina V-FICT (AP-Biotech) y Ioduro de propidio. Las tasas de apoptosis se determinaron mediante citometría de flujo. A través de una prueba T se identificaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

- Se realizó un ensayo de herida en la línea celular HCT116 para evaluar el efecto de M, P y sus combinaciones sobre la capacidad de migración celular.

Se cultivó una monocapa de células HCT116 hasta el 90% de confluencia, el cultivo se realizó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en DMEM suplementado con SFB al 10%. Posteriormente se retiró el medio y se realizó la herida con un microtip amarillo estéril, se agregó medio DMEM con suero el 0,1% más los tratamientos: metformina 2,5 mM, propranolol 2,5 µM y las combinaciones M+P (1mM y 1µM), M+P (2,5mM y 2,5µM) y un grupo control. Se tomó una foto de la herida inmediatamente después de ser realizada (T0) y otra a las 24 hs de tratamiento (T1); se cuantificó el área de la herida y se determinaron si las diferencias fueron significativas entre los tratamientos a través de un análisis ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

- Se realizaron inmunotinciones para evaluar el efecto de la combinación de M+P sobre la distribución celular de las proteínas vinculina, tubulina y FAK, importantes proteínas relacionadas con la adhesión focal y la capacidad migratoria de las células.

Se sembraron 5×10^3 células de la línea celular HCT116 sobre cubreobjetos, un grupo de los cuales fue tratado con la combinación M+P, otro grupo fue mantenido como control. Las células se fijaron con paraformaldehído 4%, se permeabilizaron en una solución 0,3% de Triton-X100 en PBS por diez minutos y se incubaron con BSA al 2,5% durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 2 minutos en PBS entre cada paso. Para la tinción de las proteínas de interés se incubaron las células con el anticuerpo primario durante dos horas a temperatura ambiente. Las diluciones utilizadas fueron: FAK (Santa Cruz Biotechnology) 1:50, Tubulina (Sigma-Aldrich) 1:200 y Vinculina (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000. Se realizó una incubación con una dilución 1:200 de anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 a temperatura ambiente en oscuridad durante una hora y luego de tres lavados en PBS, las células se incubaron por 20 minutos con faloidina-rodamina 1:200 y posteriormente con DAPI 1:10000 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron examinados en un microscopio

confocal equipado con epifluorescencia y fotografiados con un objetivo 40X. Se cuantificó el número de uniones focales en los grupos control y tratados.

In vivo:

- Para la obtención de un modelo murino de CCR se utilizaron ratones BALB/c que fueron tratados durante ocho semanas siguiendo un protocolo estándar de carcinogénesis que utiliza azoxymetano y dextran sulfato de sodio para inducir el desarrollo de tumores colorrectales (Neufert *et al.*, 2007). Transcurrido el tiempo de inducción los animales fueron divididos en un grupo control y un grupo tratado, al último se le administró como tratamiento M+P durante seis semanas en el agua de bebida (400 mg/kg/día y 7 mg/kg/día respectivamente). Luego los especímenes fueron sacrificados, se removió el colon y se cuantificó el número de tumores en ambos grupos. Para poner en relieve las formaciones tumorales, los intestinos se tiñeron con colorante azul de metileno 0,5% y se visualizaron bajo una lupa. A través de una prueba T se determinó si las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$).
- Para detectar diferencias en la proliferación celular entre los tumores control y tratados con M+P, se tomaron muestras de tumores colorrectales de especímenes de ambos grupos que fueron incluidas en tacos de parafina. Con un micrótopo se obtuvieron porciones de tejido de 6 micras que se fijaron en portaobjetos. El tejido fue sometido a un proceso de desparafinación, bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno, bloqueo de sitios inespecíficos con suero de caballo e incubación overnight en una dilución 1:400 de anticuerpo policlonal de conejo para Ki67 (Leica Biosystems). Posteriormente se lo incubó durante 30 minutos con una dilución 1:50 del anticuerpo secundario, se lavó con TBS y se incubó durante 30 minutos más con un complejo ABC. Para el revelado se utilizó DAB, se realizó una contratinación con hematoxilina y una posterior decoloración con una solución alcohol-ácida (70% etanol y 1% ácido clorhídrico). Finalmente el tejido fue deshidratado y montado con cubreobjeto. Las muestras se observaron bajo microscopio óptico con un objetivo de inmersión 100x. Se tomó igual número de fotos por porción de tejido, y se cuantificaron las células Ki67+ en cada campo. Se realizó una prueba T para determinar diferencias significativas entre el grupo tratado y control ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

