



GMD Facultad Cs. Médicas
Biblioteca
TDM 2321



FCM Facultad de Ciencias
Médicas · UNR

REPOSICIONAMIENTO DE DROGAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER. NUEVOS USOS PARA DROGAS CONOCIDAS

Lic. M. Virginia Baglioni

Director: Dr. Menacho Márquez, Mauricio A.

Co-directora: Dra. Rico, M. José

Instituto de Genética Experimental

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Rosario

Santa Fe 3100

Rosario - Argentina





FCM Facultad de Ciencias
Médicas · UNR

Tesis doctoral

Reposicionamiento de drogas para el tratamiento del cáncer. Nuevos usos para drogas conocidas

Lic. M. Virginia Baglioni

Director: Dr. Menacho Márquez, Mauricio A.

Co-directora: Dra. Rico, M. José

2020

Instituto de Genética Experimental
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
Cáncer	4
Características de la célula tumoral	5
Desarrollo de metástasis	7
Cáncer de Mama	9
Modalidades Terapéuticas	11
Reposicionamiento de Fármacos	13
Metformina	16
Propranolol	18
Cloroquina	20
Dehidroepiandrosterona	21
Orlistat	22
Doxiciclina	23
Albendazol - Ricobendazol	23
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
<i>in vitro</i>	25
<i>in vivo</i>	25
Hipótesis de Trabajo	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Ensayos <i>in vitro</i>	26
Fármacos	26
Cultivo de líneas celulares y células derivadas de tumor	27
Ensayo de proliferación	27
Cálculo de IC50	28
Ensayo de clonogenicidad	29
Determinación de apoptosis	29
Análisis del metabolismo celular en tiempo real	30
Ensayo de migración	31
Ensayo de invasión en matrigel	31
Western blot	32
Ensayos <i>in vivo</i>	33
Animales	33
Estudio del efecto antitumoral	33
Estudio de la supervivencia	34
Obtención de muestras	35
Estudio de la toxicidad	35
Estudios inmunohistoquímicos	35
Cuantificación de linfocitos circulantes e intratumorales	36
Efecto del tratamiento sobre el desarrollo de metástasis experimentales	37
Estudio de la cascada metastásica: INTRAVASACIÓN	38
Estudio de la cascada metastásica: SUPERVIVENCIA y EXTRAVASACIÓN	39

Estudio de la cascada metastásica: PROLIFERACIÓN EN UN NICHOS SECUNDARIO _____	40
Modelo para la evaluación de terapia adyuvante _____	40
Análisis estadístico _____	40
RESULTADOS _____	42
Estudios <i>in vitro</i> de la quimiosensibilidad a fármacos en reposicionamiento _____	42
Análisis del efecto de fármacos en reposicionamiento sobre la proliferación de la línea celular 4T1	42
Estudio del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la proliferación de otras células tumorales de cáncer de mama triple negativo _____	44
Exploración del efecto del tratamiento sobre la activación de la vía de MAP quinasas _____	46
Análisis del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre células no tumorales _____	47
Evaluación del efecto de metformina, propranolol y cloroquina administradas en forma crónica _____	48
Análisis del efecto combinado de metformina, propranolol y cloroquina _____	48
Análisis del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la muerte celular _____	50
Estudio del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la capacidad clonogénica de las líneas celulares 4T1 y MDA-MB-231 _____	51
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la bioenergética mitocondrial _____	53
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la glucólisis _____	54
Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los fármacos en reposicionamiento sobre eventos relacionados con el desarrollo de metástasis _____	56
Análisis del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la migración celular _____	56
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la invasión celular _____	58
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la expresión de marcadores asociados a la transición epitelio mesénquima _____	58
Estudios <i>in vivo</i> del efecto antitumoral de los fármacos en reposicionamiento _____	59
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la evolución del volumen tumoral _____	59
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la supervivencia _____	61
Estudio de la toxicidad asociada a metformina y propranolol _____	62
Análisis del efecto de cloroquina y propranolol sobre la evolución del volumen tumoral _____	63
Análisis del efecto de cloroquina y propranolol sobre la supervivencia _____	64
Estudio de la toxicidad asociada a cloroquina y propranolol _____	65
Análisis histológico e inmunohistoquímicos _____	66
Determinación de la proliferación y apoptosis _____	67
Determinación del contenido de células madre del cáncer en tumor _____	68
Determinación del área tumoral vascularizada _____	69
Análisis de poblaciones linfocitarias circulantes e intratumorales _____	69
Estudios <i>in vivo</i> del efecto antimetastático de los tratamientos _____	71
Análisis del efecto de los fármacos reposicionados sobre el desarrollo de metástasis espontáneas	71
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre el desarrollo de metástasis experimentales	73
Efecto del tratamiento con metformina y propranolol sobre la cascada metastásica _____	74
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre el proceso de intravasación _____	74
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la supervivencia de células tumorales en sangre y su extravasación _____	75
Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la proliferación de las células tumorales en pulmones _____	76
Evaluación del efecto de metformina y propranolol como terapia adyuvante _____	77
Trabajos en Colaboración _____	79
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES _____	81
BIBLIOGRAFÍA _____	106
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA _____	112

Agradecimientos

Me toca terminar mi tesis doctoral luego de un año muy particular, nunca imaginé que el final de este camino iba a ser de esta manera. Aun así, son muchos los que compartieron conmigo el recorrido de todos estos años, por lo que tengo palabras de agradecimiento hacia muchas personas! El resultado de este trabajo doctoral no hubiese sido tal sin la ayuda y colaboración de ellos.

Gracias a mis directores, por confiar en mí, darme la libertad de trabajar y por la paciencia que tuvieron cuando hizo falta. A Jose por su ayuda y sus consejos, y a Mauri, con quien a pesar de no haber compartido el día a día, siempre se las arregló para estar presente y pendiente de mi trabajo.

Gracias a todo el grupo del IGE, con quienes trabajamos en equipo y disfrutamos muchísimo el día a día. Gracias a todos por el granito de arena que cada uno aportó, a su manera, para lograr sacar este trabajo adelante.

Mención especial para los de abajo, fueron muchos estudiantes y tesinistas a lo largo de estos años. Anto fue mi compañera de escritorio y mi amiga, los días no hubiesen sido igual sin sus mates. Gracias a Geor, Cin y Caro por dejarme enseñarles lo que sé; no solo ustedes aprendieron lo que yo les pude haber enseñado, yo también aprendí muchísimo de ustedes. Cele, Mati y Ro, con quienes compartimos estos últimos años.

Gracias a quienes me aceptaron en sus grupos de trabajo en algún momento para trabajar en colaboración y a quienes me prestaron más de una vez un equipo para realizar mis experimentos.

Gracias a mi familia porque ellos sentaron las bases de lo que soy hoy, a Esteban que a pesar de cuestionarme, en el fondo se siente orgulloso y a los amigos que creen en mí y se interesan en mi trabajo.

Por decisiones que deben tomarse en la vida, dejo el proyecto con muchos objetivos por delante todavía; en este tiempo, coseché muchas cosas buenas y también espero haber aportado mi parte para que lo que hicimos en la mesada, llegue en algún momento a los pacientes.

Me llevo recuerdos hermosos y la certeza que durante el doctorado no solo me formé profesionalmente sino también, maduré como persona.

Eternamente gracias!

ABREVIATURAS

- 2-DG:** 2-desoxi-D-glucosa, derivado análogo de la glucosa que tiene el radical 2-hidroxilo sustituido por un hidrógeno
- 4EBP:** Proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E
- ABC:** Área bajo la curva
- ABZ:** Albendazol
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- Akt:** También: PKB, Proteína quinasa B
- AMPK:** Proteína quinasa dependiente de AMP (*Del inglés: AMP-inducible protein kinase*)
- APC:** Gen supresor de tumores, regulador de la vía de señalización Wnt (*Del inglés: Adenomatous polyposis coli*)
- BRCA:** Gen supresor de tumores, asociado a la reparación de ADN (*Del inglés: Breast Cancer*)
- CD:** Ciclodextrina
- CSC:** Células madre del cáncer (*Del inglés: Cancer Stem Cells*)
- CQ:** Cloroquina
- DHEA:** Dehidroepiandrosterona
- DM2:** Diabetes mellitus tipo 2
- DMT:** Dosis máxima tolerada
- Doxi:** Doxiciclina
- ECAR:** Tasa de acidificación extracelular (*Del inglés: Extracellular Acidification Rate*)
- EMT:** Transición epitelio mesénquima (*Del inglés: Epithelial Mesenchymal Transition*)
- ER:** Receptor de estrógeno (*Del inglés: Estrogen Receptor*)
- FASN:** Ácido graso sintasa (*Del inglés: Fatty acid synthase*)
- FCCP:** Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
- HER2:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (*Del inglés: Human Epidermal growth factor Receptor 2*)
- HIF-1 α :** Factor inducible por hipoxia 1 α (*Del inglés: Hypoxia-inducible factor 1-alpha*)
- I:** Insulina
- IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Del inglés: Insulin-Like Growth Factor 1*)
- IL-17:** Interleuquina 17
- KRAS:** Protooncogen, codifica la proteína KRAS que participa en vías de señalización celular que controlan el crecimiento, la maduración y la muerte celular.
- Met:** Metformina
- MMP:** Metaloproteínasa de la matriz extracelular (*Del inglés: Matrix metalloproteinase*)
- mTOR:** Diana de rapamicina en mamíferos (*Del inglés: Mammalian Target of Rapamycin*)
- OCR:** Tasa de consumo de oxígeno
- ON:** Durante la noche (*Del inglés: overnight*)
- Orl:** Orlistat
- PARP:** Poli-ADP-ribosa polimerasa
- PBS:** Solución tamponada con fosfato
- PI3K:** Fosfatidilinositol 3-quinasa (*Del inglés: Phosphatidylinositol 3-kinase*)
- PR:** Receptor de progesterona (*Del inglés: Progesterone Receptor*)
- Prop:** Propranolol
- RBZ:** Ricobendazol
- SFB:** Suero fetal bovino
- TNBC:** Tumores de mama triple negativos
- Treg:** Célula T reguladora
- VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular (*Del inglés: Vascular Endothelial Cell Growth Factor*)
- QTM:** Quimioterapia metronómica

RESUMEN

Según estimaciones realizadas por la IARC (International Association of Cancer Registries), Argentina se encuentra dentro del rango de países con una incidencia de cáncer media-alta, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia en mujeres. Se considera al cáncer de mama como una enfermedad heterogénea ya que no todos los tumores de mama tienen un comportamiento biológico similar y no todas las pacientes responden de la misma forma a las terapias. El cáncer de mama triple negativo (TNBC) representa del 12-17% de los tumores de mama, pero es responsable de un alto porcentaje de muertes debido a su agresividad. Afecta principalmente a mujeres jóvenes y es difícil de tratar ya que existen pocas opciones de tratamiento eficaces dadas sus características moleculares. Dentro de las opciones de tratamiento que se utilizan actualmente para TNBC se encuentran la cirugía combinada con quimioterapia adyuvante y/o neoadyuvante y radioterapia.

En general, el tratamiento del cáncer se basa en estrategias de control local y sistémico, pero los pacientes oncológicos se encuentran expuestos a los severos efectos tóxicos que generan. A su vez, el desarrollo de nuevos fármacos oncológicos es uno de los grandes desafíos de la medicina moderna, ya que la mayoría de los potenciales fármacos antitumorales suele fracasar en los ensayos clínicos y no logran llegar al mercado; además, los tratamientos más efectivos y novedosos poseen un alto precio que los hace inaccesibles para los pacientes oncológicos de países de medianos y bajos recursos. Todo esto ha despertado un interés en la búsqueda de alternativas más costeables y menos tóxicas. La estrategia conocida como “reposicionamiento de fármacos” consiste en estudiar medicamentos existentes en el mercado e indicados para enfermedades distintas al cáncer, que podrían tener un efecto antitumoral. Una vez descubierto el efecto potencial contra el cáncer, se pueden iniciar los ensayos clínicos en pacientes, acortándose el tiempo y el costo final al público ya que estos medicamentos se encuentran disponibles como genéricos. Actualmente existe un proyecto llamado reposicionamiento de drogas en oncología (ReDO, del inglés *Repurposing Drugs in Oncology*) donde se han descrito más de 200 medicamentos que podrían reposicionarse en distintos tipos

de cáncer ya que han mostrado efecto antitumoral en estudios *in vitro*, *in vivo* o en humanos, donde se ha visto que algunos de ellos administrados en combinación con quimioterapéuticos convencionales, han logrado mejorar la eficacia del tratamiento.

En este trabajo se evaluó *in vitro* el efecto antitumoral de los fármacos en reposicionamiento metformina, propranolol, cloroquina, DHEA, orlistat, doxiciclina y albendazol. En primer lugar, sobre diferentes líneas celulares de TNBC, se realizó un screening del efecto de estos fármacos sobre la proliferación celular para seleccionar el/los fármacos más efectivos. Luego se evaluó el efecto de los fármacos elegidos, sobre diferentes procesos implicados en el desarrollo de TNBC y metástasis pulmonares (clonogenicidad, apoptosis, migración, invasión). A partir de los resultados obtenidos *in vitro*, con las combinaciones de fármacos más efectivas se evaluó, en modelos inmunocompetentes de TNBC, el efecto de los tratamientos sobre la velocidad de crecimiento tumoral, la supervivencia de los animales y el desarrollo de metástasis pulmonares, analizando el efecto de los tratamientos sobre la respuesta inmune y el contenido de células madre tumorales, terminando por caracterizar el efecto del tratamiento sobre los diferentes pasos que conducen a las metástasis pulmonares y evaluando su efecto como terapia adyuvante. Los resultados obtenidos constituyen el fundamento experimental que sostiene una propuesta terapéutica novedosa consistente en una combinación de fármacos reposicionados para el tratamiento adyuvante de TNBC, evitando la toxicidad asociada a las quimioterapias convencionales y, a la vez, brindando un tratamiento de bajo costo que resultaría especialmente beneficioso para los sistemas de salud de países de bajos y medianos ingresos.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad crónica que comienza en una célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso de múltiples etapas, dado por la acumulación de alteraciones que afectan la estructura y función del genoma. El número de alteraciones genéticas aumenta a medida que las células proliferan, incrementando así la malignidad de la enfermedad. Estas alteraciones genéticas pueden ser mutaciones heredadas o generarse *de novo* por daño en el ADN [1]. La comprensión actual del número y la especificidad tisular de las mutaciones aun es limitada, pero por lo general, cada tipo de tumor va acompañado de mutaciones específicas, como por ejemplo, alteraciones en los genes *BCRA1* y *BCRA2* en cáncer de mama y ovario, alteraciones en *APC* y *KRAS* en cáncer colorrectal y pancreático, entre otras; de aquí que el cáncer suele definirse no como una, sino como varias enfermedades diferentes [2].

Las células normales cuentan con mecanismos para minimizar la inestabilidad genómica y de este modo logran un equilibrio entre el crecimiento y la muerte celular. En las células cancerosas, el ADN dañado no se repara y la célula no muere cuando debería, por lo que continúa originando nuevas células con el mismo daño y a medida que el tumor progresa se seleccionan subpoblaciones celulares cada vez más malignas, resistentes y heterogéneas [1].

Según las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) en base a datos disponibles a nivel mundial para el año 2018, Argentina se posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta. Presenta una tasa de incidencia de 212 casos por 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción del cáncer de piel no-melanoma), ubicándose en el séptimo lugar en Latinoamérica. Esta estimación corresponde a más de 125.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. El cáncer de mayor incidencia se presenta en mujeres y es el de mama, con una tasa de 73 casos por cada

100.000 mujeres. Luego, lo siguen los tumores de próstata (42 casos/100.000 varones) y colorrectal en hombres (31 casos/100.000 varones) [3].

Características de la célula tumoral

Hace ya una década que Hanahan y Weinberg describieron una serie de características implicadas en el desarrollo del cáncer, que permiten distinguir las células tumorales de células normales y se detallan en la **Figura 1**. Entre ellas se encuentran la resistencia a factores inhibidores del crecimiento, la proliferación sostenida en ausencia de factores de crecimiento exógenos, la evasión de la apoptosis, la reprogramación metabólica, el potencial de replicación ilimitado a través de la expresión de la telomerasa, la inducción de la angiogénesis, la evasión del sistema inmune, invasión y desarrollo de metástasis [4].



Figura 1: Características de la célula tumoral. El reconocimiento de las características que distinguen una célula normal de una tumoral es importante a la hora de desarrollar nuevos medios para tratar el cáncer. Adaptado de [4] y modificado en BioRender.com.

Todas estas características hoy en día, constituyen el blanco de múltiples investigaciones con la finalidad de desarrollar nuevas terapias dirigidas específicamente a ellas.

Por su parte, el proceso angiogénico juega un papel crucial en la progresión tumoral, se produce cuando el tumor adquiere unos pocos milímetros y comienza a requerir vascularización propia para el ingreso de oxígeno y nutrientes que le permitan

seguir proliferando. Las células tumorales secretan altos niveles de factores proangiogénicos que contribuyen a la creación de una red vascular anormal que se caracteriza por vasos sanguíneos desorganizados, inmaduros y permeables. Entre los estímulos que lo desencadenan, la hipoxia es uno de los principales ya que, cuando el oxígeno es limitante, la producción de ATP se ve comprometida y se forman especies reactivas del oxígeno que, en altas dosis, causan un gran daño celular [5].

En cuanto al sistema inmunológico, este desempeña un rol indispensable en el mantenimiento de la integridad de un organismo. Además de la protección contra patógenos, está fuertemente involucrado en la prevención, el desarrollo y la defensa del cáncer. Existe evidencia que indica que la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, nos protege frente al desarrollo de tumores, sin embargo, la realidad demuestra que, los tumores crecen aun en presencia de un sistema inmune funcional, logrando evadir la respuesta inmune del paciente. Los tumores altamente inmunogénicos logran evitar la destrucción inmune al impedir la acción de los componentes del sistema inmunológico que fueron enviados para eliminarlos [6]. Algunas de las células inmunes que infiltran el tumor son: linfocitos T citotóxicos CD8⁺ que atacan a las células tumorales e inducen su muerte. Su infiltración en el microambiente tumoral se asocia con un buen pronóstico y supervivencia prolongada en muchos tipos de cáncer, entre ellos el de mama [6, 7]; linfocitos T cooperadores CD4⁺, una de sus subpoblaciones, las células Th17, se caracterizan por una alta secreción de interleuquina-17 (IL-17) y otras citoquinas inflamatorias para mediar respuestas inmunitarias antitumorales; células T reguladoras Foxp3⁺ (Treg) comprometen la activación y/o función de la inmunidad antitumoral y, por ello, ciertos tumores promueven su reclutamiento, expansión y activación [6].

En particular, la reprogramación metabólica le permite a la célula tumoral exhibir fenotipos metabólicos distintos para sostener su proliferación y progresión dentro del microambiente tumoral. El proceso de reprogramación metabólica por el que transcurre la célula tumoral está asociado a la activación de oncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumores; hoy en día se sabe que los productos de estos genes mutados pueden influir en la forma en que las células tumorales

metabolizan la glucosa para generar ATP [8]. Los avances que se han dado en la comprensión de la biología tumoral, nos demuestran que el cáncer es una enfermedad compleja y no se puede entender a través de la simple investigación de las mutaciones genéticas de las células tumorales, dado que estas células no se encuentran aisladas en el tumor, sino que interactúan con el microambiente circundante por lo que continuamente deben desarrollar rasgos que favorezcan su crecimiento, supervivencia y metástasis en este ambiente de constante cambio. Dentro de las características más conocidas de las células tumorales, se destaca la de utilizar altas cantidades de glucosa convirtiéndola en piruvato y luego en lactato en el citosol, en lugar de oxidar el piruvato en las mitocondrias como se da en las células normales. Estas últimas, solo convierten glucosa en lactato en condiciones hipóxicas, mientras que este fenotipo es común en las células cancerosas, aún frente a la disponibilidad de oxígeno. Este fenotipo fue descrito por primera vez por Otto Warburg hace más de cincuenta años y fue denominado "Efecto Warburg" o glucólisis aeróbica [9, 10]. No existe un único metabolismo específico del tumor, si no que existen varios programas metabólicos para apoyar la proliferación de sus células. La necesidad de producir ATP para la supervivencia de todas las células, y la capacidad de convertir nutrientes en biomasa es crucial en los tumores, por lo que resulta de interés atacar los procesos biosintéticos en las células cancerosas como una estrategia para mejorar la terapia contra el cáncer [11].

Desarrollo de metástasis

Una metástasis es el resultado del crecimiento secundario de un tumor, es decir, se produce en un órgano o tejido diferente al del tumor primario y está formada por el mismo tipo de células que las del tumor que le dio origen. El proceso de desarrollo de metástasis consta de múltiples etapas secuenciales e interrelacionadas durante las cuales las células malignas se desprenden del tumor primario y migran e invaden órganos cercanos o distantes. Este proceso recibe el nombre de cascada metastásica (**Figura 2**), el cual comienza con la pérdida de adhesión de las células tumorales y su migración fuera del tumor primario e invasión al tejido circundante. La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso normalmente involucrado en la embriogénesis, morfogénesis tisular y sanación de heridas, donde las células epiteliales sufren modificaciones en su forma y reprograman la expresión génica de

modo que adquieren movilidad y un fenotipo invasivo. Todas estas características lo transforman en un proceso clave en la cascada de invasión-metástasis, ya que mediante la EMT las células epiteliales transformadas adquieren las capacidades de invadir, resistir a la apoptosis y diseminarse [12].

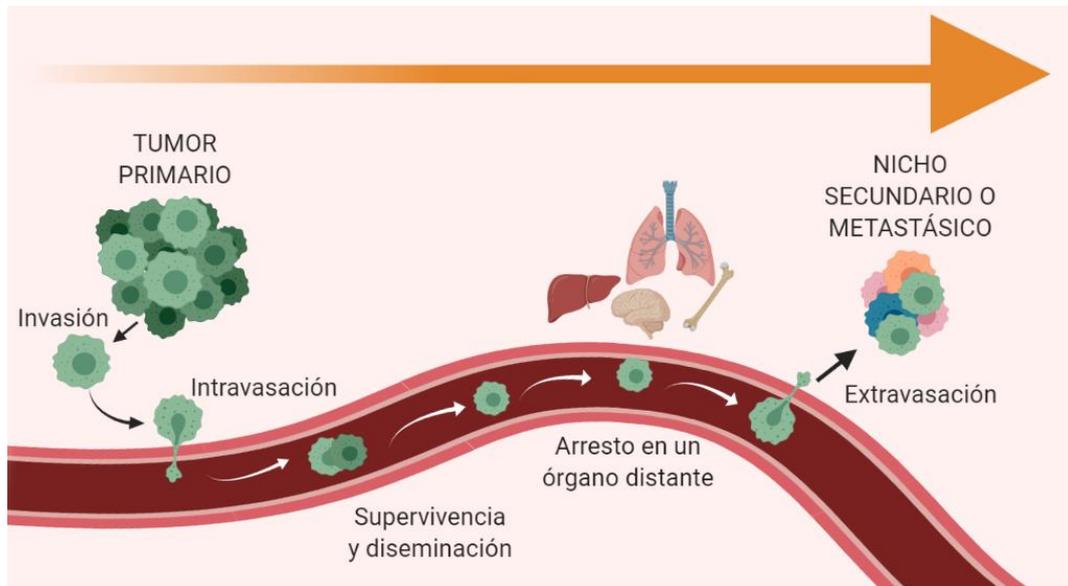


Figura 2: Cascada metastásica. Las metástasis se producen a través de una serie de pasos en que las células tumorales abandonan el sitio original del tumor y se transportan a otras partes del cuerpo a través de la circulación sanguínea o linfática. Creado con BioRender.com

Durante el proceso de metástasis, las células tumorales ingresan al torrente sanguíneo o a la circulación linfática, con lo que logran diseminarse por todo el cuerpo. A partir de aquí, tienen que sobrevivir a duras condiciones en el torrente sanguíneo y hacer frente, entre otras cosas, a la vigilancia inmunológica. En un sitio secundario, las células tumorales se adhieren al endotelio de un nuevo órgano, extravasan y migran al nuevo tejido. Al llegar al "nicho secundario o metastásico", ingresan en un estado celular latente como células tumorales diseminadas individuales o como micrometástasis multicelulares que al comenzar a proliferar forman las metástasis macroscópicas. A pesar de que solo el 0,01% de las células tumorales que ingresan a la circulación sistémica logran completar todos estos pasos, el desarrollo de metástasis es la causa de más del 90% de las muertes asociadas al cáncer [13], por lo que resulta fundamental desarrollar tratamientos que no solo batallen contra el tumor primario, sino que también sean capaces de combatir el desarrollo de metástasis.

Las etapas de la cascada metastásica son las mismas para todo tipo de tumor, pero se sabe que diferentes tipos de tumores pueden formar metástasis en los mismos tejidos o en otros diferentes. Se ha visto que algunos tumores tienen un espectro más restringido de órganos diana que otros, lo que se conoce como organotropismo metastásico. Esto puede deberse a que el microambiente del huésped y el proceso de adaptación que experimentan las células tumorales invasoras juegan un papel importante en la extravasación y colonización de sitios específicos [14]. Por ejemplo, los tumores de mama y pulmón presentan un esquema similar de órganos donde desarrollan metástasis como hueso, pulmón, hígado y cerebro, a pesar de que la cinética de metástasis difiere entre estos dos tipos de tumores, ya que el cáncer de pulmón establece micrometástasis mucho más rápido que el cáncer de mama. Por otra parte, las metástasis de tumores de próstata se limitan en gran parte al hueso y las metástasis de páncreas y colon es común encontrarlas en hígado o pulmones [15].

CÁNCER DE MAMA

Según las estimaciones del Observatorio Global de Cáncer de la OMS para 2018, el cáncer de mama es el de mayor magnitud en cuanto a ocurrencia en nuestro país: con un volumen de más de 21.000 casos al año, representa el 17% de todos los tumores malignos y casi un tercio de los cánceres femeninos. El cáncer de mama afecta mayoritariamente a mujeres de entre 45 y 70 años de edad; también afecta a los hombres, pero en forma menos frecuente. Más del 75% de las mujeres con cáncer de mama no tienen antecedentes familiares de dicha enfermedad por lo que la detección temprana es fundamental para aumentar las probabilidades de curación [2].

Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, entre los que se incluyen edad, raza, edad de la menarca, edad del primer parto y antecedentes de familiares directos con cáncer de mama. Dentro de las mutaciones genéticas encontradas en mujeres con cáncer de mama las más comunes ocurren en genes de alta penetrancia como *p53*, *PTEN*, *BCRA1* y *BRCA2*. Las mutaciones en estos últimos dos confieren un riesgo de por vida de entre el 60 y 80% de desarrollo

de cáncer de mama y están asociadas con otras neoplasias malignas, como cáncer de ovario [16, 17].

Se considera al cáncer de mama como una enfermedad heterogénea, ya que no todos los tumores de mama tienen un comportamiento biológico similar debido a que las pacientes tienden a tener diferentes respuestas a las terapias y resultados clínicos variables a pesar de haber sido diagnosticadas en el mismo estadio tumoral. La clasificación del cáncer de mama involucra la evaluación de criterios histológicos, basados en la morfología y en su análisis inmunohistoquímico. Estos análisis permiten identificar cada subtipo tumoral a partir de la muestra histológica obtenida en la biopsia (**Tabla I**). Los marcadores analizados de rutina son: el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el índice de proliferación indicado por Ki67 [18].

Subtipo molecular de tumor de mama				
Luminal A (50%)	Luminal B (15%)		HER2 sobreexpresado (15-30%)	Triple negativo (12-17%)
	HER2-	HER2+		
ER+	ER+	ER+	ER-	ER-
PR+	PR bajo	PR+	PR-	PR-
HER2-	HER2-	HER2+	HER2+	HER2-
Ki67 bajo	Ki67 alto	Ki67 intermedio	Ki67 alto	Ki67 alto

Tabla I: Clasificación molecular de los tumores de mama de acuerdo a los marcadores inmunohistoquímicos analizados en las biopsias. A continuación de cada nombre se indica entre paréntesis la incidencia promedio para cada subtipo tumoral. Adaptado de [18].

Los subtipos luminales son aquellos que expresan receptores hormonales, se subclasifican a su vez, según el estado de HER2 y su tasa de proliferación, en luminal A y luminal B. Los tumores luminales A son más frecuentes que los luminales B, pero menos agresivos y responden mejor a la terapia endócrina. Los tumores que sobreexpresan HER2 y no expresan receptores hormonales, suelen asociarse con malos resultados clínicos, pero a su vez la sobre-expresión de HER2 predice respuestas terapéuticas positivas a terapias dirigidas anti-HER2 (por ejemplo: trastuzumab), la modalidad de tratamiento para este tipo de tumores consiste en

combinaciones de fármacos dirigidos y quimioterapia citotóxica [19]. El subtipo llamado “triple negativo” (TNBC) se caracteriza por la ausencia de RE, RP y HER2. Este tipo de tumores representa del 12-17% de los tumores de mama solamente, pero es el responsable de un alto porcentaje de muertes debido a su agresividad. Se caracteriza por tener un alto grado histológico y altas tasas de proliferación (Ki67). Suelen presentarse en mujeres jóvenes, poseen un alto riesgo de recurrencia, son extremadamente malignos y metastásicos. En general, el tratamiento del cáncer de mama puede incluir cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia con hormonas o terapia dirigida. Debido a sus características moleculares, las únicas opciones de tratamiento disponible que poseen los pacientes con TNBC son la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia o combinaciones de estas, ya que no pueden recibir terapias hormonales ni terapias dirigidas a blancos celulares. Por todo lo mencionado anteriormente, los TNBC están asociados a un pronóstico muy pobre [18, 20]. La exploración de tratamientos para TNBC está en constante evolución. Cabe destacar que, a pesar de la carencia de terapias dirigidas para TNBC, actualmente se están incluyendo pacientes en ensayos clínicos para investigar la eficacia de la inmunoterapia en este tipo de tumor [21].

MODALIDADES TERAPÉUTICAS

El creciente conocimiento de la biología molecular y tumoral permite que en la clínica se apliquen diferentes terapias contra el cáncer, en forma individual o combinada, con el fin de aumentar su potencial de acción. En general, se puede clasificar a los tratamientos utilizados en la terapia del cáncer en dos grupos: tratamientos localizados – cirugía y radioterapia – y tratamientos sistémicos – quimioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia –. Luego del diagnóstico, los tratamientos se seleccionan según la etapa y estadio del tumor, su histología y los biomarcadores presentes. Lo importante es que la terapia elegida debe equilibrar los beneficios terapéuticos con los daños que pueda ocasionar el tratamiento debido a sus efectos adversos [22, 23]. Las terapias dirigidas actúan bloqueando vías o proteínas que son requeridas para el crecimiento y mantenimiento tumoral, como por ejemplo, la terapia hormonal o la inhibición del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. La inmunoterapia, por su parte, controla el crecimiento y desarrollo de

los tumores mediante la activación de la respuesta inmune contra las células malignas [24]. La quimioterapia, consiste en el uso de fármacos citotóxicos, la mayoría de los cuales son agentes que dañan el ADN o inhiben la formación de los microtúbulos y están diseñados para matar células en rápida división [22].

La cirugía es la terapia local que se prefiere para el cáncer de mama invasivo, siempre que el tumor resulte operable. Muchas veces suele incluirse el uso de quimioterapia neoadyuvante, es decir, quimioterapia previa a la cirugía, debido a sus ventajas que incluyen cirugías más exitosas y la posibilidad de medir la respuesta temprana en el paciente al tratamiento sistémico [25]. Aun así, muchos pacientes experimentan el desarrollo de metástasis luego de la extirpación del tumor primario, confirmando el hecho de que la diseminación de las células tumorales en el organismo se estaba produciendo al momento del diagnóstico o la cirugía. Para evitar esto, suelen administrarse tratamientos posteriores a la cirugía, lo que se conoce como terapia adyuvante. Por ejemplo, la radioterapia puede indicarse para eliminar la enfermedad microscópica residual que puede permanecer en la región donde se encontraba el tumor evitando así futuras recidivas; o quimioterapia cuyo objetivo será erradicar las micrometástasis que se hayan establecido y puedan convertirse en una enfermedad metastásica franca si no se trata. La selección del tipo de terapias sistémicas adyuvantes dependerá de la estratificación del riesgo del paciente. Suelen tenerse en cuenta el número de ganglios linfáticos comprometidos, el tamaño del tumor primario y sus características moleculares [25, 26].

A pesar de la eficacia clínica que puede conseguirse con la quimioterapia, ésta presenta grandes efectos tóxicos. Al ser un tratamiento sistémico, se pueden ver afectadas células sanas del organismo que se encuentran proliferando, como las células progenitoras de los glóbulos blancos de la médula ósea, los folículos capilares, y las células del sistema digestivo y aparato reproductor. La quimioterapia implica el uso de fármacos citotóxicos en dosis cercanas a la “dosis máxima tolerada por el organismo” (DMT) lo que requiere de períodos de descanso entre una aplicación y otra para permitirle al paciente recuperarse de los efectos tóxicos generados en el organismo. Estos períodos de descanso resultan contraproducentes

para el tratamiento, ya que el tumor es una masa heterogénea de células, y los clones específicos que adquirieron resistencia al fármaco quimioterapéutico pueden volver a crecer, por lo que muchas veces la inhibición del crecimiento del tumor inicial se revierte hacia el crecimiento de tumores más malignos. Este conjunto de efectos adversos de la quimioterapia, que en ocasiones requiere la re-internación del paciente, junto con el alto costo de los medicamentos regularmente utilizados para el tratamiento antitumoral, eleva los gastos públicos en salud asociados con la terapia [27, 28].

A diferencia de la quimioterapia convencional utilizando DMT, Hanahan y colaboradores, plantearon una nueva modalidad de tratamiento utilizando un nuevo esquema de administración de fármacos al cual denominaron quimioterapia metronómica (QMT) [29]. La QMT hace referencia a la administración frecuente y a intervalos regulares de fármacos quimioterapéuticos por debajo de la DMT, sin necesidad de períodos de descanso prolongados ya que presenta poca o nula toxicidad. En un principio, los efectos sobre la angiogénesis tumoral parecieron ser el blanco principal de la QMT, pero luego se ha visto que presenta efectos inmunoestimulantes ya que el efecto anti-inflamatorio de este tipo de terapia estimula la respuesta inmune del paciente contra el tumor, por lo que en última instancia termina por afectar a las células tumorales, sus progenitoras y el microambiente tumoral [30, 31]. A pesar de no ser actualmente una terapia de primera línea para el cáncer de mama, la quimioterapia metronómica se posiciona en pacientes pediátricos como una excelente opción dada su buena tolerabilidad y baja toxicidad; lo que nos lleva a pensar que en un futuro esto podría trasladarse a otros modelos tumorales.

REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

Actualmente, el tratamiento del cáncer se basa en tecnologías costosas y complejas y los tratamientos efectivos desarrollados recientemente no resultan accesibles a los pacientes que viven en países de medianos o bajos ingresos. Aún está pendiente el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que se adapten a las restricciones que se presentan en este tipo de países. Otro punto importante a tener en cuenta, es que a pesar de la eficacia clínica que pueda conseguirse, siguen sin poder atenuarse

los efectos tóxicos que acompañan al paciente durante el tratamiento, por lo que existe la necesidad de desarrollar nuevas terapias que resulten efectivas, seguras y accesibles para el tratamiento del cáncer. Con respecto a esto, es posible combinar un esquema de terapia metronómica (o crónica), con terapias dirigidas y el reposicionamiento de fármacos para aumentar los resultados positivos y disminuir la toxicidad del tratamiento manteniendo los bajos costos. Debido a esto, hace unos años se ha propuesto el término genérico “metronómica” (Del inglés: *metronomics*) para englobar todos los tratamientos que combinan QTM y reposicionamiento de fármacos [32].

