

Nuevo enfoque terapéutico experimental para el cáncer de mama combinando la administración de Metformina y Quimioterapia Metronómica con Ciclofosfamida

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Antonela Sofía Asad

El trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título
de:

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 16 de diciembre del 2014.

Nuevo enfoque terapéutico experimental para el cáncer de mama combinando la administración de Metformina y Quimioterapia Metronómica con Ciclofosfamida

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Antonela Sofía Asad

Directora:

Dra. O. Graciela Scharovsky

Co-Directora externa:

Dra. Viviana R. Rozados

Co-Directora interna:

Dra. Paola Ferrero

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 16 de diciembre del 2014.

*“No puede volver a dormir tranquilo,
aquel que una vez abrió los ojos”*

*Dedico este trabajo a todos
los soñadores del mundo,
por poder ver siempre
un poco más allá.*



AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi Directora Graciela, por su excelente predisposición, su enseñanza y las charlas eternas que compartimos.
- ❖ A mi Co-Directora Vivi, a Jose, a Eduardo, a Mauri, a los “jóvenes” del bioterio y a todo el Instituto de Genética Experimental, por todas las mañanas llenas de ratones, pipetas, café y algún que otro carbohidrato...
- ❖ A la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires y todos los docentes que me iniciaron en mi profesión.
- ❖ A Susana Pistorale, la mejor docente, coordinadora y consejera que pudimos haber tenido todos los alumnos... Una mujer luchadora.
- ❖ A mis compañeros de Genética, porque sin nuestras largas tardes de estudio (y las aún más largas noches de peña), mi carrera hubiese sido un camino desierto.
- ❖ A mi Equipo Pergaminense, mi segunda familia, por haberme rodeado de amor, diversión y compañerismo. Con ustedes aprendí a crecer como persona, me llevo los mejores recuerdos.
- ❖ A todos mis amigos de Rosario: los Juanos, las Olgas, los del Taburetazo y los de la vida. Para todos ustedes sobran las palabras, gracias por tanta amistad.
- ❖ A mis abuelos Helen y Sabre, mi tía abuela Delia, todos mis tíos y primos. A mi gran familia, la presente y la que me cuida desde más lejos.
- ❖ Por supuesto, a los grandes pilares de mi vida. Gracias Mamá, Papá, Gonzalo y Rocío. Gracias, gracias, gracias. Vamos a estar juntos por siempre.
- ❖ Y, por último, a mis Sueños. Porque nunca dejaron de inspirarme y motivarme para seguir persiguiéndolos... Día a día, se van haciendo realidad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Cáncer.....	1
Carcinogénesis.....	3
Proliferación.....	4
Apoptosis	6
Metástasis.....	8
Células madre del cáncer	10
Terapias contra el cáncer	11
Anti-angiogénesis.....	12
Quimioterapia metronómica	15
Ciclofosfamida	18
Metformina.....	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS.....	22
Generales	22
Específicos	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Drogas	24
Animales.....	24
Tumor.....	24
Modelo experimental: Efecto antitumoral	25
Modelo experimental: Efecto antimetastásico	25
Volumen tumoral y peso corporal.....	26
Número y tamaño de las metástasis	26
Glicemia	26
Recuento de glóbulos blancos.....	26
Necropsias y biopsias	27
Apoptosis	27
Capacidad proliferativa.....	27
Angiogénesis.....	27
Células madre del cáncer	27
Análisis estadísticos	28

RESULTADOS	29
Estudio del efecto antitumoral	29
<i>Volumen Tumoral</i>	29
<i>Tiempo de Duplicación del Volumen Tumoral</i>	30
<i>Supervivencia</i>	30
Estudio del efecto antimetastásico	31
<i>Número de Metástasis</i>	31
<i>Tamaño Metastásico</i>	32
<i>Volumen Metastásico</i>	32
Estudio de la toxicidad	33
<i>Peso Corporal</i>	34
<i>Glicemia</i>	34
<i>Recuento de Glóbulos Blancos</i>	35
<i>Otros síntomas de toxicidad</i>	36
Estudio de los mecanismos de acción	36
<i>Apoptosis</i>	36
<i>Capacidad Proliferativa</i>	37
<i>Angiogénesis</i>	38
<i>Células Madre del Cáncer</i>	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	62
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	80

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El término “cáncer” designa a un amplio grupo de enfermedades que comienzan cuando el ciclo celular se descontrola, debido a daños o alteraciones en el material genético de una célula, lo cual produce mutaciones que afectan el crecimiento y la división normales de las células, así como la muerte de las mismas (Puglisi F et al., 2002; Shen Z, 2011). En células normales, cuando el ADN se daña, la célula puede reparar el daño, o bien, morir. En cambio, en células cancerosas, el ADN dañado no se repara y la célula no muere como debería, sino que continúa originando nuevas células que tengan el mismo ADN dañado (Rass K & Reichrath J, 2008; Sperka T et al., 2012). De esta manera, nuevas células se siguen formando cuando el organismo no las necesita y otras viejas no mueren cuando deberían morir. Así, se forman masas de tejido denominadas tumores. Los tumores pueden ser benignos o malignos, y sólo estos últimos resultan ser cancerosos, ya que pueden invadir y destruir el tejido a su alrededor, entrar al torrente sanguíneo o al sistema linfático y diseminarse a otros órganos (Lyshchik et al., 2007; Bach AG et al., 2013). Mediante la diseminación desde el sitio primario, pueden formarse nuevos tumores en otros órganos por un proceso llamado metástasis (Wirtz D et al., 2011).

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células de la mama. Es una enfermedad que afecta a hombres y mujeres, siendo más frecuente en estas últimas. Casi todos los cánceres de mama son en realidad carcinomas, porque aparecen en las células epiteliales de los órganos. Un adenocarcinoma es un tipo de carcinoma que aparece en tejidos glandulares, como los conductos y lóbulos de la mama (Weigelt B & Reis-Filho JS, 2009; Rakha EA & Ellis IO, 2009; Matsen CB & Neumayer LA, 2013). Existen ciertos tipos de cáncer de mama llamados “triple-negativos”. Éstos se caracterizan por la ausencia de expresión del receptor de estrógeno (RE), del receptor de progesterona (RP) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Los tumores triple-

negativos frecuentemente se encuentran asociados al oncogén BRCA 1 (Dawson SJ et al., 2009; Jiao Q et al., 2014). Los pacientes con este tipo de tumores de mama, tienen la desventaja de no poder recibir terapias dirigidas a estos receptores, como por ejemplo terapias hormonales o basadas en Trastuzumab, un anticuerpo contra HER2. Por lo tanto, las únicas opciones que tienen como tratamiento son la cirugía y la quimioterapia de forma individual, o combinaciones de ambas, aunque existen estudios sobre nuevos blancos terapéuticos (K.B. Reddy, 2011).

Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 x 100.000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) para el año 2012. Esta estimación corresponde a más de 100.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. Con estos números, la IARC ha estimado para la Argentina una incidencia en ambos sexos de 217 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes, basándose en datos provenientes de Registros de Cáncer de Base Poblacional (RCBP) del país y otros que pertenecen a países de la región. En magnitud, el volumen más importante de casos estimados corresponde al cáncer de mama, con más de 18.700 casos nuevos por año (18% del total y 36% del total de casos en mujeres). El cáncer de mayor incidencia sería el de mama en mujeres, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres, seguido por los cánceres masculinos de próstata (44 x 100.000 hombres) y pulmón (32,5 x 100.000 hombres) (INC, 2014).