A pesar de que los efectos del tratamiento con metformina y propanolol individualmente han sido caracterizados en algunos tipos de cáncer (Al-Wadei *et al.*, 2009; Dowling *et al.*, 2011; Pasquier

et al., 2011; Pierotti *et al.*, 2013), investigaciones recientes sobre el efecto de la combinación de M+P sobre un modelo “*in vivo*” de cáncer de mama mostraron que la combinación de estas drogas disminuye la velocidad de crecimiento de tumores de mama triple negativos murinos, prolongando la supervivencia de los animales sin generar efectos tóxicos, inhibiéndose además el desarrollo y crecimiento de metástasis pulmonares con mayor efectividad que los tratamientos individuales (Rico *et al.*, 2017).

En este trabajo se utilizaron un grupo de drogas que afectan el metabolismo celular para evaluar su impacto sobre la proliferación de la línea celular HCT116. Los tratamientos mostraron un efecto significativo ($p < 0,05$). La combinación de M+P expuso efectos más fuertes que los tratamientos individuales, incluso a bajas dosis de ambas drogas (**Figura 1**).

Dado el resultado de las combinaciones de las drogas M, P y CQ sobre la proliferación de la línea celular HCT116, se evaluó también su efecto sobre la línea HT29. Se detectaron diferencias significativas con respecto al crecimiento normal especialmente a dosis altas. Nuevamente el efecto más fuerte fue el de la combinación de M+P ($p < 0,05$; **Figura 2**).

Para validar si el tratamiento con M+P además de inhibir la proliferación celular, también era capaz de promover la muerte celular, se evaluó el efecto apoptótico de M+P a través del ensayo TUNEL sobre la línea celular HCT116, determinándose diferencias significativas entre el grupo tratado con M+P y el grupo control no tratado. Como control positivo se utilizaron células tratadas con 5-FU 5 μ M ($P < 0.001$; **Figura 4**). Adicionalmente, en un análisis preliminar de los niveles de apoptosis medidos por citometría de flujo también se observaron diferencias significativas del tratamiento de M+P con respecto al control ($p < 0,05$; **Figura 4**).

Los efectos sobre la muerte celular programada de los tratamientos con metformina y propranolol individualmente han sido estudiados en varios tipos de cáncer (Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011). El efecto de metformina sobre la apoptosis celular en colon, estaría relacionado con la sobreexpresión del receptor adenosina A1 (ADORA1) (Lan *et al.*, 2017), mientras que el propranolol involucra la sobreactivación de la ruta de las caspasa-3, -8, y -9 (Chin *et al.*, 2016).

Con el propósito de estimar de manera indirecta un posible efecto de la combinación M+P sobre la capacidad metastásica de las células derivadas de CCR, estudiamos el efecto de