El reposicionamiento de fármacos consiste en investigar nuevas indicaciones terapéuticas de fármacos diseñados para tratar una dada enfermedad. La reutilización de fármacos desempeña un papel importante en el descubrimiento de medicamentos con actividad antitumoral junto con nuevos mecanismos de acción. Debido a la heterogeneidad del cáncer, los blancos terapéuticos para combatir el avance de la enfermedad suelen ser diversos, por lo tanto, disponer de medicamentos ya conocidos que interfieran con estos blancos resulta ventajoso (Figura 3) [33].

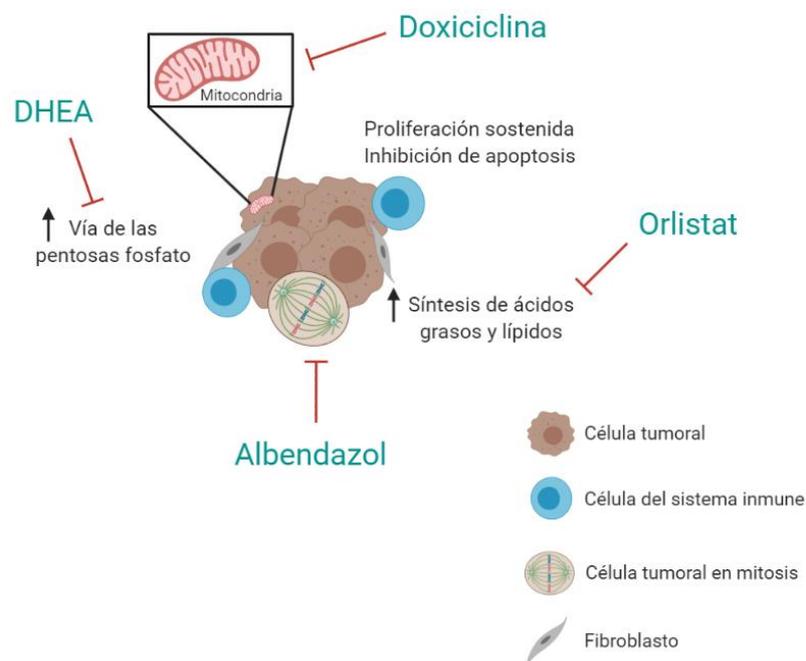


Figura 3: Blancos de acción de algunos fármacos en reposicionamiento. En las células tumorales existen blancos para distintos fármacos que, si bien no resultan citotóxicos, su interacción con distintas vías metabólicas clave en las células cancerosas podría prevenir el crecimiento tumoral. Creado con BioRender.com.

Al contrario de lo que ocurre con el desarrollo de nuevos medicamentos, un proceso altamente costoso y que requiere de muchos años, el reposicionamiento de medicamentos utiliza fármacos ya conocidos y utilizados en la clínica, por lo que existe un conocimiento previo de su farmacodinamia, farmacocinética y toxicidad, a la vez de que existen protocolos establecidos de dosificación. Otra ventaja de esta estrategia es que los fármacos en reposicionamiento se encuentran disponibles como genéricos, es decir, se puede acceder a ellos a un costo considerablemente menor al de los nuevos medicamentos oncológicos, lo que abre nuevas oportunidades para los pacientes de países de medianos o bajos recursos. Actualmente existe un proyecto llamado reposicionamiento de drogas en oncología (ReDO, del inglés *Repurposing Drugs in Oncology*) el cual se centra en el uso de medicamentos que no son antitumorales como nuevas terapias contra el cáncer [32, 34].

Los primeros ejemplos de reposicionamiento exitoso de medicamentos se produjeron por casualidad, como el caso del ácido acetilsalicílico, la talidomida o el sildenafil. Por su parte, los estudios epidemiológicos resultan útiles a la hora de relacionar la incidencia de tumorigénesis y la tasa de mortalidad de los pacientes medicados con ciertos fármacos. Además, actualmente, el reposicionamiento de medicamentos también hace uso de enfoques *in silico* para encontrar la relación entre enfermedades, medicamentos y blancos celulares para lograr predecir mejores terapias. Se han descrito más de 200 medicamentos que podrían reposicionarse en distintos tipos de cáncer, luego de haber mostrado efecto antitumoral en estudios *in vitro*, *in vivo* o en humanos y esta lista actualmente sigue en aumento [34, 35]. Aun así, es importante destacar que si bien esta estrategia puede acortar el período de desarrollo en comparación a los nuevos medicamentos oncológicos, particularmente con respecto a los ensayos de toxicidad de fase temprana, es importante poder demostrar la eficacia terapéutica en cualquier nueva indicación o esquema terapéutico que se les adjudique [36].

Las estrategias a seguir son variadas, en el proyecto ReDO se propone que combinaciones de medicamentos reposicionados podrían tener un efecto terapéutico significativo, con menor toxicidad y costo en comparación con las

terapias estándar. También, los medicamentos reposicionados podrían agregarse a los protocolos existentes porque mejoran la eficacia clínica, ya sea por revertir la resistencia a los medicamentos o al alterar un aspecto del microambiente tumoral mejorando la biodisponibilidad del fármaco quimioterapéutico. Estas opciones abren las puertas a la exploración de un nuevo campo dentro del descubrimiento de nuevas terapias para el cáncer.

A continuación, se describen en mayor detalle los fármacos en reposicionamiento que se utilizaron en este estudio.

Metformina

Metformina (1,1-dimetilbiguanida; Met) es una biguanida que se usa ampliamente en la clínica para tratar la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y el síndrome de ovario poliquístico. Desde hace un tiempo, se viene estudiando la asociación de Met con el cáncer dado que estudios epidemiológicos han mostrado que pacientes con DM2 diagnosticados con cáncer, tienen un riesgo de mortalidad menor cuando están tratados con Met en comparación con pacientes que reciben otros tratamientos [37]. En un estudio de meta-análisis se describe que Met puede reducir la incidencia de cáncer de hígado, páncreas, colorrectal y mama, así como reducir la mortalidad del cáncer de hígado y cáncer de mama [38]. En particular, se ha visto que pacientes diabéticas con cáncer de mama que reciben Met y quimioterapia neoadyuvante estándar presentan una tasa de respuesta más alta al tratamiento oncológico que pacientes diabéticas no recibiendo Met [39].

Existen numerosos estudios en los que se demuestra la inhibición de la proliferación de las células tumorales por parte de Met. Actualmente la evidencia demuestra que el efecto antitumoral de Met estaría ejerciéndose por dos vías diferentes (**Figura 4**):

La vía insulina/IGF-1 (I/IGF): La vía I/IGF promueve la mitosis e inhibe la apoptosis favoreciendo el desarrollo tumoral. Met reduce los niveles de insulina en sangre al aumentar la sensibilidad del tejido circundante a la insulina e inhibir la absorción de glucosa por parte de las células intestinales, como consecuencia, se inactiva la vía de señalización I/IGF corriente abajo (PI3K/Akt/mTOR) para inhibir la proliferación celular [40].

La vía AMPK: La proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) es un sensor energético en la célula que se activa debido a un aumento en la relación AMP/ATP. El blanco de Met es el complejo I de la cadena respiratoria, lo que lleva a una reducción de la fosforilación oxidativa resultando en una reducción del ATP celular y la activación de AMPK que inhibe la fosforilación de mTOR y la proteína quinasa S6 ribosómica corriente abajo (p70S6K) y proteínas de unión a eIF4E (4E-BP1), los cuales cumplen importantes funciones en la regulación del inicio de la traducción [40, 41].

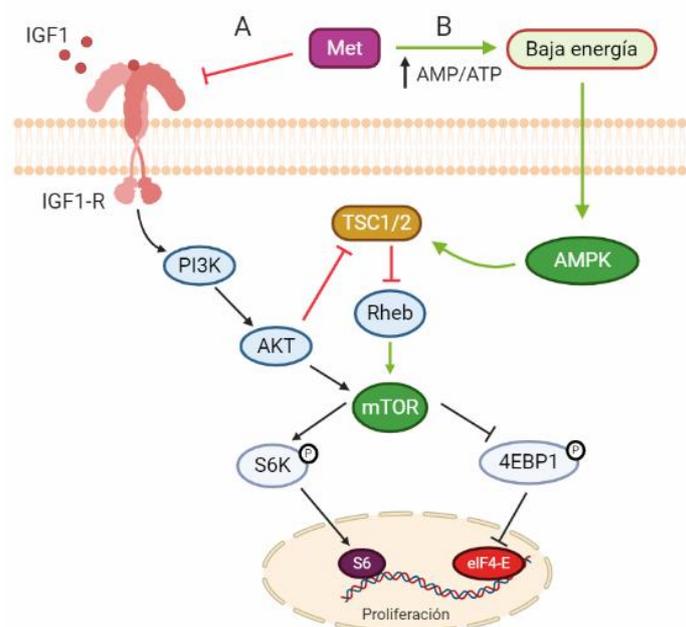


Figura 4: Mecanismo de acción propuesto para metformina en células tumorales. (A) Reducción del nivel de insulina en sangre e inactivación de la vía de señalización I/IGF. (B) Activación de AMPK e inhibición de la vía mTOR. Adaptado de [40] y creado con BioRender.com.

También se ha descrito en la bibliografía que Met podría tener efectos inhibitorios sobre las células madre del cáncer (CSC), las cuales se han asociado con el desarrollo de metástasis, resistencia a los medicamentos y recaídas. Existen estudios en distintos modelos de cáncer, que incluyen mama, páncreas, próstata y colon, donde se demuestra que el efecto de Met sobre las CSC se da a través de la inhibición de vías específicas involucradas en la diferenciación celular, auto-renovación, metástasis y metabolismo [42].

Propranolol

Propranolol (Prop) es un agente β -bloqueante no selectivo que presenta propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias; es ampliamente utilizado para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, migraña y trastornos de ansiedad [43]. El sistema β -adrenérgico está compuesto por los receptores adrenérgicos y las catecolaminas, moléculas neuroefectoras liberadas por el sistema nervioso simpático (norepinefrina) y las glándulas suprarrenales (epinefrina) para regular la función de varios sistemas de órganos y mediar la respuesta frente al estrés. Se conocen 3 tipos de receptores β -adrenérgicos: β 1, β 2 y β 3. Prop bloquea de forma no selectiva los receptores de tipo β 1 y β 2 que se encuentran distribuidos en distintos tejidos del organismo, incluidos los tumores. Se ha sugerido que las catecolaminas exhiben una función promotora de tumores y que el uso de β -bloqueantes resulta eficaz contra tumores de mama, melanoma, ovario, próstata, colon, páncreas, entre otros [44, 45]. Prop es un medicamento altamente efectivo y seguro para tratar hemangiomas en niños debido a su acción sobre la vasoconstricción, inhibición de la angiogénesis e inducción de apoptosis [46]. El mecanismo de acción para este tipo de tumores está bien caracterizado (**Figura 5**), y se cree que el mismo mecanismo podría estar llevándose a cabo en otro tipo de células tumorales. Análisis retrospectivos correlacionaron el uso de Prop con una disminución de la proliferación tumoral en cáncer de mama tanto en fase temprana como en fase tardía [47] y en particular, para TNBC se asoció el uso de β -bloqueantes con una mejor supervivencia libre de recurrencia y un menor riesgo de metástasis [48].

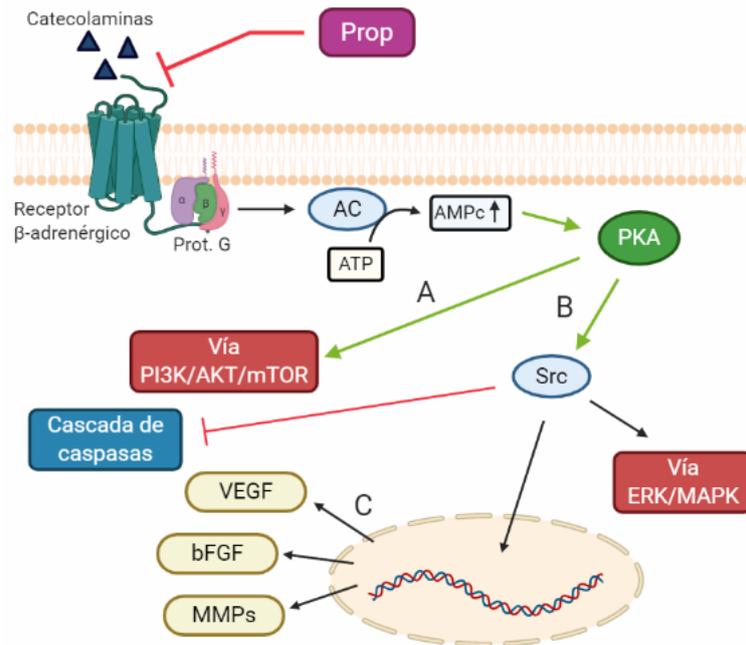


Figura 5: Mecanismo de acción propuesto para propranolol en células tumorales. La unión de las catecolaminas a su receptor, dispara la síntesis de factores de crecimiento, factores proangiogénicos y factores asociados al desarrollo de metástasis. Prop puede bloquear estos procesos biológicos fundamentales subyacentes a la progresión de los tumores. Adaptado de [45, 46] y creado con BioRender.com.

Los receptores β -adrenérgicos son receptores asociados a proteínas G, que cuando son estimulados por sus ligandos, activan la síntesis de AMPc y la fosforilación de la proteína quinasa A. Esta quinasa interviene en múltiples rutas de señalización mediante la posterior fosforilación de otras proteínas como la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR/p70S6K que está involucrada en la producción del factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) el cual, a su vez estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). También se ha visto que las catecolaminas pueden inducir la expresión de VEGF, metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), en particular las isoformas 2 y 9, involucradas en el desarrollo de metástasis, y otros factores de crecimiento a través de la activación de Src en forma independiente de HIF- 1α . Src es un mediador que también puede activar la cascada de señalización ERK/MAPK que controla múltiples genes implicados en la proliferación y supervivencia celular. Además Src sería un inhibidor de la cascada de señalización de caspasas responsables de la muerte celular programada [45, 46]. La administración de un antagonista de los receptores β -adrenérgicos como Prop, podría detener la síntesis de los factores mencionados reduciendo el desarrollo de tumores primarios y metástasis.

Cloroquina

Cloroquina (CQ) es un fármaco perteneciente al grupo de las 4-aminoquinolinas que se ha utilizado durante más de 70 años para prevenir o tratar infecciones de malaria y, más tarde, dado su efecto antiinflamatorio y que se tolera muy bien en personas, comenzó a utilizarse para tratar enfermedades como el lupus eritematoso y la artritis reumatoide. Existen estudios preclínicos en cáncer en los que se ha demostrado la eficacia de CQ como monoterapia o como agente adyuvante para aumentar la eficiencia y limitar la resistencia a los medicamentos de la quimioterapia estándar [49]. En un estudio clínico en fase I se determinó que CQ combinada con gemcitabina, un agente quimioterapéutico, fue bien tolerada y mostró efectos alentadores en el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico o irreseccable [50]. Se han descrito diversos mecanismos, tanto directos como indirectos, por los cuales CQ podría afectar a las células tumorales: potenciar la toxicidad de los tratamientos contra el cáncer al desencadenar la muerte celular, inhibir la autofagia, evitar la resistencia a fármacos, mejorar la penetración del fármaco o intercalarse en el ADN [51].

La autofagia es una vía intracelular muy importante para la degradación y reciclaje de proteínas y organelas, que normalmente ocurre a niveles basales bajos para mantener la homeostasis celular (**Figura 6**). Las células tumorales pueden sobrevivir en entornos desfavorables (hipoxia, acidez) para las células normales, por lo que la autofagia constituye una fuente de energía para las células tumorales en estas condiciones desfavorables y se cree que tendría un papel promotor del cáncer [52].

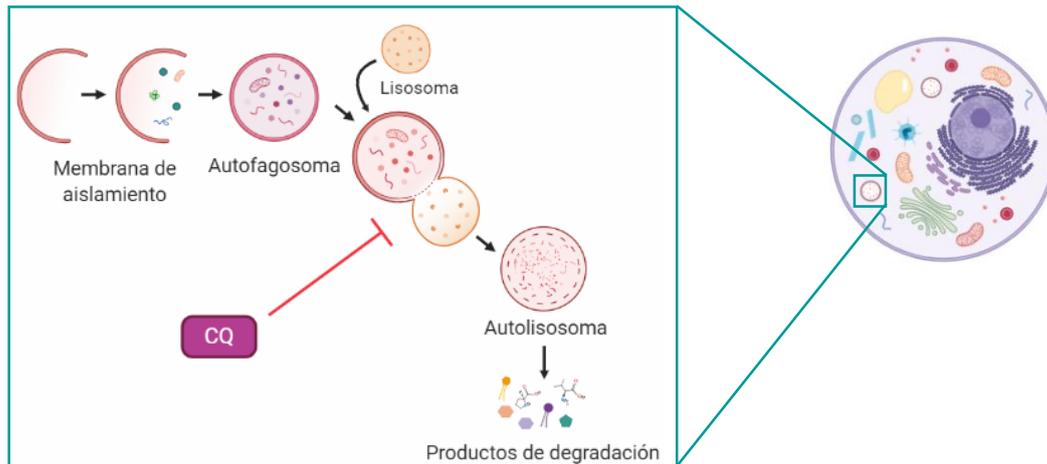


Figura 6: Cloroquina inhibe la autofagia celular evitando el reciclaje de aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y otros precursores estructurales y fuente de energía para la célula. Adaptado de [53] y creado con BioRender.com.

Brevemente, el proceso de autofagia comienza con una membrana de aislamiento que encierra una pequeña porción del citoplasma con los materiales solubles y los orgánulos a reciclar, para formar el autofagosoma. El autofagosoma se fusiona con el lisosoma para convertirse en un autolisosoma y degradar los materiales que contiene con sus enzimas hidrolíticas. Los productos resultantes de la degradación pueden reutilizarse con diferentes propósitos, como las síntesis de nuevas proteínas, producción de energía, etc. Cuando CQ ingresa al lisosoma, se protona debido al bajo pH dentro del mismo. La acumulación de la forma protonada de CQ disminuye la acidez y conduce a una disminución de la función lisosómica. Con esto, se detiene el último paso de la autofagia, la degradación del autolisosoma, lo que resulta en la falta de suministro de energía a través de esta vía. Debido a que la autofagia parece contribuir a promover el cáncer, se cree que CQ puede sensibilizar las células tumorales mediante la inhibición de este proceso [52, 53].

Dehidroepiandrosterona

Dehidroepiandrosterona (DHEA) es una hormona esteroide producida en las glándulas suprarrenales, la más abundante en circulación en humanos, que es precursora de hormonas sexuales como testosterona y estrógeno. Los niveles de DHEA alcanzan su punto máximo a los veinte años y a partir de allí comienzan a disminuir gradualmente con la edad. A partir de esto, se ha relacionado la disminución de esta hormona con trastornos de salud relacionados con la edad, como cáncer, diabetes, arteriosclerosis y osteoporosis [54].

Los datos epidemiológicos en hombres y mujeres no son concluyentes; algunos estudios indican que la disminución relacionada con la edad en los niveles de DHEA protegen contra la aparición de tumores sensibles a hormonas, como próstata y mama, mientras que otros estudios revelan que los niveles séricos elevados de DHEA están asociados con una disminución de las tasas de cáncer, lo que sugeriría un efecto protector por parte de esta hormona [55]. Esto se cree que puede deberse a que DHEA puede inhibir la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual participa en la vía de las pentosas fosfato, una ruta metabólica de la cual se obtiene poder reductor en forma de NADPH citosólico y que la célula utiliza como coenzima en el metabolismo anabólico (**Figura 3**). Un estudio con ratones transgénicos que desarrollan lesiones mamarias reveló que DHEA podría inhibir la progresión tumoral pero no el inicio ya que los efectos inhibitorios de esta hormona se vieron luego del desarrollo de las lesiones pre-invasivas [56]. Todos estos datos, ponen de manifiesto la necesidad de realizar nuevas investigaciones de laboratorio y traslacionales que permitan definir los mecanismos de acción, eficacia y seguridad de la DHEA.

Orlistat

Orlistat (Orl) es un medicamento indicado para tratar la obesidad e inducir la pérdida de peso corporal en pacientes diabéticos, debido a que es un inhibidor irreversible de las lipasas pancreáticas y gástricas por lo que previene la absorción de ácidos grasos libres derivados de la dieta. Las células tumorales catabolizan la glucosa a una velocidad que excede a la de las células normales. Una de las causas de este comportamiento es que sintetizan *de novo* sus ácidos grasos, por esto, sobreexpresan la proteína ácido graso sintasa (FASN) que se encarga de catalizar la conversión de los carbohidratos obtenidos de la dieta en ácidos grasos [57]. Se ha comprobado que FASN se encuentra sobre-expresada en varios tipos tumorales, entre los que se incluyen próstata, mama, pulmón, ovario, vejiga y melanoma; esta sobre-expresión suele asociarse con un mal pronóstico. Orl es un inhibidor irreversible de FASN, por lo que podría tener efectos antitumorales (**Figura 3**) [58]. Debido a esto, se ha estudiado la acción antitumoral de Orl en diferentes modelos tumorales. Por ejemplo, la adición de Orl a cisplatino para tratar tumores de ovario resistentes en modelos xenográficos en ratones, ha demostrado aumentar la eficacia

del tratamiento disminuyendo la proliferación tumoral e induciendo apoptosis [59]. Además, se han realizado estudios *in vitro* donde se logró desarrollar nanopartículas portadoras de Orl para aumentar la biodisponibilidad de este fármaco y probar su eficacia en el tratamiento de TNBC, demostrando una reducción en la proliferación celular y aumento de la apoptosis [60].

Doxiciclina

Doxiciclina (Doxi) es un antibiótico semisintético perteneciente a la familia de las tetraciclinas utilizado desde mediados del siglo XX. El blanco de este antibiótico es la síntesis de los ribosomas y proteínas en bacterias, lo que resulta en la prevención de la unión del aminoacil ARN-t a la subunidad ribosómica 30S. La subunidad ribosómica bacteriana 30S es homóloga a la subunidad ribosómica mitocondrial 28S en células de mamífero, por lo que se cree que el efecto antitumoral de Doxi estaría dado por la inhibición en la síntesis de proteínas del metabolismo mitocondrial (**Figura 3**) [61]. Además, por estudios proteómicos cuantitativos se determinó que Doxi afecta la ADN-PK, la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN, necesaria para el funcionamiento del sistema de reparación del ADN, un mecanismo que permite mantener la integridad y el número de copias del ADN mitocondrial otorgando resistencia a la radiación y a la quimioterapia en células tumorales [62]. Se ha demostrado que Doxi puede inhibir la proliferación de células de cáncer de mama y la autorrenovación de las células madre del cáncer, además altera la migración de las células tumorales afectando la EMT y la expresión de MMPs [63]. Doxi tiene un buen perfil de seguridad cuando se usa durante mucho tiempo, es bien tolerada en humanos y se absorbe prácticamente por completo luego de la administración oral [61]. Es por ello que vale la pena el estudio de este fármaco como potencial antitumoral.

Albendazol - Ricobendazol

Albendazol (ABZ) y ricobendazol (RBZ) son antihelmínticos pertenecientes a la familia de los benzimidazoles. La actividad farmacológica de estos fármacos se centra en la inhibición de la polimerización de la tubulina y el bloqueo de la captación de glucosa en las etapas larval y adulta de los parásitos [64]. La formación de microtúbulos, que depende de la correcta polimerización de la tubulina, está

íntimamente relacionada con la división celular, por lo que su inhibición por parte del ABZ resulta interesante de evaluar como tratamiento para el cáncer (**Figura 3**). Se ha demostrado que ABZ presentó actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer gástrico mediante la interrupción del ciclo celular debido a interferir con la formación y función de los microtúbulos induciendo apoptosis [65].

A pesar de su eficacia clínica, la utilidad de ABZ se ve comprometida por su baja biodisponibilidad oral. La tecnología farmacéutica ha desarrollado varias estrategias para superar las limitaciones de solubilidad y absorción de medicamentos insolubles, como formulaciones micelares, sistemas nano y microestructurados, y complejos de inclusión de ciclodextrinas (CDs). El uso de complejos de inclusión de ABZ con hidroxipropil- β -CD en un modelo *in vivo* de cáncer colorrectal, demostró una mejora significativa en la solubilidad y eficacia antitumoral de ABZ indicando que este tipo de formulaciones resultarían prometedoras como nuevas indicaciones terapéuticas para el cáncer [66].

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración en forma crónica, de fármacos en reposicionamiento (metformina, propranolol, cloroquina, DHEA, orlistat, doxiciclina, albendazol) tanto en terapia individual como combinada de a pares, sobre distintos modelos tumorales *in vitro* e *in vivo*, analizando los mecanismos responsables de los efectos observados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

in vitro

- Evaluar las respuestas celulares de proliferación, apoptosis y migración e invasión de líneas derivadas de cáncer de mama a tratamientos con fármacos en reposicionamiento.
- Caracterizar el estado de las vías de señalización celular implicadas en respuestas proliferativas/apoptóticas.

in vivo

- Evaluar el efecto de estos fármacos en terapia individual y conjunta con bajas dosis, administradas de modo regular, sobre el crecimiento de los tumores primarios M-406, 4T1 y M-234p, analizando el grado de proliferación, apoptosis y vascularización.
- Analizar el efecto de los tratamientos sobre la respuesta inmune y el contenido de células madre tumorales.
- Explorar el impacto de estas modalidades de tratamiento sobre el desarrollo de metástasis.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La administración crónica de fármacos en reposicionamiento como metformina, propranolol, cloroquina, DHEA, orlistat, doxiciclina y albendazol en terapia individual, o combinada de a pares, sobre distintos modelos tumorales *in vitro* e *in vivo*, es efectiva para el tratamiento de tumores de mama, sin toxicidad asociada ya que afecta el metabolismo de la célula tumoral modificando parámetros que alteran el desarrollo del tumor primario y metástasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYOS *in vitro*

Fármacos

Metformina (clorhidrato de metformina; Sigma-Aldrich): se disolvió en agua destilada y se conservó a -20°C.

Propranolol (clorhidrato de propranolol; Sigma-Aldrich): se disolvió en 5% DMSO y agua destilada y se conservó a -20°C.

Cloroquina (sal bifosfato; Sigma-Aldrich): se disolvió en agua destilada y se conservó a 4°C.

DHEA (dehidroepiandrosterona; Laboratorios Bagó): se disolvió en etanol y se conservó a -20°C.

Orlistat (Frugal, Laboratorios Bagó): se solubilizó en etanol y conservó a -20°C hasta su utilización.

Doxiciclina (monohidrato de doxiciclina; Lafedar, Argentina): se solubilizó en agua destilada y se conservó a -20°C.

Albendazol (Parafarm): se disolvió en DMSO y solución tamponada con fosfato (PBS), se conservó a 4°C.

Doxorrubicina (Tuteur): se disolvió en agua destilada y se conservó a -20°C. Se utilizó como control positivo en ensayos de crecimiento celular *in vitro*.

C-β-CD (citrato β-ciclodextrina): Las CDs son oligosacáridos cíclicos que forman una estructura con una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa con afinidad hidrofílica. La C-β-CD fue sintetizada en el área de tecnología farmacéutica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, como se describió previamente [67].

Todos los fármacos que se utilizaron en ensayos *in vitro* fueron preparados en la concentración final deseada en medio de cultivo completo, las diluciones utilizadas fueron tales que las concentraciones de DMSO y etanol no excedieron el 0,1%. En los ensayos *in vivo* los fármacos fueron preparados en el agua de bebida en la concentración final deseada.

Cultivo de líneas celulares y células derivadas de tumor

4T1: Línea celular originalmente aislada de tumores de mama espontáneos, triple negativos, desarrollados en ratones BALB/c. Estas células pueden ser implantadas en ratones inmunocompetentes mostrando crecimiento rápido y siendo altamente metastásicas, contando además con contrapartes no-metastásicas aisladas del mismo tumor original [68]. Las células 4T1-GFP fueron amablemente proporcionadas por el grupo de trabajo del Dr. Javier Girardini.

MDA-MB-231: Línea celular proveniente de un adenocarcinoma de mama humano triple negativo con mutación en p53, *KRAS* Y *BRAF*. Esta línea es capaz de formar adenocarcinomas poco diferenciados en ratones BALB/c atímicos [69].

M-406 y M-234p: Células derivadas de tumores espontáneos surgidos en el Bioterio del Instituto de Genética Experimental en ratones CBi y BALB/c, respectivamente. Representan adenocarcinomas mamarios, triple negativos, moderadamente diferenciados [70], que muestran un patrón mixto y desarrollan metástasis pulmonares. Se mantienen *in vivo* por trasplantes seriados intraperitoneales (M-406) y subcutáneos (M-234p) en ratones singéneos [71].

MDCK (Madin Darby Canine Kidney): Línea celular obtenida del riñón normal de una hembra adulta de Coker Spaniel en 1958 por SH Madin Darby y NB [72].

Todas las células fueron mantenidas mediante técnicas estándares de cultivo celular en medio RPMI o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) según correspondiera, suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), los antibióticos penicilina (10 U/ml) y estreptomycin (10 µg/ml), y L-glutamina (200mM) en el caso de medio DMEM (medios completos).

Ensayo de proliferación

Para determinar el efecto de los fármacos en estudio sobre el crecimiento de las células tumorales se realizó un ensayo de reducción de sales de tetrazolio. En placas de 96 pocillos se sembraron 5×10^3 células 4T1 por pocillo y se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de SFB a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 8 h. Transcurrido este tiempo se renovó el medio de cultivo y se crecieron las células en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de los fármacos por triplicado, en modo individual (**Tabla II**) y combinado.

Fármaco	Concentraciones usadas
Metformina	0 – 10 mM
Propranolol	0 – 10 μ M
Cloroquina	0 – 10 μ M
DHEA	0 – 100 μ M
Orlistat	0 – 100 μ M
Doxiciclina	0 – 10 μ M
Albendazol	0 – 5 μ M
Ricobendazol	0 – 100 μ M

Tabla II: Rango de concentraciones individuales probadas en los ensayos de proliferación celular.

Tras 36 h de incubación, se agregó a cada pocillo 10 μ l del reactivo WST-1 (Roche). Luego de incubar entre 20 y 60 min a 37°C, dependiendo del tipo celular, se procedió a leer absorbancia (Abs) con un espectrofotómetro (Rayto RT-2100C Microplate Reader) a 450 nm, utilizando como referencia la medida de absorbancia a 630 nm. En el caso de las células MDA-MB-231 y MDCK se procedió de igual modo, cultivándolas en medio DMEM completo.

Las células M-406 y M-234p, se prepararon a partir de tumores de mama de ratones mediante disgregación mecánica. El contenido celular de las suspensiones fue analizado por conteo de células viables tras tinción con el colorante Azul Tripán (Sigma) en cámara de Neubauer. Posteriormente se sembraron 5×10^4 células por pocillo en medio RPMI completo y se procedió del modo descrito anteriormente.

En todos los casos, los resultados se expresan como la media \pm error estándar (EE) de, al menos, tres experimentos independientes.

Cálculo de IC50

Para realizar el cálculo de IC50 de Met, Prop y CQ para cada línea celular, se procedió de forma similar a la descrita en los ensayos de proliferación, ampliando el rango de dosis utilizadas. Las células fueron incubadas en presencia de los fármacos durante un período equivalente a un tiempo de duplicación celular. Posteriormente, se procedió del modo descrito en el apartado anterior.

Para estimar la IC50 de los fármacos en estudio, administrados en esquema continuo, las líneas celulares fueron sembradas en placas de 24 pocillos (10^3 células

por pocillo). Tras 8 h de incubación se cambió el medio de cultivo y se incubaron las células en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de Met, Prop y CQ durante 144 h (6 días), renovándose el medio de cultivo cada día. Transcurrido este plazo se agregaron 30 μ l de reactivo WST-1 para estimar la proliferación celular tal como se ha descrito previamente. En todos los casos los valores de IC50 se obtuvieron con el software online ED50plus (v1.0).

Para los análisis de sinergismo, se procedió del modo descrito anteriormente, estimándose la IC50 de un fármaco en presencia de distintas concentraciones del otro (por debajo de su IC50) y viceversa. Los valores obtenidos permitieron construir un isoblograma para evaluar el posible efecto sinérgico de las combinaciones.

Ensayo de clonogenicidad

Paralelamente, se evaluó la capacidad de las células tumorales de formar colonias. Para tal fin, se sembraron 500 células por pocillo de las líneas 4T1 o MDA-MB-231 y se incubaron en placas de 6 pocillos, en medio completo, durante 6-8 días, en presencia y ausencia de los tratamientos, renovándose el medio de cultivo cada vez que fue necesario. Bajo el microscopio óptico invertido (CK Olympus Tokio) se tomaron fotografías de los clones a distintos tiempos (5 campos por pocillo, 10X) y se analizó el diámetro de las colonias formadas con el software ImageJ. Las colonias formadas se lavaron con PBS, se fijaron con formol tamponado al 10% y luego se tiñeron con colorante Giemsa (Biopur; solución 10% en agua destilada) para facilitar su visualización y cuantificación. En todos los casos los experimentos se realizaron por triplicado y se expresan como media \pm EE.

Determinación de apoptosis

Para evaluar el grado de apoptosis inducido por los tratamientos individuales y combinados se incubaron las células hasta alcanzar un 70% de confluencia en placas de 6 pocillos en presencia y ausencia de los fármacos en estudio. Las células se tripsinizaron (Trypsina-EDTA 0,25%; Gibco), se centrifugaron 5 min a 1500 rpm, se resuspendieron y se lavaron 2 veces con tampón PBS. Luego, se lavaron con Buffer Anexina (Immunostep; 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) y se tiñeron con 5 μ l de Anexina V-FITC (Immunotools) y 5 μ l de yoduro de propidio

(IP, Immunostep). Se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. Pasado el período de incubación se adicionaron 400 μ l de Buffer Anexina y se determinó la presencia y porcentaje de poblaciones apoptóticas mediante citometría de flujo (Becton Dickinson FACS Aria II) adquiriéndose 20000 eventos para cada muestra. Los resultados se analizaron con el software FlowJo y se expresan como la media \pm EE de tres experimentos independientes.

Análisis del metabolismo celular en tiempo real

Estos ensayos se llevaron a cabo en el Centro de Investigación en Oncología Biológica y Oncofarmacología de la Universidad de Aix-Marsella, Francia, en el laboratorio de la Dra. Manon Carré.

Los análisis metabólicos multiparamétricos de células intactas se realizaron en el analizador de flujo extracelular Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica). Se sembraron células 4T1 en placas de 24 pocillos XF24 V7 ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) y se incubaron durante la noche (ON) a 37°C en CO₂ al 5%. A continuación, las células se trataron con Met y/o Prop durante 4, 24 o 48 h antes del ensayo.

Para medir la actividad mitocondrial celular, se utilizó medio de cultivo DMEM suplementado con glucosa 10 mM. La tasa de consumo de oxígeno (OCR) se analizó en estas condiciones basales y tras inyecciones secuenciales de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa, 1 μ M), FCCP (desacoplante de la cadena de transporte de electrones, 1 μ M) y antimicina A / rotenona (inhibidores específicos de la cadena respiratoria mitocondrial, 0,5 μ M). Para medir la actividad glucolítica, el medio de cultivo celular se reemplazó durante 1 h con DMEM mínimo (glucosa 0 mM) suplementado con glutamina 2 mM y piruvato de sodio 1 mM, pH 7,4. La tasa de acidificación extracelular (ECAR) se midió después de inyecciones secuenciales de glucosa (10 mM), oligomicina (1 μ M) y 2-desoxiglucosa (inhibidor de la glucólisis, 100 mM). Para normalizar los datos de OCR y ECAR al número de células, se sembraron y trataron simultáneamente células 4T1 en una segunda placa de pocillos múltiples. Las células se fijaron con glutaraldehído al 1%, se tiñeron con cristal violeta al 0,1% (en metanol al 20%), que se solubilizó en DMSO para ser analizados con un espectrofotómetro de microplacas.