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son en la actualidad la principal causa de mortalidad mundial. En el año 2008, casi dos terceras partes de las defunciones que se dieron en el mundo se debieron a ENT, principalmente enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades pulmonares crónicas. El cáncer, como segunda causa de estas defunciones, fue responsable de 7,6 millones de muertes – más de las dos terceras partes de las cuales ocurrieron en países de ingresos bajos y medios. En el año

2012 murieron por cáncer casi 62.000 hombres y mujeres en Argentina. La región Centro, al ser la más poblada, registró más del 70% de estas defunciones. El cáncer de pulmón se observa en primer lugar de importancia en todas las regiones menos en Cuyo, en la que encontramos el cáncer de mama. Le siguen en orden de frecuencia el cáncer colorrectal y el de mama; excepto en NOA y Sur donde se observa en tercer lugar al cáncer de próstata y estómago, respectivamente. En mujeres, la mayor mortalidad por cáncer se debe al cáncer de mama con una Tasa de Mortalidad Estandarizada de 18,0 por cada 100.000 mujeres. El cáncer de pulmón y el colorrectal le siguen en segundo y tercer lugar de importancia. (INC, 2014).

El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres, tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Además, la incidencia del cáncer de mama está incrementándose en países en vías de desarrollo, debido a la mayor esperanza de vida, el aumento de urbanización y la forma de vida occidental. Según las estimaciones de la Organización Mundial de Salud del año 2013, en el 2011 fallecieron alrededor de 508.000 mujeres en el mundo por cáncer de mama. (WHO, 2014).

Carcinogénesis

El cáncer es causado por alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de micro ARNs. Las mutaciones en los oncogenes aumentan la síntesis de proteínas normales o mutadas que estimulan la proliferación celular, mientras que las mutaciones en los genes supresores de tumores resultan en la pérdida de proteínas que restringen la proliferación e inducen la apoptosis (Croce CM, 2008). Por otro lado, las mutaciones en los micro ARNs, alteran la regulación génica (Dvinge H et al., 2013; Kan CW et al., 2014). Si bien mutaciones en la línea germinal pueden predisponer a una persona al cáncer familiar o hereditario, generalmente las alteraciones son eventos somáticos. La evidencia indica que no sólo son las mutaciones las únicas causantes de la

expresión génica alterada en las células tumorales, sino que también existen alteraciones epigenéticas y modificaciones numéricas y estructurales de los cromosomas (López-Lázaro M, 2009).

Los cambios genéticos que causan el cáncer son principalmente acumulativos, es decir que el proceso involucra muchas alteraciones y en varios genes de las células tumorales (Croce CM, 2008). El hecho de que se necesiten varias mutaciones para que se desarrolle el cáncer, explica el largo período de latencia del mismo y su predominancia en personas de edades avanzadas (López-Lázaro M, 2009).

Frecuentemente, los tumores poseen clones genéticamente diferentes que surgen de la célula transformada original a través de alteraciones génicas secundarias y terciarias. Además de estos clones y subclones, las células tumorales progenitoras pueden estar constituidas por diferentes alteraciones genéticas o estados de diferenciación. Debido a esa heterogeneidad celular, existen diferencias en el comportamiento frente a las distintas terapias y, por eso, es de suma importancia el tratamiento temprano del cáncer (Lawrence MS et al., 2013; Burrell RA et al., 2013).

Proliferación

La regulación del crecimiento y la división celular ocurre de forma secuencial por la acumulación de complejos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK), y la eliminación de estas ciclinas de forma cíclica durante el transcurso del ciclo celular. Sin embargo, en los tumores, el ciclo celular está desregulado, generando falta de diferenciación y una proliferación celular aberrante. Estos presentan alteraciones oncogénicas en ciclinas, complejos ciclina-CDK, sus inhibidores (CDKI) y otros componentes de la vía del gen supresor tumoral *Rb* (retinoblastoma), del gen supresor de

tumores *p53* y de los factores de transcripción de la familia E2F, entre otros (Bonelli P et al., 2014).

Una de las principales características del cáncer es su capacidad de sostener una proliferación crónica. La producción y liberación de señales promotoras del crecimiento, no se encuentran reguladas como en los tejidos normales. Estas señales suelen ser mayormente factores de crecimiento, que se unen a receptores de superficie, frecuentemente del tipo tirosina quinasa, y así emiten señales intracelulares que regulan la progresión a través del ciclo celular, así como el crecimiento celular (Lo HW et al., 2006; Hanahan D & Weinberg RA, 2011).

Las células tumorales pueden sostener la señalización mitogénica de diferentes maneras. Una de ellas, es produciendo ellas mismas los ligandos de los receptores de factores de crecimiento y actuando por señalización autocrina. Otra, es mandando señales para estimular a las células normales del estroma asociado al tumor, para que éstas produzcan los factores de crecimiento. Alternativamente, pueden aumentarse los niveles de proteínas receptoras presentes en las células tumorales, o modificarse la estructura de los mismos para facilitar su unión con los ligandos. También puede lograrse una independencia de factores de crecimiento, generando una activación constitutiva de los componentes de las vías de señalización que operan corriente abajo de estos receptores. Otra de las opciones que tienen las células tumorales, es inhibir los mecanismos de retroalimentación negativos que regulan la señalización proliferativa. También, pueden evitar los programas que regulan negativamente la proliferación celular, de los cuales muchos dependen de genes supresores de tumores como los que expresan las proteínas RB y TP53 (Bianco R et al., 2006; Hanahan D & Weinberg RA, 2011; Hilton HN et al., 2014; Iqbal N & Iqbal N, 2014).

Apoptosis

Descrita por Kerr en 1972, la apoptosis es el mecanismo por el cual la célula es eliminada de forma regulada, lo cual tendría un rol complementario y opuesto al de la mitosis. Ésta puede ser iniciada o inhibida por una variedad de estímulos tanto fisiológicos como patológicos. La apoptosis es responsable de la eliminación de células durante el desarrollo embrionario y en el metabolismo de tejidos adultos. Ocurre espontáneamente en neoplasias malignas, así como también participa en la regresión terapéutica de las mismas. Además, está implicada en la involución fisiológica y atrofia de varios tejidos y órganos (Kerr JF et al., 1972).

La apoptosis se da en dos etapas principales. En la primera, ocurre una condensación nuclear y citoplasmática y una fragmentación bien preservada de la célula, donde cada parte queda unida a la membrana. En la segunda etapa, estos cuerpos apoptóticos se desprenden de las superficies epiteliales o son tomados por otras células, donde sufren una serie de cambios y son degradados rápidamente por enzimas lisosomales derivadas de las células que los ingieren (Kerr JF et al., 1972; Elmore S, 2007). Muchas veces, las células fagocíticas envuelven a las células apoptóticas antes de que se generen los cuerpos apoptóticos. Por esta razón, la apoptosis tardó en ser descubierta y los cuerpos apoptóticos suelen verse *in vitro* bajo condiciones especiales (Taylor RC et al., 2008; Wong RS, 2011).

La apoptosis es un programa dirigido genéticamente, el cual implica que la muerte celular, así como cualquier otro programa metabólico o de desarrollo, puede ser interrumpido por mutaciones. Por esta razón, la vía apoptótica está comprometida en muchas patologías, incluyendo el cáncer (Elmore S, 2007).

Con el clonado y caracterización del oncogén *bcl-2*, pudo establecerse la importancia de la apoptosis en el desarrollo de tumores. Este oncogén puede encontrarse en líneas

tumorales, linfomas, cáncer de mama y otros, y la sobreexpresión de Bcl-2 promueve la supervivencia de las células tumorales al bloquear su programa de muerte celular. Existen por lo menos 15 miembros proteicos que forman parte de esta familia. Bcl-x_L es otro supresor de la apoptosis en ciertos tipos de cánceres. Por otro lado, Bax es un promotor de la muerte celular que se encuentra inactivado en muchos procesos tumorales (Lowe SW & Lin AW, 2000).