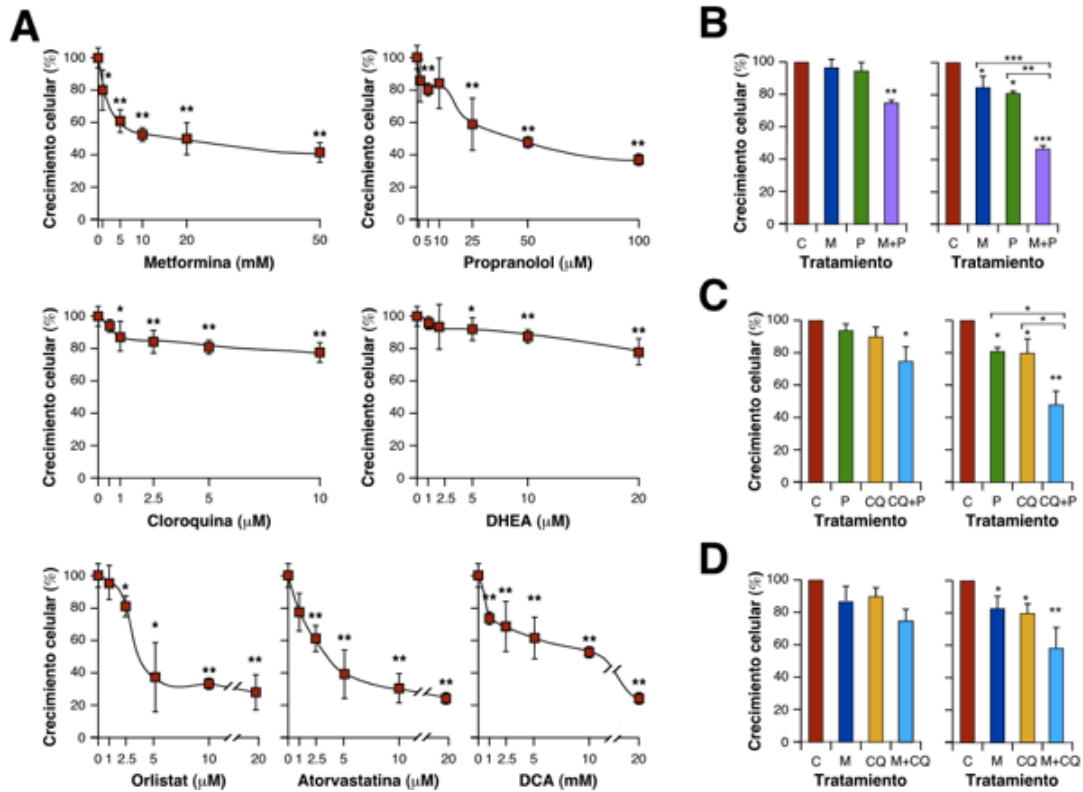


Figura 1. (A) Ensayos de proliferación de tratamientos individuales. **(B-D)** Análisis del efecto de la combinación de algunas drogas sobre el crecimiento celular. **B:** panel izquierdo, M 1mM y P 1 μ M; panel derecho, M 2.5mM y P 2.5 μ M. **C:** panel izquierdo, P 1 μ M y CQ 1 μ M; panel derecho, P 2.5 μ M y CQ 2.5 μ M. **D:** panel izquierdo, M 1mM y CQ 1 μ M; panel derecho, M 2.5mM y CQ 2.5 μ M. (n=3; * P<0.05. ** P<0.01. *** P<0.001).