Ensayo de migración

Para evaluar la capacidad de migración de las células tumorales, se llevaron a cabo ensayos de cierre de herida en placa. En placas de 6 pocillos, se sembraron células hasta alcanzar la subconfluencia, se quitó el medio de cultivo y se realizó una cicatriz lineal con un tip amarillo (tiempo 0). Los pocillos se lavaron con PBS para eliminar los restos de células sueltas y se adicionó medio reducido en suero con los tratamientos. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante un tiempo no mayor al tiempo de duplicación celular correspondiente para cada línea y en condiciones no proliferativas (0,1% SFB). Se tomaron fotografías a diferentes tiempos de, al menos, tres campos representativos por pocillo con un aumento de 10X. El área de la herida fue analizada con el software ImageJ y se calculó el área bajo la curva. Los resultados se expresaron como la media de tres experimentos independientes \pm EE.

Ensayo de invasión en matrigel

Se realizaron ensayos de invasión celular en matrigel (Becton-Dickinson) utilizando placas con cámaras de invasión de policarbonato (Corning). Se colocaron delicadamente 100 μ l de matrigel frío diluido en medio de cultivo sin SFB (2 mg/ml) en la cámara superior. Se incubó a 37°C durante 4 h para permitir la gelificación del matrigel. Células 4T1 y MDA-MB-231 se tripsinizaron y se lavaron con medio de cultivo suplementado con 1% de SFB. Se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y se resuspendieron en medio de cultivo conteniendo 1% de SFB. En la cámara superior de cada pocillo se sembraron $0,8 \times 10^6$ células por pocillo en 100 μ l de medio de cultivo suplementado con 1% de SFB en presencia o ausencia de los tratamientos. En la cámara inferior se agregaron 600 μ l de medio completo (suplementado con 10% de SFB) conteniendo los tratamientos. El SFB actuó como attractante para las células. Se incubó la placa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 24 h. Luego se quitó el medio de cultivo de ambas cámaras y se pasó un hisopo de algodón en la parte superior para quitar excesos de células no invasoras. Se fijaron las células con formol tamponado al 10% durante 10 min, se lavaron con PBS y se tiñeron en la parte inferior con colorante Giemsa (Biopur; solución 10% en agua destilada) durante 5-10 min en agitación. Las cámaras se volvieron a lavar con abundante agua destilada y se extrajo la membrana para visualizar las células bajo el microscopio.

Se cuantificaron 4 campos por pocillo con un aumento 40X. Los resultados se expresan como mediana y rango de tres experimentos independientes.

Western blot

Células 4T1 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta alcanzar el 70% de confluencia, luego se trataron con Met 5 mM y Prop 5 μ M durante 24h para las determinaciones de marcadores de EMT. Para la detección de p-ERK las células fueron ayunadas y tratadas durante 4 h en medio RPMI sin SFB. Posteriormente, fueron estimuladas metabólicamente con medio completo por 2, 5 y 10 min, se lavaron con PBS frío y se conservaron a -80°C hasta su uso. Las células fueron lisadas con buffer RIPA (10 mM Tris HCl pH8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) complementado con inhibidor de proteasas (Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche). La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante el método de Lowry. Se sembraron 100 μ g de cada muestra en geles 8% SDS-poliacrilamida. La corrida electroforética se llevó a cabo a voltaje constante y temperatura ambiente. Se realizó la electrotransferencia a membranas de PVDF (Amersham Hybond P, GE Healthcare Life Sciences) durante 90 min a 4°C con corriente constante (200mA). Las membranas se bloquearon con una solución al 5% de leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo ON a 4°C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti- α -Tubulina (Sigma, 1:1000), anti-p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling, 1:1000), anti-E-cadherina (Cell Signaling, 1:1000), anti- β -catenina (Cell Signaling, 1:1000) y anti-Snail (Cell Signaling, 1:1000). Luego de 3 lavados con TBS-T para remover el anticuerpo primario, las membranas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Pierce™ goat anti-mouse (1:2500), Pierce™ goat anti-rabbit (1:3000)). La detección se realizó con el kit comercial Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) según las recomendaciones del fabricante, las imágenes se generaron en Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) y se cuantificaron densitométricamente con el software ImageJ.

ENSAYOS *in vivo*

Animales

Se utilizaron ratones hembra adultos de la línea endocriada CBI del bioterio del Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR y ratones hembra adultos de la línea BALB/c provenientes de ICiVet-Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Los animales fueron provistos de alimento comercial y agua *ad libitum* se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante la primera mitad del ciclo de luz. Los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos éticos institucionales que acuerdan con los del “Canadian Council on Animal Care” (www.ccac.ca). La eutanasia de los animales se realizó por sobre-exposición a CO₂ o por dislocación cervical.

Estudio del efecto antitumoral

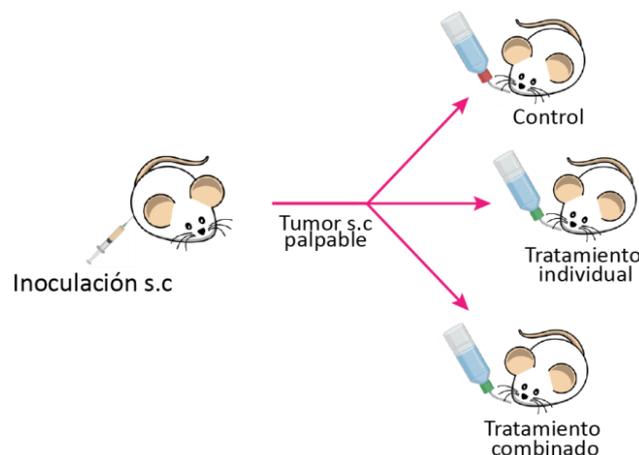


Figura 7: Esquema del modelo experimental llevado a cabo para el desarrollo de tumores subcutáneos y posterior tratamiento de los animales.

El procedimiento que se siguió se ilustra en la **Figura 7** y se describe a continuación.

En el día 0 del ensayo:

- ✘ Ratones hembra de la línea CBI se desafiaron con el tumor M-406 mediante inoculación subcutánea con trócar (aproximadamente 8×10^5 células) en la zona de la grasa mamaria.
- ✘ Ratones hembra de la línea BALB/c fueron inoculados con el tumor M-234p de forma subcutánea con trócar (aproximadamente 8×10^5 células) en la zona de la grasa mamaria.

- ✗ Para la generación de tumores con las células 4T1 se utilizaron ratones hembra de la línea BALB/c. Se inyectaron 100µl de una suspensión con 5×10^3 células en PBS de modo subcutáneo en la zona de la grasa mamaria.

Para cada caso, cuando los tumores fueron palpables, los ratones se distribuyeron al azar en cuatro grupos experimentales que quedaron definidos según el tratamiento recibido en el agua de bebida (n=6-8 por grupo).

Control: sin tratar

M: Tratados con metformina en el agua de bebida (dosis estimada: 400 mg/Kg/d)

P: Tratados con propranolol en el agua de bebida (dosis estimada: 7mg/Kg/d)

CQ: Tratados con cloroquina en el agua de bebida (dosis estimada: 67 mg/Kg/d)

M+P: Tratados con la combinación de Met y Prop

CQ+P: Tratados con la combinación de CQ+Prop

El tratamiento fue mantenido hasta el momento del sacrificio de los animales y se utilizaron las mismas dosis para todos los tratamientos *in vivo*. Se controló diariamente la ingesta de líquido y los fármacos se renovaron dos veces por semana. Durante el transcurso del experimento, se pesó a los animales, se controlaron las dosis ingeridas y se utilizó un calibre Vernier para medir dos veces por semana los diámetros mayor y menor de cada tumor para determinar el volumen tumoral mediante la fórmula $V=0,4 \times a \times b^2$, donde a es el diámetro mayor y b el diámetro menor del tumor. El crecimiento del volumen tumoral se ajustó a una curva de crecimiento exponencial para los animales de todos los grupos, lo cual permitió calcular el tiempo de duplicación tumoral, una variable inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento del tumor, utilizando el software GraphPad Prism 7. En todos los casos se graficó la curva de ajuste exponencial correspondiente a un experimento representativo y los valores se representaron como la media \pm EE para cada grupo experimental.

Estudio de la supervivencia

Con el objetivo de determinar si la supervivencia se veía afectada por los diferentes tratamientos, los animales fueron sacrificados uno por uno, a medida que alcanzaron el máximo volumen tumoral éticamente permitido. Los datos se

cargaron en el software GraphPad Prism 7 donde se graficó la curva de supervivencia. A cada ratón, luego del sacrificio, se le extrajeron los pulmones y se fijaron en solución Bouin (Biopack) durante 24 h para el análisis de metástasis espontáneas.

Obtención de muestras

Para la obtención de muestras, en un estudio idéntico al anterior, cuando los tumores se encontraron en crecimiento exponencial, antes de alcanzar el máximo volumen tumoral éticamente permitido, se sacrificaron los animales de todos los grupos al mismo tiempo. Se colectaron muestras de tumores que fueron fijados en formol al 10% en PBS y posteriormente embebidos en parafina. Se realizaron cortes con micrótopo de 5-7 μm de espesor, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina para su evaluación histológica. Se evaluó la integridad del tejido, presencia de infiltrado linfocitario, regiones necróticas y evidencia de cuerpos apoptóticos con el fin de seleccionar las zonas más aptas y/o las muestras mejor conservadas para realizar las determinaciones inmunohistoquímicas.

Estudio de la toxicidad

Con el fin de determinar posibles efectos tóxicos asociados a los tratamientos, se evaluó el porcentaje de mortalidad y la evolución del peso de los animales durante el tratamiento. Además, se controlaron características de los animales tales como actividad motora, calidad del pelaje, ingesta de comida, respuesta a los estímulos, conducta y respiración, a lo largo del experimento.

Estudios inmunohistoquímicos

Para los análisis inmunohistoquímicos ($n=4/\text{grupo}$), cortes histológicos de 5-7 micras fueron desparafinados, se llevó a cabo la recuperación antigénica con citrato de sodio (10 mM, pH 6) a 95° durante 30 min. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno (Cicarelli) al 3% en H_2O_d durante 15 min y, posteriormente, se bloquearon las reacciones no específicas con suero normal de caballo (Vectastain, Vector Laboratories). En los lavados del protocolo se utilizó agua destilada o TBS-T. Las muestras fueron incubadas ON a 4°C con los anticuerpos primarios anti-Ki67 (Cell Signaling, 1:400), anti-CD31 (Cell Signaling, 1:200), anti-CD44 (Abcam, 1:500) y anti-Sox-2 (Santa Cruz, 1:30). Luego se

incubaron 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario universal y reactivo ABC (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories), se desarrollaron con DAB Substrate Kit (BD Pharmingen™) y se realizó contratinción con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron, se montaron con bálsamo y fueron visualizadas bajo el microscopio óptico. Para analizar la proliferación se cuantificaron células Ki67⁺ en 10 campos en muestras de tumor con una magnificación 400X. Para el cálculo del área vascularizada se tomaron fotos de 10 campos con una magnificación 400X y se cuantificó el área vascularizada (CD31⁺) en el tumor con el software ImageJ. Las células CD44⁺ y Sox-2⁺ se cuantificaron en 20 campos con aceite de inmersión y una magnificación de 1000X. Las células tumorales apoptóticas se determinaron con el kit In situ cell death fluorescein (Roche) basado en la técnica de TUNEL, según las especificaciones del fabricante. Se realizó contratinción con DAPI (1μg/ml; Invitrogen), se montaron las muestras con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) y se almacenaron a -20°C hasta su evaluación en microscopio de fluorescencia (Nikon TE2000-E). La cuantificación de células TUNEL⁺ se llevó a cabo en 8 campos con una magnificación de 400X.

Cuantificación de linfocitos circulantes e intratumorales

Para la evaluación del número de células T circulantes CD4⁺, CD8⁺, Treg y Th17, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca (200 μl por animal) con anticoagulante (W, Wiener lab). Se lisaron los glóbulos rojos con buffer de lisis (153 mM NH₄Cl, 8,4 mM KHCO₃, 1,2 mM EDTA) se incubaron 30 min y se centrifugaron. También se analizó la presencia de estos linfocitos dentro del tumor, para tal fin, se extrajo una porción del tumor al momento del sacrificio de los animales, se realizó un homogenado por disgregación mecánica y se trabajó con una suspensión conteniendo aproximadamente 10⁶ células. De aquí en adelante se procedió de la misma forma, tanto para las muestras de sangre como para las muestras de tumor.

Las muestras se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-CD8-FITC (1:400, BD Pharmingen™) durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron con buffer de tinción (PBS, 1% SFB) y se fijaron con formol al 10% en PBS durante 30 min a 4°C; posteriormente se incubaron con buffer de permeabilización (BD Pharmingen™) por 30 min a 37°C. Se adicionó la mezcla con los 3 anticuerpos

(BD Pharmingen™): anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (1:400), anti-IL17-PE (1:400) y anti-Foxp3-AlexaFluor®647 (1:300) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron con buffer de tinción y se conservaron a 4°C hasta su análisis. En todos los casos se llevó a cabo un control negativo, sin anticuerpo. Las muestras se cuantificaron mediante citometría de flujo (Becton Dickinson FACS Aria II), se adquirieron 100000 eventos para las muestras de sangre y 500000 eventos para las muestras de tumor. Los valores adquiridos se analizaron con el software FlowJo.

Efecto del tratamiento sobre el desarrollo de metástasis experimentales

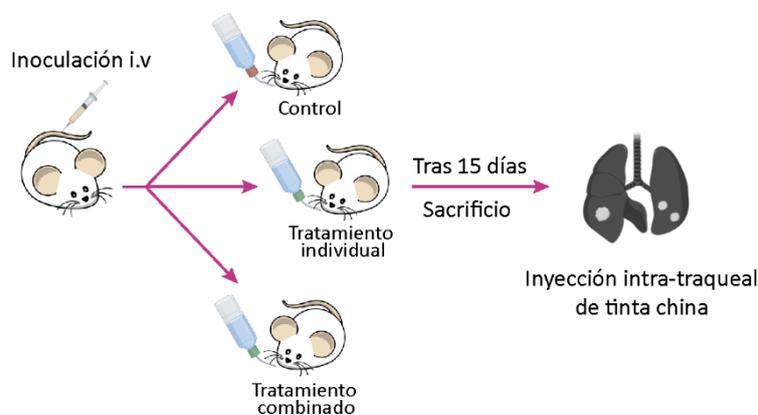


Figura 8: Esquema del modelo experimental llevado a cabo para el desarrollo de metástasis experimentales.

Se inyectaron 100 μ l de una suspensión de células tumorales en PBS en la vena lateral de la cola (50×10^3 células 4T1 en ratones BALB/c y 2×10^5 células M-406 en ratones CBI), luego los ratones fueron distribuidos al azar en los mismos grupos experimentales que en el ensayo de evolución del volumen tumoral con Met y Prop. Tras 2 semanas desde el momento de la inyección los ratones fueron sacrificados (**Figura 8**). Tanto los ratones CBI como los ratones BALB/c, fueron sometidos a una inyección intra-traqueal para inocular una solución de tinta china disuelta en PBS (1:16), de modo de inflar y teñir los pulmones de negro. Se extirparon los pulmones, se lavaron en PBS, y se sumergieron en solución Fekete (100 ml de etanol al 70% (Cicarelli), 10 ml de formaldehído al 4% (Anedra) y 5 ml de ácido acético glacial al 100% (Cicarelli)) para fijarlos y desteñirlos. Esto puso de manifiesto los nódulos metastásicos de color blanco, facilitando su cuantificación macroscópica. Luego se hizo un recuento y medición del diámetro de los focos metastásicos superficiales.

Estudio de la cascada metastásica: INTRAVASACIÓN

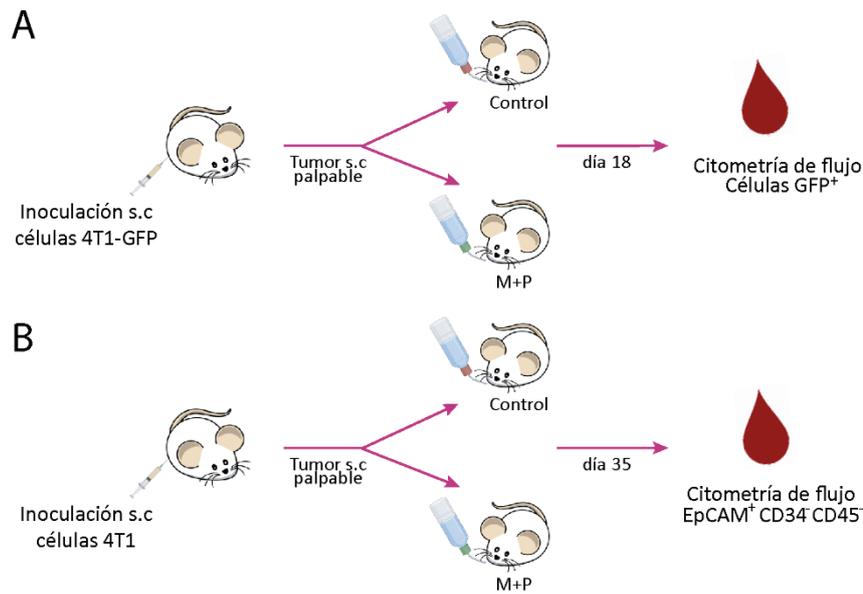


Figura 9: Esquema del modelo experimental llevado a cabo para el estudio del efecto del tratamiento en el proceso de intravasación.

Para realizar este estudio se utilizaron dos enfoques diferentes en paralelo (**Figura 9**):

- A)** Se generaron tumores a partir de células 4T1-GFP por inoculación subcutánea en ratones BALB/c ($n=6/\text{grupo}$) y, como se describió previamente, los ratones se distribuyeron al azar en 2 grupos: **Control** y **M+P**. Al día 18 del experimento se tomaron muestras de sangre periférica con anticoagulante, se lisaron los glóbulos rojos con buffer de lisis (153 mM NH_4Cl , 8,4 mM KHCO_3 , 1,2 mM EDTA) y se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células verdes (GFP⁺).
- B)** Se generaron tumores de células 4T1 subcutáneos en ratones BALB/c ($n=6/\text{grupo}$) y se los sometió a los tratamientos (**Control** y **M+P**). Luego de 35 días se extrajo sangre periférica con anticoagulante, se lisaron los glóbulos rojos como se describió previamente y se incubaron las muestras con los anticuerpos anti-EpCAM (1:200, BD Pharmingen), anti-CD34-Biot (1:200, eBioscience), Streptavidina-APC (1:200, BD Pharmingen), anti-CD45-APC (1:200, BD Pharmingen) durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron con buffer de tinción (PBS, 0,1% SFB) y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células EpCAM⁺CD34⁻CD45⁻.

En ambos casos los valores adquiridos se analizaron con el software FlowJo.

Estudio de la cascada metastásica: SUPERVIVENCIA y EXTRAVASACIÓN

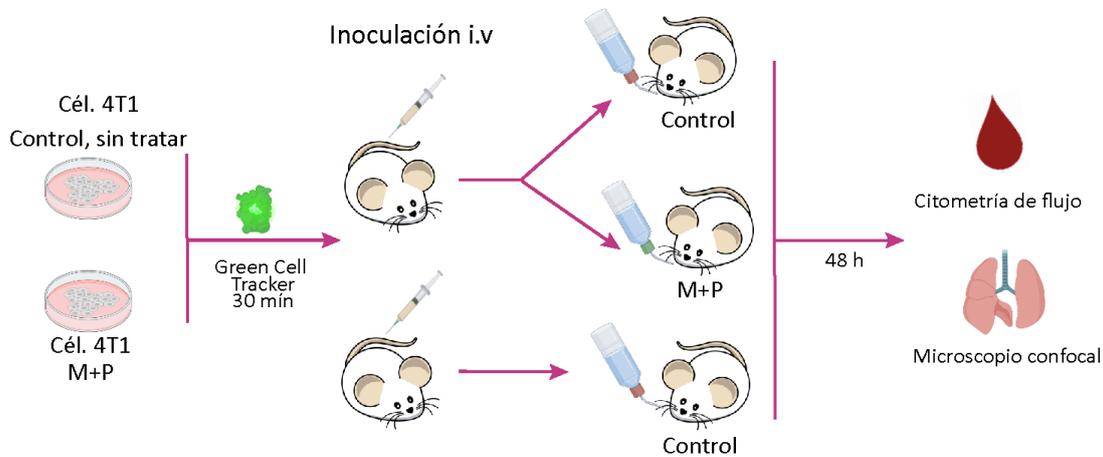


Figura 10: Esquema del modelo experimental llevado a cabo para el estudio del efecto del tratamiento en la supervivencia de las células tumorales en el torrente sanguíneo y en el proceso de extravasación.

Como se muestra en la **Figura 10**, células 4T1 en cultivo se marcaron con 5 μM de Green CellTracker (Invitrogen) durante 30 minutos y se inyectó el mismo número de células viables ($5 \times 10^4/100\mu\text{l}$) por vía intravenosa en ratones BALB/c ($n=5/\text{grupo}$). Un grupo de estas células recibió tratamiento durante 24 h (Met: 5 mM, Prop 5 μM) antes de la inyección. Los ratones se separaron de la siguiente manera: **G1**) ratones no tratados inyectados con células control; **G2**) ratones tratados con **M+P** inyectados con células control; **G3**) ratones no tratados inyectados con células pre-tratadas *in vitro*. Transcurridas 48 h, que es cuando se espera que haya ocurrido el proceso de extravasación, se inyectó a los ratones por vía intravenosa, lectina I conjugada con rodamina (Vector Laboratories) para teñir el epitelio pulmonar. Luego de 1 h se tomaron muestras de sangre periférica con anticoagulante y los ratones fueron sacrificados. Las muestras de sangre se procesaron por citometría de flujo para determinar las células verdes circulantes positivas que fueron analizadas con el software FlowJo.

A los ratones se les extirparon los pulmones, se fijaron y embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 30 micras de espesor para analizar bajo el microscopio confocal (Nikon C2) en busca de células verdes tumorales. Se recorrió todo el tejido

pulmonar y se cuantificaron las células verdes positivas por lóbulo pulmonar con una magnificación 100X.

Estudio de la cascada metastásica: PROLIFERACIÓN EN UN NICHOS SECUNDARIO

Mediante una inyección intravenosa de células 4T1 en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c (n=5/grupo) se generaron metástasis experimentales como se describió previamente. Tras 30 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados, se les extirparon los pulmones y se realizaron cortes histológicos que se inmunomarcaron con Ki67 como se describió previamente. Se cuantificó el porcentaje de células Ki67⁺ en las micrometástasis pulmonares con una magnificación 400X.

Modelo para la evaluación de terapia adyuvante

Se generaron tumores subcutáneos 4T1 y M-406 en ratones BALB/c y CBI respectivamente. Cuando los tumores alcanzaron los 100 mm³ los ratones fueron anestesiados (inyección intraperitoneal de una solución Ketamina 100mg/Kg, Xilacina 10mg/Kg) y se sometieron a cirugía para extirparles el tumor. Cuando se recuperaron de la anestesia, los ratones fueron distribuidos en los grupos experimentales (**Control** y **M+P**) y se mantuvieron en esas condiciones durante 6 semanas. Durante este tiempo, se controló que no hubiese recidivas. Luego, los ratones fueron sacrificados y sometidos a una inyección intra-traqueal de una solución de tinta china en PBS (1:16), para inflar y teñir los pulmones de negro, que luego fueron extirpados, se lavaron en PBS, y se sumergieron en solución Fekete para desteñir y poner de manifiesto los nódulos metastásicos. Se analizó el número de ratones que desarrolló metástasis luego de la cirugía en cada grupo experimental.

Análisis estadístico

La comparación estadística de los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales se realizó utilizando tests paramétricos y no paramétricos dependiendo de la variable a analizar.

Para la comparación de variables paramétricas, cuando se compararon los 4 grupos experimentales, se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) seguida del test de

Tukey, la comparación de 2 grupos experimentales se realizó mediante la prueba t de Student.

La comparación de variables no paramétricas se analizó por Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn en los análisis de los 4 grupos experimentales o se utilizó Mann - Whitney para comparar 2 grupos experimentales.

El análisis de supervivencia se realizó mediante el test Log-rank (Mantel-Cox).

El porcentaje de ratones con metástasis se analizó mediante la prueba chi-cuadrado.

En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

ESTUDIOS *in vitro* DE LA QUIMIOSENSIBILIDAD A FÁRMACOS EN REPOSICIONAMIENTO

Análisis del efecto de fármacos en reposicionamiento sobre la proliferación de la línea celular 4T1

Existen medicamentos sin patente actualmente utilizados en patologías distintas al cáncer que han mostrado alguna evidencia de efectos antitumorales; ya sea en modelos preclínicos o, en estudios clínicos retrospectivos en pacientes donde se observó una incidencia y gravedad reducida de cáncer. Con el objetivo de evaluar el efecto antitumoral de fármacos en reposicionamiento en tumores de mama triple negativos, realizamos una selección de fármacos, según datos disponibles en la bibliografía, para analizar sus efectos sobre la capacidad proliferativa de la línea celular 4T1 mediante ensayos de proliferación celular con sales de tetrazolio. Luego de incubar las células en presencia de concentraciones crecientes de los fármacos, el análisis espectrofotométrico mostró que todos los fármacos fueron capaces de disminuir el crecimiento celular en forma dependiente de la dosis (**Figura 11**).

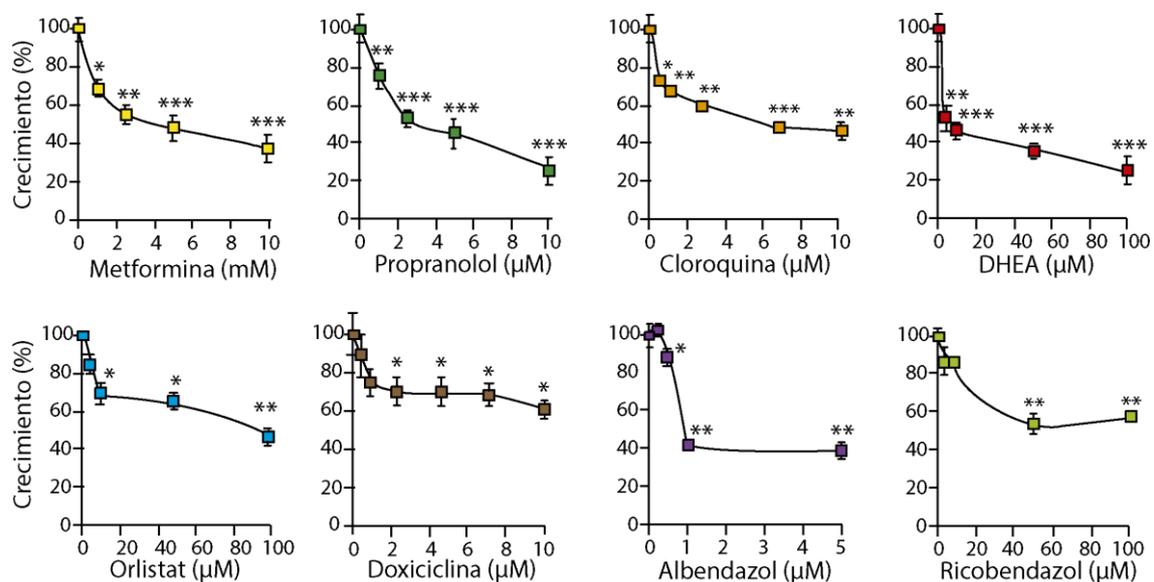


Figura 11: Evaluación del efecto de distintos fármacos reposicionados sobre el crecimiento de células 4T1. En todos los casos las células fueron incubadas durante 36 h en medio completo con concentraciones crecientes de los fármacos. El número de células viables se determinó por ensayo colorimétrico con el reactivo WST-1. Se graficó media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento respecto al control (100%).

Del análisis de las curvas de proliferación, para cada fármaco se eligió un valor donde se observó un efecto significativo sobre el crecimiento sin comprometer drásticamente la viabilidad celular, para posteriormente combinarlos entre sí. Esta selección no se realizó en el caso de ABZ y RBZ, ya que estos fármacos se utilizaron para estudios posteriores diferentes (ver trabajos en colaboración). En la **Tabla III** se detalla la concentración elegida para cada uno de los 6 fármacos utilizados para probar el efecto de distintas combinaciones sobre el crecimiento celular:

Fármaco	Concentración
Metformina	1 mM
Propranolol	1 μ M
Cloroquina	1 μ M
DHEA	1 μ M
Orlistat	5 μ M
Doxiciclina	2,5 μ M

Tabla III: En la columna de la izquierda se detalla el fármaco probado y en la columna de la derecha se indica la concentración de fármaco elegida para evaluar el efecto de la combinación sobre el crecimiento y para usar en los futuros experimentos *in vitro*.

En todos los casos, se observaron disminuciones significativas del crecimiento a la concentración elegida de aproximadamente el 20% ($P < 0,05$ para Met y Doxi; $P < 0,01$ para CQ, Prop y DHEA).

Mediante un ensayo idéntico al descrito anteriormente se evaluó el efecto de los fármacos en forma combinada sobre el crecimiento de las células tumorales 4T1. Se comparó el efecto de los fármacos por separado con la acción combinada de los mismos. De todas las combinaciones ensayadas, las más efectivas fueron Met+Prop ($P < 0,001$) y CQ+Prop ($P < 0,05$), ya que lograron diferenciarse significativamente de los tratamientos individuales (**Figura 12**).

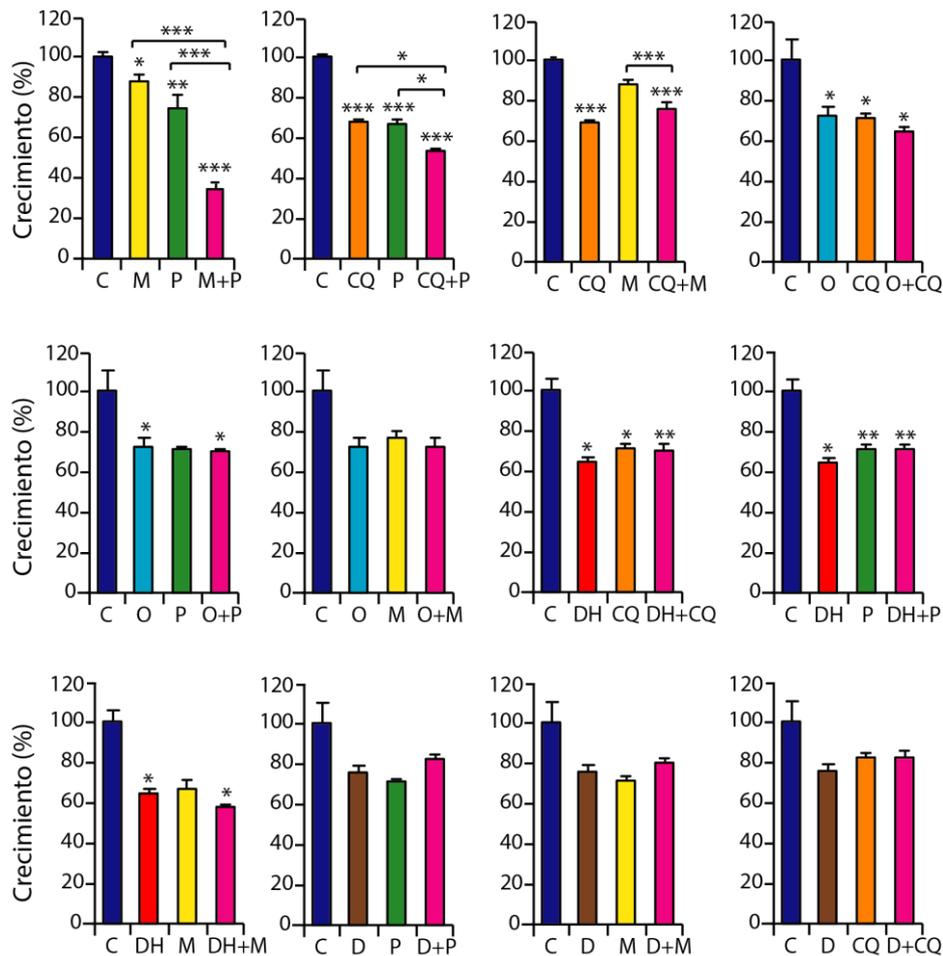


Figura 12: Efecto combinado de fármacos en reposicionamiento sobre el crecimiento de células 4T1. Las células fueron incubadas durante 36 h en presencia de los fármacos en forma individual y combinada. En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento respecto al control (100%). C: Control; M: Metformina; P: Propranolol; CQ: Cloroquina; O: Orlistat; DH: DHEA; D: Doxiciclina.

Este ensayo fue importante para seleccionar los fármacos a utilizar y sus concentraciones en el resto de nuestro trabajo, ya que partimos de un estudio inicial de 6 fármacos y lo limitamos a solo 3 de ellos: Met, Prop y CQ.

Estudio del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la proliferación de otras células tumorales de cáncer de mama triple negativo

Para respaldar nuestra elección, a través de ensayos idénticos al primer apartado, evaluamos el efecto de concentraciones crecientes de los fármacos elegidos sobre la proliferación celular de la línea MDA-MB-231 y las células derivadas de los tumores M-406 y M-234p. Como puede verse en la **Figura 13**, los 3 fármacos afectan el crecimiento celular en todos los modelos de manera dependiente de la dosis.

Además, el comportamiento fue similar al observado para la línea 4T1, por lo que la concentración elegida para cada fármaco para ensayar la combinación fue la misma.

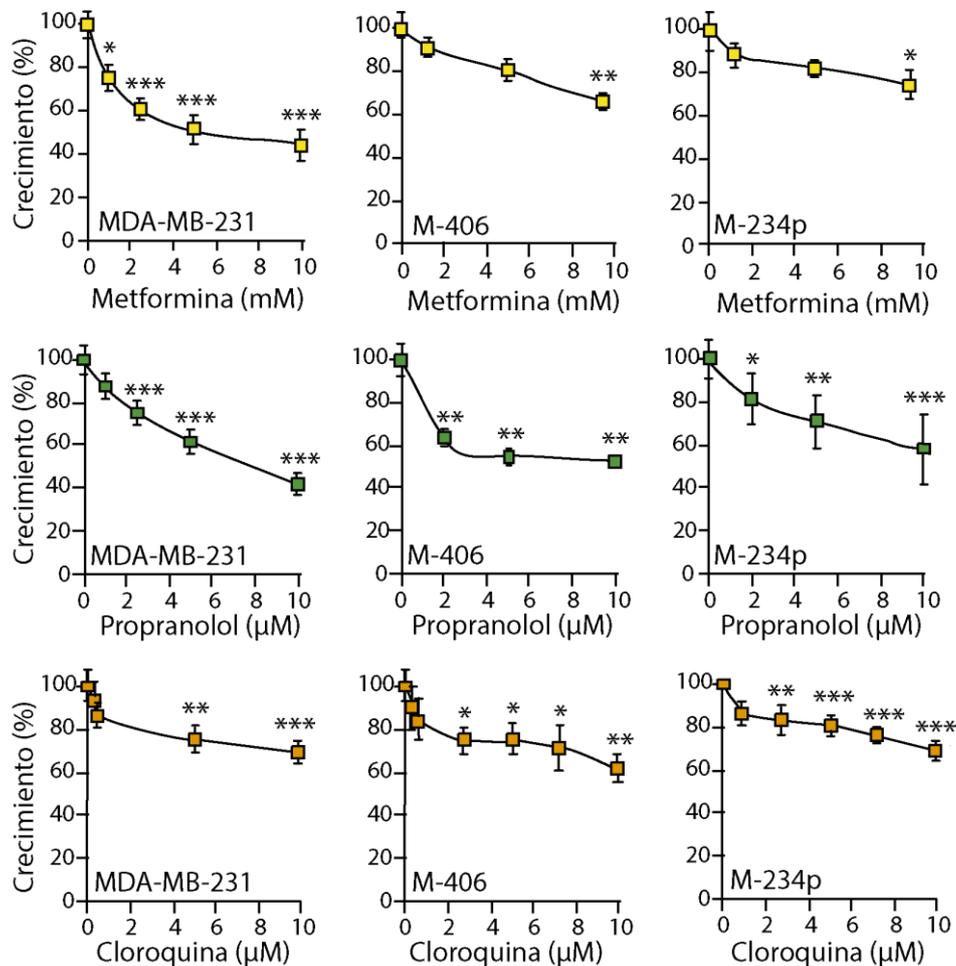


Figura 13: Efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre el crecimiento celular de otros tumores de mama triple negativos. Las células fueron incubadas durante 36 h en presencia de los fármacos. En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento respecto al control (100%).