P53 fue el primer gen supresor de tumores asociado a la apoptosis que se descubrió. Las mutaciones en este gen y los componentes de su vía (Mdm-2, ARF y Bax), ocurren en la mayoría de los tumores humanos y suelen encontrarse en etapas tumorales avanzadas. Las funciones de TP53 son el arresto del ciclo celular, el mantenimiento de la integridad del genoma luego de un daño en el ADN y la regulación de la supervivencia celular mediante la inducción de apoptosis (Lowe SW & Lin AW, 2000).

Existe una gran variedad de señales capaces de promover la apoptosis durante el desarrollo y la evolución tumoral. Sus principales activadores incluyen la depleción de factores de crecimiento y supervivencia, la hipoxia, la radiación y la pérdida de interacciones entre la célula y su matriz. También la promueven el daño en el ADN, ya sea causado por defectos en el control del ciclo celular o por toxinas exógenas, el funcionamiento incorrecto de los telómeros y las señales proliferativas inapropiadas producidas por mutaciones oncogénicas. Estas señales tienen como función atenuar las señales anti-apoptóticas (Brachat A et al., 2000; Koumenis C et al., 2001; Pustisek N & Situm M, 2011; Roos WP & Kaina B, 2013; Shu Q et al., 2014). Por otro lado, la inhibición de la apoptosis también contribuye al desarrollo de metástasis (Townson JL et al., 2003).

Actualmente, se sabe que los agentes anticancerígenos inducen apoptosis. La radiación y la quimioterapia pueden provocar muerte celular con las mismas características morfológicas y biológicas de la apoptosis. La interrupción de los programas apoptóticos es

responsable de una disminución en la sensibilidad al tratamiento, ya que puede producir resistencia a múltiples drogas. Sin embargo, hay evidencias que indican que los agentes anticancerígenos que inducen apoptosis, no sólo lo hacen en los tejidos tumorales sino también en los normales, por lo que se cree que este proceso también contribuiría a la toxicidad asociada a estos tratamientos (Searle J et al., 1975; Johnstone RW et al., 2002; Lopes F et al., 2014).

Metástasis

La metástasis tumoral es un proceso de múltiples etapas durante las cuales las células malignas se desprenden del tumor primario hacia órganos distantes. Estas etapas son las mismas para todo tipo de tumor. Para que se produzca la metástasis, es necesario desarrollar una red vascular, evadir la respuesta inmune del huésped y responder a factores órgano-específicos que promuevan su crecimiento. Una vez que esto sucede, las células pueden proceder a la invasión del estroma, penetrar los vasos sanguíneos e ingresar a la circulación para producir tumores secundarios (Talmadge JE & Fidler IJ, 2010).

Sólo algunas células del tumor primario tienen la capacidad de causar metástasis, debido a la eliminación de las células tumorales circulantes que fallan en completar todos los pasos del proceso metastásico. Este proceso es bastante ineficiente, dado que la mayoría de las células que invaden un órgano o tejido diferente del tumor primario suelen terminar en apoptosis o en estado de latencia, en lugar de desarrollar una metástasis clínicamente detectable (Wirtz D et al., 2011).

A medida que los carcinomas progresan a grados más elevados de malignidad, las células tumorales asociadas suelen desarrollar alteraciones en su forma y en su unión a otras células o a la matriz extracelular (MEC). Una de las alteraciones más características

es la pérdida de Cadherina-E, lo cual potencia la invasión y metástasis. Por otro lado, las moléculas de adhesión que están relacionadas con las migraciones celulares suelen verse reguladas positivamente, como es el caso de la Cadherina-N (Hanahan D & Weinberg RA, 2011).

Durante la cascada de invasión-metástasis, se dan una serie de cambios biológicos a nivel celular que comienzan con la invasión local, la intravasación de las células tumorales a los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de las células a través de los sistemas linfático y hematógeno, y siguen con la extravasación de las células tumorales desde el lumen vascular hacia el parénquima de tejidos distantes, la formación de pequeños nódulos de células tumorales (micrometástasis) y finalmente el crecimiento de los mismos hasta formar macrometástasis (colonización) (Klein CA, 2014).

Un programa regulatorio clave en el proceso de metástasis es la transición epitelio-mesénquima (EMT). Con esta transición, las células epiteliales transformadas adquieren las capacidades de invadir, resistir a la apoptosis y diseminarse. Este programa puede activarse de forma transitoria o estable por las células tumorales, e incluso en diferentes grados, mediante diferentes combinaciones de factores de transcripción pleiotrópicos como Snail, Slug y Twist (Hanahan D & Weinberg RA, 2011). La EMT involucra además de los factores de transcripción, factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, factores pro-angiogénicos y moléculas remodeladoras de la MEC. Los genes regulados positivamente durante la progresión tumoral y metástasis están asociados a procesos como la embriogénesis, la morfogénesis tisular y la sanación de heridas. En neoplasias, la EMT resulta en la pérdida de propiedades epiteliales como la adhesión célula-célula y la polaridad baso-apical, y la ganancia de propiedades mesenquimáticas tales como un aumento en la capacidad para migrar e invadir a través de las proteínas de la MEC. Además, la EMT sería responsable de la progresión del tumor benigno hacia la célula invasiva y metastásica (Lamouille S et al., 2014).

Células madre del cáncer

En 1867, Cohnheim escribió la “teoría embrionaria”. Según esta teoría, los tumores sólidos se forman a partir de rudimentos embrionarios que quedan sin utilizarse durante el origen y desarrollo del embrión, que comenzarían a reproducirse de forma intensiva (Cohnheim J, 1867). Más tarde, esta teoría se convirtió en la “hipótesis de las células madre del cáncer (CMC)”, postulada por Moore *et al* en 1973, que enuncia que el cáncer se desarrolla a partir de un subgrupo de células malignas que poseen características de célula madre, por lo que los tumores tienen células que pueden crecer indefinidamente (Moore MA et al., 1973). Las CMC expresan características tanto de células tumorales como de células madre, y tienen propiedades de auto-renovación, división asimétrica, resistencia a apoptosis, crecimiento independiente, tumorigenicidad y potencial metastásico. La teoría CMC sugiere que los tumores contienen una población de CMC que se dividen de forma asimétrica y dan origen a células progenitoras que se expanden rápidamente, las cuales eventualmente se diferencian y agotan su potencial proliferativo. Las células madre retienen su fenotipo original y competencia proliferativa, a la cual se refiere como capacidad de auto-renovación. Las poblaciones celulares enriquecidas en CMC tendrían un mayor potencial tumorigénico en comparación con la masa de células tumorales (Cho RW & Clarke MF, 2008). Cuando una CMC se divide, da origen a otra célula madre maligna y a una célula que va a aportar a la población celular tumoral un fenotipo diverso. Las células madre de diferentes tejidos divergen respecto a sus capacidades intrínsecas de auto-renovación y de diferenciación en tipos celulares particulares (Bjerkvig R et al., 2005). La capacidad ilimitada de auto-renovación de las CMC, es la causa principal de la recurrencia de los tumores, ya sean hematológicos o sólidos. (Ciurea ME et al., 2014).

A pesar de los grandes avances en las terapias para el cáncer, los tumores sólidos siguen presentando resistencia a los tratamientos. La población de CMC es muy importante en el

potencial maligno de los tumores y en la respuesta de los mismos a las terapias. Las terapias dirigidas a la masa tumoral producen una regresión parcial del tumor, pero ésta suele ser seguida por la aparición de nuevos clones tumorales que se desarrollan a partir de la población existente de CMC, que es resistente a la mayoría de las terapias convencionales. Por esta razón, las terapias dirigidas a las CMC serían las mejores alternativas y presentan un gran desafío para la investigación actual (Ciurea ME et al., 2014).