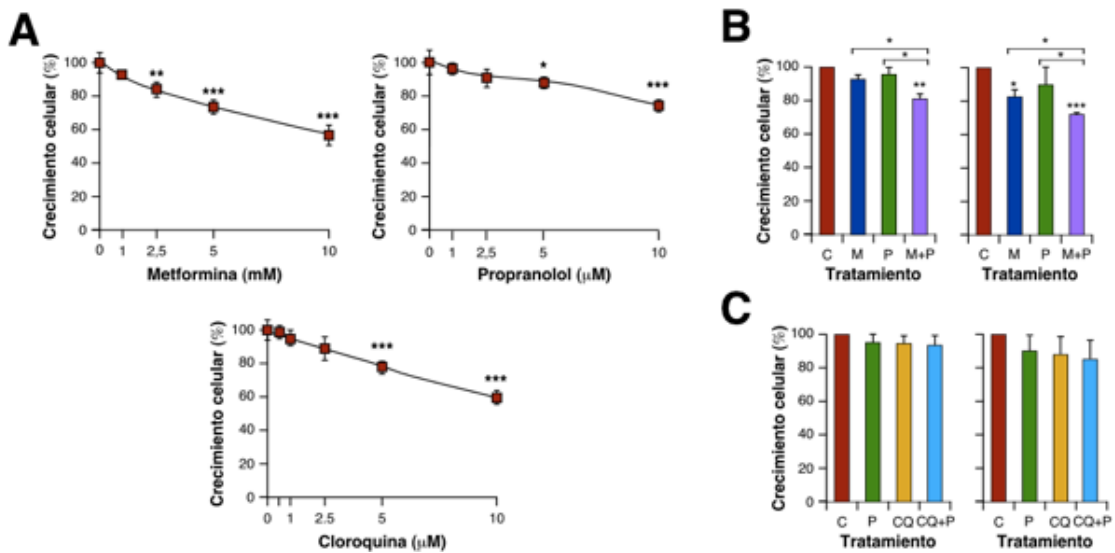


Figura 2. (A) Ensayos de proliferación de tratamientos individuales. **(B-C)** Análisis del efecto de la combinación de algunas drogas sobre el crecimiento de la línea celular HT29. **B:** panel izquierdo, M 1mM y P 1 μ M; panel derecho, M 2.5mM y P 2.5 μ M. **C:** panel izquierdo, P 1 μ M y CQ 1 μ M; panel derecho, P 2.5 μ M v CQ 2.5 μ M. (n=3; * P<0.05. ** P<0.01. *** P<0.001).

estas drogas sobre la capacidad migratoria celular a través de un ensayo de herida. Los resultados indicaron que la combinación de M+P indujo una reducción significativa en el comportamiento migratorio de la línea celular HCT116 que difirió de los tratamientos individuales. Efectos sobre la migración celular ya habían sido reportados en tratamientos con los fármacos por separado en varios tipos de cáncer, como líneas celulares de cáncer uterino (Lamy *et al.*, 2010; Sarfstein *et al.*, 2013), tiroideo (Han *et al.*, 2015) y de colon (Han *et al.*, 2015), entre otros (Figura 3).