Al evaluar el efecto de las combinaciones de Met, Prop y CQ, observamos que en todos los casos el efecto de la combinación de fármacos resultó ser más eficaz en disminuir el crecimiento celular respecto al grupo control (**Figura 14**). En particular el tratamiento con Met+Prop fue más efectivo que los tratamientos individuales en todos los modelos celulares ensayados ($P < 0,001$) y CQ+Prop solo se diferenció de los tratamientos individuales en la línea MDA-MB-231 (CQ+Prop vs CQ: $P < 0,001$; CQ+Prop vs Prop: $P < 0,05$).

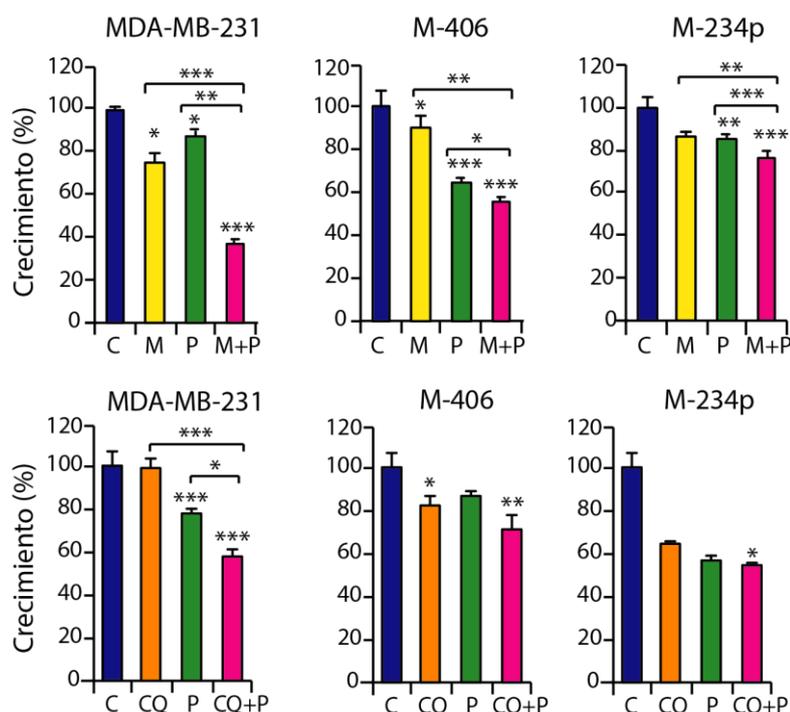


Figura 14: Efecto combinado de fármacos en reposicionamiento sobre el crecimiento celular de otros tumores de mama triple negativos. Las células fueron incubadas durante 36 h en presencia de los fármacos en forma individual y combinada. En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento respecto al control (100%). C: Control; M: Metformina; P: Propranolol; CQ: Cloroquina.

Exploración del efecto del tratamiento sobre la activación de la vía de MAP quinasas

La proteína ERK es un intermediario clave en la vía de las MAP quinasas, una ruta de transducción de señales intracelular íntimamente relacionada con proliferación y supervivencia celular. Los blancos terapéuticos de Met y Prop son intermediarios metabólicos en las células, por ejemplo, es ampliamente conocido el efecto que ejerce Met sobre la AMPK. Con el propósito de analizar la correcta activación en presencia de Met+Prop de vías de señalización asociadas a la proliferación, como es el caso de la activación de la vía de las MAP quinasas, evaluamos el estado de fosforilación de la proteína ERK en extractos de células 4T1 pre-tratadas durante 4 h (**Figura 15**). Observamos que 2 min de activación con SFB son suficientes para activar la señalización asociada a la proliferación que logramos apagar ayunando las células, esto se sostiene por 5 min, pero comienza a decrecer cuando la activación se realiza por 10 min. Puede verse que el mayor nivel de fosforilación de ERK se da a los 5 min luego de la activación con SFB, siendo esta respuesta menor en las células que fueron tratadas con Met+Prop.

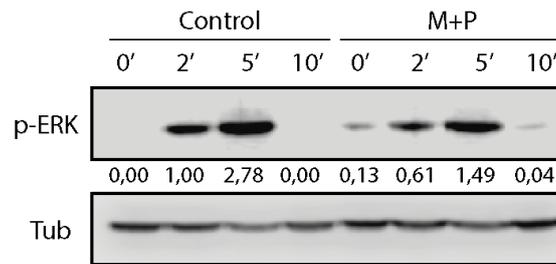


Figura 15: Detección de p-ERK mediante western blot. Los tiempos indicados corresponden a los minutos de activación de la vía con SFB a los que fueron sometidas las células luego del ayuno. Se indica la cuantificación de los niveles de fosforilación por densitometría. Control de carga: Tubulina

Análisis del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre células no tumorales

Los fármacos citotóxicos, utilizados en el tratamiento del cáncer, no combaten específicamente a las células tumorales, también afectan el crecimiento de células normales del organismo, lo que conlleva a los efectos tóxicos que manifiestan los pacientes. Luego de comprobar que los fármacos en estudio presentaban efectos sobre el crecimiento de las células tumorales, nos pareció importante evaluar si estos fármacos también afectaban el crecimiento de células no tumorales para descartar posibles efectos tóxicos. Como puede verse en la **Figura 16**, observamos que ni Met, Prop o CQ, ni sus combinaciones presentan efecto sobre el crecimiento de células normales en las dosis evaluadas.

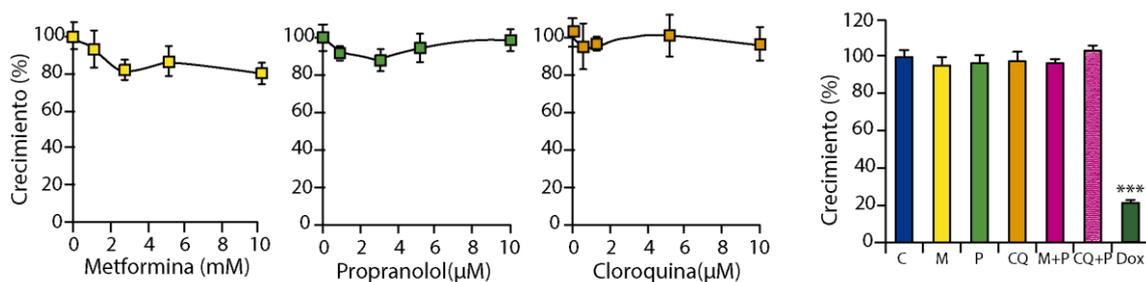


Figura 16: Efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre el crecimiento de células no tumorales. Las células fueron incubadas durante 36 h en presencia de los fármacos en forma individual en concentraciones crecientes, y en forma combinada. Se utilizó doxorrubicina (1 μ M) como control positivo. En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento respecto al control (100%). C: Control; M: Metformina; P: Propranolol; CQ: Cloroquina; Dox: Doxorrubicina.

Evaluación del efecto de metformina, propranolol y cloroquina administradas en forma crónica

Dado que los fármacos en reposicionamiento evaluados se administran a los pacientes en forma crónica, nos pareció importante comparar los efectos de estos fármacos administrados a corto plazo y en esquema crónico (largo plazo). Mediante ensayos idénticos a los anteriores, se determinaron las IC50 para cada fármaco luego de 24 h y 144 h de tratamiento en 2 modelos celulares distintos. Al comparar las mismas, se observó que luego de la incubación a largo plazo, las IC50 de los fármacos disminuyen significativamente con respecto a las IC50 calculadas a las 24 h de tratamiento (Tablas III, IV y V).

Línea celular	IC50 Met (mM) 24 h	IC50 Met (mM) 144 h
4T1	5,87 ± 0,23	0,17 ± 0,01***
MDA-MB-231	5,90 ± 0,39	0,27 ± 0,01***

Tabla IV: Valores de IC50 de Met para las células detalladas en tratamiento a corto (24 h) y largo (144 h) plazo. Los resultados se expresan como media ± EE de al menos tres experimentos independientes.

Línea celular	IC50 Prop (μM) 24 h	IC50 Prop (μM) 144 h
4T1	5,20 ± 0,43	0,10 ± 0,01***
MDA-MB-231	7,91 ± 0,20	0,21 ± 0,01***

Tabla V: Valores de IC50 de Prop para las células detalladas en tratamiento a corto (24 h) y largo (144 h) plazo. Los resultados se expresan como media ± EE de al menos tres experimentos independientes.

Línea celular	IC50 CQ (μM) 24 h	IC50 CQ (μM) 144 h
4T1	27,64 ± 2,43	4,89 ± 0,42***
MDA-MB-231	30,48 ± 10,23	15,31 ± 6,19

Tabla VI: Valores de IC50 de CQ para las células detalladas en tratamiento a corto (24 h) y largo (144 h) plazo. Para la línea 4T1, los resultados se expresan como media ± EE de al menos tres experimentos independientes; para la línea MDA-MB-231, los resultados se expresan como media ± EE de dos experimentos independientes.

Análisis del efecto combinado de metformina, propranolol y cloroquina

Una combinación de fármacos puede resultar más efectiva que los fármacos individuales, ya sea porque los efectos de cada fármaco por separado se suman sin afectarse entre sí, lo que se llama “efecto aditivo” o, la combinación puede conducir

a un resultado mejor que la suma de los efectos individuales, lo que se llama “efecto sinérgico”. Dado que, en los estudios realizados hasta el momento, observamos un efecto mayor de las combinaciones probadas, nos propusimos determinar si la eficacia de las combinaciones se debía a un efecto aditivo o sinérgico. Para tal fin se construyeron isoblogramas para la línea celular 4T1 en los cuales se probaron combinaciones de diferentes concentraciones de los fármacos (**Figura 17**).

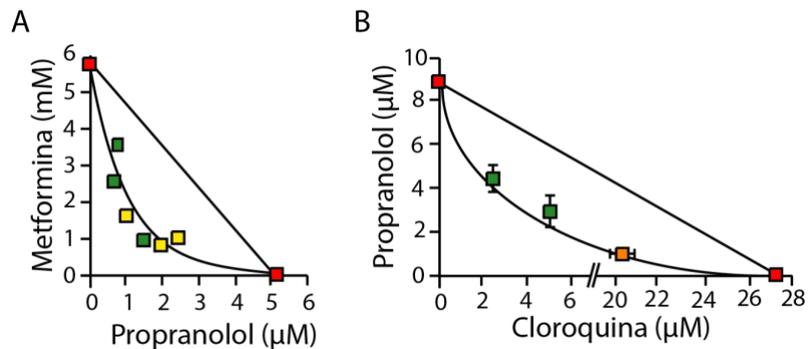


Figura 17: En ambos casos, se indica en rojo el valor correspondiente a la IC50 para cada fármaco en ausencia del otro. **A) Isoblograma de células 4T1 en presencia de Met y Prop:** En verde se indican los valores de IC50 para Prop en presencia de una concentración fija de Met y en amarillo los valores de IC50 para Met en presencia de una concentración fija de Prop. **B) Isoblograma de células 4T1 en presencia de CQ y Prop:** En verde se indican los valores de IC50 para Prop en presencia de una concentración fija de CQ y en naranja se indica la IC50 para CQ en presencia de una concentración fija de Prop.

Los resultados indican que las combinaciones Met+Prop y CQ+Prop actúan de forma sinérgica, dado que en ambos casos, los valores de IC50 para cada fármaco en presencia de distintas dosis del otro caen por debajo de la línea de aditividad. En el caso de la línea MDA-MB-231 solo se ensayó la combinación de Met y Prop, la cual arrojó resultados similares a los obtenidos en las células 4T1 (**Figura 18**).

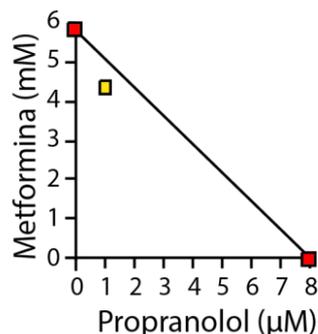


Figura 18: Isoblograma de células MDA-MB-231 en presencia de Met y Prop. En color rojo se indica el valor correspondiente a la IC50 para cada fármaco en ausencia del otro. En amarillo está representado el valor de IC50 para Met en presencia de una concentración fija de Prop.

Análisis del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la muerte celular

Las células tumorales tienen la capacidad de evadir las señales apoptóticas por lo que, no solo es importante que una terapia logre inhibir el crecimiento tumoral, también es deseable que el tratamiento sea capaz de inducir la muerte de las células malignas. Debido a esto, evaluamos si Met, Prop y CQ eran capaces de inducir muerte celular por apoptosis. Para esto, las células se incubaron en presencia de Met, Prop, CQ y sus combinaciones durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se levantaron y se tiñeron con Anexina-V e IP para determinar, mediante citometría de flujo, el porcentaje de poblaciones apoptóticas. En la línea 4T1 se observó un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas en todos los casos tratados (Met: $P < 0,05$; Prop: $P < 0,001$; Met+Prop: $P < 0,001$; Met+Prop vs Met y Prop: $P < 0,05$) (**Figura 19A**). Al realizar el mismo análisis para la línea celular MDA-MB-231, Met no se diferenció del grupo control, pero Prop y el tratamiento combinado fueron efectivos al aumentar el porcentaje de células apoptóticas en forma significativa ($P < 0,01$ en ambos casos) (**Figura 19B**). Con respecto al tratamiento con CQ y Prop, solo la combinación aumentó significativamente el porcentaje de la población apoptótica ($P < 0,001$ en 4T1; $P < 0,01$ en MDA-MB-231) (**Figura 19C,D**).

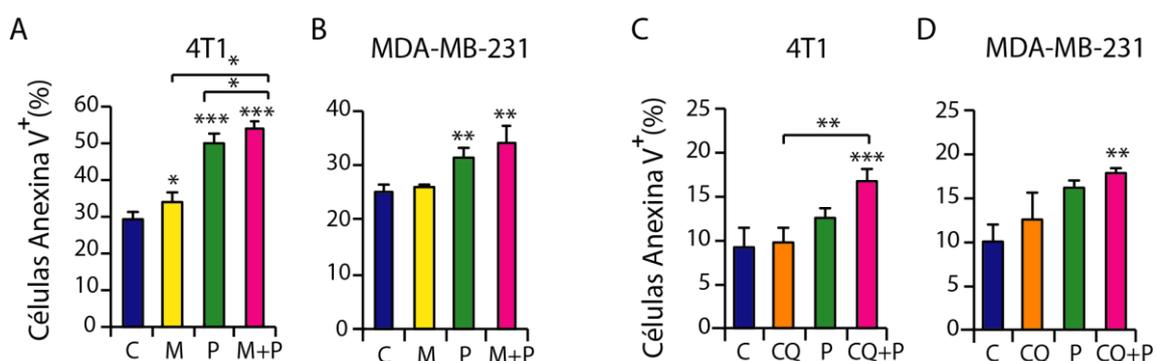


Figura 19: Estudio de la muerte celular por apoptosis inducida por los tratamientos. Se cuantificó el porcentaje de células positivas para Anexina V-FITC para las líneas celulares 4T1 y MDA-MB-231. A y B) Células tratadas con Met 5 mM y/o Prop 5 μ M. C y D) Células tratadas con CQ 1 μ M y/o Prop 2,5 μ M. En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentaje de células Anexina V+ en función del tratamiento recibido.

El tratamiento con Met y Prop también se probó en otros modelos tumorales. En las células derivadas de tumor M-406 solo Met ($P < 0,01$) y la combinación de Met+Prop mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas

($P < 0,05$) diferenciándose entre sí ($P < 0,05$); las células M-234p mostraron un aumento significativo en la cantidad de células apoptóticas en presencia de Prop ($P < 0,01$) y la combinación de Met+Prop ($P < 0,01$) siendo más efectivo el tratamiento combinado ($P < 0,05$) (**Figura 20**).

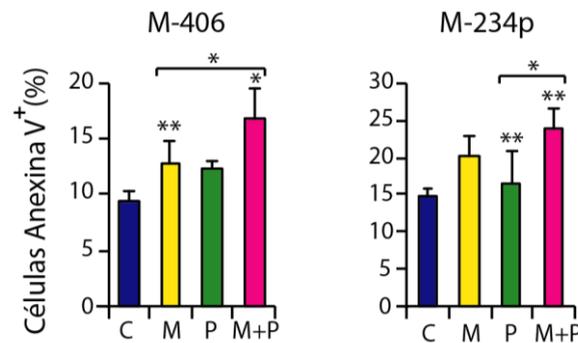


Figura 20: Estudio de la muerte celular por apoptosis inducida por los tratamientos con Met y Prop. Cuantificación del porcentaje de poblaciones apoptóticas para las células derivadas de tumor de mama M-406 y M-234p (Met 7,5 mM y/o Prop 10 μ M). En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentaje de células Annexina V⁺ en función del tratamiento recibido.

Estudio del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la capacidad clonogénica de las líneas celulares 4T1 y MDA-MB-231

No solo resulta importante evaluar el efecto de un tratamiento sobre la proliferación y la muerte celular. Evaluar la capacidad de formar colonias de una célula tumoral es conveniente ya que este tipo de pruebas miden la supervivencia celular *in vitro* basada en la capacidad que tiene cada célula por separado de crecer en una colonia cuando se siembran en una densidad muy baja. De esta forma, podemos medir la capacidad de expansión clonal que tienen las células en distintas condiciones, algo que no solo nos da una idea de su capacidad proliferativa, sino que también, se encuentra directamente relacionado con el desarrollo de metástasis, ya que en este caso, a partir de una única célula que logre llegar a un nuevo órgano, debe formarse un nuevo tumor. En consecuencia, evaluamos la capacidad de las células 4T1 y MDA-MB-231 de formar colonias en placas, en presencia o ausencia de los tratamientos, en forma individual y combinada. A su vez, se analizó el tamaño de las colonias formadas.

Para el caso de la línea celular 4T1, Met+Prop inhibió de forma significativa la capacidad de formar colonias respecto del control ($P < 0,001$), diferenciándose de

los tratamientos individuales (Met+Prop vs Met: $P < 0,001$; Met+Prop vs Prop: $P < 0,01$). Además, el tamaño de las colonias fue significativamente menor a partir del día 5 del ensayo ($P < 0,001$) (**Figura 21A-C**). En cuanto a las células MDA-MB-231, el tratamiento con Met y/o Prop disminuyó significativamente el número de colonias formadas respecto al control ($P < 0,001$ en todos los casos), nuevamente el tratamiento combinado mostró mayor efecto que los individuales (Met+Prop vs Met y Prop: $P < 0,01$); el diámetro de las colonias formadas fue significativamente menor, a los 8 días del ensayo, en todos los casos tratados (Met: $P < 0,01$; Prop: $P < 0,001$; Met+Prop: $P < 0,001$; Met+Prop vs Met y Prop: $P < 0,01$) (**Figura 21D**).

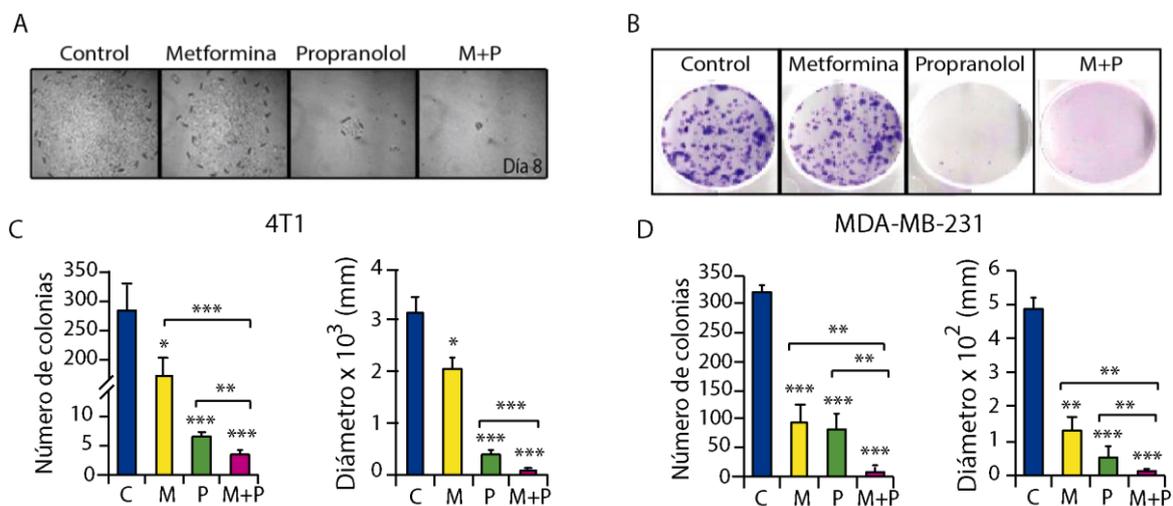


Figura 21: Estudio de la capacidad clonogénica en presencia de metformina y propranolol. A) Fotografías representativas de las colonias 4T1 bajo el microscopio óptico invertido (10X) a los 8 días del tratamiento. El tamaño de las mismas se analizó mediante el software ImageJ. B) Fotos representativas de colonias de las células 4T1 tratadas con Met y/o Prop fijadas y teñidas con Giemsa al final del experimento. C) Número de colonias 4T1 formadas (Izquierda). Diámetro de las colonias formadas al día 8 (Derecha). D) Número de colonias MDA-MB-231 formadas (Izquierda). Diámetro de las colonias formadas al día 8 (Derecha). Las concentraciones utilizadas fueron Met: 5 mM y Prop: 5 μ M. En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes.

La combinación CQ+Prop también disminuyó el número de colonias de células 4T1 formadas, diferenciándose del grupo CQ ($P < 0,01$) y tanto los tratamientos individuales como la combinación afectaron el tamaño de las colonias formadas ($P < 0,001$), sin observarse diferencias significativas al comparar la combinación con los fármacos individuales (**Figura 22A**). En la línea MDA-MB-231, el tratamiento con CQ y/o Prop no mostró efectos significativos en la capacidad clonogénica pero sí disminuyó significativamente el tamaño de las colonias formadas diferenciándose de los tratamientos individuales ($P < 0,001$ en todos los casos) (**Figura 22B**).

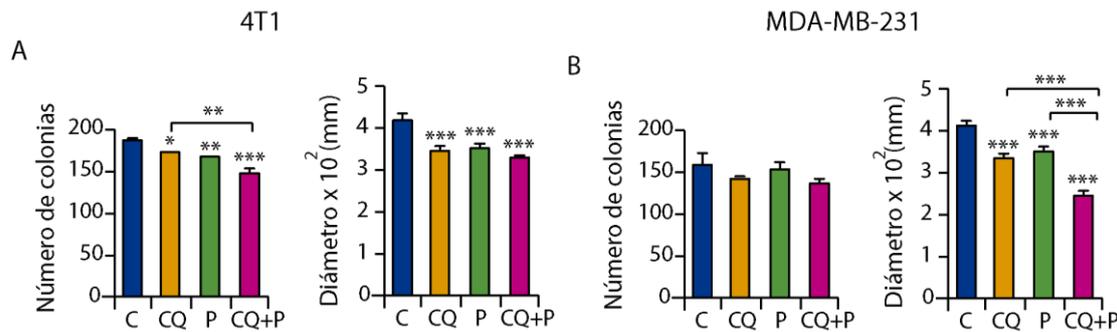


Figura 22: Estudio de la capacidad clonogénica en presencia de cloroquina y propranolol. A) Número de colonias 4T1 formadas (Izquierda). Diámetro de las colonias al día 6 de tratamiento (Derecha). B) Número de colonias MDA-MB-231 formadas (Izquierda). Diámetro de las colonias al día 6 de tratamiento (Derecha). Las concentraciones utilizadas fueron CQ: 1 μ M y Prop: 1 μ M. En todos los casos se graficó la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. El tamaño de las colonias se analizó con el software ImageJ.

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la bioenergética mitocondrial

El blanco intracelular de Met es la mitocondria y está ampliamente reportado el efecto de este fármaco sobre la biogénesis mitocondrial. Tanto Met como Prop son fármacos cuyos efectos en las células se deben a la alteración que producen en su metabolismo; dado que la mitocondria es clave en el metabolismo de las células y dado el efecto sinérgico que observamos para la combinación Met+Prop, nos interesó evaluar si Prop aportaba algo a los efectos ya reportados para Met. En primer lugar, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la respiración mitocondrial, para lo cual se utilizaron células 4T1 intactas, sobre las que se realizaron mediciones en tiempo real de la tasa de consumo de oxígeno (OCR).

En primer lugar, se realizaron las mediciones tras 4 h de tratamiento, donde las células mostraron una respiración basal y generación de ATP dependiente de mitocondrias reducida en un 35% y 33%, respectivamente, en comparación con el control. Met también produjo una disminución significativa, tanto en la respiración mitocondrial como en la producción de ATP dependiente de la dosis, que alcanzó el 77% y el 83% respectivamente a 7,5 mM. Es importante destacar que cuando Met se combinó con Prop se redujeron aún más estos parámetros ($P < 0,001$ para todas las combinaciones probadas, **Figura 23A,B**).

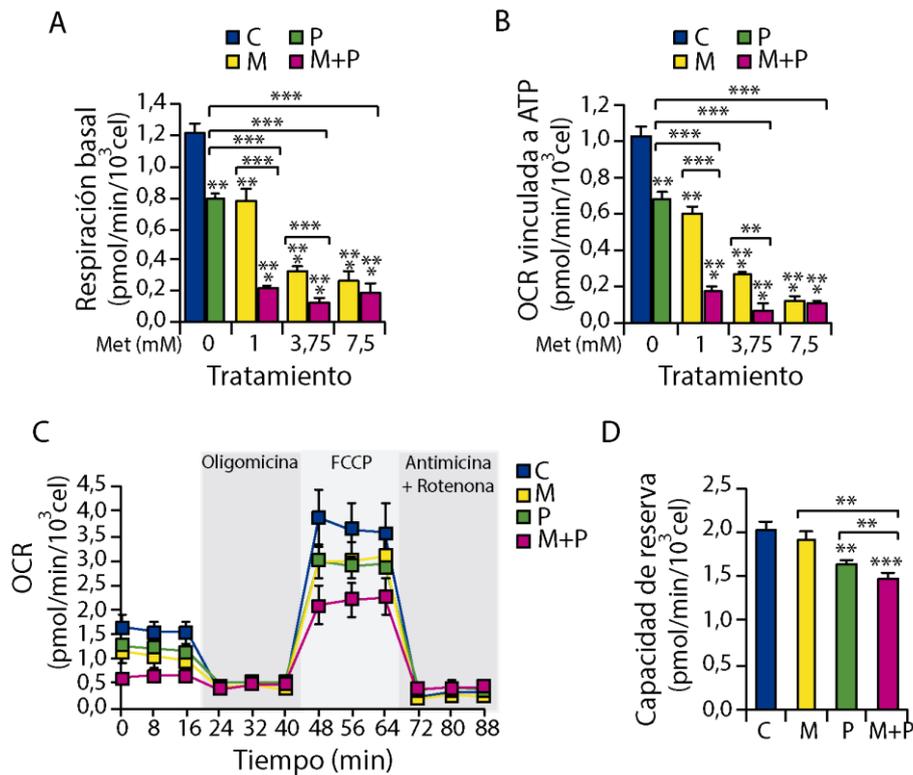


Figura 23: Estudio de la bioenergética mitocondrial. Las células 4T1 se trataron con Prop (10 μ M) y/o Met (1; 3,75 y 7,5 mM). La medición del nivel basal de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) fue seguida por inyecciones secuenciales de oligomicina, FCCP y antimicina A/rotenona para determinar la cantidad de consumo de oxígeno no vinculado a la generación de ATP, la respiración máxima y el consumo de oxígeno no mitocondrial. A) Respiración basal, calculada como la diferencia entre OCR basal y OCR no mitocondrial tras 4 h de tratamiento. B) OCR vinculada a ATP, definida como la diferencia entre OCR basal y el consumo de oxígeno no vinculado a ATP tras 4 h de tratamiento. C) Perfil bioenergético mitocondrial en tiempo real de células 4T1 intactas tras 4 h de tratamiento (Met: 1 mM, Prop: 10 μ M). D) Capacidad de reserva, definida como la diferencia entre las tasas basal y máxima.

Cuando se agregó FCCP, un desacoplante de la cadena de transporte de electrones, se estimuló la respiración mitocondrial imitando un aumento en la demanda de energía y mostrando la tasa máxima de respiración, la cual fue menor en las células tratadas, siendo la combinación de Met+Prop el tratamiento más efectivo en reducir la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células 4T1 (Figura 23C). En línea con esto, la capacidad de reserva también fue significativamente disminuida por el tratamiento combinado ($P < 0,001$; Figura 23D).

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la glucólisis

Las células malignas son conocidas por su capacidad para adaptar su fenotipo metabólico rápidamente a las necesidades del medio. Teniendo en cuenta la

inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial por parte de Met y Prop que observamos antes, determinamos si las células 4T1 a su vez hiperactivaban la glucólisis. Para tal fin, medimos la tasa de acidificación extracelular (ECAR) que refleja la liberación de lactato a lo largo del tiempo. Encontramos que las células expuestas a diferentes dosis de Met durante 4 h mostraron un aumento de ECAR dependiente de la dosis, después de la adición de glucosa (**Figura 24A**). El tratamiento con Prop también estimuló la glucólisis basal de una manera dependiente del tiempo (**Figura 24B**).

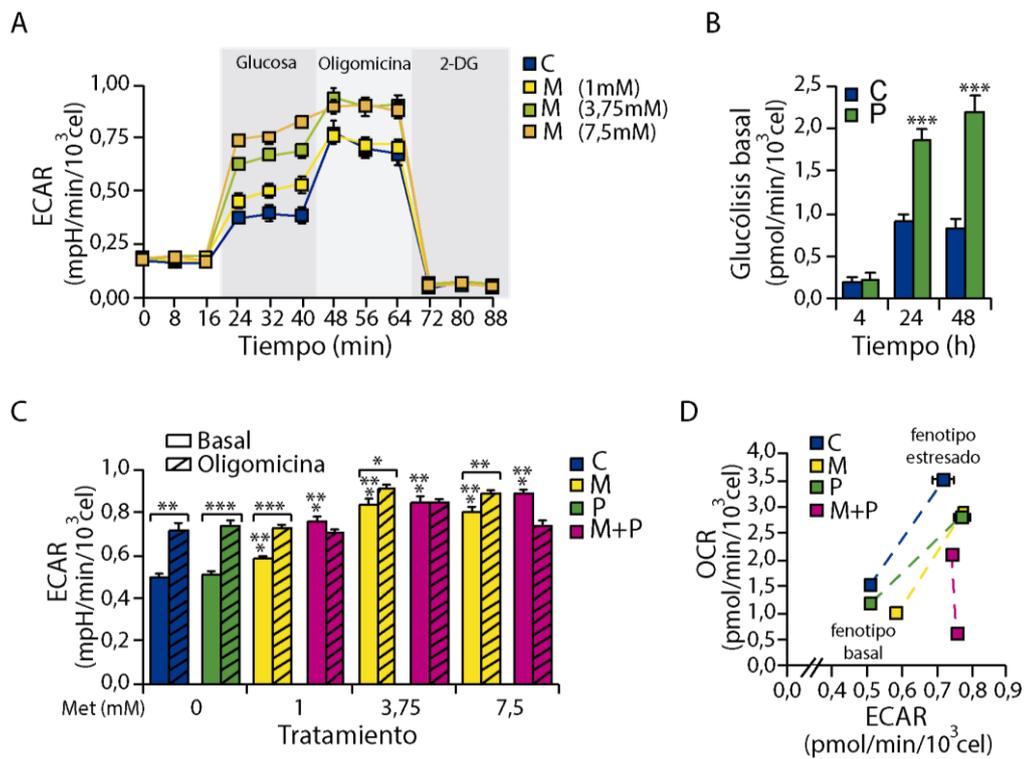


Figura 24: Determinación del efecto de metformina y propranolol sobre la glucólisis. A) Las mediciones en tiempo real de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) se realizaron en cultivos de células 4T1, primero incubados sin glucosa y luego suplementados sucesivamente con glucosa, oligomicina que consecuentemente acelera el proceso glucolítico, y con el inhibidor de la glucólisis 2-desoxiglucosa (2-DG). B) Glucólisis basal, calculada como la diferencia entre ECAR mediada por glucosa y sin glucosa, en células 4T1 control o tratadas con Prop 10 μ M durante los tiempos indicados. C) ECAR basal y estimulado con oligomicina en células incubadas durante 4 h con fármacos solos o combinados (Prop 10 μ M). D) Fenotipo energético de las células 4T1 después de un tratamiento de 4 h con Met y/o Prop. La respiración mitocondrial y la glucólisis se analizaron simultáneamente en las condiciones del medio de partida (fenotipo basal) y luego del agregado de FCCP y oligomicina, respectivamente (fenotipo estresado). El potencial metabólico (líneas de puntos) reveló la capacidad de las células 4T1 para satisfacer una demanda de energía y la vía preferida.

Prop mejoró significativamente las propiedades pro-glucolíticas de Met en condiciones basales, especialmente para las concentraciones más bajas (**Figura 24C**). Después de la adición de oligomicina, las células control o tratadas en forma

individual exhibieron un ECAR más alto; por el contrario, las combinaciones con Met y Prop, cualesquiera que sean las concentraciones utilizadas, obligaron a las células 4T1 a activar la glucólisis al máximo, como lo revela su insensibilidad a la oligomicina (**Figura 24C**). En la **Figura 24D**, se representa el fenotipo energético para las células 4T1, donde puede verse que, en aquellas células sin tratar o que recibieron los tratamientos individuales, su fenotipo estresado (luego del agregado de FCCP y oligomicina) muestra que aumentaron tanto la OCR como la ECAR; sin embargo, aquellas células tratadas con Met+Prop, luego del agregado de FCCP y oligomicina, no lograron modificar su ECAR.

EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN REPOSICIONAMIENTO SOBRE EVENTOS RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE METÁSTASIS

El desarrollo de metástasis es la principal causa de muerte asociada a cáncer, debido a esto, es importante encontrar tratamientos que no solo sean efectivos contra el crecimiento del tumor primario, sino que también eviten la formación de nodos secundarios. Durante el desarrollo de metástasis, las células malignas deben poner en marcha una serie de eventos para promover la migración celular de modo que puedan colonizar nuevos tejidos en el organismo. Debido a esto y a los resultados que sustentan el efecto *in vitro* de los tratamientos sobre la proliferación celular y apoptosis, resultó interesante realizar estudios para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares tumorales.

Análisis del efecto de metformina, propranolol y cloroquina sobre la migración celular

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la capacidad migratoria de las células, se realizaron ensayos de cierre de herida en placa donde las células fueron sometidas a los tratamientos individuales y combinados. Tanto para las células 4T1 como para las células MDA-MB-231, los resultados con Met+Prop muestran que el área de la herida a lo largo del tiempo, disminuye en forma más lenta en las células tratadas respecto de aquellas que no recibieron tratamiento alguno o solo recibieron los tratamientos individuales (**Figura 25A-C**). En particular, en el caso de

las células 4T1, a partir de las 4 h de tratamiento se observaron diferencias significativas en el efecto de todos los tratamientos respecto al control (Met $P < 0,05$; Prop $P < 0,01$; Met+Prop $P < 0,001$) y para las células MDA-MB-231 el tratamiento combinado presentó un efecto significativo sobre el cierre de la herida a partir de las 4 h ($P < 0,01$) mientras que Prop lo hizo a partir de las 12 h ($P < 0,05$) y Met a partir de las 16 h ($P < 0,05$). En ambos modelos celulares, el efecto del tratamiento combinado sobre el cierre de la herida se diferenció de los tratamientos individuales como puede verse en la representación del área bajo la curva. Células 4T1: Met+Prop vs. Met y Prop $P < 0,01$. Células MDA-MB-231: Met+Prop vs. Met $P < 0,001$; Met+Prop vs. Prop $P < 0,01$. En el caso del tratamiento con CQ y/o Prop, ni los tratamientos individuales, ni la combinación ejercieron efecto sobre la capacidad migratoria de las células 4T1 (**Figura 25D**).