Terapias contra el cáncer

Actualmente, existen múltiples terapias contra el cáncer que se aplican solas o combinando sus efectos para aumentar el potencial de acción. Los tratamientos principales son la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, y la denominada bioterapia que incluiría la terapia dirigida a blancos moleculares y la inmunoterapia (Lissoni P et al., 2009; Yagata H et al., 2011; Kumar M et al., 2012; Vanneman M & Dranoff G, 2012).

El presente trabajo está basado en la utilización de la quimioterapia y, dentro de ella, un tipo especial de quimioterapia, como tratamiento antitumoral. La quimioterapia consiste en el uso de medicinas o drogas para tratar el cáncer. Mientras que la cirugía y la radiación atacan a las células tumorales en un área determinada, la quimioterapia puede actuar en todo el organismo. De esta manera, mata células tumorales que se han diseminado a zonas distantes del tumor primario. Las drogas pueden utilizarse de forma individual pero, generalmente, se aplican en combinación con otras, para que puedan actuar juntas de forma sinérgica y para intentar reducir las posibilidades de que el cáncer se vuelva resistente al tratamiento. La quimioterapia es útil para curar el cáncer, evitar su diseminación, retardar su crecimiento e, incluso, aliviar los síntomas de la enfermedad. Muchas veces se usa en combinación con cirugía o con radiación (Mohan A & Ponnusankar S, 2013). A pesar de las ventajas de la quimioterapia, ésta presenta un

grave problema: la toxicidad. Estas terapias ejercen una acción citotóxica, matando a las células que crecen rápidamente. Sin embargo, al ser drogas sistémicas, pueden también matar otras células sanas que crecen rápido, como las células progenitoras de los glóbulos blancos de la médula ósea, los folículos capilares y células del sistema digestivo y del aparato reproductivo (Sánchez-Suárez P et al., 2008). Algunas drogas pueden también dañar células cardíacas, riñones, pulmones o al sistema nervioso. Muchas veces se administran otros medicamentos para proteger a las células normales del efecto tóxico de las drogas quimioterapéuticas. Los efectos secundarios más comunes son náuseas y vómitos; pérdida de cabello; cambios en la médula ósea y, consecuentemente, en glóbulos rojos, blancos y plaquetas, que llevan a la inmunodepresión; cambios en boca y piel; cambios en la vida sexual y reproductiva; cambios en la memoria y cambios emocionales; e inclusive pueden originar nuevas neoplasias (Ganz PA & Greendale GA, 2001; Xue H et al., 2011; Billan S et al., 2013; Bascones-Martínez A et al., 2013; Shimada T et al., 2014). Por supuesto, no todas las personas sufren cada uno de los efectos secundarios y además existen distintos niveles de gravedad o de duración de los mismos, pero esto no deja de ser un problema mayor.

Anti-angiogénesis

Judah Folkman propuso, por primera vez, la anti-angiogénesis como terapia para el cáncer. En 1971, publicó un artículo donde indicaba la importancia de la angiogénesis en la formación tumoral y cómo esta misma podría ser utilizada para frenar su crecimiento. El crecimiento de tumores sólidos siempre está acompañado por neovascularización. Folkman sugirió que la inhibición de la formación de nuevos vasos podría evitar la aparición de metástasis y favorecer el ataque inmunológico (Folkman J, 1971).

La angiogénesis es un proceso de regulación compleja, mediante el cual se forman nuevos vasos a partir de los ya existentes. En mamíferos adultos, la angiogénesis fisiológica se ve limitada a ovarios, útero y placenta, siendo la tasa de angiogénesis muy baja para el resto de los tejidos. Está incrementada durante la reparación de heridas y, principalmente, durante enfermedades neoplásicas. Las células tumorales suelen proliferar de forma desregulada. Durante el crecimiento tumoral, van aumentando las necesidades de oxígeno y nutrientes, y se acumulan mayores cantidades de desperdicios metabólicos. Por esta razón, las células neoplásicas comienzan a sobreexpresar factores pro-angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF) (Sakurai T & Kudo M, 2011). Asimismo, durante la progresión tumoral está estimulado el proceso de linfangiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos linfáticos a partir de otros ya existentes. A través de las circulaciones sanguíneas y linfáticas, las células malignas pueden diseminarse para formar los tumores secundarios o metástasis, las cuales, a su vez, son dependientes del proceso de angiogénesis (Carmeliet P & Jain RK, 2000).

El control de la angiogénesis tumoral es un punto clave en el tratamiento del paciente. Es muy común en el ambiente tumoral, la pérdida de los inhibidores angiogénicos endógenos como la endostatina y la trombospondina-1, lo cual acelera el crecimiento tumoral. (Tabruyn SP & Griffioen AW, 2007; Sharma BK et al., 2013). Contrariamente, la sobreexpresión de estos inhibidores angiogénicos lleva a los tumores a un estado de latencia prolongada. Actualmente, existen muchas drogas anti-angiogénicas aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration* de EEUU) (Fakhrehani E & Toi M, 2014). Uno de los principales ejemplos es Bevacizumab, un anticuerpo anti-VEGF. Esta droga se administra en combinación con quimioterapia y aumenta significativamente la supervivencia promedio de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico, cáncer de

pulmón y cáncer cervical, entre otros. Sin embargo, los beneficios de la mayoría de las drogas anti-angiogénicas siguen siendo pobres, por lo que se investiga cómo potenciar sus efectos en combinación con otras terapias (Ma J & Waxman DJ, 2008; Welti J et al., 2013).

Las drogas anti-angiogénicas tienen un efecto positivo sobre la quimioterapia, por lo que su administración conjunta puede potenciar el efecto antitumoral de las siguientes tres maneras. En primer lugar, las drogas anti-angiogénicas normalizan la vasculatura tumoral, que suele ser desorganizada y con deformidades estructurales y, por lo tanto, dificulta la entrada de drogas para el cáncer. En segundo lugar, la anti-angiogénesis inhibe la rápida repoblación de células tumorales después de la quimioterapia citotóxica. Generalmente, si bien las quimioterapias convencionales en principio atacan y reducen al tumor, en los períodos de recuperación del paciente de la toxicidad ocasionada, suele darse un crecimiento acelerado del mismo. Por esta razón, se han propuesto estrategias terapéuticas como regímenes de quimioterapia administrada en mayor frecuencia junto con agentes que aceleren la recuperación del paciente, o la exposición del tumor a drogas anti-angiogénicas durante los períodos de descanso. Por último, las drogas anti-angiogénicas aumentan los efectos antivascuales de las quimioterapias. Existen muchas drogas contra el cáncer que tienen actividades anti-angiogénicas. Éstas pueden deberse, por un lado, a la destrucción del subgrupo de células endoteliales en proliferación durante la neovascularización. Por otro lado, la quimioterapia también actúa de forma sistémica en la vasculatura, atacando a las células circulantes derivadas de la médula ósea que contribuyen a la angiogénesis, como las células progenitoras endoteliales (CPE). Sin embargo, si bien la quimioterapia convencional causa una disminución de las CPE, éstas resurgen generalmente en los períodos de descanso, momento en el que podrían administrarse drogas anti-angiogénicas. Dentro del tercer mecanismo de acción mencionado, se destaca una forma alternativa de quimioterapia que tiene efectos anti-

angiogénicos acentuados. Ésta consiste en la administración regular y en largos plazos de dosis bajas de drogas quimioterapéuticas, exentas de toxicidad y sin períodos prolongados de descanso. Su actividad anti-angiogénica involucra el ataque directo a las células endoteliales de la neovasculatura del tumor y la supresión de las CPE circulantes. Puede ser acompañada por drogas anti-angiogénicas para potenciar los efectos antitumorales. Este tratamiento se denomina Quimioterapia Metronómica (Kerbel RS, 2006; Quintieri L et al, 2014).