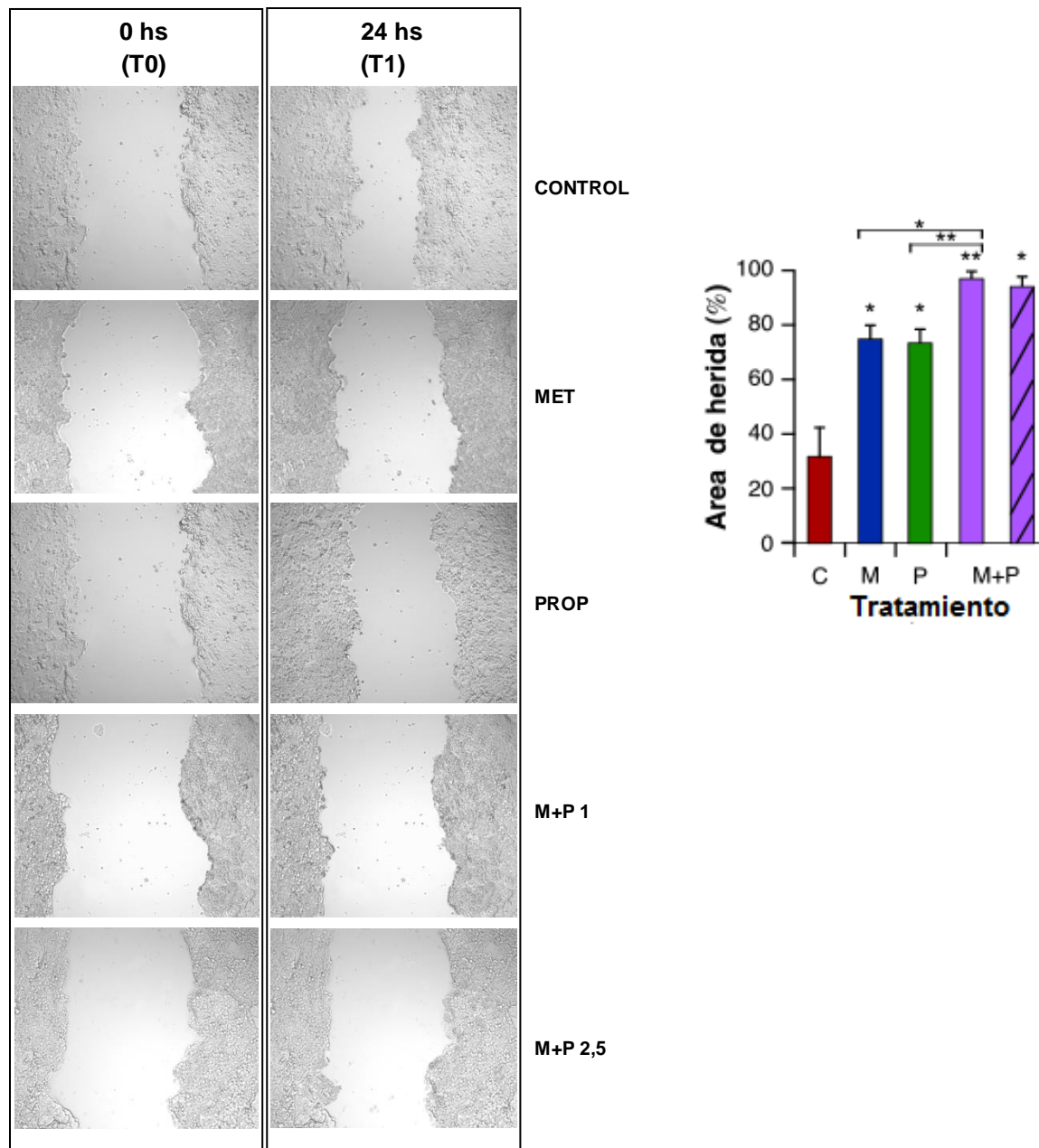


Figura 3. Ensayo de herida sobre una monocapa subconfluente de células HCT116. En el tiempo 0, se realizó una herida con un tip amarillo estéril, el cierre del área de herida se fotografió en un microscopio de células

Figura 4. Panel superior, imagen del resultado del ensayo enzimático TUNEL en células HCT116. Panel inferior izquierdo, cuantificación de células HCT116 TUNEL+ sin tratamiento (C) y tratadas con M+P (M:

F. 2,5mM; P 2,5µM). Se utilizó un grupo

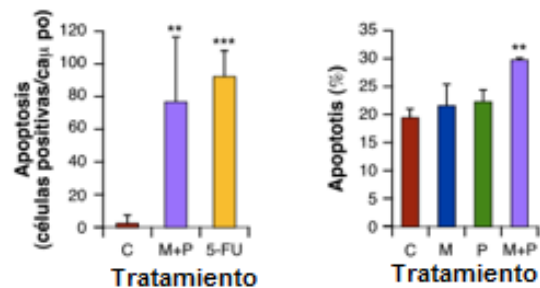
como control

de la derecha, análisis

de la combinación

de los fármacos medidos

(n=10000; **



Otro evento celular altamente asociado con la capacidad metastásica es la propiedad de las células de reordenar su citoesqueleto y soltarse de los puntos de adhesión que las mantiene unidas a la matriz extracelular. Para evaluar un posible efecto del tratamiento de M+P sobre el reordenamiento del citoesqueleto y la remoción de adhesiones focales, se realizaron inmunotinciones con el fin de visualizar las proteínas citoesqueléticas actina y tubulina, y las proteínas implicadas en el mantenimiento de adhesiones focales FAK y vinculina; observándose diferencias tanto en la disposición del esqueleto de actina como de microtúbulos, y en el número de adhesiones focales entre las células tratadas con M+P y el grupo control. Estas proteínas se encuentran ampliamente involucradas en la capacidad de migración celular y estarían

directamente relacionadas con el potencial metastásico de las células cancerígenas. A grande rasgos, las tinciones de FAK y vinculina permitieron visualizar un mayor número de adhesiones focales en las células tratadas con M+P ($p < 0,05$), lo que indirectamente permite inferir una reducción en su capacidad migratoria. Asimismo, en las tinciones de tubulina se observaron diferencias en la disposición de los microtubulos en las células tratadas (**Figura 5**).

Para estudiar el efecto “*in vivo*” de la combinación de M+P se generó un modelo de CCR químicamente inducido en un grupo de ratones BALB/c. Luego de la inducción los individuos fueron divididos en dos grupos: un grupo control y un grupo tratado con M+P. Al finalizar el tratamiento los especímenes se sacrificaron, el colon fue extirpado quirúrgicamente y se cuantifico el número de tumores en ambos grupos. Los resultados de la cuantificación establecieron diferencias significativas entre los tratamientos (**Figura 6**), observándose un menor número de tumores en el grupo tratado con respecto al control ($p < 0,05$).