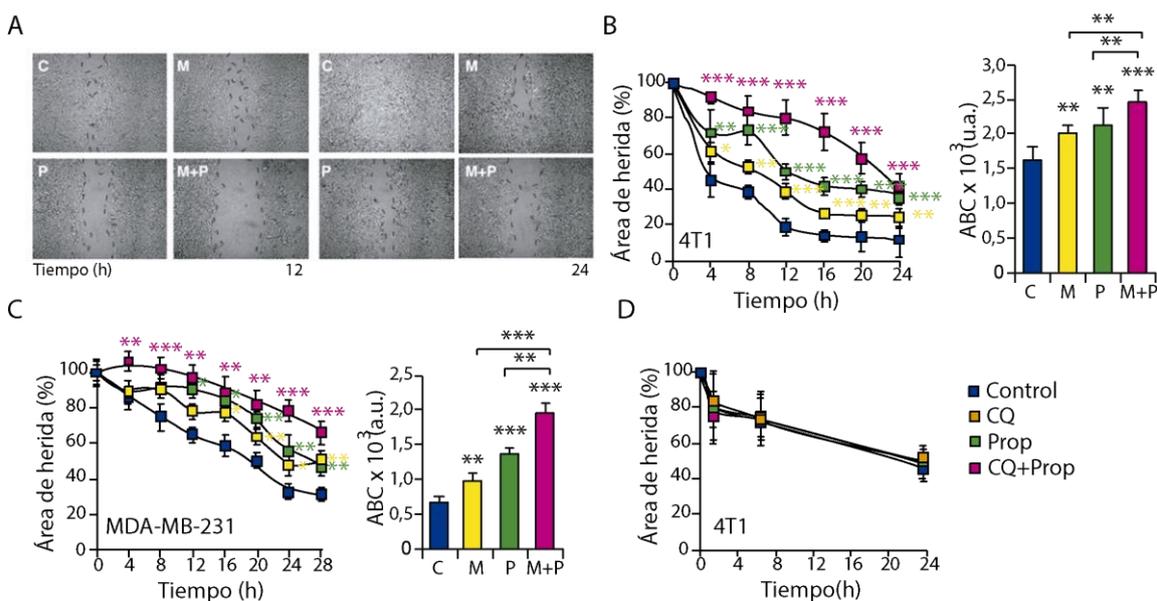


Figura 25: Efecto de los tratamientos sobre la migración celular. A) Fotografías representativas tomadas bajo el microscopio invertido (100X) de las células 4T1 tratadas con Met y/o Prop a 12 y 24 h de tratamiento. El área de la herida fue calculada utilizando el software ImageJ. B) Área de la herida en función del tiempo para células 4T1 que recibieron el tratamiento con Met 5 mM y/o Prop 5 μ M; a partir de este gráfico se calculó el área bajo la curva (ABC). C) Área de la herida en función del tiempo para células MDA-MB-231 que recibieron el tratamiento con Met 5 mM y/o Prop 5 μ M; a partir de este gráfico se calculó el ABC. D) Área de la herida en función del tiempo para células 4T1 que recibieron el tratamiento con CQ 1 μ M y/o Prop 2,5 μ M.

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la invasión celular

Para lograr colonizar nuevos órganos, las células tumorales no solo deben ganar capacidad migratoria, sino también deben lograr invadir la matriz extracelular y el tejido circundante. Para evaluar el impacto del tratamiento sobre la capacidad invasiva de las células tumorales, se realizó un ensayo de invasión celular en matrigel en cámaras de invasión, en ausencia y presencia de Met y/o Prop. Los resultados para las células 4T1 muestran una disminución significativa en la invasión relativa de las células tratadas respecto a las que no recibieron tratamiento (Met: $P < 0,05$; Prop: $P < 0,001$; Met+Prop: $P < 0,001$) (Figura 26A,B). Para las células MDA-MB-231 también se observó una disminución de la invasión relativa en todos los casos tratados (Met: $P < 0,05$; Prop: $P < 0,05$; Met+Prop: $P < 0,001$) (Figura 26C).

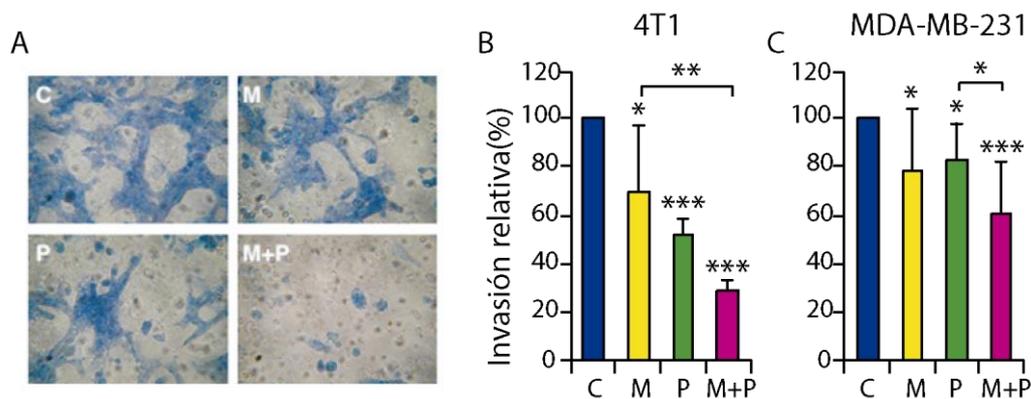


Figura 26: Efecto de metformina y propranolol sobre la invasión celular. Para cuantificar invasión las células fueron fijadas y posteriormente teñidas con Giemsa. A) Se muestran fotos representativas de cada grupo para las células 4T1 (400X), se analizaron 4 campos por pocillo. Los gráficos muestran los resultados como porcentajes de invasión respecto al control (100%) para las líneas 4T1 (B) y MDA-MB-231 (C) (Met: 5 mM; Prop: 5 μ M). Se graficó mediana y rango de tres experimentos independientes. C: Control; M: Met; P: Prop; M+P: Met+Prop.

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la expresión de marcadores asociados a la transición epitelio mesénquima

La transición epitelio-mesénquima suele darse en diversos procesos fisiológicos, como embriogénesis o sanación de heridas y, se cree que resulta clave en el desarrollo de metástasis, ya que las células epiteliales sufren modificaciones en su morfología y reprograman su expresión génica para adquirir movilidad y un fenotipo invasivo. Dado el efecto que observamos sobre la migración y la invasión celular por parte del tratamiento con Met+Prop, decidimos evaluar marcadores relacionados con la transición epitelio-mesénquima, como E-cadherina (Figura 27)

Snail y β -catenina (datos no mostrados). Contrariamente a lo esperado, no encontramos diferencias significativas en la expresión de estos marcadores entre los grupos experimentales.

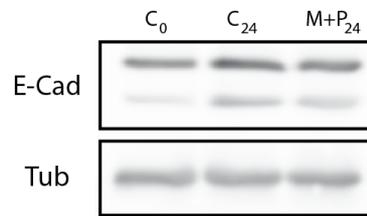


Figura 27: Detección de E-cadherina mediante western blot. Los tiempos indicados como subíndices corresponden a los tiempos de incubación de las células con o sin tratamiento. Control de carga: Tubulina

ESTUDIOS *in vivo* DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LOS FÁRMACOS EN REPOSICIONAMIENTO

Con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos en estudio sobre el crecimiento tumoral, se desafiaron ratones hembra con las células tumorales en forma subcutánea y se les administraron los tratamientos en el agua de bebida. Se evaluó el efecto del tratamiento con Met y/o Prop y CQ y/o Prop. A lo largo del ensayo se tomaron medidas de los diámetros mayor y menor del tumor con los que se calculó el volumen tumoral para cada ratón. A partir de estos valores se realizó una curva de ajuste de crecimiento exponencial para cada grupo.

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la evolución del volumen tumoral

Para evaluar el efecto antitumoral de Met y Prop, se utilizaron dos modelos murinos de tumores de mama triple negativos inmunocompetentes. En los ratones BALB/c inoculados con las células 4T1, el efecto de Prop fue significativo a partir del día 25 ($P < 0,05$) y el efecto de Met fue significativo a partir del día 28 del ensayo ($P < 0,05$). A diferencia de esto, el grupo tratado con la combinación de Met+Prop no solo presentó siempre un volumen tumoral menor respecto al resto de los grupos, sino que su efecto fue significativo a partir del día 14 del ensayo ($P < 0,05$). Con el correr de los días la diferencia entre los valores de cada grupo se hizo más pronunciada aún (**Figura 28A**), logrando diferencias significativas entre los grupos al día 25. Cabe destacar, que luego del día 40 solo quedaron en tratamiento los animales de los

grupos tratados, debido a que en el grupo control, todos los ratones alcanzaron el máximo volumen tumoral éticamente permitido y debieron ser sacrificados.

Además, en todos los grupos tratados el tiempo de duplicación para el tumor de células 4T1 fue mayor que para el grupo control, el grupo tratado con la combinación Met+Prop presentó el mayor tiempo de duplicación tumoral como puede verse en la **Figura 28B** (Met: $P < 0,01$; Prop: $P < 0,05$; Met+Prop: $P < 0,01$).

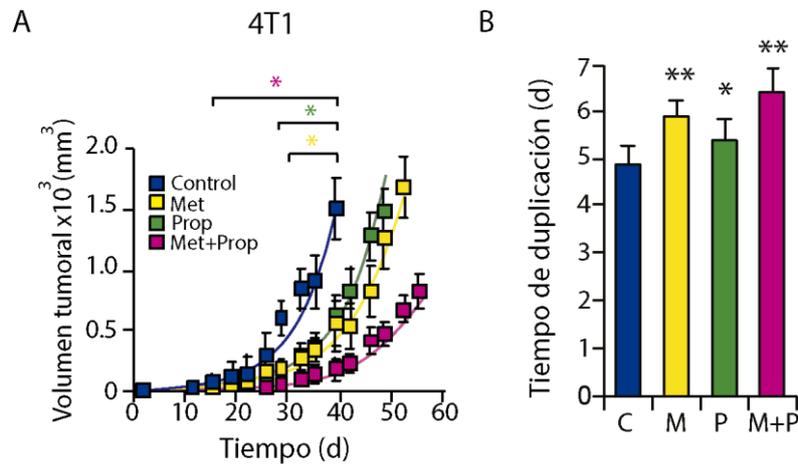


Figura 28: Evolución del volumen tumoral y tiempo de duplicación del tumor de células 4T1. A) Evolución del volumen tumoral. Curva de ajuste exponencial para cada grupo experimental. Se graficó media \pm EE de un experimento representativo. B) Tiempos de duplicación tumoral (media \pm EE). C: Control; M: Met; P: Prop; M+P: Met+Prop.

En el caso de los ratones CBI portadores del tumor M-406, aquellos tratados con Prop y Met+Prop mostraron efectos significativos en el crecimiento tumoral a partir del día 15 ($P < 0,05$); el efecto de Met fue significativo a partir del día 17 ($P < 0,05$). Los ratones del grupo control fueron los primeros en alcanzar el máximo volumen tumoral éticamente permitido y fueron sacrificados (**Figura 29A**).

El tiempo de duplicación para el tumor M-406, fue mayor en todos los grupos tratados en forma significativa, siendo el grupo tratado con Met+Prop el que presentó el mayor tiempo de duplicación tumoral (Met: $P < 0,01$; Prop: $P < 0,05$; Met+Prop: $P < 0,01$) (**Figura 29B**).

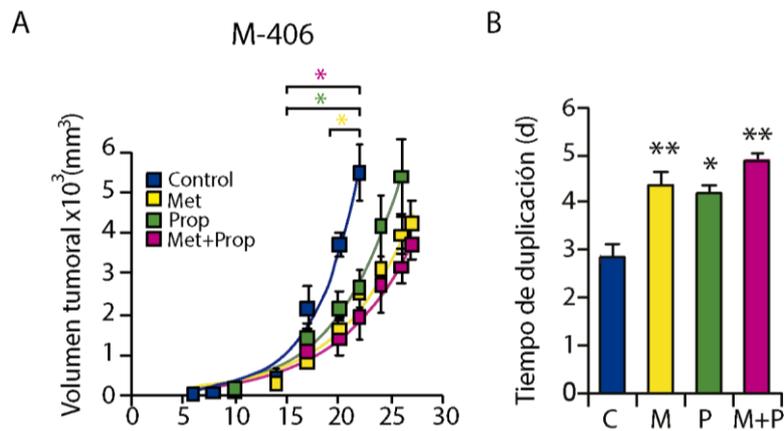


Figura 29: Evolución del volumen tumoral y tiempo de duplicación del tumor M-406. A) Evolución del volumen tumoral. Curva de ajuste exponencial para cada grupo experimental. Se graficó media \pm EE de un experimento representativo. B) Tiempos de duplicación tumoral (media \pm EE). C: Control; M: Met; P: Prop; M+P: Met+Prop.

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la supervivencia

A medida que cada ratón alcanzó el máximo volumen tumoral éticamente permitido, se lo sacrificó y se construyó la correspondiente curva de supervivencia.

Para el caso de los tumores 4T1, todos los grupos tratados aumentaron la supervivencia respecto al control, siendo la combinación de Met+Prop la que mostró el efecto más pronunciado ($P < 0,001$); entre los días 39 y 48 del ensayo, todos los ratones del grupo control debieron ser sacrificados, mientras que del grupo tratado con Met+Prop todavía no se había sacrificado ningún animal (**Figura 30A**). Los ratones con el tumor M-406 que fueron tratados con Met y/o Prop, también mejoraron su supervivencia respecto a los ratones del grupo control, siendo esta diferencia significativa para el grupo que recibió la combinación Met+Prop ($P < 0,001$) (**Figura 30B**).

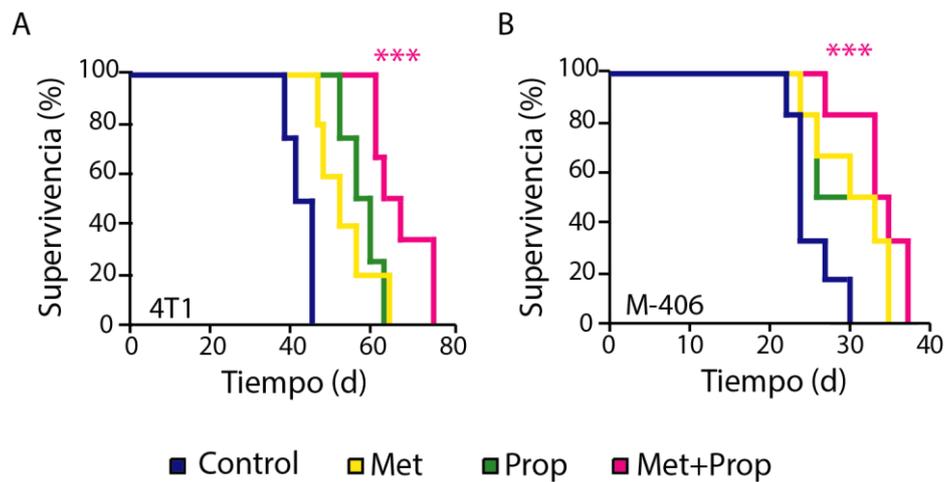


Figura 30: Estudio de la supervivencia de ratones tratados con metformina y propranolol. A) Curva de supervivencia de ratones portadores del tumor 4T1 tratados con Met y/o Prop. B) Curva de supervivencia de ratones portadores del tumor M-406 tratados con Met y/o Prop.

Estudio de la toxicidad asociada a metformina y propranolol

La búsqueda de nuevos tratamientos para el cáncer no solo se basa en encontrar tratamientos efectivos, también es importante que estos sean seguros y no provoquen efectos tóxicos severos. Una medida cuantificable e indicadora de toxicidad general en nuestros modelos, es la modificación del peso corporal relativo de los ratones. Se considera que existe toxicidad cuando el peso corporal desciende 20% o más, con respecto al valor antes de comenzar el tratamiento. Además, se controlaron semanalmente otros parámetros en los ratones como indicadores de toxicidad: la calidad del pelaje, la actividad motora, el comportamiento, la frecuencia respiratoria y el consumo de comida y bebida. No se observaron cambios evidentes en ninguno de los parámetros mencionados. En la **Figura 31** se muestra la representación gráfica de la evolución del peso relativo de los ratones donde puede verse claramente que no hubo modificaciones significativas luego de tratarlos con Met y/o Prop.

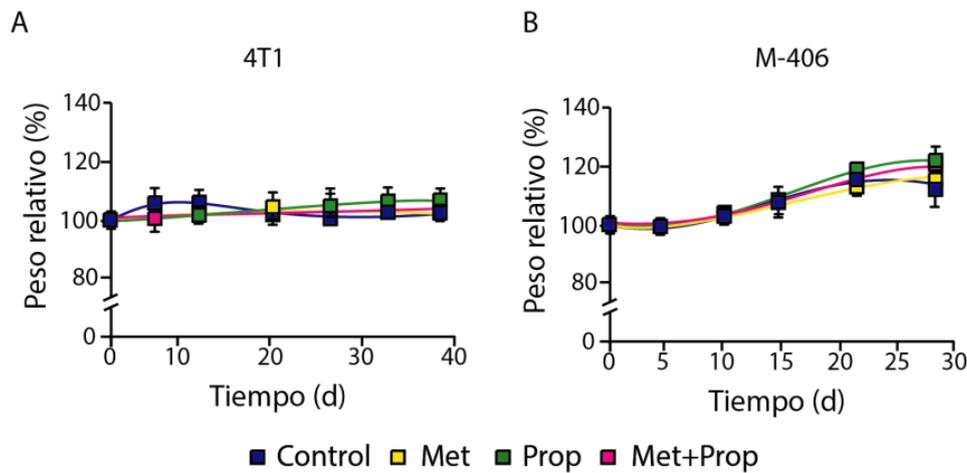


Figura 31: Evolución del peso corporal de ratones tratados con Met y/o Prop. Los datos se expresan como el porcentaje del peso corporal respecto al peso antes de iniciar el tratamiento (media \pm EE). A) Ratones portadores del tumor de células 4T1 tratados con Met y/o Prop. B) Ratones portadores del tumor M-406 tratados con Met y/o Prop.

Análisis del efecto de cloroquina y propranolol sobre la evolución del volumen tumoral

En este caso se utilizaron dos modelos tumorales inmunocompetentes, el tumor M-234p inoculado en ratones BALB/c y el tumor M-406 inoculado en ratones CBI. Para el caso de ratones BALB/c, no llegaron a observarse diferencias significativas en la evolución del volumen tumoral entre los grupos, pero puede verse que los ratones que recibieron el tratamiento combinado con CQ+Prop presentaron una menor cinética de crecimiento tumoral (**Figura 32A**).

A partir de las curvas de ajuste de crecimiento exponencial, se calculó el tiempo de duplicación tumoral. En este caso, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales para este parámetro (**Figura 32B**)

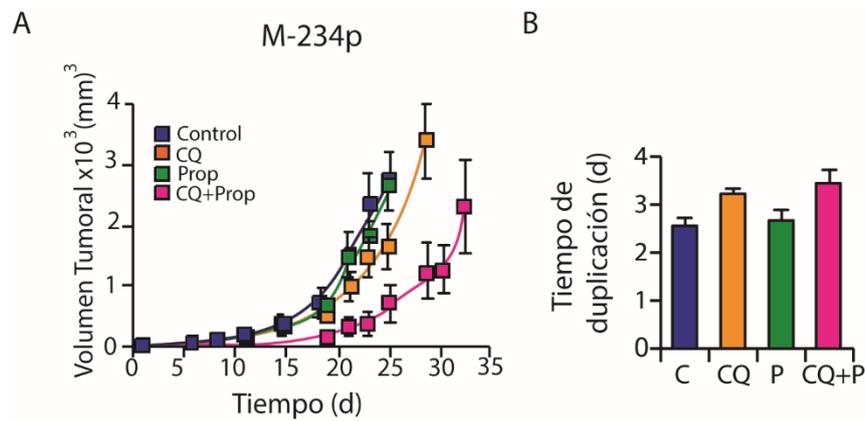


Figura 32: Evolución del volumen tumoral y tiempo de duplicación del tumor M-234p. A) Evolución del volumen tumoral. Curva de ajuste exponencial para cada grupo experimental. Se graficó media \pm EE de un experimento representativo. B) Tiempos de duplicación tumoral (media \pm EE). C: Control; CQ: Cloroquina; P: Prop; CQ+P: Cloroquina+Prop.

Los ratones CBI, portadores del tumor M-406, tratados con CQ y Prop, tampoco llegaron a mostrar mejoras significativas en la evolución del volumen tumoral ni en el tiempo de duplicación tumoral (Figura 33A,B).

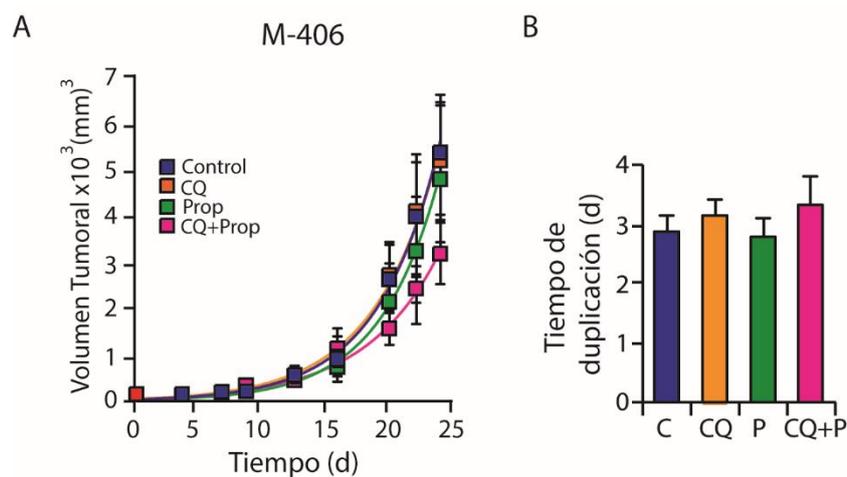


Figura 33: Evolución del volumen tumoral y tiempo de duplicación del tumor M-406. A) Evolución del volumen tumoral. Curva de ajuste exponencial para cada grupo experimental. Se graficó media \pm EE de un experimento representativo. B) Tiempos de duplicación tumoral (media \pm EE). C: Control; CQ: Cloroquina; P: Prop; CQ+P: Cloroquina+Prop.

Análisis del efecto de cloroquina y propranolol sobre la supervivencia

A pesar de no haber visto un efecto claro del tratamiento con CQ y/o Prop sobre el crecimiento tumoral, evaluamos si estos tratamientos afectaban la supervivencia de los animales. Encontramos que CQ+Prop afectó positivamente la supervivencia de los animales BALB/c portadores del tumor M-234p, pero esta mejora no llegó a ser significativa (Figura 34A). En el caso de los ratones CBI portadores del tumor M-406,

estos no presentaron mejoras en la supervivencia al ser tratados (**Figura 34B**). Es importante destacar, que en estos ratones no observamos diferencias significativas en el desarrollo de metástasis espontáneas (dato no mostrado).

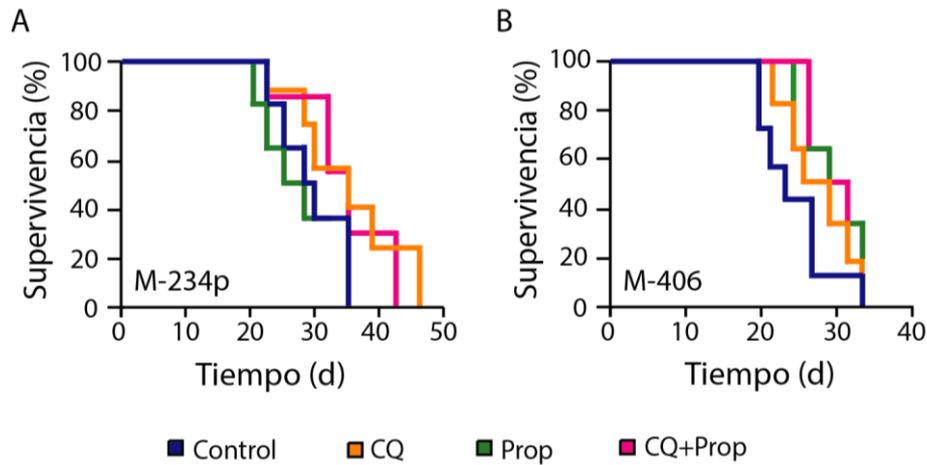


Figura 34: Estudio de la supervivencia de ratones tratados con cloroquina y propranolol. A) Curva de supervivencia de ratones portadores del tumor M-234p tratados con CQ y/o Prop. B) Curva de supervivencia de ratones portadores del tumor M-406 tratados con CQ y/o Prop.

Estudio de la toxicidad asociada a cloroquina y propranolol

Como se detalló para los ratones tratados con Met y/o Prop, para evaluar la toxicidad asociada a los tratamientos, se analizaron distintos parámetros en los ratones. Se controló semanalmente el peso corporal, la calidad del pelaje, la actividad motora, el comportamiento, la frecuencia respiratoria y el consumo de comida y bebida. Nuevamente, no se observaron cambios evidentes en ninguno de los parámetros mencionados. En la **Figura 35** se muestra la representación gráfica de la evolución del peso relativo de los ratones tratados con CQ y/o Prop.

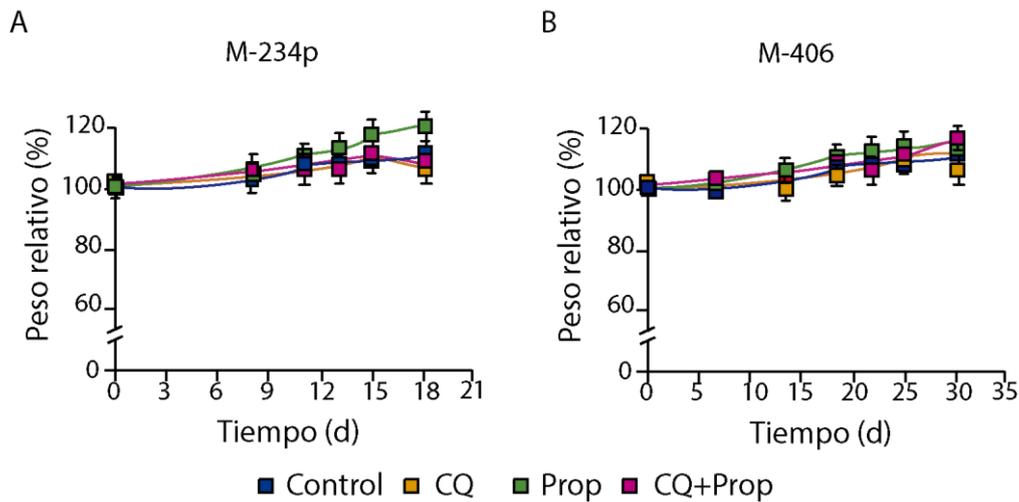


Figura 35: Evolución del peso corporal de ratones tratados con CQ y/o Prop. Los datos se expresan como el porcentaje del peso corporal respecto al peso antes de iniciar el tratamiento (media \pm EE). A) Ratones portadores del tumor M-234p tratados con CQ y/o Prop. B) Ratones portadores del tumor M-406 tratados con CQ y/o Prop.

Dados los resultados recabados hasta el momento, de las dos combinaciones de fármacos probadas, Met+Prop resultó ser la más efectiva, tanto en los ensayos *in vitro* como en los ensayos *in vivo*, por lo que fue la elegida para continuar con el resto de los ensayos que se describen a continuación.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICOS

Con el fin de evaluar el impacto de los tratamientos administrados a nivel del tejido tumoral y circundante, se analizaron bajo el microscopio óptico cortes histológicos del tumor M-406 teñidos con hematoxilina-eosina. El análisis realizado por el patólogo E. Roggero corroboró que, se trata de un adenocarcinoma de mama poco diferenciado, caracterizado por numerosas figuras mitóticas y extensas áreas de necrosis. No se observaron diferencias histológicas entre los tumores pertenecientes a los grupos tratados y no tratados (**Figura 36**).

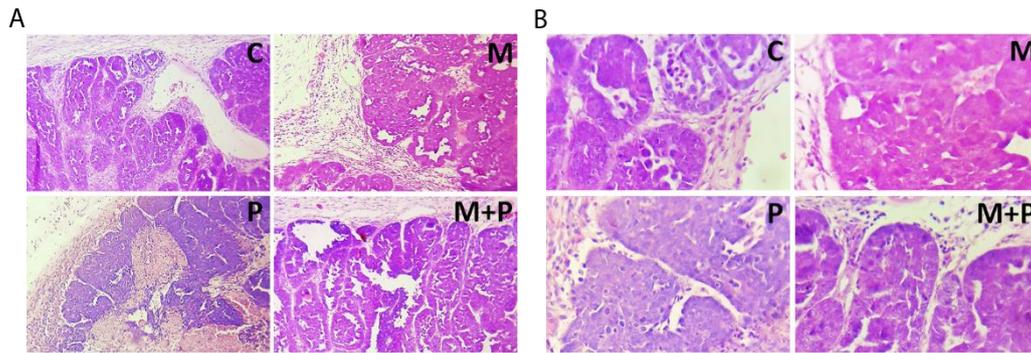


Figura 36: Análisis histológico del tumor M-406. Fotos representativas para cada grupo experimental. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y se observaron bajo el microscopio óptico. A) 100 X. B) 400 X.

Determinación de la proliferación y apoptosis

En nuestros ensayos *in vitro*, comprobamos que el tratamiento con Met y/o Prop afecta tanto la proliferación celular como la apoptosis, ya que ambos parámetros están relacionados directamente con el crecimiento tumoral. Para darle mayor sustento a nuestro estudio, evaluamos en cortes histológicos del tumor M-406 el efecto de Met y Prop sobre la proliferación y apoptosis mediante inmunomarcaciones para Ki67 y TUNEL (**Figura 37**). Encontramos un menor número de células Ki67⁺ por campo en los tumores de ratones que habían sido tratados, indicando una menor capacidad proliferativa de las células tumorales en dichos grupos experimentales (**Figura 37A**; $P < 0,001$). En cuanto a la muerte celular, observamos que, aquellos tumores pertenecientes a ratones que recibieron el tratamiento combinado de Met+Prop presentaron un número significativamente mayor de células TUNEL⁺ por campo analizado, lo que indicaría que el tratamiento con Met+Prop es capaz de inducir apoptosis en las células tumorales (**Figura 37B**; $P < 0,05$).

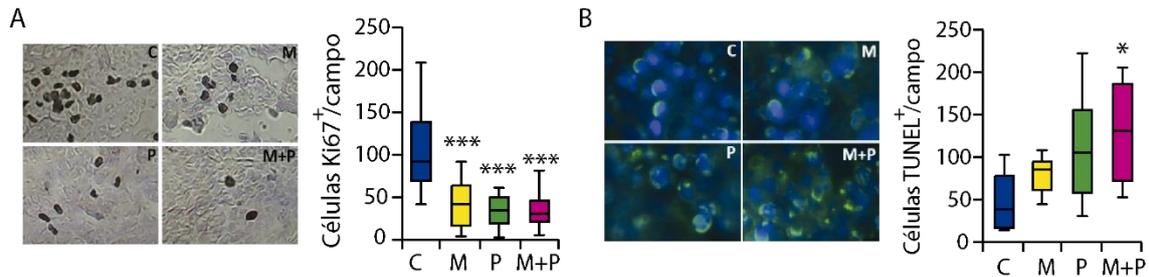


Figura 37: Análisis inmunohistoquímico del tumor M-406. A) Fotos representativas de cada grupo y cuantificación de células Ki67⁺ por inmunohistoquímica: se contaron 10 campos al azar en microscopio óptico (400X). B) Fotos representativas de cada grupo y cuantificación de apoptosis por la técnica de TUNEL: Las células TUNEL⁺ se cuantificaron en microscopio de fluorescencia en 8 campos elegidos al azar (400X). En ambos casos, los resultados se expresan como mediana-rango (n=4/grupo).

Determinación del contenido de células madre del cáncer en tumor

Dentro de los tumores, se ha descrito que existe una población celular denominada células madre del cáncer, íntimamente relacionada al desarrollo de resistencia a las terapias y recaídas de los pacientes. Se ha reportado que Met podría tener efectos inhibitorios sobre las células madre del cáncer, por lo que evaluamos en los tumores mediante inmunomarcación, si los tratamientos utilizados alteraban la expresión de dos marcadores de células madre expresados en ratón, CD44 y SOX-2. A pesar de observar un menor número de células tumorales positivas para estos marcadores en los tumores tratados con Met y Met+Prop, no llegamos a ver una disminución significativa de células CD44⁺ o SOX-2⁺ en ninguno de los grupos tratados (**Figura 38**).

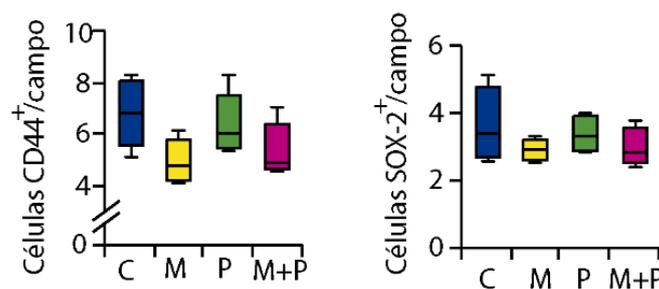


Figura 38: Análisis inmunohistoquímico del contenido de células madre del cáncer en el tumor M-406. Las células CD44⁺ y Sox-2⁺ se cuantificaron en 20 campos con aceite de inmersión (1000X). En todos los casos, los resultados se expresan como mediana-rango (n=4/grupo).

Determinación del área tumoral vascularizada

La angiogénesis juega un papel crucial en la progresión del cáncer, la capacidad de un tumor de generar nuevos vasos sanguíneos para lograr nutrirse condiciona su crecimiento, por lo que este proceso resulta un blanco importante a combatir. Con el fin de probar si los tratamientos en estudio ejercen efecto sobre la vascularización tumoral, realizamos inmunotinciones para CD31 en cortes histológicos del tumor M-406. En este caso no se observaron diferencias en el porcentaje del área tumoral vascularizada entre los grupos experimentales (**Figura 39**).

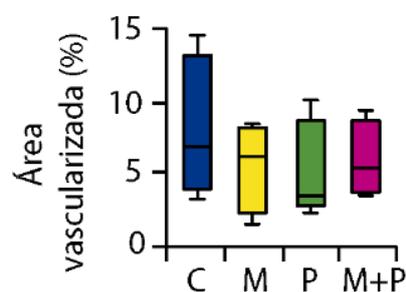


Figura 39: Análisis inmunohistoquímico del área vascularizada en el tumor M-406. A) El porcentaje de área vascularizada se cuantificó en 10 fotos (400X) con el software Image J. Los resultados se expresan como mediana-rango (n=4/grupo).

ANÁLISIS DE POBLACIONES LINFOCITARIAS CIRCULANTES E INTRATUMORALES

Algunos tumores se encuentran altamente infiltrados por células inmunes, mientras que en otros, solo se detectan infiltraciones sutiles. Dado que se ha reportado que, tanto en TNBC como en tumores de mama que sobre-expresan HER2, un mayor contenido de linfocitos infiltrantes tumorales, se correlaciona con resultados clínicos favorables analizamos la población de un grupo de células inmunológicas por citometría de flujo. Para esto, se determinó el contenido de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ circulantes para tener un enfoque sistémico de la respuesta inmune que podría estar montándose en respuesta a los tratamientos. Además, con el fin de caracterizar más en profundidad el tipo de respuesta inmunológica, se determinó en las mismas muestras el contenido de linfocitos CD4⁺Foxp3⁺ y linfocitos CD4⁺IL17⁺. También, se analizaron las mismas poblaciones de linfocitos en muestras de tumores 4T1.

No observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguna de las poblaciones de linfocitos circulantes estudiadas (**Figura 40**).