Quimioterapia Metronómica

En el tratamiento quimioterapéutico estándar, el paciente es tratado con la “máxima dosis tolerada” (MDT), lo que trae aparejado la necesidad de establecer períodos de descanso entre los ciclos de terapia, para que el mismo pueda recuperarse de la toxicidad inherente al tratamiento. Durante estos períodos, se favorece la repoblación tumoral y el crecimiento de clones seleccionados resistentes a la quimioterapia MDT que anularán el efecto terapéutico obtenido en los primeros ciclos. Para evitar las desventajas de estos tratamientos, se propuso un nuevo esquema de administración de drogas denominado por Hanahan, en el año 2000, como “Quimioterapia Metronómica” (QTM). Esta modalidad de tratamiento va en contra del paradigma convencional: “Cuanto más alta la dosis, mejor”, que tiene muchos efectos negativos sobre el paciente (Hanahan D et al., 2000; Scharovsky OG et al., 2009).

La QTM hace referencia a la administración crónica y a intervalos regulares de dosis bajas de una o varias drogas quimioterapéuticas, sin períodos de descanso prolongados. Sus principales características son, además de su eficacia antitumoral, que presenta escasa o nula toxicidad y que tiene como blanco celular principal a las células endoteliales tumorales. Fue clave para este cambio de paradigma en la quimioterapia para el cáncer lo planteado por Fidler y Ellis, quienes en el año 2000 sugirieron que: “El cáncer es una

enfermedad crónica y debería ser tratada como otras enfermedades crónicas” (Fidler IJ & Ellis LM, 2000; Scharovsky OG et al., 2009).

Aunque el mecanismo de acción principal y más estudiado de la QTM es su acción anti-angiogénica, actualmente se conocen otros mecanismos de acción. Esta modalidad de tratamiento puede matar células del cáncer resistentes o detener el crecimiento celular por diferentes medios, como la inhibición de la angiogénesis por diferentes vías, la inmuno-modulación y el ataque a las células tumorales (André N et al., 2012; Montagna E et al., 2014).

Los procesos que contribuyen a la angiogénesis en los tumores sólidos involucran varios elementos clave, como por ejemplo: factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores; inhibidores endógenos de la angiogénesis tales como trombospondina-1 (TSP-1) o angiostatina; pericitos de los vasos sanguíneos, que señalizan a través del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y sus receptores; células endoteliales y sus subgrupos circulantes (células endoteliales circulantes y células endoteliales progenitoras); integrinas que participan en adhesión y migración celular durante la angiogénesis; y células tumorales con receptores para ligandos como VEGF, PDGF, factor de células madre (SCF) y otros (André N et al., 2012; Maiti R, 2014). Como la QTM ataca a las células endoteliales tumorales, puede destruir tanto las células malignas sensibles como las resistentes a fármacos, mediante la destrucción de los vasos existentes y la inhibición de la neo-angiogénesis, lo que genera hipoxia y privación de nutrientes (Kerbel RS & Kamen BA, 2004). En el año 2000, Browder y su grupo desarrollaron un esquema alternativo para la administración de Ciclofosfamida (Cy) utilizando dosis menores a la MDT, a intervalos más cortos y sin períodos prolongados de descanso. Este tratamiento demostró ser anti-angiogénico y pudo erradicar el carcinoma de pulmón de Lewis y la leucemia L1210, enfermedades que no podían ser tratadas eficazmente con los esquemas convencionales. Además, la QTM con Cy también pudo

suprimir el crecimiento tumoral de líneas de cáncer de pulmón de Lewis y cáncer de mama EMT-6 murinas que eran resistentes a Cy administrada de forma convencional. Browder también combinó esta quimioterapia con otros inhibidores de la angiogénesis, obteniendo resultados aún más prometedores. Con sus experimentos, pudo demostrar que este nuevo esquema podía incrementar la apoptosis de células endoteliales tumorales controlando el crecimiento tumoral, incluso cuando el tumor era resistente a fármacos, y minimizando la toxicidad (Browder T et al., 2000).

Como parte de la toxicidad de las quimioterapias de MDT, suelen presentarse efectos dañinos para el sistema inmune como neutropenia y linfopenia. El efecto citotóxico de las quimioterapias mata a las células en división, ya sean tumorales o del sistema inmune. Esto puede favorecer la aparición de infecciones e incluso tumores secundarios. Sorprendentemente, algunos agentes anticancerígenos pueden tener efectos inmunomoduladores cuando se los administra de diferente modo. De esta manera, pueden erradicarse células malignas que hayan escapado al efecto de la quimioterapia o pueden mantenerse micrometástasis en estado de latencia. (André N et al., 2012). La QTM, además de funcionar mediante anti-angiogénesis, también ha demostrado incrementar la respuesta inmune. Si bien faltan estudios para terminar de entender los mecanismos de acción, ya son varios los avances en el conocimiento de estos campos. Bassini *et al* estudiaron el impacto del régimen metronómico de Temozolomida (TMZ) en un modelo de glioma de rata, descubriendo que éste era capaz de disminuir la relación linfocitos Treg (T reguladores)/Linfocitos CD4⁺ dentro del tumor y además suprimir la función de las Treg remanentes (Banissi C et al., 2009). Ghiringhelli y su grupo pudieron demostrar que también la administración de Cy metronómica podía disminuir la función de las Treg en carcinoma de colon de ratón y reducir las células Treg circulantes en pacientes con cáncer avanzado, además de restaurar la función de las células T y NK (Ghiringhelli F et al., 2004; Ghiringhelli F et al., 2007). Tanaka y su equipo también

podieron marcar la mejora en la respuesta inmune antitumoral *in vivo* mediante inyecciones de vinblastina en dosis bajas, lo cual activaba la maduración de células dendríticas intra-tumorales (Tanaka H et al., 2009). Rozados y colaboradores también demostraron la participación del sistema inmune en el efecto de QTM con Cy en un modelo de linfoma (Rozados VR et al., 2010).

El reposicionamiento de drogas consiste en utilizar drogas conocidas para nuevas indicaciones. En el caso de la QTM, el reposicionamiento trata de usar fármacos conocidos utilizados para diferentes indicaciones, de los cuales se ha encontrado que pueden ser utilizados como agentes antitumorales para la terapia contra el cáncer. Esto implica muchas ventajas ya que se conocen las vías de acción de la droga y sus efectos secundarios, su farmacodinamia y, a la vez, permite abaratar el costo de los tratamientos. Muchas drogas están siendo estudiadas con estos propósitos, como por ejemplo Celecoxib, Propranolol y Metformina (Grösch S et al., 2006; Schönthal AH, 2007; Mainetti LE et al., 2011; Del Barco S et al., 2011; Pasquier E et al., 2011; Kourelis TV & Siegel RD, 2012).

Ciclofosfamida

La Ciclofosfamida (Cy) es un agente alquilante utilizado como quimioterapia para diferentes tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes. Ejerce su acción citotóxica matando principalmente células en proliferación. El efecto de esta droga sobre la respuesta inmune antitumoral depende altamente de la dosis y el esquema de administración. Cuando se la administra en dosis altas ataca a las células tumorales, reduciendo la masa tumoral, pero también ataca a las células normales del organismo que se encuentran en división, como pueden ser las células del sistema inmune. Esto causa inmunosupresión, favoreciendo infecciones oportunistas e incluso segundas neoplasias. Sin embargo, la administración de dosis bajas de Cy logra potenciar la respuesta inmune

del organismo, lo cual es también útil para la eliminación del tumor (Scharovsky OG et al., 2011).