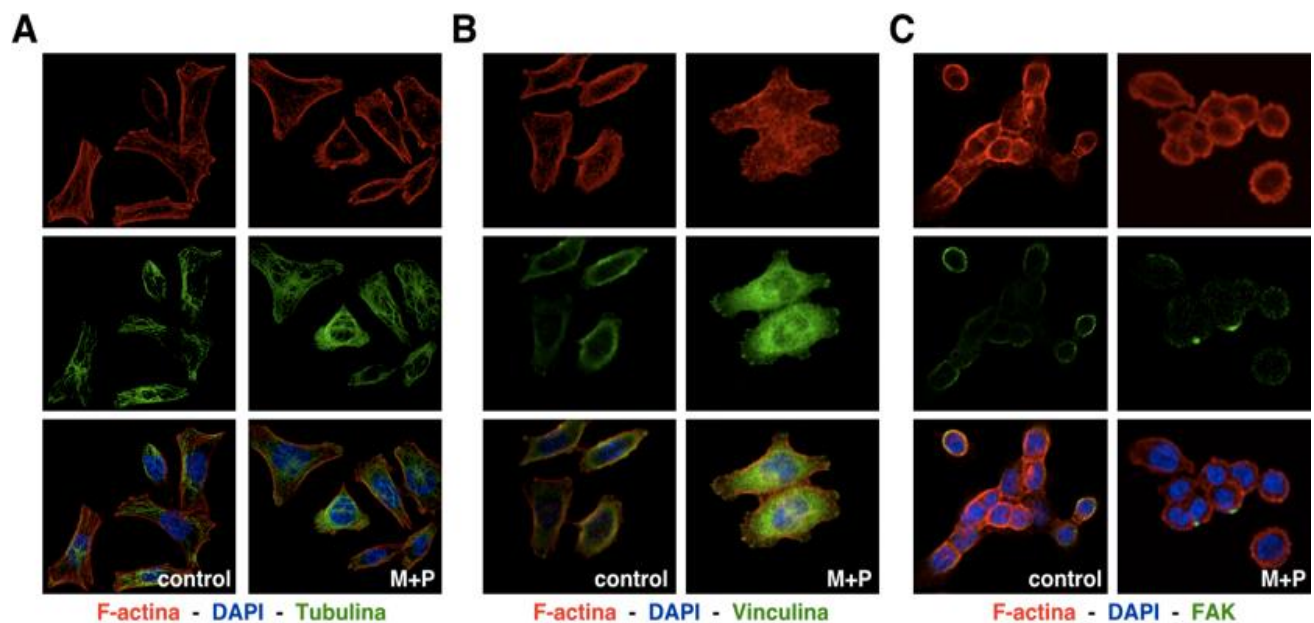
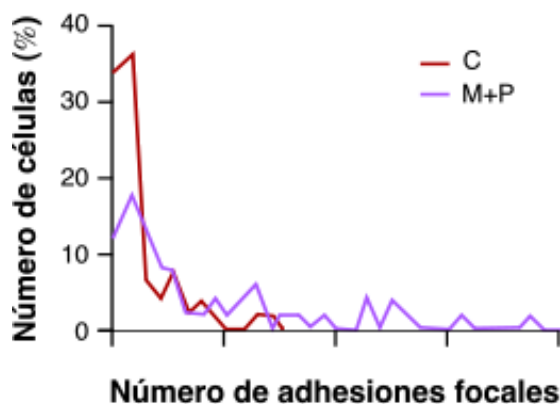


Figura 5. Inmunotinción de proteínas relacionadas con citoesqueleto y placas de adhesión focal en células control y tratadas con M+P. En todos los casos, la F-actina se visualiza en rojo mediante la tinción con faloidina-rodamina y los núcleos en azul con DAPI. Tubulina (**A**), Vinculina (**B**) y FAK (**C**) se detectaron en verde. En la figura D se observa el porcentaje de células en función del número de adhesiones focales para ambos tratamientos.



Por último, para evaluar la actividad proliferativa de las células tumorales se tomó una sección de tumor de animales del grupo control y tratado, en el que se realizó una inmunotinción del marcador de proliferación celular Ki67. La comparación estadística del número de células Ki67+ en ambos grupos arrojó un resultado significativo, observándose mayor cantidad de células proliferantes en los tumores colorrectales del grupo control con respecto al grupo tratado ($p < 0,05$; **Figura 7**).