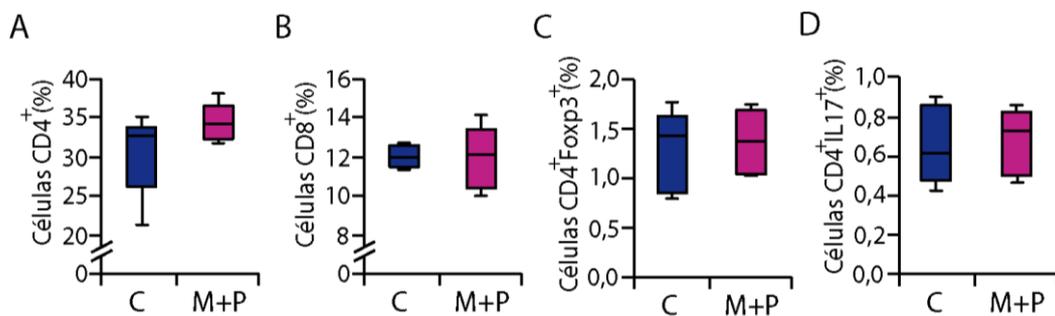


Figura 40: Porcentaje de linfocitos circulantes: A) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ circulantes. B) Porcentaje de linfocitos CD8⁺ circulantes. C) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ Foxp3⁺ circulantes. D) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ IL17⁺ circulantes. Los resultados se analizaron con el software FlowJo y se expresan en función del porcentaje de linfocitos de sangre periférica luego de excluir los eritrocitos residuales y detritos de acuerdo con los perfiles de dispersión frontal y lateral (mediana-rango; n=5/grupo).

En las muestras de tumor primario tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido de células inmunitarias entre los grupos (**Figura 41**).

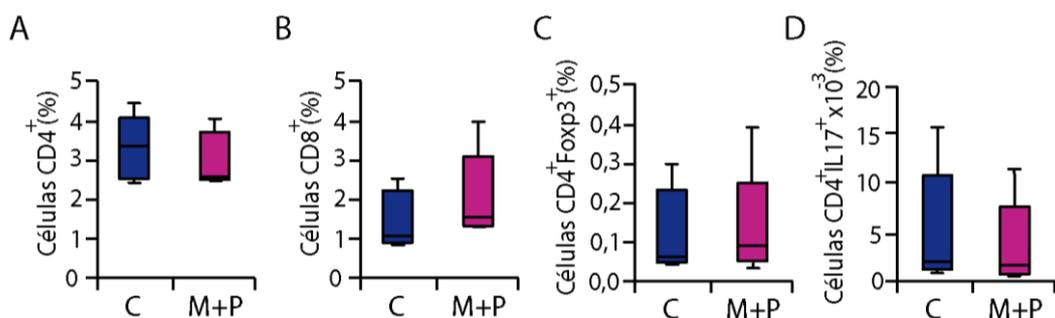


Figura 41: Porcentajes de linfocitos en el tumor de células 4T1: A) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ intratumorales. B) Porcentaje de linfocitos CD8⁺ intratumorales. C) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ Foxp3⁺ intratumorales. D) Porcentaje de linfocitos CD4⁺ IL17⁺ intratumorales. Los resultados se analizaron con el software FlowJo y se expresan en función del contenido total de células luego de excluir los eritrocitos residuales y detritos según los perfiles de dispersión frontal y lateral (mediana-rango; n=5/grupo).

Cabe destacar que, en las muestras de tumores provenientes de ratones tratados con Met+Prop se observó un mayor contenido de linfocitos intratumorales, aunque esta tendencia no llegó a ser significativa (dato no mostrado). Así como el infiltrado linfocitario tiene importancia pronóstica en la progresión de los tumores, la proporción CD4/CD8 también podría ser de relevancia clínica. En nuestro modelo no encontramos diferencias en esta relación entre los grupos experimentales, pero notamos que la relación en el grupo control fue reproducible para las muestras de

sangre y tumor, mientras que este cociente fue tendencialmente menor para el grupo tratado en las muestras de tumor (**Figura 42A,B**). Con respecto a la relación Foxp3/IL17 tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos (**Figura 42C,D**).

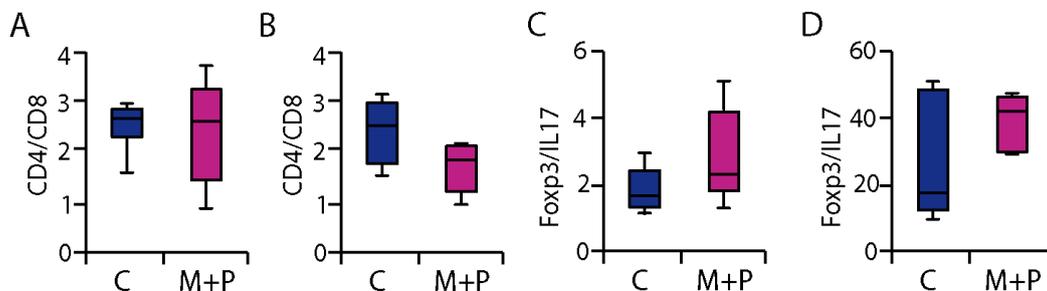


Figura 42: A) Relación CD4/CD8 en sangre. B) Relación CD4/CD8 en tumor. C) Relación Foxp3/IL17 en sangre. D) Relación Foxp3/IL17 en tumor (mediana-rango; n=5/grupo).

ESTUDIOS *in vivo* DEL EFECTO ANTIMETASTÁSICO DE LOS TRATAMIENTOS

Análisis del efecto de los fármacos reposicionados sobre el desarrollo de metástasis espontáneas

Al finalizar el estudio del efecto antitumoral de los diferentes tratamientos, los ratones portadores de tumores, fueron sacrificados a medida que alcanzaron el máximo volumen tumoral éticamente permitido y se les extirparon los pulmones, los cuales fueron colocados en solución Bouin durante 24 h para fijarlos y teñirlos.

En los ratones BALB/c, portadores del tumor 4T1 tratados con Met y/o Prop, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos al analizar el número de metástasis por ratón, como se muestra en la **Figura 43**.

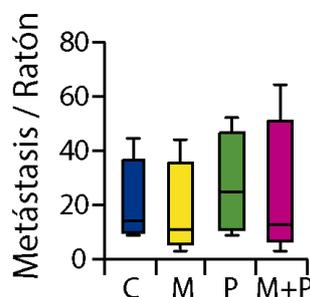


Figura 43: Análisis del efecto antimetastásico de metformina y propranolol sobre metástasis pulmonares espontáneas del tumor 4T1. Se graficó el número de nódulos metastásicos por ratón (mediana-rango) en ratones BALB/c portadores del tumor 4T1. C: Control; M: Met; P: Prop; M+P: Met+Prop.

Para los ratones CBI portadores del tumor M-406 tratados con Met y/o Prop se analizó la cantidad de ratones en cada grupo que presentaron metástasis y se construyó la **Tabla VII**. Los resultados indican que en el grupo control el 100% de los ratones presentó metástasis. En todos los casos los tratamientos redujeron el porcentaje de ratones con metástasis, siendo significativa la diferencia para los grupos tratados con Prop y Met+Prop ($P < 0,05$ en ambos casos).

Grupo	%	$n^{\text{met}}/n^{\text{tot}}$
Control	100	16/16
Metformina	84,21	16/19
Propranolol	72,22 *	13/18
Met+Prop	58,33 *	7/12

Tabla VII: Porcentaje de ratones con metástasis pulmonares. n^{met} : número de ratones con metástasis; n^{tot} : número total de ratones.

Además, se evaluó el número de nódulos metastásicos por ratón. Los ratones tratados con Prop y Met+Prop presentaron un menor número de metástasis con respecto a los ratones del grupo control, siendo este resultado significativo solo para los ratones tratados con la combinación de los fármacos ($P < 0,05$) (**Figura 44**).

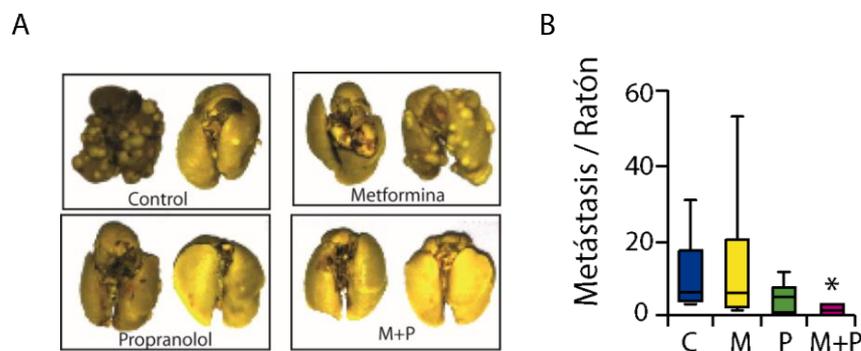


Figura 44: Análisis del efecto antimetastásico de metformina y propranolol sobre metástasis pulmonares espontáneas del tumor M-406. Se graficó el número de nódulos metastásicos por ratón (mediana-rango) en ratones CBI portadores del tumor M-406. C: Control; M: Met; P: Prop; M+P: Met+Prop.

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre el desarrollo de metástasis experimentales

El proceso de metástasis consta de cuatro pasos esenciales: el desprendimiento de las células cancerosas del tumor primario, su entrada en circulación (intravasación), su salida de la circulación (extravasación), y la supervivencia y crecimiento en un órgano distante.

Para independizarnos de las primeras etapas de la cascada metastásica, se realizó una inyección intravenosa de una suspensión de células 4T1; de esta manera, depositamos las células directamente en el torrente sanguíneo y nos centramos en evaluar la supervivencia de las células tumorales en sangre, su extravasación y la capacidad de crecer en un nicho secundario. Transcurridos 15 días desde la inoculación, los ratones se sacrificaron, y mediante una inyección intra-traqueal con tinta china, se tiñeron los pulmones de negro de modo de facilitar la cuantificación de los nódulos metastásicos (**Figuras 45A y 46A**).

Luego de analizar las metástasis por pulmón en cada grupo, en ratones BALB/c, inoculados con células 4T1, todos los tratamientos fueron efectivos en disminuir el número de metástasis por ratón, pero solo los ratones tratados con Prop y la combinación de Met+Prop presentaron un número significativamente menor de nódulos metastásicos ($P < 0,05$) (**Figura 45B**). Al analizar la distribución de tamaños de dichos nódulos, se encontró que los ratones tratados con Prop y Met+Prop presentaron nodos metastásicos de menor tamaño (**Figura 45C**).

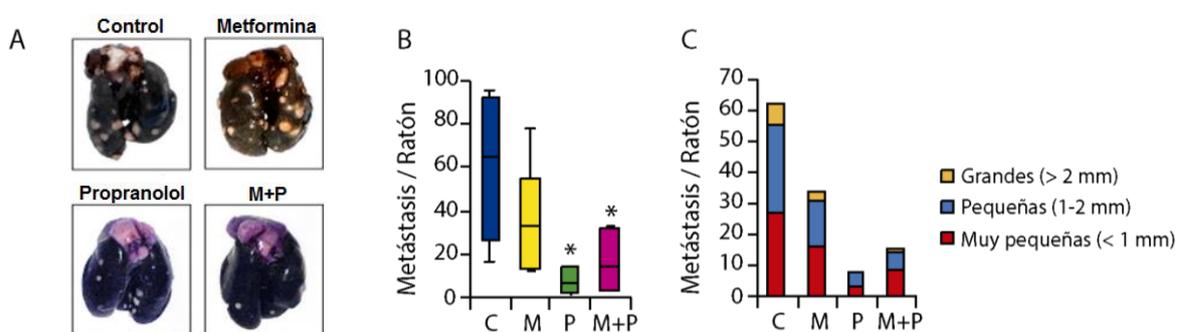


Figura 45: Análisis del efecto antimetastásico de metformina y propranolol sobre metástasis pulmonares experimentales del tumor 4T1. A) Foto representativa de pulmones en cada grupo experimental B) Número de nódulos metastásicos por ratón. Las metástasis se contaron macroscópicamente (mediana-rango) C) Distribución por tamaños de los nódulos metastásicos para cada grupo. C: Control; M: Met; P: Prop; M+P: Met+Prop.

En los ratones CBI, inoculados con las células M-406, el grupo tratado con Prop mostró una tendencia a presentar un menor número de metástasis que no llegó a ser significativo, comparado con los controles. Sin embargo, el grupo tratado con Met+Prop presentó diferencias significativas respecto del control ($P < 0,01$) (**Figura 46B**). Al analizar la distribución de tamaños de los nódulos metastásicos, se observó que los grupos tratados con Prop y Met+Prop desarrollaron metástasis más pequeñas (**Figura 46C**).

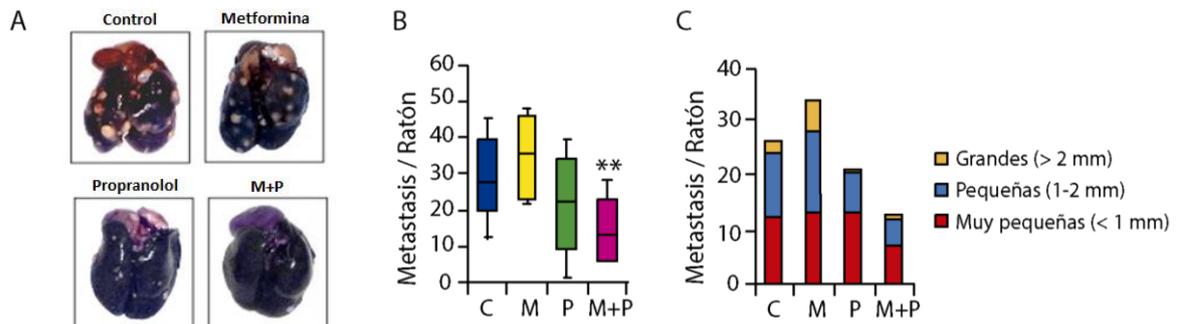


Figura 46: Análisis del efecto antimetastásico de metformina y propranolol sobre metástasis experimentales del tumor M-406. A) Foto representativa de pulmones en cada grupo experimental B) Número de nódulos metastásicos por ratón. Las metástasis se contaron macroscópicamente (mediana-rango) C) Distribución por tamaños de los nódulos metastásicos para cada grupo. C: Control; M: Met; P: Prop; M+P: Met+Prop.

Los resultados obtenidos nos alentaron a profundizar en estudios para caracterizar el efecto del tratamiento con Met+Prop en los diferentes pasos correspondientes a la progresión metastásica.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA Y PROPRANOLOL SOBRE LA CASCADA METASTÁSICA

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre el proceso de intravasación

Para dissociar el efecto Met+Prop sobre los distintos pasos que conducen a la formación de metástasis, inicialmente evaluamos si el tratamiento con Met+Prop afectaba el desprendimiento de las células del tumor primario y su intravasación. Se inocularon por vía subcutánea ratones BALB/c con células 4T1-GFP. Al día 18 se tomaron muestras de sangre y se analizaron por citometría de flujo para evaluar la población de células verdes positivas circulantes (**Figura 47A**). En un experimento paralelo, se tomaron muestras de sangre de ratones portadores del tumor 4T1, luego de la lisis de glóbulos rojos, se tiñeron con los anticuerpos EpCAM, CD34 y

CD45 para analizar las muestras por citometría de flujo, se seleccionó la población de células que tuviera marcación positiva para EpCAM y marcación negativa para CD34 y CD45, para descartar tinciones inespecíficas de progenitores hematopoyéticos y leucocitos respectivamente (**Figura 47B**). En ambos casos se observó una disminución en el porcentaje de células tumorales en sangre que, aunque no llegó a ser estadísticamente significativa, nos indica que el tratamiento podría afectar parcialmente el proceso de intravasación.

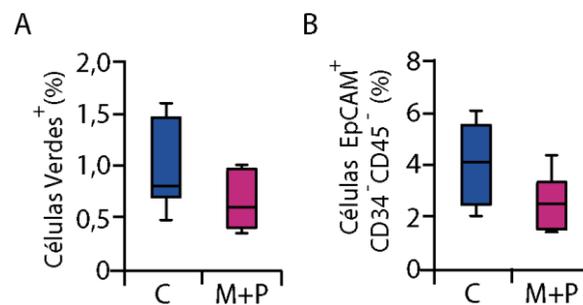


Figura 47: Estudio del efecto del tratamiento con Met+Prop sobre la intravasación. A) Se extrajo sangre de ratones portadores del tumor subcutáneo de células 4T1-GFP al día 18, se realizó la cuantificación del porcentaje de células verdes positivas por citometría de flujo ($P=0,193$, mediana-rango). B) Se extrajo sangre de ratones portadores del tumor de células 4T1 al día 35, se realizaron las tinciones correspondientes y se determinó por citometría de flujo del porcentaje de células EpCAM⁺CD34⁻CD45⁻ ($P=0,06$, mediana-rango).

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la supervivencia de células tumorales en sangre y su extravasación

Una vez que la célula metastásica es capaz de alcanzar la circulación sistémica, debe ser capaz de sobrevivir en este nuevo entorno en ausencia de anclaje, evadir el sistema inmune y conseguir detenerse y extravasarse en un tejido distante. Nuestro siguiente paso consistió en evaluar el impacto del tratamiento sobre la supervivencia de las células tumorales en sangre y su extravasación. Para tal fin, inoculamos ratones por vía intravenosa con células tumorales marcadas en color verde. Luego de 48 h de tratamiento con Met+Prop, se sacrificaron los ratones y se tomaron muestras de sangre que fueron analizadas por citometría de flujo y se extirparon los pulmones para realizar cortes histológicos y ser visualizados bajo el microscopio confocal. En la **Figura 48A** puede verse que en aquellos ratones que recibieron el tratamiento con Met+Prop se encontró un menor porcentaje de células tumorales en sangre ($P<0,05$). En cuanto a la cuantificación de las células verdes encontradas en pulmones, los ratones que recibieron el tratamiento presentaron un

número de células verdes por lóbulo significativamente menor ($P < 0,05$), lo mismo pudo observarse en aquellos ratones que fueron inyectados con células pre-tratadas con Met+Prop (**Figura 48B,C**; $P < 0,05$).

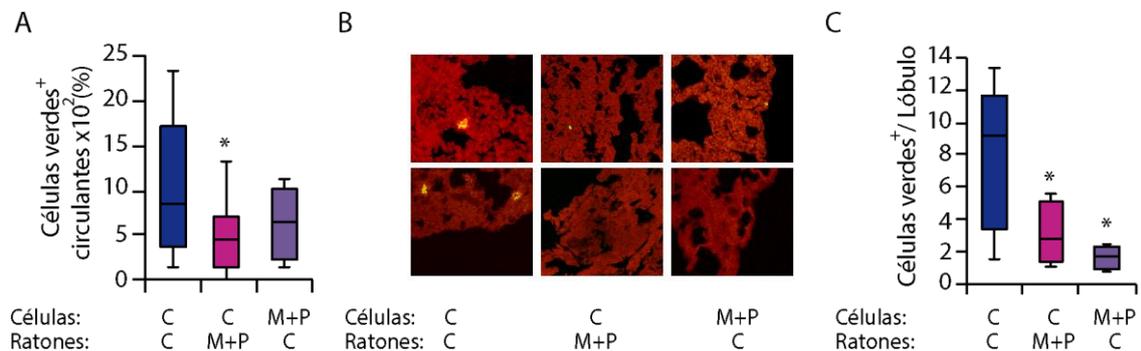


Figura 48: Estudio del efecto del tratamiento sobre la supervivencia y extravasación de las células tumorales. A) La cuantificación del porcentaje de células verdes positivas circulantes se realizó por citometría de flujo (mediana-rango). B) Fotos representativas de los pulmones de cada grupo tomadas bajo el microscopio confocal (100X) C) Cuantificación de células verdes positivas por lóbulo pulmonar. Se analizó todo el tejido pulmonar presente en el corte histológico (mediana-rango).

Análisis del efecto de metformina y propranolol sobre la proliferación de las células tumorales en pulmones

Resultados anteriores indicaron que las metástasis pulmonares desarrolladas en ratones tratados con Met+Prop, eran de menor tamaño. Por lo tanto, para finalizar nuestro estudio del efecto del tratamiento con Met+Prop sobre la cascada metastásica, nos quedaba por ver si esa diferencia en el tamaño de los nodos metastásicos podía deberse a que el tratamiento afectaba la proliferación de las células tumorales una vez que se instalaban en un nuevo nicho. Para esto, se inoculó por vía intravenosa una suspensión de células 4T1 en la vena lateral de la cola de ratones BALB/c. Al día 30 se sacrificaron los ratones, se extirparon los pulmones a los cuales se les realizaron cortes histológicos y posteriores tinciones para Ki67. Se cuantificó el porcentaje de células Ki67⁺ en las micrometástasis pulmonares. Se encontró un porcentaje significativamente menor ($P < 0,05$) de células Ki67⁺ en las metástasis de los pulmones de los ratones que habían recibido tratamiento (**Figura 49A**).

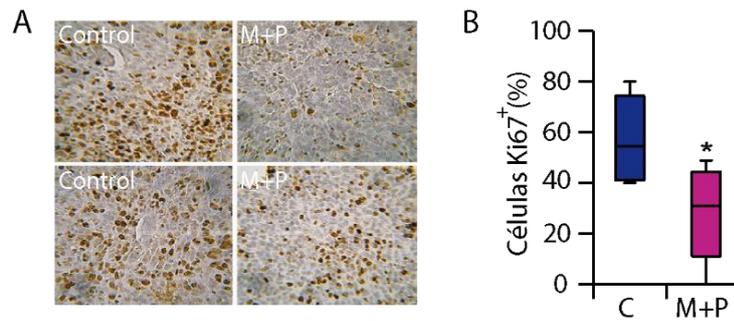


Figura 49: Análisis del efecto del tratamiento sobre la proliferación de células tumorales en pulmones. A) Fotos representativas de cada grupo tomadas bajo el microscopio óptico (400X). B) Porcentaje de células Ki67⁺ en metástasis pulmonares (mediana-rango).

Evaluación del efecto de metformina y propranolol como terapia adyuvante

Siempre que sea posible, la primera línea de tratamiento para el cáncer de mama es la cirugía, esto puede variar dependiendo del estadio y la histología del tumor. Seguido a la cirugía suelen administrarse rondas de quimioterapia y/o radioterapia, lo cual reduce la mortalidad de las pacientes y recurrencia de los tumores. Dados los resultados obtenidos hasta el momento, nuestro siguiente paso fue probar el efecto del tratamiento con Met+Prop como terapia adyuvante. Para esto, se extirparon quirúrgicamente los tumores subcutáneos M-406 de ratones CBI y 4T1 de ratones BALB/c y se trataron los animales durante 6 semanas con la combinación Met+Prop. Pasado este tiempo, se sacrificaron y se evaluaron los pulmones en busca de metástasis. Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Grupo	%	n _{met} /n _{tot}
Control	66,6	6/9
Met+Prop	20*	2/10

Tabla VIII: n_{met} = ratones CBI con metástasis pulmonares del tumor M-406, n_{tot} = ratones totales. P=0,019

Grupo	%	n _{met} /n _{tot}
Control	61,5	8/13
Met+Prop	30	3/10

Tabla IX: n_{met} = ratones BALB/c con metástasis pulmonares del tumor 4T1, n_{tot} = ratones totales. P=0,067

Como puede verse en las **Tablas VIII y IX**, un número menor de ratones que recibieron el tratamiento con Met+Prop desarrollaron metástasis luego de la

extirpación del tumor primario. Cabe destacar que no se observaron recidivas en los ratones.

TRABAJOS EN COLABORACIÓN

A pesar de su eficacia terapéutica, los benzimidazoles, como albendazol (ABZ) o ricobendazol (RBZ), tienen poca solubilidad acuosa, por lo que su absorción es limitada luego de su administración oral. Para contrarrestar esto, el grupo de la Dra. M. Celina Lamas del área Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas desarrolló complejos de inclusión de ABZ con citrato- β -ciclodextrina (C- β -CD). Se planteó que esta formulación de CD podría ayudar a reposicionar el ABZ para el tratamiento de tumores de mama triple negativos.

Para evaluar la posibilidad de reposicionar este tipo de fármacos, se comenzó evaluando el efecto de ABZ y RBZ sobre la proliferación de la línea celular 4T1. Como se muestra en la **Figura 11** de la sección resultados, tanto ABZ como RBZ disminuyeron en forma dependiente de la dosis el crecimiento de células 4T1 en cultivo. A partir de esto, se eligió seguir trabajando con ABZ ya que se conseguían los mismos efectos sobre el crecimiento celular que con RBZ, pero utilizando concentraciones mucho más bajas. Fue así que se desarrolló un complejo de ABZ con C- β -CD al que se le evaluó su efecto sobre el crecimiento de células 4T1 *in vitro* (**Figura 50**). Tanto ABZ como su complejo con C- β -CD disminuyeron significativamente el crecimiento de células 4T1 en comparación con el control no tratado. Como era de esperar, no se observaron diferencias en el crecimiento de células que fueron incubadas con la C- β -CD sola.

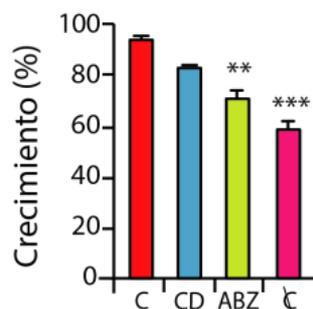


Figura 50: Efecto del complejo de inclusión de ABZ y C- β -CD sobre el crecimiento de células 4T1: Las células se incubaron en presencia (0,5 μ M) o ausencia de los tratamientos durante 48 h. Se graficó media \pm EE de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes de crecimiento respecto al control (100%). C: Control; CD: Ciclodextrina; ABZ: Albendazol; ζ : complejo de inclusión de ABZ y C- β -CD.

Para complementar la validación de estos datos, se llevó a cabo un experimento con ratones BALB/c inoculados subcutáneamente con células 4T1. Los animales fueron

separados al azar en 3 grupos experimentales una vez que el tumor fue palpable. Los tratamientos administrados fueron:

Control: Sin tratamiento

ABZ: 30 mg/Kg 3 veces a la semana administrados en el alimento

Complejo (ABZ:C- β -CD): 30 mg/Kg 3 veces a la semana administrados en el alimento

Se procedió de la forma descrita anteriormente para los ensayos *in vivo*. Como se muestra en la **Figura 51** los ratones tratados con el complejo mostraron una cinética de crecimiento significativamente más lenta en comparación con los otros grupos ($P < 0,01$). El examen de los animales, al final del ensayo, no indicó diferencias en el número de metástasis pulmonares espontáneas (datos no mostrados).

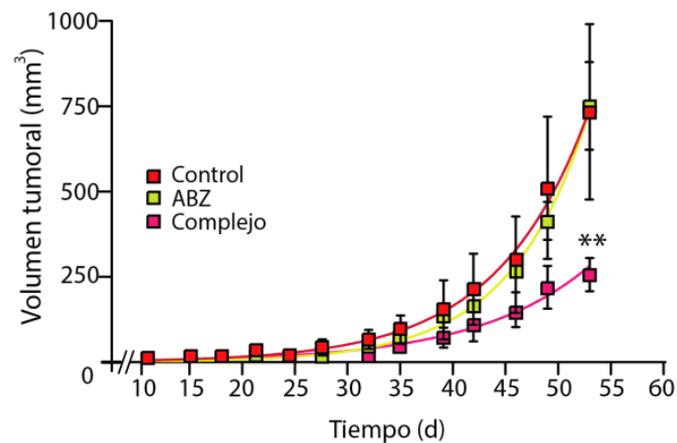


Figura 51: Evolución del volumen de tumores 4T1. Curva de ajuste exponencial para cada grupo experimental.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial y el responsable de una alta tasa de mortalidad en personas de este sexo. En general, el pronóstico para pacientes con cáncer de mama ha ido mejorando con los años debido a la detección temprana de la enfermedad y al desarrollo de terapias dirigidas. Los tumores de mama triple negativos (TNBC) son un tipo particular de tumores de mama que no expresan receptores de estrógenos, receptores de progesterona y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER2). Representan del 12 al 17% de los tumores de mama aproximadamente, pero tienen un pronóstico muy pobre y debido a su falta de respuesta a las terapias hormonales y dirigidas, los pacientes que padecen este tipo de tumores ven disminuidas sus opciones de tratamiento a la cirugía, a la quimioterapia estándar neo-adyuvante o adyuvante y radioterapia [20]. Con el constante avance de la medicina moderna, se espera que sea posible una caracterización molecular mejorada de los TNBC para lograr establecer subgrupos dentro de este tipo de tumores que proporcionen información sobre el pronóstico y comportamiento tumoral, y permitan desarrollar estrategias terapéuticas específicas mejorando el grado de precisión con el que elegir el tratamiento más adecuado. Con respecto a esto, se han desarrollado inhibidores de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), inhibidores de la vía PI3K, inhibidores de puntos de control inmunológico e inhibidores de quinasa dependiente de ciclina que han mostrado resultados positivos en ensayos clínicos en pacientes con TNBC [73].

Uno de los desafíos a los que se enfrentan los oncólogos en países de medianos y bajos ingresos, es ofrecer a sus pacientes tratamientos efectivos, seguros y accesibles. Resulta de gran importancia lograr reducir los costos en la atención de pacientes oncológicos para que más personas puedan acceder a un tratamiento. Una alternativa para esto es el reposicionamiento de fármacos, el cual se refiere al uso de medicamentos ya existentes en indicaciones diferentes para las que fueron diseñados, en este caso, el tratamiento del cáncer. Este enfoque posee algunas ventajas, al tratarse de medicamentos viejos que se encuentran en versión genérica, están disponibles a un bajo costo, además, se administran de forma oral con lo que

se evitarían las inyecciones intravenosas y estadías en centros de salud. Este tipo de medicamentos suele administrarse en forma crónica, sus esquemas de dosificación ya son conocidos por lo que resultarían poco tóxicos en comparación con los regímenes de quimioterapia convencional donde se administra la dosis máxima tolerada de fármaco por el paciente [74, 75]. Recientemente Spini y colaboradores han publicado una revisión brindando evidencias sobre la utilización de fármacos en reposicionamiento para el tratamiento de TNBC, basándose en estudios preclínicos publicados y en ensayos clínicos actuales en fase 1 y 2 donde se destaca la utilización de β -bloqueantes, estatinas, metformina, antifúngicos y antiinflamatorios no esteroideos entre otros [76].

En nuestro trabajo, evaluamos el efecto antitumoral de distintos fármacos en reposicionamiento administrados crónicamente y en bajas dosis, en forma individual o combinada, sobre distintos modelos de TNBC *in vitro* e *in vivo*. La mayoría de los fármacos en reposicionamiento actúan a nivel del metabolismo de la célula tumoral, por lo que afectarían las diferentes vías que conducen a la obtención de energía y metabolitos indispensables para sostener la síntesis de compuestos a gran escala, la proliferación y otros procesos relacionados con la progresión tumoral. En este trabajo seleccionamos un grupo de fármacos en reposicionamiento que se conoce que actúan modulando distintas vías metabólicas en las células (**Figura 3**): el metabolismo energético celular (Met, **Figura 4**), el metabolismo asociado a la actividad simpática (Prop, **Figura 5**), el metabolismo de degradación de proteínas y organelas por autofagia (CQ, **Figura 6**), el metabolismo hormonal (DHEA), el metabolismo lipídico (Orl), el metabolismo mitocondrial (Doxi) y el ciclo celular (ABZ, RBZ).

Para el abordaje inicial, se utilizaron concentraciones crecientes de los fármacos mencionados (**Tabla II**) y se evaluó su efecto sobre la proliferación celular. La línea murina 4T1 resultó ser sensible a todos los fármacos probados en forma dependiente de la dosis (**Figura 11**) confirmando la potencialidad de utilizar fármacos en reposicionamiento para el tratamiento de TNBC. En acuerdo con nuestros resultados, se reportaron los efectos de Met, Prop, CQ, DHEA y Doxi sobre la proliferación de células 4T1 u otros modelos de tumores de mama en forma

dependiente de la dosis [63, 77-80]. Por otra parte, se ha informado que Orl y ABZ fueron capaces de afectar el crecimiento de células de cáncer de páncreas humano [81, 82].

De cada fármaco (excepto ABZ y RBZ que se utilizaron para otros estudios) se decidió elegir un valor de concentración (**Tabla III**) donde observamos una disminución del crecimiento de aproximadamente el 20% para realizar los estudios posteriores. Así, luego de observar un efecto sobre el crecimiento celular por parte de cada fármaco, nos preguntamos si combinarlos resultaría una alternativa más efectiva. Todas las combinaciones probadas se muestran en la **Figura 12**. En algunos casos observamos que la combinación de los fármacos disminuyó significativamente el crecimiento celular pero no produjo un mayor efecto que los tratamientos por separado, como por ejemplo, las combinaciones de CQ+Met, Orl+CQ, Orl+Prop, DHEA+CQ. Para Doxi, a las concentraciones y los tiempos en que realizamos nuestros ensayos, no llegamos a ver efectos significativos de su combinación con Prop, Met o CQ sobre el crecimiento.

Finalmente, las combinaciones de Met+Prop o CQ+Prop resultaron ser las alternativas más efectivas en disminuir significativamente el crecimiento de las células 4T1, diferenciándose significativamente de los tratamientos individuales (**Figura 12**). A partir de este ensayo, limitamos el resto de nuestros estudios a estos 3 fármacos en reposicionamiento. La elección de continuar nuestro trabajo con Met, Prop y CQ se sustenta con resultados publicados por otros investigadores tanto en líneas celulares de mama como en otros modelos tumorales. Se ha comprobado que Met es capaz de disminuir la capacidad proliferativa de líneas celulares humanas triple negativas (MDA-MB-231) y no triple negativas (MCF7) en concentraciones 1 mM y 5 mM [83]; por su parte, Prop ha demostrado efectos antiproliferativos y antiangiogénicos *in vitro* sobre las mismas líneas celulares de cáncer de mama además de líneas de neuroblastoma, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y glioblastoma en concentraciones mayores a las utilizadas en nuestro trabajo [80]. Se ha demostrado que CQ inhibe el crecimiento de células tumorales de vejiga en forma dependiente del tiempo y la dosis [84] pero, nuevamente, a estos resultados se arribó utilizando concentraciones de CQ mayores a las utilizadas en nuestro

trabajo. Resulta interesante el hecho de utilizar estas combinaciones, ya que al tratarse de fármacos que están alterando distintas vías del metabolismo de la célula tumoral, es posible que como resultado se produzca una mayor alteración en la obtención de energía y metabolitos indispensables para la supervivencia celular.

El siguiente paso fue evaluar el efecto de Met, Prop y CQ sobre otros modelos celulares de TNBC humanos (MDA-MB-231) y murinos (M-406, M-234p). Nuestros resultados indican que los 3 fármacos afectaron negativamente el crecimiento de las células en forma dependiente de la dosis (**Figura 13**); la combinación Met+Prop disminuyó significativamente el crecimiento en los 3 modelos celulares estudiados mientras que CQ+Prop solo lo hizo en la línea celular de origen humano (**Figura 14**). Cabe destacar que nuestro grupo de trabajo también demostró la eficacia del tratamiento con Met+Prop en una línea celular que expresa receptores hormonales (MCF7; dato no mostrado). Además, el efecto de Met+Prop sobre la proliferación celular se correlacionó con menores niveles de fosforilación de ERK luego de estímulos proliferativos cuando las células 4T1 se pre-trataron con Met+Prop (**Figura 15**). Cabe destacar, que nuestro grupo de trabajo observó los mismos resultados para la línea de cáncer colorrectal HCT116, sin evidenciarse modificaciones en la expresión de ERK total; indicando que el efecto de Met+Prop sobre las vías de señalización asociadas a proliferación no estaría restringido a un único tipo tumoral. Otros autores también informaron un efecto significativo de Prop y Met sobre la fosforilación de ERK en la línea celular de TNBC, MDA-MB-231. El efecto de Prop fue observado luego de pre-tratar las células 24 h, pero a concentraciones mayores a las utilizadas en nuestro trabajo [85], mientras que Met disminuyó la fosforilación de ERK de una manera dependiente de la dosis y del tiempo en la misma línea celular. A estos resultados llegaron incubando con concentraciones crecientes de Met (1-10 mM) durante 6 h o, incubando con Met 5 mM durante 24 h [86]. Es necesario destacar que en nuestro caso, observamos los mismos resultados incubando solo 4 h con la combinación Met+Prop y resultó suficiente para afectar las vías de señalización asociadas a proliferación.