El efecto inmunomodulador de Cy ha sido ampliamente estudiado. En 1982, North concluyó que la inmunoterapia adaptativa facilitada por Cy favorecía la eliminación de tumores por medio de la eliminación de las células T supresoras. Descubrió que la transfusión de células inmunes del bazo no tenía efecto en el crecimiento tumoral si no era en conjunto con Cy, y que la droga sola generaba únicamente una detención temporaria en la progresión tumoral. Cuando se combinaba la transfusión de células inmunes y el tratamiento con dosis bajas de Cy, se daba la regresión completa y permanente de los tumores, independientemente de cuál fuera su tamaño (North RJ, 1982). Estudios posteriores de otros grupos de investigación se enfocaron en dilucidar las vías por las que Cy ejercía su efecto inmune. Pudo verse no sólo una reducción de las células T reguladoras $CD4^+CD25^+$, sino también un aumento de la expresión de citoquinas y de la proliferación y activación intratumoral de células B y T $CD4^+$ y $CD8^+$ (Ghiringhelli F et al., 2004; Bracci L et al., 2007; Van der Most RG et al., 2009; Rico MJ et al., 2012; Takeuchi A et al., 2012; Guo Q et al., 2012).

Muchos trabajos científicos mostraron la actividad antitumoral de Cy. En el Instituto de Genética Experimental (IGE) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) se estudió el efecto de la QTM con Cy en linfoma y sarcoma de rata. No sólo se erradicaron completamente los tumores establecidos sin toxicidad alguna, sino que también se evitó el inicio de metástasis y la recurrencia del cáncer en los sitios primarios (Rozados VR et al., 2004). Como una característica de la QTM es que puede utilizar más de una droga para conseguir mejores resultados, también existen muchos trabajos donde se prueba el funcionamiento de Cy en combinación con otros agentes antitumorales. En el IGE se estudió el efecto de la QTM con Cy administrada en combinación con Celecoxib en modelos de adenocarcinomas mamarios murinos. Se

obtuvo la inhibición del crecimiento tumoral, la disminución de metástasis pulmonares y el aumento en el tiempo medio de supervivencia, con muy baja toxicidad. Además, el tratamiento combinado demostró ser más efectivo que cada monoterapia (Mainetti LE et al., 2011). Resultados similares se obtuvieron al combinar Cy con Doxorrubicina (Mainetti LE et al., 2013).

Metformina

La Metformina (N',N'-dimetilbiguanida; Met) es uno de los agentes hipoglicémicos orales más prescritos. Suele usarse para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 pero, en la actualidad, tiene muchas otras indicaciones, como por ejemplo el síndrome de ovario poliquístico, la hiperglicemia y el síndrome metabólico. Actualmente, a Met se le está atribuyendo un efecto antitumoral aparentemente independiente de sus efectos hipoglicémicos, por medio de la supresión de procesos transformadores e hiperproliferativos que dan inicio a la carcinogénesis. Existen varios mecanismos que se creen relacionados con su efecto anticarcinogénico, entre ellos: activación de la vía LKB1/AMPK; inhibición de la lipogénesis; inducción del arresto del ciclo celular y/o apoptosis; supresión de la actividad de mTOR (*mammalian target of rapamycin*); inhibición de síntesis proteica; inhibición de actividad y expresión de HER2; reducción de los niveles circulantes de insulina; inhibición de la respuesta a proteínas desplegadas; activación del sistema inmune; eliminación de las células madre del cáncer (CMC) y represión transcripcional de la transición epitelio-mesénquima (EMT). Una ventaja de Met es que no es tóxica y puede ser muy útil para potenciar los efectos de otras drogas. Además, dado que Met tendría efecto sobre una subpoblación de células madre como las CMC, es razonable pensar que los subtipos de cáncer de mama más agresivos, enriquecidos con células del tipo CMC, tales como los tumores triple negativos (Receptores de Estrógeno

(RE), Receptores de Progesterona (RP) y HER2/neu), pueden ser más sensibles a la acción de Met (Del Barco S et al., 2011; Kourelis TV & Siegel RD, 2012).

Existen muchos estudios que encontraron una disminución en la incidencia del cáncer y en la mortalidad ocasionada por esta enfermedad en pacientes que recibían Met. En el año 2006, Bowker y colaboradores exploraron la asociación entre terapias antidiabéticas y la mortalidad por cáncer, en pacientes con diabetes de tipo 2. Pudieron ver que los pacientes con diabetes de tipo 2 expuestos a sulfonilureas e insulina exógena tuvieron un riesgo significativamente mayor de mortalidad por cáncer, en comparación con los pacientes tratados con Met (Bowker SL et al., 2006). Más adelante, Currie y su equipo examinaron el riesgo de desarrollar tumores sólidos en pacientes de diabetes de tipo 2, en relación con el tratamiento con agentes orales, insulina humana y análogos de la insulina. Concluyeron que aquellos pacientes que recibían insulina o sus secretagogos tenían más probabilidades de desarrollar tumores sólidos que los que recibían Met. A su vez, la combinación de las terapias con Met eliminaba casi por completo el riesgo de contraer la enfermedad (Currie CJ et al., 2009). De la misma manera, tanto en un meta-análisis de Decensi como en un análisis prospectivo de Landman en el estudio ZODIAC-16, se pudo ver la disminución en la incidencia del cáncer y en la mortalidad por la enfermedad, respectivamente, cuando los pacientes tomaban Met. De hecho, en el meta-análisis del primer grupo pudo encontrarse una relación dependiente de dosis (Decensi A et al., 2010; Landman GW et al., 2010). Finalmente, también hay numerosos estudios que demuestran una relación entre el consumo de Met y la quimioprevención del cáncer de mama, encontrándose en algunos de ellos que la disminución del riesgo de contraer cáncer de mama se da cuando el consumo de Met es a largo plazo (Jiralerspong S et al., 2009; Bodmer M et al., 2010; Bosco JL et al., 2011).

HIPÓTESIS

Si a la quimioterapia metronómica con Ciclofosfamida se le suma un tratamiento de buena tolerabilidad y escasa toxicidad que inhiba, disminuya o elimine las células madre del cáncer, células poco sensibles a la quimioterapia habitual y que son la fuente de la repoblación celular del tumor, podrá encontrarse un método más eficiente que frene el crecimiento o elimine el tumor, acompañado, a su vez, por una buena calidad de vida debido a la escasa toxicidad.

OBJETIVOS

Generales

Analizar, en un modelo de adenocarcinoma de mama experimental, el efecto antitumoral y antimetastásico ejercido por una terapia combinada que utiliza Metformina, una droga hipoglucemiante, de muy buena tolerabilidad, uno de cuyos variados efectos sobre las células tumorales es la eliminación de las células madre del cáncer, y quimioterapia metronómica con Ciclofosfamida, una modalidad terapéutica con demostrado efecto anti-angiogénico e inmunomodulador. Simultáneamente, analizar los mecanismos responsables del efecto observado.

Específicos

- Evaluar el efecto antitumoral y antimetastásico del tratamiento combinado con Metformina y quimioterapia metronómica con Ciclofosfamida y la toxicidad de la terapia a través del seguimiento del peso corporal, la glicemia y el recuento de glóbulos blancos.
- Analizar el efecto de los tratamientos sobre la supervivencia de los animales.
- Cuantificar en los tumores tratados, el grado de apoptosis y de proliferación celular.
- Determinar la densidad de vasos sanguíneos intratumorales.