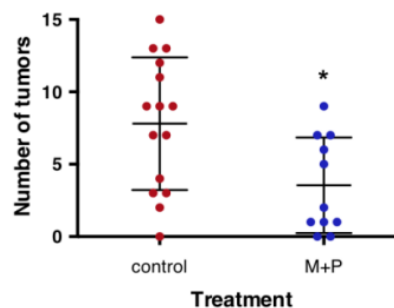


Figura 6. Cuantificación de tumores observados bajo el microscopio tanto en el intestino delgado como en el colon de ratones BALB / c después del protocolo de carcinogénesis con azoximetano / sulfato dextrano. Cada punto representa la cantidad de tumores de un animal individual. (C: $n = 15$; M + P: $n = 12$).

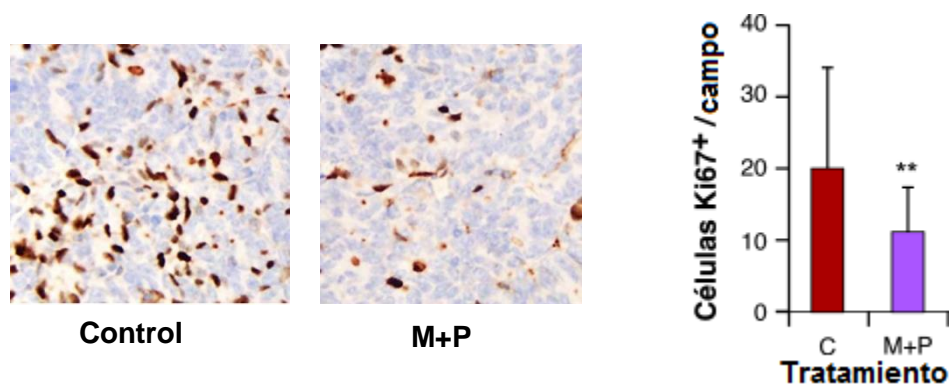


Figura 7. A la izquierda se observan imágenes tomadas bajo microscopio con objetivo de inmersión 100x de cortes de tumores colorrectales con inmunotinción del marcador de proliferación celular ki67. A la derecha el resultado de la cuantificación de células Ki 67 positivas en ambos grupos de tratamiento.

Conclusión

Nuestros resultados mostraron que fármacos utilizados para el tratamiento de otras patologías que afectan diferentes targets metabólicos celulares mostraron un efecto antiproliferativo en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer colorrectal. La combinación de M+P inhibió el crecimiento de dos líneas celulares de cáncer de colon, aumentando los niveles de apoptosis de las células tratadas, afectando los procesos de migración, y modificando el número de adhesiones focales en las células. Estudios previos en cáncer de mama habían descrito buenos resultados para el tratamiento con M+P; nuestras investigaciones mostraron además, un efecto antiproliferativo del tratamiento en un modelo *in vivo* de cáncer colorrectal en el que redujo significativamente el número de tumores del grupo tratado.

A futuro, una caracterización más profunda del efecto de esta combinación de fármacos en reposicionamiento en modelos de CCR permitiría sugerir el uso de los mismos como un tratamiento alternativo del CCR, o como tratamiento preventivo en patologías con síndrome de poliposis intestinal. Del mismo modo, la evaluación de nuevas combinaciones de drogas en reposicionamiento con efectos sobre distintas vías metabólicas en otras líneas celulares de CCR contribuiría al avance en el desarrollo de nuevos tratamientos en la terapia contra el cáncer.

Bibliografía

Al-Wadei, H. A., Al-Wadei, M. H., & Schuller, H. M. (2009). Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. *Anti-cancer drugs*, 20(6), 477.

- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85.
- Chin, C. C., Li, J. M., Lee, K. F., Huang, Y. C., Wang, K. C., Lai, H. C., Shi, C. S. (2016). Selective β 2-AR Blockage Suppresses Colorectal Cancer Growth Through Regulation of EGFR-Akt/ERK1/2 Signaling, G1-Phase Arrest, and Apoptosis. *Journal of cellular physiology*, 231(2), 459-472.
- Dowling, R. J., Goodwin, P. J., & Stambolic, V. (2011). Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC medicine*, 9(1), 33.
- Grainger, D. (2015). Why Too Many Clinical Trials Fail—and a Simple Solution that Could Increase Returns on Pharma R&D.
- Gualdrini, U., & Iummato, L. (2011). Cáncer colorrectal en la Argentina Organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. *Informe final de diciembre de*.
- Han, B., Cui, H., Kang, L., Zhang, X., Jin, Z., Lu, L., & Fan, Z. (2015). Metformin inhibits thyroid cancer cell growth, migration, and EMT through the mTOR pathway. *Tumor Biology*, 36(8), 6295-6304.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792.
- Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., & Isaka, Y. (2013). Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer research*, 73(1), 3-7.
- Lai, G. M., Moscow, J. A., Alvarez, M. G., Fojo, A. T., & Bates, S. E. (1991). Contribution of glutathione and glutathione-dependent enzymes in the reversal of adriamycin resistance in colon carcinoma cell lines. *International journal of cancer*, 49(5), 688-695.
- Lamy, S., Lachambre, M.-P., Lord-Dufour, S., & Béliveau, R. (2010). Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascular pharmacology*, 53(5-6), 200-208.
- Lan, B., Zhang, J., Zhang, P., Zhang, W., Yang, S., Lu, D., Dai, Q. (2017). Metformin suppresses CRC growth by inducing apoptosis via ADORA1. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 22, 248-257.
- Mohs, R. C., & Greig, N. H. (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(4), 651-657.
- Neufert, C., Becker, C., & Neurath, M. F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols*, 2(8), 1998.
- Pantziarka, P., Bouche, G., Sukhatme, V., Meheus, L., Rooman, I., & Sukhatme, V. P. (2016). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—Propranolol as an anti-cancer agent. *ecancermedicalscience*, 10.
- Pasquier, E., Ciccolini, J., Carre, M., Giacometti, S., Fanciullino, R., Pouchy, C., . . . André, N. (2011). Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget*, 2(10), 797.
- Pierotti, M., Berrino, F., Gariboldi, M., Melani, C., Mogavero, A., Negri, T., . . . Pilotti, S. (2013). Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene*, 32(12), 1475.
- Raguz, S., & Yagüe, E. (2008). Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. *British journal of cancer*, 99(3), 387.
- Rico, M., Baglioni, M., Bondarenko, M., Laluece, N. C., Rozados, V., Nicolas, A., Márquez, M. M. (2017). Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models. *Oncotarget*, 8(2), 2874.

- Salani, B., Del Rio, A., Marini, C., Sambuceti, G., Cordera, R., & Maggi, D. C. (2014). Metformin, cancer and glucose metabolism. *Endocrine-related cancer*, ERC-14-0284.
- Sarfstein, R., Friedman, Y., Attias-Geva, Z., Fishman, A., Bruchim, I., & Werner, H. (2013). Metformin downregulates the insulin/IGF-I signaling pathway and inhibits different uterine serous carcinoma (USC) cells proliferation and migration in p53-dependent or-independent manners. *PloS one*, 8(4), e61537.
- Soga, T. (2013). Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer science*, 104(3), 275-281.
- Wang, L.-W., Li, Z.-S., Zou, D.-W., Jin, Z.-D., Gao, J., & Xu, G.-M. (2008). Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World journal of gastroenterology*, 14(47), 7192.
- Wishart, D. S. (2015). Is cancer a genetic disease or a metabolic disease? *EBioMedicine*, 2(6), 478-479.
- Wu, N., Gu, C., Gu, H., Hu, H., Han, Y., & Li, Q. (2011). Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p38 MAPK pathway and GADD153. *Neoplasma*, 58(6), 482-490.
- Yang, Z., Xiao, H., Jin, H., Koo, P. T., Tsang, D. J., & Yang, C. S. (2010). Synergistic actions of atorvastatin with γ -tocotrienol and celecoxib against human colon cancer HT29 and HCT116 cells. *International journal of cancer*, 126(4), 852-863.
- Zhao, Y., Butler, E. B., & Tan, M. (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell death & disease*, 4(3), e532.

Financiamiento