Uno de los problemas que presentan los tratamientos convencionales del cáncer es la toxicidad generada en los pacientes. Esto se debe a que los fármacos citotóxicos

no resultan específicos de las células tumorales y afectan también a las células normales del organismo. Por tal motivo, es importante desarrollar terapias que resulten efectivas y con un buen perfil de seguridad. Para profundizar en este punto, evaluamos *in vitro* el efecto de Met, Prop y CQ sobre una línea celular epitelial no tumoral encontrando que, ni los tratamientos individuales ni los combinados causaron un efecto significativo sobre la proliferación en las concentraciones evaluadas (**Figura 16**). Esto podría deberse a que las células tumorales resultan más sensibles al tratamiento que las células normales, en virtud de la reprogramación metabólica a la que se ven sometidas, como por ejemplo, glucólisis, biogénesis mitocondrial, síntesis de proteínas y metabolismo de lípidos alterados, entre otras. Este resultado nos estaría confirmando que la posibilidad de atacar el metabolismo alterado de la célula tumoral representa una estrategia terapéutica interesante.

Met, Prop y CQ suelen administrarse en esquema continuo a los pacientes, por lo tanto, con el fin de imitar la administración crónica de estos fármacos, realizamos ensayos de proliferación en presencia de Met, Prop y CQ en forma continua. Como puede verse en las **Tablas IV, V y VI**, los valores de IC50 de los fármacos fueron más bajos para las células que recibieron el tratamiento a largo plazo (144 h) en comparación con los valores de IC50 obtenidos durante la incubación de las células con los tratamientos a corto plazo (24 h). Esto, nos estaría indicando que cuando las células son sometidas a tratamientos prolongados en el tiempo se pueden observar los mismos efectos en el crecimiento utilizando menores concentraciones de los fármacos. Esta no es una característica especial de estos medicamentos, sino que, creemos, es una consecuencia del esquema de administración, lo cual se remonta a los inicios del 2000, cuando Browder y colaboradores demostraron que el tratamiento con dosis bajas y continuas de ciclofosfamida fue más efectivo que un esquema convencional evitando el desarrollo de resistencia al fármaco, lo que sentó las bases de lo que más tarde se denominó quimioterapia metronómica [87]. A su vez, la efectividad de este esquema continuo nos podría estar indicando que el efecto de los fármacos utilizados no es puntual, sino que se sostiene en el tiempo.

El uso de combinaciones de fármacos resulta ventajoso ya que es posible aumentar la eficacia terapéutica, evitando la toxicidad y minimizando el desarrollo de

resistencia a los medicamentos. La eficacia de un tratamiento combinado puede deberse al efecto aditivo de la utilización de fármacos diferentes o bien, puede potenciarse si la acción de un fármaco de alguna manera, aumenta la del otro. Para completar este estudio, dado que observamos un efecto más pronunciado sobre la proliferación celular por parte de los tratamientos combinados, determinamos si existía o no sinergismo entre los fármacos mediante la construcción de isobogramas (**Figuras 17 y 18**). Encontramos que los valores de IC50 de diferentes combinaciones de Met y Prop y, CQ y Prop caen por debajo de la línea de aditividad, indicando que los fármacos mencionados al combinarse actúan de manera sinérgica, es decir, existe una interacción biológica entre ellos que permite utilizarlos en dosis bajas y obtener mejores efectos terapéuticos que si se usaran por separado a esas mismas dosis. Se ha reportado que existe una relación estrecha entre la actividad de los receptores β -adrenérgicos y el metabolismo de la glucosa en cáncer de mama mediada por la hexoquinasa-2, lo que podría explicar el efecto sinérgico observado entre Met y Prop. Además, la actividad de los receptores β -adrenérgicos se correlaciona positivamente con la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR-4EBP, por lo que la expresión de hexoquinasa-2 podría verse inhibida por acción de Prop mediante la regulación de la traducción [88]. Por otra parte, se ha visto que Prop inhibiría la autofagia en células de cáncer de próstata mediante la acumulación de los autofagosomas impidiendo su maduración [89], si este efecto fuera independiente del tipo celular, podríamos extender estas observaciones a células de tumores de mama y se explicaría, en parte, el efecto sinérgico observado entre CQ y Prop.

Normalmente, las células del organismo cuentan con mecanismos para lograr un equilibrio entre el crecimiento y la muerte celular. Las células malignas proliferan descontroladamente y no mueren cuando deberían. Es por esto que, preferentemente se busca que un tratamiento no solo inhiba el crecimiento de las células tumorales, sino que también logre matarlas. Los tratamientos con Met, Prop y CQ, no solo consiguieron inhibir el crecimiento de las líneas celulares de TNBC, sino que también lograron inducir la muerte celular programada de estas células, como verificamos mediante la determinación del porcentaje de células positivas para Anexina-V por citometría de flujo (**Figuras 19 y 20**). La combinación de

Met+Prop aumentó significativamente el porcentaje de poblaciones apoptóticas en todas las líneas estudiadas (**Figura 19A,B y Figura 20**), pero Met no llegó a mostrar valores significativos en los casos de la línea MDA-MB-231 y las células M-234p a las dosis y tiempos evaluados. Sin embargo, como puede verse en la **Figura 13**, Met inhibió el crecimiento de las células MDA-MB-231 significativamente en forma dependiente de la dosis. Este comportamiento, puede deberse a que los fármacos podrían afectar de manera diferente los ciclos de vida y de muerte celular en cada tumor en particular. Asimismo, en el caso de las células tratadas con Prop, no observamos un aumento significativo en las poblaciones apoptóticas de M-406, a pesar que en el ensayo de proliferación se observó que Prop fue eficiente en disminuir el crecimiento de las células M-406, aún en las concentraciones más bajas que se probaron (**Figura 13**). En este caso, esta diferencia también puede deberse a que estas células se obtienen a partir de la disgregación de tumores primarios, que no representan la misma población celular homogénea en cada experimento, y debido a esto pueden presentar comportamientos distintos y variabilidad de un ensayo a otro. Se debe tener en cuenta que las vías que conducen a la muerte celular pueden no estar igualmente activas en los distintos tipos celulares y, dado que aún no se conocen en profundidad los mecanismos por los cuales Met y Prop ejercen sus efectos antitumorales, esto constituye un punto pendiente sobre el que deben realizarse numerosos estudios. Se ha descrito en líneas de cáncer de mama que el tratamiento con Met induce la generación de especies reactivas del oxígeno, reduce la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 y Mcl-1, e induce la expresión de BAX, una proteína pro-apoptótica, lo que sugeriría que el efecto de Met en las células de cáncer de mama estaría mediado por la vía intrínseca de la apoptosis, mediada por las mitocondrias [90]. Por otra parte, Montoya y colaboradores analizaron el tumor de una paciente con cáncer de mama avanzado, tratada con Prop como terapia neoadyuvante. El análisis se realizó en tejido de la biopsia diagnóstica (pre-tratamiento) y en tejido extirpado durante la cirugía (post-tratamiento). Encontraron que, en las muestras analizadas, disminuyó la expresión de Bcl-2 y aumentó la expresión pro-apoptótica de p53. También, trataron células MDA-MB-231 *in vitro* con Prop y encontraron que el tratamiento aumentó notablemente los niveles de productos de escisión de las caspasas 3, 6 y 9 tras 2 h de tratamiento [47],

lo que nos lleva a pensar que Prop estaría induciendo apoptosis a través de la activación de las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca. Para el caso de la combinación CQ+Prop observamos un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas tanto en la línea 4T1 como MDA-MB-231, mientras que los tratamientos individuales no ejercieron ningún efecto (**Figura 19C,D**); este resultado podría parecer contradictorio al observado para Prop en la **Figura 19A,B**, pero vale la pena aclarar que en ese caso se usaron concentraciones mayores de Prop y esto puede haber ayudado a alcanzar resultados estadísticamente significativos. Respecto a CQ, se ha observado que es capaz de inducir apoptosis en células de cáncer de vejiga a mayores concentraciones a las utilizadas en nuestro estudio, también se vio que reduce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y regula positivamente la expresión de caspasa-3. Cabe destacar que además se verificó su acción inhibitoria de la autofagia [91], algo que hubiera sido interesante demostrar en nuestros modelos también.

El cáncer evoluciona por un proceso reiterativo de expansión clonal que requiere de la adaptación de las células a los cambios en el microambiente tumoral. Desde una célula inicial hasta la detección clínica del tumor, existe un constante desarrollo celular con el que se adquieren alteraciones genéticas y epigenéticas, las cuales contribuyen a la heterogeneidad que caracteriza a los tumores. A su vez, la capacidad clonogénica de las células tumorales está íntimamente relacionada con la formación de metástasis en nuevos nichos, donde una o unas pocas células deben adquirir la capacidad de expandirse clonalmente. Para evaluar el posible efecto de los fármacos sobre la capacidad clonogénica de las células tumorales, se realizaron ensayos de formación de colonias. El tratamiento con Met y Prop resultó efectivo en disminuir la capacidad clonogénica de las células 4T1 (**Figura 21C**) y MDA-MB-231 (**Figura 21D**), siendo más pronunciado el efecto del tratamiento combinado. Por su parte, CQ y Prop lograron disminuir el número de clones viables y su tamaño en el caso de la línea 4T1 (**Figura 22A**), mientras que para la línea MDA-MB-231 se observó efecto del tratamiento solo en el tamaño de las colonias formadas (**Figura 22B**). Es importante destacar que, no solo resulta importante evaluar la cantidad de colonias formadas, sino que el tamaño que puedan alcanzar esas colonias resulta igualmente relevante. En nuestro caso, observamos colonias más pequeñas en los

grupos tratados, algo que concuerda con el efecto observado anteriormente sobre la proliferación celular por parte de estos tratamientos y su esquema de administración crónico. En un estudio, Amaral y colaboradores, encontraron que Met disminuyó significativamente la capacidad clonogénica de células de cáncer de mama, pero no logró ejercer efectos significativos en la línea MDA-MB-231 a menos que se combinara con aspirina [92]. Recientemente se informó el efecto de Prop sobre la capacidad clonogénica de células de cáncer de cuello uterino, pero a concentraciones considerablemente mayores a las utilizadas en nuestro trabajo [93]. Es importante tener en cuenta las concentraciones usadas ya que, en nuestro estudio, para el caso de la línea MDA-MB-231 no observamos el mismo efecto de Prop sobre el número de colonias formadas (**Figuras 21D y 22B**). Este hecho, puede deberse a las concentraciones utilizadas, ya que la concentración 5 μM de Prop mostró efecto sobre la clonogenicidad en las células MDA-MB-231 (**Figura 21D**), pero no fue suficiente la concentración 1 μM (**Figura 22B**). Caso contrario a lo que ocurrió con las células 4T1, en las que la concentración 1 μM de Prop fue suficiente para ver efecto sobre la clonogenicidad (**Figura 22A**). Con respecto a CQ, un estudio llevado a cabo sobre las líneas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231, mostró una reducción significativa en la clonogenicidad en respuesta a CQ pero, nuevamente, a concentraciones mayores que las usadas en nuestro estudio [94].

Los resultados analizados hasta el momento y la evidencia que existe que Met inhibe la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones [40], nos alentó a evaluar el efecto de Met y Prop sobre la actividad mitocondrial de las células tumorales y analizar si se mantenía el comportamiento sinérgico de ambos fármacos. Efectivamente pudimos confirmar un efecto sobre las mitocondrias de las células 4T1 por parte de nuestro tratamiento, ya sea en forma individual o combinada, al observar una disminución significativa en las tasas de consumo de oxígeno y, en consecuencia, una reducción en la síntesis de ATP impulsada por las mitocondrias (**Figura 23A,B**). Además, los niveles de respiración en células que recibieron los tratamientos, fueron más bajos que los niveles de respiración en células no tratadas después del desacoplamiento de la respiración mitocondrial con FCCP (**Figura 23C,D**). Este resultado era esperable para Met, pero logramos reproducir el mismo efecto en células tratadas con Prop, contribuyendo a dilucidar

su efecto sobre la función mitocondrial, por lo que Prop podría mejorar la inhibición, mediada por Met, de los intermediarios metabólicos y energéticos dependientes de las mitocondrias necesarios para el crecimiento y la supervivencia celular. Este resultado, es consistente con un trabajo donde se muestra que el atenolol, otro β -bloqueante, inhibe el complejo I de la cadena respiratoria en las células de cáncer de mama [95]. Se sabe que las células tumorales tienen la capacidad de adaptar su metabolismo a las necesidades del medio, y la disminución que observamos en la tasa de fosforilación oxidativa en presencia de los tratamientos, condujo a un aumento en la glucólisis, como se pudo ver mediante la determinación de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) (**Figura 24A**). Este efecto también fue observado por Ariaans y colaboradores en líneas de tumores de mama tratadas *in vitro* con Met [96]. Además, vimos que Prop en forma individual, también estimuló la glucólisis basal de las células (**Figura 24B**). Heinrich Warburg ha postulado que las células malignas tienen una respiración oxidativa deficiente y por lo tanto deben recurrir a glucólisis aeróbica para producir energía; sin embargo, estudios han demostrado que Met puede inhibir la división de las células tumorales en presencia de cantidades abundantes de glucosa e inducir su muerte en condiciones de privación de glucosa [97]. Es posible que la combinación Met+Prop, al aumentar la glucólisis en las células tumorales, conduzca a una carencia de glucosa, con lo que en un principio se inhibiría la proliferación celular y luego las células morirían a medida que disminuyen los niveles de este metabolito. En nuestro estudio, puede verse que las células tratadas con Met+Prop se mostraron insensibles al agregado de oligomicina (**Figura 24C**), lo que indica que las células 4T1 activaron la glucólisis al máximo en presencia del tratamiento. Además, el fenotipo energético de las células (**Figura 24D**) muestra que, en condiciones de estrés, las células no lograron modificar su ECAR con respecto a las condiciones de cultivo basales, lo que estaría dando una idea, en conjunto, de la falta de plasticidad metabólica de las células tumorales en presencia de la combinación Met+Prop. Este estudio, resulta relevante no solo porque nos permite probar el efecto directo de la combinación Met+Prop sobre la función mitocondrial, sino también, porque hay reportes que indican que la plasticidad metabólica de las células juega un papel importante en el desarrollo de metástasis. Estudios recientes, demuestran que la respiración mitocondrial es

indispensable para la migración y el desarrollo de metástasis [98], por lo que sumado a los efectos que observamos sobre la proliferación, apoptosis y clonogenicidad de las células tumorales por parte del tratamiento con Met+Prop, es probable que también afecte el desarrollo de metástasis.

La progresión del cáncer es un proceso dinámico que requiere la adquisición de capacidades invasivas y migratorias; luego de probar el efecto de los fármacos en estudio sobre el crecimiento, la muerte celular, la clonogenicidad y metabolismo mitocondrial, nos enfocamos en los eventos asociados al desarrollo de metástasis, las cuales constituyen la principal causa de muerte por cáncer. Se sabe que el desarrollo de metástasis consta de múltiples etapas secuenciales (**Figura 2**); para analizar los mecanismos relacionados con este proceso *in vitro*, realizamos ensayos de cierre de herida en condiciones no proliferativas para estudiar la migración celular. En ambos modelos celulares estudiados (4T1 y MDA-MB-231), Met+Prop redujo la capacidad migratoria, diferenciándose de los tratamientos individuales (**Figura 25B,C**). En cambio, el tratamiento con CQ+Prop no ejerció ningún efecto sobre la capacidad migratoria de las células 4T1 (**Figura 25D**). Nuevamente, el comportamiento disímil de Prop puede explicarse por las concentraciones usadas, indicando que la dosis utilizada de Prop con CQ no fue efectiva por ser demasiado baja. Por otro lado, existe evidencia del efecto de Prop sobre la migración en otros modelos tumorales [99] y en células MDA-MB-231; en particular para este último caso, se encontró que a altas (25 μM) y bajas (2,5 μM) concentraciones, Prop fue capaz de inhibir la migración celular. El hecho de que una dosis tan baja de Prop haya sido efectiva los autores lo atribuyen a haber realizado sus ensayos en condiciones hipóxicas, las cuales son más representativas del microambiente y progresión tumoral que las condiciones en las que realizamos nuestros ensayos (normoxia) [100]. Además, recientemente se ha encontrado que Met disminuye la viabilidad celular comprometiendo drásticamente la migración y la invasión de células MDA-MB-231 a altas concentraciones (10 mM) [101]; mientras que, en nuestro trabajo conseguimos los mismos resultados utilizando una dosis de Met menor. Con respecto al proceso de invasión, observamos que el tratamiento con Met+Prop disminuyó significativamente la capacidad invasiva de células 4T1 y MDA-MB-231 en un ensayo de invasión en matrigel (**Figura 26**). Es interesante

destacar, que nuestros datos concuerdan con los publicados por Lin y colaboradores, quienes demuestran que existe una relación entre la función mitocondrial y la invasividad de células tumorales: a menor actividad mitocondrial, menor capacidad invasiva en células de tumores colorrectales [102], lo que resalta la importancia de proponer fármacos que afecten el metabolismo mitocondrial, como Met y Prop, para el tratamiento de tumores metastásicos. Liang y colaboradores, utilizando una concentración de Met 5 mM o más baja, y una línea celular de melanoma murino, encontraron en un ensayo de cierre de herida, que este fármaco inhibe la capacidad migratoria en forma significativa y disminuye la capacidad de invasión en forma dependiente de la dosis. Analizando el patrón de expresión de E-cadherina encontraron que en células que fueron tratadas con Met, aumentó la expresión de dicha proteína [103]. Esto concuerda con lo informado por otros autores: las células tumorales ganan movilidad e invasividad al perder características epiteliales mientras que adquieren características mesenquimales, a través de la transición epitelio-mesenquima (EMT). En nuestro caso no observamos cambios en la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina (**Figura 27**), β -catenina o Snail, en extractos de células 4T1 pre-tratadas durante 24 h con Met+Prop. Este comportamiento que difiere del esperado, se sustenta con evidencia que asegura que marcadores epiteliales como E-cadherina también pueden cumplir roles promotores en la progresión tumoral. Se ha observado una expresión conservada o aumentada de este marcador en carcinomas mamarios invasivos, tumores de ovario y tumores cerebrales agresivos. Lo que asegura que la funcionalidad de E-cadherina en el desarrollo de metástasis dependería en gran medida del contexto y que son necesarios estudios más rigurosos para lograr proporcionar información sobre estos mecanismos [104]. Por otro lado, estudios paralelos de nuestro grupo de trabajo con células de cáncer colorrectal, comprueban que la combinación Met+Prop fue capaz de modular los niveles de marcadores epiteliales, lo que sugeriría que la acción de esta combinación de fármacos reposicionados es contexto dependiente, en lo que concierne a la EMT.

Los tumores de mama triple negativos integran un subtipo tumoral muy agresivo dentro de la diversidad de tumores de mama que existen. Además, debido a la ausencia de expresión del receptor de estrógeno, del receptor de progesterona y de

HER2, los pacientes con este tipo de tumores ven reducidas sus opciones de tratamiento y se los asocia con un pronóstico muy pobre [20]. La utilización de modelos animales en la investigación en cáncer, resulta valiosa porque incluye las interacciones entre las células tumorales y su entorno, y nos aporta información cualitativamente diferente a la que podemos obtener de los modelos *in vitro*. Los modelos inmunocompetentes utilizados en este estudio, M-406, M-234p y 4T1, representan adenocarcinomas mamarios triple negativos, muestran un rápido crecimiento y son altamente metastásicos, por lo que nos pareció una adecuada elección para explorar nuevas opciones de tratamiento que resulten efectivas y poco tóxicas para los pacientes con este tipo de tumores.

El efecto antitumoral de Met y Prop se vio reflejado en la evolución del volumen tumoral en los modelos utilizados a lo largo del experimento. Los animales pertenecientes al grupo tratado con la combinación Met+Prop vieron significativamente afectado su crecimiento tumoral, lo cual se reproduce en un mayor tiempo de duplicación tumoral, tanto en el caso de los tumores 4T1 (**Figura 28A,B**) como en el caso de los tumores M-406 (**Figura 29A,B**). Este comportamiento no se obtuvo en los ratones tratados con CQ y Prop ya que, a pesar de observar una tendencia de CQ+Prop a disminuir el crecimiento tumoral, esta disminución no llegó a ser significativa en los modelos evaluados (**Figuras 32 y 33**). El tratamiento con Met+Prop aumentó significativamente la supervivencia de los animales en los dos modelos utilizados (**Figura 30**), mientras que en los animales que recibieron el tratamiento con CQ y/o Prop no observamos mejoras significativas en la supervivencia (**Figura 34**). En este punto nos parece importante destacar que el adenocarcinoma de mama M-406 es un tumor agresivo y de crecimiento muy rápido; los ratones portadores de este tumor que mayor sobrevida presentaron vivieron menos de 40 días y fueron los ratones tratados con Met+Prop. Es decir que, a pesar del poco tiempo que estuvieron bajo tratamiento y de las bajas dosis utilizadas, éste fue suficiente para mostrar un efecto del tratamiento en el tiempo de duplicación tumoral, algo que no observamos en el caso de CQ+Prop. Existen reportes del uso de fármacos reposicionados para el tratamiento de tumores en modelos animales: Talarico y colaboradores reportaron el efecto de la combinación de Met y atenolol en ratones inmunodeficientes e inmunocompetentes, para líneas

celulares de un tumor triple negativo y un tumor HER2⁺, y encontraron que la combinación de los fármacos fue más efectiva en retrasar el crecimiento tumoral que los tratamientos por separado [95]. Asimismo, como mencionamos anteriormente, hemos realizado pruebas *in vitro* con Met y/o Prop en la línea celular MCF7 viendo que los tratamientos presentaron efectos similares a los observados en los modelos de TNBC estudiados (dato no mostrado) por lo que creemos que, nuestras observaciones *in vivo* también podrían extenderse a otros modelos de tumores de mama, no triple negativos. Por otro lado, previamente se ha probado la combinación de dosis bajas de ciclofosfamida y el fármaco reposicionado celecoxib, en los modelos murinos de adenocarcinoma mamario M-406 y M234-p. Se encontró que este tratamiento inhibió el crecimiento tumoral en ambos modelos aumentando la supervivencia de los ratones, disminuyendo las metástasis pulmonares y presentando baja toxicidad [105], sugiriendo que la utilización de terapias en las que se combinan fármacos citotóxicos con fármacos en reposicionamiento resultan prometedoras para el tratamiento de TNBC.

Resulta importante destacar que no observamos síntomas relacionados con efectos tóxicos por parte de los fármacos evaluados. Para confirmar la ausencia de efectos tóxicos debido a los tratamientos, realizamos un seguimiento del peso corporal de los animales, además del análisis de otros parámetros como la calidad del pelaje, la actividad motora, el comportamiento, la frecuencia respiratoria y el consumo de comida y bebida. En las **Figuras 31 y 35** se muestran las modificaciones del peso corporal de los ratones a lo largo de cada experimento. Ninguno de los tratamientos utilizados resultó ser tóxico, ya que no se observó disminución en el peso; consideramos que un tratamiento causa toxicidad cuando el peso corporal del animal desciende 20% o más con respecto a su peso al inicio del tratamiento. Esto no constituye un dato menor ya que en los pacientes con tumores de mama triple negativos, la quimioterapia convencional representa una de las pocas opciones de tratamiento posible, pero genera importantes efectos adversos. Cabe destacar que, si bien no se realizaron mediciones de glicemia, nuestro laboratorio cuenta con antecedentes en el tratamiento de animales con Met y este parámetro fue cuantificado numerosas veces sin mostrar modificaciones significativas a las dosis usadas [106]. Por otro lado, no contamos con el instrumental requerido para medir

la presión arterial de ratones pero por evidencia bibliográfica sabemos que las dosis utilizadas de Prop no resultan perjudiciales [107], al igual que las dosis utilizadas de CQ, resultan efectivas y no producen efectos tóxicos [108].

A partir de aquí, teniendo en cuenta los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*, inferimos que, de los tratamientos evaluados, Met+Prop es el que mostró mejores resultados por lo que tomamos la decisión de continuar nuestros estudios solo con estos fármacos. Para indagar en las posibles diferencias estructurales y morfológicas que pudieran presentarse en los tumores y para profundizar en los mecanismos involucrados en la respuesta antitumoral observada con el tratamiento Met+Prop, tomamos muestras de tumores M-406 en crecimiento exponencial de todos los grupos experimentales para análisis histológicos e inmunohistoquímicos. En cortes histológicos del tumor M-406 teñidos con hematoxilina-eosina el análisis anatomopatológico corroboró que se trata de un adenocarcinoma de mama triple negativo, poco diferenciado. No observamos diferencias histológicas entre los tumores pertenecientes a los diferentes grupos experimentales (**Figura 36**). A pesar de esto, la disminución en el crecimiento tumoral observada en los ratones tratados (**Figura 29**) se correlacionó con una reducción de la proliferación asociada a los tratamientos, como observamos por inmunotinción con Ki67 (**Figura 37A**) y un aumento significativo de la apoptosis, como pudimos observar mediante la técnica de TUNEL (**Figura 37B**), en concordancia con nuestras observaciones *in vitro*.

Las células madre del cáncer (CSC) cumplen un papel importante, no solo en el origen de los tumores, sino también en su evolución, metástasis y recurrencia. Se les atribuye el desarrollo de resistencia a los tratamientos en muchos tipos tumorales, por lo que resultan fundamentales en la terapia del cáncer [109]. CD44 es una glicoproteína de la superficie celular involucrada en la adhesión y migración celular ampliamente reconocida como marcador de CSC, especialmente en mama; Sox-2 es un factor de transcripción que se ha visto que también juega un papel importante en CSC de mama [110]. En cortes histológicos realizamos inmunotinciones para CD44 y Sox-2 y, contrariamente a lo esperado, no observamos diferencias en la expresión de estas proteínas en los tumores M-406 entre los grupos experimentales (**Figura 38**). Entendemos que es un punto sobre el que vale la pena seguir explorando, dados

los antecedentes que existen del efecto de Met sobre la regulación de las CSC [42]; además no existen reportes del efecto de Prop sobre las CSC en mama. Creemos que deberíamos profundizar en este punto, dada la relevancia que tiene esta población celular en la progresión del cáncer. En particular, podríamos apuntar a definir correctamente esta población en nuestro modelo, al evaluar otros marcadores de CSC como ALDH1, o analizar la presencia de células CD44⁺CD24⁻ por citometría de flujo. También sería interesante realizar estas pruebas en el tumor de células 4T1, en el cual observamos un claro efecto antitumoral de Met+Prop. Además, podrían tomarse muestras de los tumores durante las diferentes fases de crecimiento, a fin de obtener una representación de las poblaciones celulares que integran el tumor en cada momento.

Todas las células necesitan una fuente constante de oxígeno y nutrientes, por lo que el desarrollo de vasos sanguíneos es un paso esencial en el crecimiento de un tumor. Con el fin de caracterizar el efecto del tratamiento con Met y/o Prop sobre la vasculatura tumoral, analizamos el área vascularizada mediante inmunotinciones para CD31 en muestras histológicas del tumor M-406 (**Figura 39**). Tras la cuantificación, no observamos diferencias entre los grupos experimentales en el porcentaje del área tumoral vascularizada. Creemos que sería interesante extender nuestros estudios a muestras del tumor de células 4T1, además podría complementarse con el análisis de la expresión de VEGF en los tumores ya que, en particular, se ha demostrado que Met redujo los niveles de expresión de VEGF *in vitro* en células de cáncer de mama murinas [111]; por otro lado, hay reportes que indican un efecto antiangiogénico por parte de Prop, por ejemplo, se sabe que Prop es un tratamiento muy eficaz para el hemangioma infantil ya que lograría modificar la neovascularización [112], además Pasquier y colaboradores han reportado que β -bloqueantes como Prop, ejercen efectos antiangiogénicos *in vitro* [113].

Se ha demostrado que, la presencia de linfocitos infiltrantes tumorales se asocia con una mejor supervivencia y respuesta de pacientes a tratamientos en cáncer de mama, incluido TNBC [114]. Mediante citometría de flujo determinamos en muestras de sangre de ratones BALB/c y en tumores 4T1 en fase exponencial, el contenido de linfocitos CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺Foxp3⁺ en representación de la población

Treg y CD4⁺IL17⁺ en representación de la población Th17. En primer lugar, encontramos que los valores obtenidos de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ circulantes se correlacionan con los informados en la bibliografía para ratones BALB/c [115]. Al evaluar el contenido de linfocitos circulantes, no observamos diferencias significativas entre los grupos, en particular, solo observamos una tendencia a mostrar mayor porcentaje de linfocitos CD4⁺ circulantes en los ratones tratados con Met+Prop, pero esta diferencia no llegó a ser significativa (**Figura 40**). En las muestras de tumor, tampoco observamos diferencias en el contenido de células inmunes intratumorales (**Figura 41**); en este caso, cabe destacar que notamos un mayor contenido de linfocitos infiltrando los tumores de ratones que habían recibido el tratamiento con Met+Prop, esta tendencia no llegó a ser significativa; aun así, este dato debería corroborarse luego de una tinción con el marcador CD3.

El sistema inmune es complejo y las células que lo integran participan en forma integrada. Para indagar en la interacción de las poblaciones linfocitarias analizadas, calculamos las proporciones CD4/CD8 y Foxp3/IL17. No encontramos diferencias significativas en estos cocientes entre los grupos experimentales, aunque hay que destacar que la relación CD4/CD8 en el grupo control se mantuvo entre las muestras de sangre y tumor (**Figura 42A,B**). Se ha observado que la proporción de células CD4/CD8 que infiltran tumores 4T1, aumenta a medida que el crecimiento del tumor progresa; en las primeras etapas de desarrollo del tumor predominan las células T CD8⁺, mientras que en las últimas etapas del tumor predominan las células T CD4⁺ [116]. En la **Figura 42B**, puede verse que, en el grupo tratado con Met+Prop, esta relación tiende a ser menor respecto al control, lo que indicaría la presencia de más células CD8⁺ que, son las que se espera medien directamente el control del crecimiento tumoral. Evaluar el balance entre células con funciones antagónicas como Tregs (Foxp3⁺) y Th17 (IL17) pensamos que podría orientarnos sobre el tipo de respuesta inmune que se está poniendo en juego. En nuestro caso, nuestros resultados no fueron esclarecedores, ya que no vimos diferencias significativas entre los grupos para este cociente (**Figura 42C,D**). Las células Tregs son importantes para mantener la tolerancia inmunológica y se cree que están implicadas en regular negativamente la inmunidad antitumoral. Se ha demostrado que Met fue capaz de reducir el infiltrado de células Tregs en modelos de cáncer de

fibrosarcoma, pero a este resultado se llegó tratando a los ratones con una dosis considerablemente mayor a la usada en nuestro trabajo [117]. Se sabe que, a medida que el tumor progresa, cambia su microambiente, modificando la respuesta inmune antitumoral, lo que le permite evadir la acción del sistema inmune, favoreciendo la proliferación y la diseminación de las células tumorales. Para comprender mejor el proceso, y cómo influyen nuestros tratamientos en él, sería interesante hacer un seguimiento del contenido de las células analizadas durante toda la progresión tumoral, así como analizar el contenido de otras poblaciones inmunes innatas, como macrófagos y células NK, y el contenido de citoquinas séricas pro y anti-inflamatorias.

El desarrollo de metástasis es la principal causa de muerte por cáncer. Para colonizar nuevos órganos, las células tumorales circulantes deben superar distintos obstáculos: invadir tejidos, evadir las defensas inmunitarias, adaptarse a nuevos nichos, sobrevivir como semillas latentes y, finalmente, infiltrarse en el nuevo tejido del huésped. Estos obstáculos hacen que este proceso sea poco eficaz, pero una vez establecidas las metástasis, los tratamientos actuales no suelen brindar respuestas duraderas. De aquí, surge la importancia de desarrollar tratamientos que logren combatir tanto el tumor primario como sus metástasis. Cuando sacrificamos los ratones portadores de tumores para realizar el estudio de supervivencia, analizamos sus órganos y encontramos que los pulmones fueron el órgano blanco de metástasis espontáneas. En los ratones tratados con Met y/o Prop portadores del tumor 4T1 no encontramos diferencias significativas entre los grupos al analizar el número de metástasis por ratón, como se muestra en la **Figura 43**. A pesar de este resultado, nos resulta alentador el hecho que los ratones tratados con Met+Prop tengan un número menor o igual de metástasis pulmonares que los ratones del grupo control, ya que los ratones con tumor tratados con la combinación de fármacos, vivieron alrededor de un mes más que aquellos que no recibieron tratamiento (**Figura 30A**) y, durante ese lapso de tiempo probablemente hubo más oportunidades para que las células tumorales ingresen al torrente sanguíneo, sean capaces de sobrevivir, alcanzar los pulmones y crecer. En el caso de los ratones portadores del tumor M-406 tratados con los mismos fármacos, los resultados indican que mientras el 100% de los ratones del grupo control desarrollaron

metástasis pulmonares espontáneas, un porcentaje menor presentó metástasis en los grupos tratados (**Tabla VII**). Como se muestra en la **Figura 44**, los tratamientos también lograron reducir el número de nódulos metastásicos espontáneos por ratón, siendo esta disminución significativa para los ratones tratados con Met+Prop. En ratones CBI portadores del tumor M-406 tratados con CQ y/o Prop no observamos desarrollo de metástasis pulmonares en los grupos experimentales. Esto puede deberse a que el tiempo que los ratones permanecieron con el tumor primario no fue suficiente para que llegaran a desarrollar metástasis espontáneas pulmonares. En cambio, los ratones BALB/c portadores del tumor M-234p tratados con CQ+Prop presentaron una tendencia a mostrar menor número de nódulos metastásicos que el grupo control, pero esta diferencia no llegó a ser significativa (datos no mostrados).

Para profundizar en el estudio del efecto antimetastásico de Met y Prop, realizamos un abordaje diferente: un estudio de metástasis experimentales (**Figura 8**). Inoculamos por vía intravenosa una suspensión de células tumorales, de esa forma se depositan las células directamente en el torrente sanguíneo independizándonos de los pasos iniciales de la cascada metastásica y logramos enfocarnos solo en las etapas de supervivencia, extravasación y crecimiento de las células en el nuevo órgano. En los ratones BALB/c inoculados con las células 4T1 todos los tratamientos fueron efectivos en disminuir el número de metástasis por ratón, especialmente Prop y la combinación de Met+Prop (**Figura 45B**). Además, al analizar la distribución de tamaños de los nódulos metastásicos, se vio que los ratones tratados con Prop y con la combinación de Met+Prop desarrollaron metástasis de menor tamaño (**Figura 45C**). En los ratones CBI, el tratamiento que resultó ser significativamente más efectivo en reducir el número de metástasis por ratón fue la combinación de Met+Prop (**Figura 46B**); nuevamente se pone de manifiesto el sinergismo entre ambos fármacos ya que, la combinación mostró un efecto más marcado que los tratamientos individuales. De manera similar a lo descrito en el modelo tumoral anterior, al analizar la distribución de tamaños de las metástasis, se encontró que los ratones tratados con Prop y Met+Prop prácticamente no presentaron metástasis grandes, en comparación con los otros grupos (**Figura 46C**). Podemos notar que al estudiar el efecto antimetastásico, el tratamiento con Met no

resultó efectivo, pero la adición de Prop mejoró la eficacia del tratamiento. Con respecto a esto, no es la primera vez que se reporta el efecto antimetastásico de Prop: Choy y colaboradores evaluaron datos retrospectivos que mostraron que en pacientes con cáncer de mama en estadio II, el uso de β -bloqueantes se asoció con un riesgo significativamente reducido de recurrencia postoperatoria o metástasis a distancia. Además, en análisis *in vitro* encontraron que células metastásicas de tumores triple negativos mostraron una alta expresión de receptores adrenérgicos β_2 , y que estos promovían la metástasis cerebral y, esta capacidad metastásica se veía reducida luego del pre-tratamiento con Prop, como observaron en experimentos *in vivo* [118].