- Evaluar la cantidad de células madre del cáncer

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas

- Ciclofosfamida (Cy): (Filaxis SA, Argentina) se disolvió en agua destilada en una concentración de 20 mg/ml (concentración stock).
- Metformina (Met): (Laboratorio Montpellier) El clorhidrato de metformina se solubilizó en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se conservó a -20°C.

Animales

Se utilizaron ratones hembra adultos de la línea endocriada CBI del bioterio del Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R. Fueron provistos de alimento comercial y agua *ad libitum* y se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. 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).

Tumor

Adenocarcinoma de mama M-406: es un adenocarcinoma semidiferenciado de tipo B (Squartini F & Pingitore R, 1994), triple negativo, de origen espontáneo que surgió en un ratón de la línea CBI. Es mantenido *in vivo* por pasajes i.p. en ratones singeneicos. Esta neoplasia epitelial es predominantemente sólida y está constituida por células atípicas semidiferenciadas con moderado grado de atipia citológica y bajo índice mitótico. En la periferia, el patrón estructural es en su mayor parte acinar y se observan amplios quistes o “lagos” de contenido hemorrágico.

Modelo experimental: Efecto antitumoral

En el día 0, los ratones CBI fueron inoculados con el adenocarcinoma M-406, con trocar por vía s.c. en el flanco derecho. Cuando el tumor alcanzó un volumen de 70-150 mm³, los animales se distribuyeron en distintos grupos experimentales.

- Grupo I: Testigo, sin tratamiento ulterior.
- Grupo II: Tratado con Cy en el agua de bebida (dosis estimada de 20-30 mg/kg de peso corporal por día).
- Grupo III: Tratado con Met por administración oro-gástrica, tres veces/semana (100 mg/kg de peso corporal).
- Grupo IV: Tratado como Grupos II + III.

Todos los animales fueron sacrificados por sobreexposición a CO₂ el mismo día en que el primer animal del grupo testigo alcanzó el máximo volumen tumoral éticamente permitido.

Se realizó la extirpación de los tumores y se los fijó en solución de Bouin, para las siguientes evaluaciones. Al inicio y al final de tratamiento se extrajeron muestras de sangre para determinar la glicemia y para realizar el recuento de glóbulos blancos.

Con el objeto de estudiar la supervivencia derivada de los diferentes tratamientos, posteriormente, se realizó un experimento idéntico al anterior, con la diferencia que se sacrificó a los animales uno por uno, por sobreexposición a CO₂, a medida que cada uno de ellos alcanzó el máximo volumen tumoral éticamente permitido.

Modelo experimental: Efecto antimetastásico

Para estudiar la actividad antimetastásica se realizó un ensayo de metástasis experimentales: en el día 0, los ratones CBI fueron inoculados con 2×10^5 células M-406 en una vena de la cola y en el día 3 se distribuyeron en 4 grupos experimentales que recibieron el mismo tratamiento descrito más arriba.

Todos los animales fueron sacrificados por sobreexposición a CO₂ el día en que el primer animal mostró signos o síntomas de enfermedad metastásica (estado general, respiración, posición corporal, etc.). Se realizó la extirpación de los pulmones, se pesaron y se fijaron en solución de Bouin. Luego, se contó el número de nódulos metastásicos, se midió su diámetro y, finalmente, se calculó el volumen metastásico total.

Volumen tumoral y peso corporal

Se determinó dos veces por semana el peso de los ratones y el volumen tumoral. Se midió con calibre los diámetros mayor (a) y menor (b) del tumor y se estimó el volumen tumoral con la fórmula $(a \times b^2) \times 0,4$.

Número y tamaño de las metástasis

En los pulmones fijados en solución de Bouin, se contaron y midieron las metástasis de cada pulmón. A las mismas se las clasificó en grupos de acuerdo a su diámetro (0-1 mm; 1-2 mm; >2 mm; >>2 mm). Luego, se calculó el volumen metastásico por ratón y por grupo.

Glicemia

Se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola al comienzo y al final del tratamiento para determinar la glicemia con las tiras reactivas Accu-Chek®.

Recuento de glóbulos blancos

Se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola al comienzo y al final del tratamiento para realizar el recuento de glóbulos blancos en Cámara de Neubauer.

Necropsias y biopsias

Cada animal sacrificado del estudio del efecto antitumoral fue sometido a una necropsia; se extirparon el tumor y diferentes órganos, para evaluar la aparición de metástasis espontáneas. Parte de los tejidos fueron fijados en solución de Bouin e incluidos en parafina, y cortes de 5 micras de espesor fueron sometidos a tinciones con Hematoxilina-Eosina e inmunohistoquímicas.

Apoptosis

Se evaluó en cortes de tejido tumoral por tinción con Hematoxilina-Eosina, contando el número de cuerpos apoptóticos. Se realizó el conteo en 50 campos por corte de tejido tumoral, con un aumento de 1000X.

Capacidad proliferativa

Se evaluó por tinción con Hematoxilina-Eosina, contando el número de células en mitosis del tejido tumoral, para luego calcular el índice mitótico. Se realizó el conteo en 10 campos por corte de tejido tumoral, con un aumento de 400X.

Angiogénesis

Se evaluó la densidad de vasos sanguíneos por tinción con Hematoxilina-Eosina. Se calculó la superficie de los vasos utilizando el software ImageJ, en 20 campos por corte de tejido tumoral, con un aumento de 400X.

Células madre del cáncer

Las células madre del cáncer (CMC) del cáncer de mama expresan un fenotipo de marcadores de superficie CD44⁺/CD24^{low}. Se analizaron, por citometría de flujo, muestras de sangre y tumor en suspensión de ratones CBI pertenecientes al grupo I y al grupo IV,

marcándose las CMC con anticuerpos BD Pharmingen™ para CD44 y CD24 unidos a los fluorocromos FITC y PE, respectivamente. Se tiñeron 500.000 células de cada muestra, en una dilución 1:200. Como control positivo de CD44 y CD24 se utilizó tejido de bazo.

Análisis estadísticos

La comparación estadística de los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales se realizó utilizando tests paramétricos y no paramétricos de acuerdo a la variable a analizar. Se consideró que las diferencias son significativas a partir de un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Estudio del efecto antitumoral

Volumen Tumoral

La evolución del volumen tumoral en los diferentes grupos se encuentra graficada en la Figura 1. El análisis del volumen tumoral en el día 36 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($P=0,1033$; ANOVA). Aun así, el volumen tumoral de los animales del grupo IV fue menor que el de los grupos restantes. Por otro lado, en el día 46, cuando sólo quedaban en tratamiento animales de los grupos II y IV debido a que los restantes ya habían alcanzado el máximo volumen tumoral éticamente permitido, el grupo IV presentó un volumen tumoral menor que el del grupo II, siendo la diferencia marginalmente significativa ($P=0,0671$; Test t de Student).