Basándonos en las alteraciones observadas por parte del tratamiento con Met+Prop sobre el desarrollo de metástasis pulmonares, nos interesó disociar aún más la cascada metastásica y evaluar si el resultado de ver menos metástasis pulmonares en los ratones tratados se debía a que el tratamiento con Met+Prop estaba afectando alguna etapa del desarrollo de metástasis en particular. Encontramos que, en ratones portadores del tumor primario de células 4T1 que fueron tratados, disminuyó el número de células tumorales en sangre (**Figura 47**) que, aunque no llegó a ser una disminución significativa, sugeriría que el tratamiento está afectando en parte, el desprendimiento de las células del tumor primario y su ingreso en el torrente sanguíneo. Esto se condice con los resultados observados *in vitro*, donde vimos que Met+Prop disminuyó significativamente la capacidad invasiva de las células, no solo de la línea murina 4T1 sino también de la línea celular humana MDA-MB-231 (**Figura 26**).

Una vez en circulación, las células tumorales deben sobrevivir, lograr adherirse al endotelio de los capilares y lograr extravasar. Para evaluar este proceso, las células 4T1 se marcaron en color verde y se inocularon por vía intravenosa en ratones. Como control, un grupo de células 4T1 fueron pre-tratadas con Met+Prop en cultivo durante 24 h antes de su inoculación. Luego de 48 h post-inoculación, se tomaron muestras de sangre y pulmones. Encontramos un porcentaje significativamente menor de células tumorales en sangre en aquellos ratones que habían recibido el tratamiento con Met+Prop (**Figura 48A**), por lo que se vería comprometida la

supervivencia de las células tumorales en sangre en presencia del tratamiento. Esto guarda relación con el efecto visto por parte del tratamiento sobre la viabilidad celular, en este caso, al administrarse sistémicamente a los ratones en el agua de bebida, el tratamiento estaría ejerciendo su efecto anti-proliferativo o pro-apoptótico sobre las células tumorales que se encontraban en circulación. Como era de esperar, los pulmones de los ratones que habían recibido el tratamiento, también presentaron un número significativamente menor de células tumorales (verdes) por lóbulo (**Figura 48C**). Cabe destacar, que los pulmones de los ratones que fueron inoculados con las células 4T1 pre-tratadas también presentaron un número significativamente menor de células tumorales, indicando que el pre-tratamiento afectaría la capacidad de extravasación de estas células (**Figura 48C**) y no solo la supervivencia. Una posible explicación al mecanismo que se está poniendo en juego en este caso, podría ser el que se muestra en un estudio con ratones inoculados con células de carcinoma escamoso de esófago. En este caso, se comprobó que Met reguló negativamente la expresión de MMP-2 y MMP-9 en forma dependiente del tiempo, con lo que se cree que podría ser un mecanismo desencadenado por este fármaco para inhibir la invasión y metástasis *in vivo* [119].

Hasta este punto, teníamos claro que el tratamiento producía menos metástasis pulmonares. En parte, habíamos observado un efecto del tratamiento sobre la intravasación, pero también, esa disminución en el número de metástasis se podía explicar por la reducción significativa en la capacidad de sobrevivir en circulación y extravasar. Nuestros resultados previos nos permitieron seguir hipotetizando; dado que las metástasis pulmonares de los ratones tratados con Met+Prop eran más pequeñas, esto podría deberse a que las células tumorales que logran llegar al pulmón ven imposibilitada su proliferación. Tal como esperábamos, las metástasis pulmonares de células 4T1 de ratones que habían recibido el tratamiento presentaron un porcentaje significativamente menor de células Ki67⁺ con respecto al grupo control (**Figura 49**), confirmando nuestros resultados previos.

Retomando el hecho que Met+Prop estaría afectando el metabolismo mitocondrial y que éste está íntimamente relacionado con la capacidad metastásica de las células, podemos decir que el tratamiento no estaría afectando principalmente una etapa en

particular de la cascada metastásica, sino que lo que vemos es el resultado de pequeños efectos a lo largo de todo el proceso por parte del tratamiento.

En pacientes con TNBC suele administrarse quimioterapia neoadyuvante, el objetivo de este enfoque es reducir el tamaño del tumor y aumentar la probabilidad de una cirugía de conservación de mama. A su vez, luego de la cirugía suele optarse por administrar un nuevo tratamiento, denominado adyuvante, para disminuir el riesgo de que la enfermedad vuelva. En el caso de pacientes con TNBC, estas terapias se verán limitadas solo a quimioterapia convencional o radioterapia. El objetivo de la terapia adyuvante es ayudar a eliminar las células tumorales que pueden haber quedado en el cuerpo luego de la cirugía, ya sea en el sitio del tumor primario o en otros sitios del cuerpo; a pesar de esto, la enfermedad metastásica sigue siendo la principal causa de muerte. Nuestro grupo de trabajo ha observado en el modelo de tumor de mama triple negativo 4T1 que, el tratamiento con Met+Prop podría resultar de interés para tratar tanto, las micrometástasis, como las células de cáncer de mama que se han escapado del tumor primario pero que aún no se han establecido como metástasis, impidiendo el crecimiento de éstas en el pulmón. Esto, nos llevó a pensar que el tratamiento con Met+Prop resultaría útil como terapia adyuvante para el cáncer de mama triple negativo. Para evaluar este punto, desarrollamos dos experimentos de terapia adyuvante, donde extirpamos los tumores primarios de los ratones y posteriormente les administramos el tratamiento con Met+Prop durante 6 semanas. Encontramos que mientras en 66,6% de los ratones CBI que no habían recibido el tratamiento post-cirugía desarrollaron metástasis, un porcentaje significativamente menor (20%) de ratones que sí recibieron el tratamiento adyuvante presentaron metástasis pulmonares (**Tabla VIII**). De la misma forma, en ratones BALB/c observamos que, mientras el 61,5% de los ratones del grupo control desarrolló metástasis pulmonares, solo el 30% de los ratones que recibieron el tratamiento post-cirugía presentaron metástasis (**Tabla IX**). Otros autores han analizado la utilidad y eficacia de Met como agente adyuvante en cáncer colorrectal y de próstata [120]. Dado que hay pruebas que recomiendan un uso prolongado de Met para lograr un efecto antitumoral [121], pensando a Met como un tratamiento de primera línea, pacientes con tumores avanzados pueden no ser capaces de recibir el tratamiento durante el tiempo

suficiente para obtener beneficios terapéuticos; de aquí que, dado el efecto que vemos sobre el desarrollo de metástasis por parte de Met+Prop, nos lleve a pensar en este tipo de tratamiento como una opción de terapia adyuvante adecuada. Este punto también ha llamado la atención de otros investigadores, dado que se han encontrado estudios donde se reporta el uso de Met como terapia adyuvante. En un ensayo clínico, 102 mujeres no diabéticas con cáncer de mama recién diagnosticado fueron divididas en 2 grupos, control y tratado con Met. Todas las pacientes recibieron quimioterapia adyuvante tradicional, pero el grupo tratado con Met recibió además, 850 mg de Met dos veces al día. Estas pacientes, al final del estudio mostraron una menor proporción de mediadores implicados en el metabolismo de la insulina que están íntimamente relacionados con un riesgo incrementado de cáncer en comparación con el grupo control. Además, se observó un menor número de casos metastásicos en aquellas pacientes que también se trataron con terapia hormonal, poniendo de manifiesto la importancia de seguir indagando en el tratamiento con este tipo de fármacos [122]. En el caso de Prop, se ha informado en un ensayo clínico de fase II, aleatorizado y controlado con placebo que, una semana de administración oral de Prop en el período pre-operatorio reduce la expresión de biomarcadores asociados con las metástasis del cáncer de mama [123]. También hay reportes donde se menciona que el uso β -bloqueantes puede ser útil en pacientes que reciben terapia adyuvante cardioprotectora, como las antraciclinas, ya que medicamentos como Prop actuarían como cardioprotectores [124].

Los tratamientos innovadores y efectivos son sinónimo de tratamientos costosos; en países de medianos o bajos ingresos, se hace imposible acceder a los tratamientos de vanguardia, ya sea por limitaciones de recursos del sistema de salud o limitaciones económicas del paciente. Además, muchas veces el diagnóstico se hace en forma tardía, debido a que no es fácil para los pacientes acceder a los programas de detección temprana de la enfermedad; todo esto conduce a las altas tasas de mortalidad que se observan en países de bajos y medianos ingresos en comparación con los países que poseen mayores recursos económicos [125]. Los fármacos evaluados en este trabajo, son fármacos reposicionados, lo que implica una nueva utilidad de los mismos para el tratamiento del cáncer, representando un potencial beneficio económico para el sistema de salud, no solo porque se consiguen como

genéricos, sino también porque al no resultar tóxicos, se evitan los gastos adicionales que implican el tratamiento de las toxicidades comunes provocadas por la quimioterapia estándar. La cantidad de fármacos existentes con potencial antitumoral va en aumento y es un área que merece se le preste atención ya que constituye la oportunidad de obtener tratamientos más económicos, eficaces y seguros. Las posibilidades de combinación y modalidades de terapias son varias y pensar en el uso de medicamentos que pueden afectar distintos blancos de la célula tumoral resulta prometedor; aún en el caso de fármacos que presentan problemas de biodisponibilidad, como es el caso de los benzimidazoles. De nuestro trabajo en colaboración que mostramos aquí, queda claro que se puede recurrir a nuevas estrategias de tecnología farmacéutica para desarrollar compuestos que mejoren la solubilidad acuosa y biodisponibilidad sin perder la eficacia del principio activo.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren un claro efecto de la combinación Met+Prop sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, tanto *in vitro* como *in vivo*, de tumores de mama triple negativos. Además, sumando los antecedentes que existen donde se describe que la administración de Met se correlaciona con una menor incidencia de cáncer y el tratamiento con Prop se relaciona con un riesgo menor de desarrollar metástasis en pacientes con cáncer de mama [39, 48], pensamos que la combinación con Met+Prop resulta una opción interesante como terapia adyuvante.

Es de destacar que no existen antecedentes previos sobre el estudio del efecto antitumoral de esta combinación de fármacos. Dados los resultados obtenidos, la traslación a la clínica del tratamiento con Met+Prop como terapia adyuvante aparece como una posibilidad concreta y factible, tanto en tumores mamarios triple negativos como otros tipos de tumores; ya que previamente, nuestro grupo de trabajo vio que esta combinación fue eficaz en tumores de mama positivos para receptores hormonales; además, recientemente hemos demostrado en modelos de cáncer colorrectal, que la combinación Met+Prop inhibió la proliferación y el crecimiento de tumores quimiorresistentes a 5-fluorouracilo (datos enviados para su publicación).

Los resultados presentados en esta tesis doctoral podrían servir como punto de partida de nuevos estudios para probar el efecto de estos fármacos en combinación con quimioterapéuticos convencionales para el tratamiento del cáncer. Con respecto a este último punto, creemos que evaluar la combinación de fármacos reposicionados con citotóxicos convencionales resultaría favorable; por ejemplo, recientemente hemos encontrado que la adición del fármaco reposicionado losartán, a un esquema de terapia metronómica con ciclofosfamida, mejoró significativamente el resultado terapéutico en modelos murinos de tumores mamarios triple negativos [126]. Además, hay reportes en los cuales se demuestra que Met sensibiliza las células de cáncer de ovario *in vitro* a agentes quimioterapéuticos como cisplatino y metotrexato [127]. También se vio que en células de tumores de mama triple negativos resistentes a inhibidores de PARP, Met sensibilizó a las células resistentes a estos inhibidores, a través del bloqueo de la vía de Akt, aumentando su eficacia [128]. Asimismo, en un estudio clínico, se les administró la combinación de vinblastina, metotrexato y Prop durante 12 meses, a pacientes con angiosarcoma avanzado que presentaban un pronóstico pobre a las terapias convencionales. Luego de este tiempo, se administró terapia de mantenimiento oral con Prop, etopósido y ciclofosfamida, lo que resultó en un tratamiento bien tolerado por los pacientes, provocando una respuesta clínica favorable [129].

En conclusión, creemos que nuestros datos y los reportes que hay disponibles en la bibliografía, sugieren que el tratamiento con Met+Prop podría plantearse como una posibilidad para aplicar como terapia adyuvante en tumores de mama triple negativos, dado que aún no se ha demostrado que el mismo sea más efectivo que otros utilizados actualmente para el tratamiento de este tipo de tumores. Además, estas observaciones se podrían extender a otros tipos de tumores, incluidos tumores quimiorresistentes; creemos que este tipo de terapia evitaría la toxicidad asociada generalmente a las quimioterapias convencionales, proporcionando un tratamiento de bajo costo, lo que resultaría especialmente beneficioso en países de bajos y medianos ingresos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roos, W.P., A.D. Thomas, and B. Kaina, *DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(1): p. 20-33.
2. Iranzo, J., I. Martincorena, and E.V. Koonin, *Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(26): p. E6010-e6019.
3. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
5. Viallard, C. and B. Larrivé, *Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets*. Angiogenesis, 2017. **20**(4): p. 409-426.
6. Candeias, S.M. and U.S. Gaipal, *The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2016. **16**(1): p. 101-7.
7. Maimela, N.R., S. Liu, and Y. Zhang, *Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment*. Comput Struct Biotechnol J, 2019. **17**: p. 1-13.
8. Levine, A.J. and A.M. Puzio-Kuter, *The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1340-4.
9. Sun, X., et al., *Metabolic Reprogramming in Triple-Negative Breast Cancer*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 428.
10. Ghaffari, P., A. Mardinoglu, and J. Nielsen, *Cancer metabolism: a modeling perspective*. Front Physiol, 2015. **6**.
11. Vander Heiden, M.G., *Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(9): p. 671-84.
12. Yeung, K.T. and J. Yang, *Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis*. Mol Oncol, 2017. **11**(1): p. 28-39.
13. Diepenbruck, M. and G. Christofori, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?* Curr Opin Cell Biol, 2016. **43**: p. 7-13.
14. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**: p. 28.
15. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massagué, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 274-284.
16. Libson, S. and M. Lippman, *A review of clinical aspects of breast cancer*. Int Rev Psychiatry, 2014. **26**(1): p. 4-15.
17. Cohen-Haguenaer, O., *[Hereditary predisposition to breast cancer (1): genetics]*. Med Sci (Paris), 2019. **35**(2): p. 138-151.
18. Merino Bonilla, J.A., M. Torres Tabanera, and L.H. Ros Mendoza, *Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies*. Radiologia, 2017. **59**(5): p. 368-379.
19. Rivenbark, A.G., S.M. O'Connor, and W.B. Coleman, *Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine*. Am J Pathol, 2013. **183**(4): p. 1113-1124.
20. Bianchini, G., et al., *Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(11): p. 674-690.
21. Bergin, A.R.T. and S. Loi, *Triple-negative breast cancer: recent treatment advances*. F1000Res, 2019. **8**.
22. Maughan, K.L., M.A. Lutterbie, and P.S. Ham, *Treatment of breast cancer*. Am Fam Physician, 2010. **81**(11): p. 1339-46.
23. Peart, O., *Breast intervention and breast cancer treatment options*. Radiol Technol, 2015. **86**(5): p. 535M-558M; quiz 559-62.
24. Vanneman, M. and G. Dranoff, *Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 237-251.
25. Moo, T.A., et al., *Overview of Breast Cancer Therapy*. PET Clin, 2018. **13**(3): p. 339-354.
26. Harbeck, N. and M. Gnant, *Breast cancer*. Lancet, 2017. **389**(10074): p. 1134-1150.
27. Kumar, M., R. Nagpal, and V. Verna, *Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment*. Acta Biomed, 2013. **83**(3): p. 220-233.
28. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 364-78.

29. Hanahan, D., G. Bergers, and E. Bergsland, *Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1045.
30. Simsek, C., E. Esin, and S. Yalcin, *Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the Literature and Clinical Experience*. J Oncol, 2019. **2019**: p. 5483791.
31. Scharovsky, O.G., L.E. Mainetti, and V.R. Rozados, *Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better*. Curr Oncol, 2009. **16**(2): p. 7-15.
32. André, N., M. Carré, and E. Pasquier, *Metronomics: towards personalized chemotherapy?* Nat Rev Clin Oncol, 2014.
33. Olgen, S. and L.P. Kotra, *Drug Repurposing in the Development of Anticancer Agents*. Curr Med Chem, 2019. **26**(28): p. 5410-5427.
34. Pantziarka, P., et al., *The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project*. Ecancermedalscience, 2014. **8**.
35. Pantziarka, P., et al., *Repurposing non-cancer drugs in oncology—how many drugs are out there?* bioRxiv, 2017: p. 197434.
36. Gyawali, B., et al., *Does the oncology community have a rejection bias when it comes to repurposed drugs?* Ecancermedalscience, 2018. **12**: p. ed76.
37. Bowker, S.L., et al., *Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin*. Diabetes Care, 2006. **29**(2): p. 254-258.
38. Zhang, P., et al., *Association of metformin use with cancer incidence and mortality: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol, 2013. **37**(3): p. 207-18.
39. Xu, H., et al., *Metformin Use Is Associated With Better Survival of Breast Cancer Patients With Diabetes: A Meta-Analysis*. Oncologist, 2015. **20**(11): p. 1236-44.
40. Zi, F., et al., *Metformin and cancer: An existing drug for cancer prevention and therapy*. Oncol Lett, 2018. **15**(1): p. 683-690.
41. Dowling, R.J., et al., *Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10804-10812.
42. Saini, N. and X. Yang, *Metformin as an anti-cancer agent: actions and mechanisms targeting cancer stem cells*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018. **50**(2): p. 133-143.
43. Pantziarka, P., et al., *Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-Propranolol as an anti-cancer agent*. Ecancermedalscience, 2016. **10**: p. 680.
44. Cole, S.W., et al., *Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(9): p. 563-72.
45. Tang, J., et al. *β -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy*. in *Semin Cancer Biol*. 2013. Elsevier.
46. Storch, C.H. and P.H. Hoeger, *Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action*. Br J Dermatol, 2010. **163**(2): p. 269-74.
47. Montoya, A., et al., *The beta adrenergic receptor antagonist propranolol alters mitogenic and apoptotic signaling in late stage breast cancer*. Biomed J, 2019. **42**(3): p. 155-165.
48. Botteri, E., et al., *Therapeutic effect of β -blockers in triple-negative breast cancer postmenopausal women*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **140**(3): p. 567-75.
49. Verbaanderd, C., et al., *Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents*. Ecancermedalscience, 2017. **11**: p. 781.
50. Samaras, P., et al., *Phase I study of a chloroquine-gemcitabine combination in patients with metastatic or unresectable pancreatic cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2017. **80**(5): p. 1005-1012.
51. Pascolo, S., *Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies*. Eur J Pharmacol, 2016. **771**: p. 139-44.
52. Kimura, T., et al., *Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy*. Cancer Res, 2013. **73**(1): p. 3-7.
53. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. **147**(4): p. 728-41.
54. Aoki, K. and Y. Terauchi, *Effect of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Diabetes Mellitus and Obesity*. Vitam Horm, 2018. **108**: p. 355-365.
55. Arnold, J.T. and M.R. Blackman, *Does DHEA exert direct effects on androgen and estrogen receptors, and does it promote or prevent prostate cancer?* Endocrinology, 2005. **146**(11): p. 4565-7.

56. Green, J.E., et al., *2-difluoromethylornithine and dehydroepiandrosterone inhibit mammary tumor progression but not mammary or prostate tumor initiation in C3(1)/SV40 T/t-antigen transgenic mice*. *Cancer Res*, 2001. **61**(20): p. 7449-55.
57. Schcolnik-Cabrera, A., et al., *Orlistat as a FASN inhibitor and multitargeted agent for cancer therapy*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018. **27**(5): p. 475-489.
58. Yoshii, Y., et al., *Fatty acid synthase is a key target in multiple essential tumor functions of prostate cancer: uptake of radiolabeled acetate as a predictor of the targeted therapy outcome*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64570.
59. Papaevangelou, E., et al., *The effect of FASN inhibition on the growth and metabolism of a cisplatin-resistant ovarian carcinoma model*. *Int J Cancer*, 2018. **143**(4): p. 992-1002.
60. Bhargava-Shah, A., et al., *Orlistat and antisense-miRNA-loaded PLGA-PEG nanoparticles for enhanced triple negative breast cancer therapy*. *Nanomedicine (Lond)*, 2016. **11**(3): p. 235-47.
61. Markowska, A., et al., *Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019. **29**(13): p. 1549-1554.
62. Peiris-Pagès, M., F. Sotgia, and M.P. Lisanti, *Doxycycline and therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer cells: old drug, new purpose*. *Oncoscience*, 2015. **2**(8): p. 696-9.
63. Zhang, L., et al., *Doxycycline inhibits the cancer stem cell phenotype and epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer*. *Cell Cycle*, 2017. **16**(8): p. 737-745.
64. Priotti, J., et al., *Albendazole Microcrystal Formulations Based on Chitosan and Cellulose Derivatives: Physicochemical Characterization and In Vitro Parasitocidal Activity in Trichinella spiralis Adult Worms*. *AAPS PharmSciTech*, 2017. **18**(4): p. 947-956.
65. Zhang, X., et al., *Anthelmintic drug albendazole arrests human gastric cancer cells at the mitotic phase and induces apoptosis*. *Exp Ther Med*, 2017. **13**(2): p. 595-603.
66. Ehteda, A., et al., *Complexation of albendazole with hydroxypropyl- β -cyclodextrin significantly improves its pharmacokinetic profile, cell cytotoxicity and antitumor efficacy in nude mice*. *Anticancer Res*, 2012. **32**(9): p. 3659-66.
67. García, A., et al., *Modified β -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. complete in vitro evaluation and characterization*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e88234.
68. Citterio, C., et al., *The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells*. *Sci Signal*, 2012. **5**(ra71).
69. Larive, R.M., et al., *Contribution of the R-Ras2 GTP-binding protein to primary breast tumorigenesis and late-stage metastatic disease*. *Nature communications*, 2014. **5**.
70. Squartini, F. and R. Pingitore, *Tumours of the mammary gland*. *IARC Sci Publ*, 1994(111): p. 47.
71. Mainetti, L.E., et al., *Metronomic therapy with cyclophosphamide or doxorubicin inhibits mouse mammary adenocarcinoma growth and metastasis development*. *Cancer Research*, 2005. **65**(9 Supplement): p. 1377-1377.
72. Irvine, J.D., et al., *MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening*. *J Pharm Sci*, 1999. **88**(1): p. 28-33.
73. McCann, K.E., S.A. Hurvitz, and N. McAndrew, *Advances in Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer*. *Drugs*, 2019. **79**(11): p. 1217-1230.
74. Malik, P.S., V. Raina, and N. André, *Metronomics as maintenance treatment in oncology: time for chemo-switch*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 76.
75. André, N., et al., *Has the time come for metronomics in low-income and middle-income countries?* *Lancet Oncol*, 2013. **14**(6): p. e239-48.
76. Spini, A., et al., *Repurposing of drugs for triple negative breast cancer: an overview*. *Ecancermedicalscience*, 2020. **14**: p. 1071.
77. Zhao, M., et al., *Aspirin and metformin exhibit antitumor activity in murine breast cancer*. *Oncol Rep*, 2018. **39**(3): p. 1414-1422.
78. Zhang, Y., et al., *Chloroquine (CQ) exerts anti-breast cancer through modulating microenvironment and inducing apoptosis*. *Int Immunopharmacol*, 2017. **42**: p. 100-107.
79. López-Marure, R., P.G. Contreras, and J.S. Dillon, *Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **660**(2-3): p. 268-74.

80. Pasquier, E., et al., *Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment*. *Oncotarget*, 2011. **2**(10): p. 797-809.
81. Sokolowska, E., et al., *Orlistat Reduces Proliferation and Enhances Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells (PANC-1)*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(11): p. 6321-6327.
82. Chen, H., Z. Weng, and C. Xu, *Albendazole suppresses cell proliferation and migration and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells*. *Anticancer Drugs*, 2020. **31**(5): p. 431-439.
83. Marinello, P.C., et al., *Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β 1 induction*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(4): p. 5337-46.
84. Lin, Y.C., et al., *Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis*. *Kaohsiung J Med Sci*, 2017. **33**(5): p. 215-223.
85. Xie, W.Y., et al., *β -blockers inhibit the viability of breast cancer cells by regulating the ERK/COX-2 signaling pathway and the drug response is affected by ADRB2 single-nucleotide polymorphisms*. *Oncol Rep*, 2019. **41**(1): p. 341-350.
86. Lee, J.O., et al., *Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51*. *Breast Cancer Res*, 2019. **21**(1): p. 115.
87. Browder, T., et al., *Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 1878-86.
88. Kang, F., et al., *Propranolol inhibits glucose metabolism and 18F-FDG uptake of breast cancer through posttranscriptional downregulation of hexokinase-2*. *J Nucl Med*, 2014. **55**(3): p. 439-45.
89. Brohée, L., et al., *Propranolol sensitizes prostate cancer cells to glucose metabolism inhibition and prevents cancer progression*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 7050.
90. Gao, Z.Y., et al., *Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro*. *Exp Ther Med*, 2016. **11**(5): p. 1700-1706.
91. Wang, F., et al., *Chloroquine Enhances the Radiosensitivity of Bladder Cancer Cells by Inhibiting Autophagy and Activating Apoptosis*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **45**(1): p. 54-66.
92. Amaral, M.E.A., et al., *Pre-clinical effects of metformin and aspirin on the cell lines of different breast cancer subtypes*. *Invest New Drugs*, 2018. **36**(5): p. 782-796.
93. Gong, L., et al., *Propranolol selectively inhibits cervical cancer cell growth by suppressing the cGMP/PKG pathway*. *Biomed Pharmacother*, 2019. **111**: p. 1243-1248.
94. Rahim, R. and J.S. Strobl, *Hydroxychloroquine, chloroquine, and all-trans retinoic acid regulate growth, survival, and histone acetylation in breast cancer cells*. *Anticancer Drugs*, 2009. **20**(8): p. 736-45.
95. Talarico, G., et al., *Aspirin and atenolol enhance metformin activity against breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 18673.
96. Ariaans, G., et al., *Anti-tumor effects of everolimus and metformin are complementary and glucose-dependent in breast cancer cells*. *BMC Cancer*, 2017. **17**(1): p. 232.
97. Wheaton, W.W., et al., *Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis*. *Elife*, 2014. **3**: p. e02242.
98. Porporato, P.E., et al., *Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 2: Mitochondria, lipid and amino acid metabolism*. *Cell Mol Life Sci*, 2016. **73**(7): p. 1349-63.
99. Işeri, O.D., et al., *beta-Adrenoreceptor antagonists reduce cancer cell proliferation, invasion, and migration*. *Pharm Biol*, 2014. **52**(11): p. 1374-81.
100. Lee, A., S.P. Fraser, and M.B.A. Djamgoz, *Propranolol inhibits neonatal Nav1.5 activity and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells: Effects of combination with ranolazine*. *J Cell Physiol*, 2019. **234**(12): p. 23066-23081.
101. Schexnayder, C., et al., *Metformin Inhibits Migration and Invasion by Suppressing ROS Production and COX2 Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(11).
102. Lin, C.S., et al., *Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells*. *Oncol Rep*, 2018. **39**(1): p. 316-330.
103. Liang, G., et al., *Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration*. *Oncol Lett*, 2015. **10**(3): p. 1527-1532.

104. Rodriguez, F.J., L.J. Lewis-Tuffin, and P.Z. Anastasiadis, *E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1826**(1): p. 23-31.
105. Mainetti, L.E., et al., *Antitumoral and antimetastatic effects of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide combined with celecoxib on murine mammary adenocarcinomas*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011. **137**(1): p. 151-63.
106. Asad, A.S., et al., *Metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and metformin inhibits tumor and metastasis growth M-406 murine mammary adenocarcinoma*. *Cancer Research*, 2014. **74**(19 Supplement): p. 795-795
107. Fabbiano, S., et al., *Genetic dissection of the vav2-rac1 signaling axis in vascular smooth muscle cells*. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**(24): p. 4404-19.
108. Cook, K.L., et al., *Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(12): p. 3222-32.
109. Moharil, R.B., et al., *Cancer stem cells: An insight*. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2017. **21**(3): p. 463.
110. Li, X., et al., *Sinomenine hydrochloride inhibits breast cancer metastasis by attenuating inflammation-related epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness*. *Oncotarget*, 2017. **8**(8): p. 13560-13574.
111. Falah, R.R., W.H. Talib, and S.J. Shbailat, *Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis*. *Ther Adv Med Oncol*, 2017. **9**(4): p. 235-252.
112. Ji, Y., et al., *The use of propranolol in the treatment of infantile haemangiomas: an update on potential mechanisms of action*. *Br J Dermatol*, 2015. **172**(1): p. 24-32.
113. Pasquier, E., et al., *β -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma*. *Br J Cancer*, 2013. **108**(12): p. 2485-94.
114. Wang, K., et al., *The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer*. *Hum Pathol*, 2017. **69**: p. 110-117.
115. Chen, J. and D.E. Harrison, *Quantitative trait loci regulating relative lymphocyte proportions in mouse peripheral blood*. *Blood*, 2002. **99**(2): p. 561-6.
116. Huang, Y., et al., *CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome*. *Oncotarget*, 2015. **6**(19): p. 17462-78.
117. Kunisada, Y., et al., *Attenuation of CD4(+)/CD25(+) Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2 Diabetes Drug*. *EBioMedicine*, 2017. **25**: p. 154-164.
118. Choy, C., et al., *Inhibition of β 2-adrenergic receptor reduces triple-negative breast cancer brain metastases: The potential benefit of perioperative β -blockade*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(6): p. 3135-42.
119. Liang, F., Y.G. Wang, and C. Wang, *Metformin Inhibited Growth, Invasion and Metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **51**(3): p. 1276-1286.
120. Coyle, C., et al., *Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(12): p. 2184-2195.
121. Bodmer, M., et al., *Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(6): p. 1304-8.
122. El-Haggag, S.M., et al., *Metformin may protect nondiabetic breast cancer women from metastasis*. *Clin Exp Metastasis*, 2016. **33**(4): p. 339-57.
123. Hiller, J.G., et al., *Preoperative β -Blockade with Propranolol Reduces Biomarkers of Metastasis in Breast Cancer: A Phase II Randomized Trial*. *Clin Cancer Res*, 2020. **26**(8): p. 1803-1811.
124. Gujral, D.M., G. Lloyd, and S. Bhattacharyya, *Effect of prophylactic betablocker or ACE inhibitor on cardiac dysfunction & heart failure during anthracycline chemotherapy \pm trastuzumab*. *Breast*, 2018. **37**: p. 64-71.
125. Birnbaum, J.K., et al., *Early detection and treatment strategies for breast cancer in low-income and upper middle-income countries: a modelling study*. *Lancet Glob Health*, 2018. **6**(8): p. e885-e893.

126. Mainetti, L.E., et al., *Losartan improves the therapeutic effect of metronomic cyclophosphamide in triple negative mammary cancer models*. *Oncotarget*, 2020. **11**(32): p. 3048-3060.
127. Yang, C., et al., *Metformin improves the sensitivity of ovarian cancer cells to chemotherapeutic agents*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(3): p. 2404-2411.
128. Han, Y., et al., *Metformin reverses PARP inhibitors-induced epithelial-mesenchymal transition and PD-L1 upregulation in triple-negative breast cancer*. *Am J Cancer Res*, 2019. **9**(4): p. 800-815.
129. Pasquier, E., et al., *Effective Management of Advanced Angiosarcoma by the Synergistic Combination of Propranolol and Vinblastine-based Metronomic Chemotherapy: A Bench to Bedside Study*. *EBioMedicine*, 2016. **6**: p. 87-95.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados presentados en esta tesis doctoral dieron origen a las siguientes publicaciones originales:

“Repositioning metformin and propranolol for colorectal and triple negative breast cancers treatment” LE Anselmino, MV Baglioni, Malizia F, N Cesatti Laluece, C Borini Etichetti, VL Martínez Marignac, V Rozados, OG Scharovsky, J Girardini, MJ Rico, M Menacho Márquez.

Scientific Reports. Springer Nature. En revisión (aa71e60f-e75e-4bd4-a066-1879f517cbf3)

“Repositioning of anti-parasitic drugs in cyclodextrin inclusion complexes for treatment of triple-negative breast cancer” Piotti J, Baglioni MV, García A, Rico MJ, Leonardi D, Lamas MC, Menacho Márquez M.

AAPS PharmSciTech. Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists. Springer. 2018 Nov;19(8):3734-3741. doi: 10.1208/s12249-018-1169-y. Epub 2018 Sep 25.

“Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models” MJ Rico, MV Baglioni, M Bondarenko, N Cesatti Laluece, VR Rozados, N André, M Carré, OG Scharovsky and M Menacho-Márquez.

Oncotarget. Impact Journals. 2017 Jan 10;8(2):2874-2889. doi: 10.18632/oncotarget.13760.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral dieron origen a las siguientes presentaciones en congresos Nacionales e Internacionales:

Baglioni MV, Reynoso GS, Anselmino LE, Cesatti Laluece N, Mainetti LE, Rozados VR, Scharovsky OG, Menacho Marquez MA, Rico MJ **“Novel therapeutic approaches with repositioned drugs for triple negative breast cancer treatment”** Reunión Anual de Sociedades de Biociencia, modalidad virtual. Mar del Plata, Argentina. Noviembre de 2020. *Medicina (B Aires) 80 - (Supl V): 120, 2020. ISSN: 1669-9106.*

MV Baglioni, LE Anselmino, N Cesatti Laluce, F Malizia, GF Chapo, LE Mainetti, V Rozados, OG Scharovsky, MJ Rico, M Menacho Márquez **“Drug repositioning for triple negative breast and colorectal cancers treatment: Exploring the use of metformin and propranolol”** [Abstract]. In: *Proceedings of the 111th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2020 June 22-24. Philadelphia (PA): AACR; 2020. Abstract n° 3943.*

M. Virginia Baglioni, Luciano Anselmino, Nahuel Laluce, Leandro Mainetti, Viviana R. Rozados, O. Graciela Scharovsky, Mauricio A. Menacho-Márquez, M. José Rico **“Metformin (M) and Propranolol (P) act on different steps of the metastatic cascade of a triple negative murine mammary adenocarcinoma”** Reunión Anual de Sociedades de Biociencia. Mar del Plata, Argentina. Noviembre de 2019. *Medicina (B Aires) 79 - (Supl IV): 196, 2019. ISSN: 1669-9106.*

M. Virginia Baglioni, Luciano Anselmino, Nahuel Cesatti Laluce, Leandro Mainetti, Viviana R. Rozados, O. Graciela Scharovsky, Mauricio Menacho Márquez, M. José Rico **“Effect of the combined treatment of metformin (Met) and propranolol (Prop) on different phases of tumor progression”** LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina. Noviembre de 2018. *Medicina (B Aires) 78 - (Supl III): 169, 2018. ISSN: 1669-9106.*

Baglioni, M. Virginia; Menacho Márquez Mauricio A; Reynoso Georgina; Rico M. José; Rozados Viviana; Scharovsky O. Graciela **“Nuevos enfoques terapéuticos con fármacos reposicionados para el tratamiento del cáncer de mama”** XXV JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES. ASOCIACIÓN DE UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDEO (AUGM). Universidad Nacional de Itapúa, Encarnación, Paraguay. Octubre de 2017. *Libro de las XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores, Tomo VI: 242-249, 2017. ISSB: 978-99967-884-0-6.*

Baglioni, M. Virginia; Cesatti Laluce, Nahuel; Oviedo, Angela P; Rozados, Viviana R; Scharovsky, O. Graciela; Rico, M. José; Menacho-Márquez, Mauricio **“Metformin and propranolol combination used for treatment of M-406 mammary tumor”** LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del

Plata, Argentina. Noviembre de 2016. *Medicina, Volumen 76 - (Supl. I): 204, 2016.*
ISSN: 1669-9106.