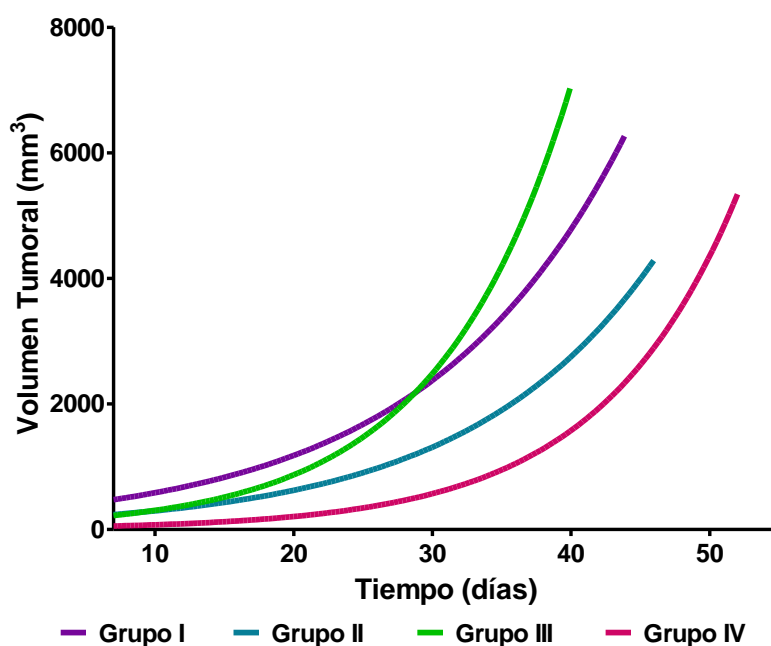


Figura 1: Evolución del Volumen Tumoral, curva con ajuste de crecimiento exponencial [Día 36: mm^3 , media \pm EE; I: 2880 ± 1530 ; II: $2897\pm976,9$; III: $3772\pm67,8$; IV: $929,7\pm213,8$; $P=0,1033$ (ANOVA). Día 46: mm^3 , media \pm EE; II: $3994\pm239,6$; IV: $2950\pm341,1$; $P=0,0671$ (Test t de Student)].

Tiempo de Duplicación del Volumen Tumoral

El crecimiento tumoral del adenocarcinoma de mama M-406 se ajustó, para los animales de todos los grupos, a una curva de crecimiento exponencial, y se calculó el tiempo de duplicación tumoral (T_{DUP}), variable inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento del tumor. El T_{DUP} difirió entre los cuatro grupos de animales ($P=0,0049$; ANOVA). Los grupos II y IV fueron los que presentaron valores más altos, es decir que tuvieron el crecimiento tumoral más lento. El T_{DUP} del grupo III fue significativamente menor que el de los grupos II y IV ($P<0,05$; Test de Tukey) (Figura 2).

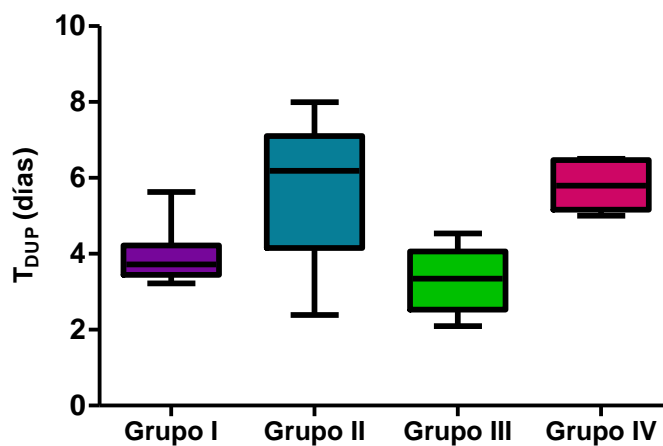


Figura 2: Tiempo de Duplicación Tumoral [días, mediana (rango); I: 3,7 (3,2-5,6); II: 6,2 (2,4-8); III: 3,3 (2-4,5); IV: 5,8 (5-6,5); $P=0,0063$ (ANOVA). III vs II, $P<0,05$ (Test de Tukey). III vs IV, $P<0,05$ (Test de Tukey)].

Supervivencia

Las diferencias observadas en la velocidad de crecimiento tumoral se vieron reflejadas en el tiempo de supervivencia de los animales ($P=0,0063$; Test de Mantel-Cox), como puede verse en la Figura 3. El grupo IV presentó la mayor supervivencia, difiriendo significativamente de los grupos I ($P=0,0011$), II ($P=0,0085$) y III ($P=0,0011$; Test de Mantel-Cox).

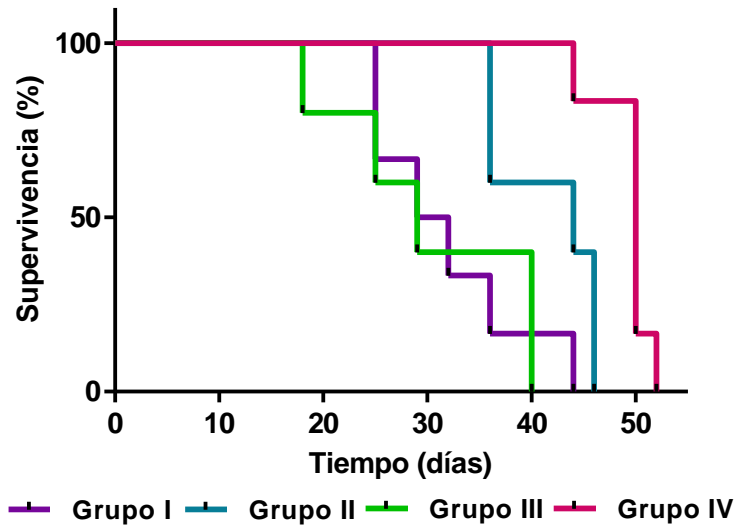


Figura 3: Supervivencia [días, mediana (rango); I: 30,5 (25-44); II: 44 (36-46); III: 29 (25-40); IV: 50 (44-52); P=0,0063 (Test de Mantel-Cox). IV vs I, P=0,0011; vs II, P=0,0085; vs III, P=0,0011 (Test de Mantel-Cox)].

Estudio del efecto antimetastásico

Número de Metástasis

El Grupo IV fue el que presentó el menor número de nódulos metastásicos pulmonares, aunque las diferencias entre grupos no fueron significativas (P= 0,3799; Test de Kruskal-Wallis) (Figura 4).

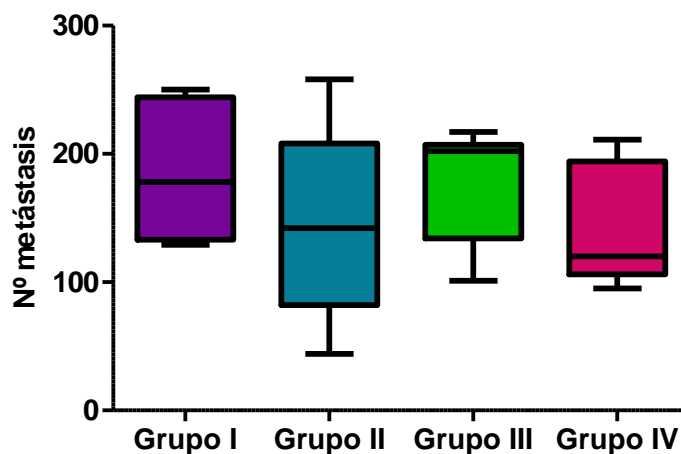


Figura 4: Número de Metástasis [nº, mediana (rango); I: 178 (129-250); II: 142 (44-258); III: 202 (101-217); IV: 120 (95-211); P= 0,3799 (Test de Kruskal-Wallis)].

Tamaño Metastásico

Para analizar el efecto de los tratamientos sobre el tamaño de las metástasis, se midió el diámetro de los nódulos metastásicos, utilizando un calibre. Luego, se clasificó a los mismos en diferentes grupos en orden creciente de tamaño. En la figura 5, puede verse que en todos los grupos, la gran mayoría de los nódulos metastásicos tuvo un tamaño pequeño (0-1 mm de diámetro). A éstos, los siguieron los nódulos de tamaño intermedio (1-2 mm) y por último los más grandes (>2 mm). Además, los ratones de los grupos I y III presentaron mayor cantidad de nódulos metastásicos de tamaños intermedio y grande que los ratones pertenecientes a los grupos II y IV.

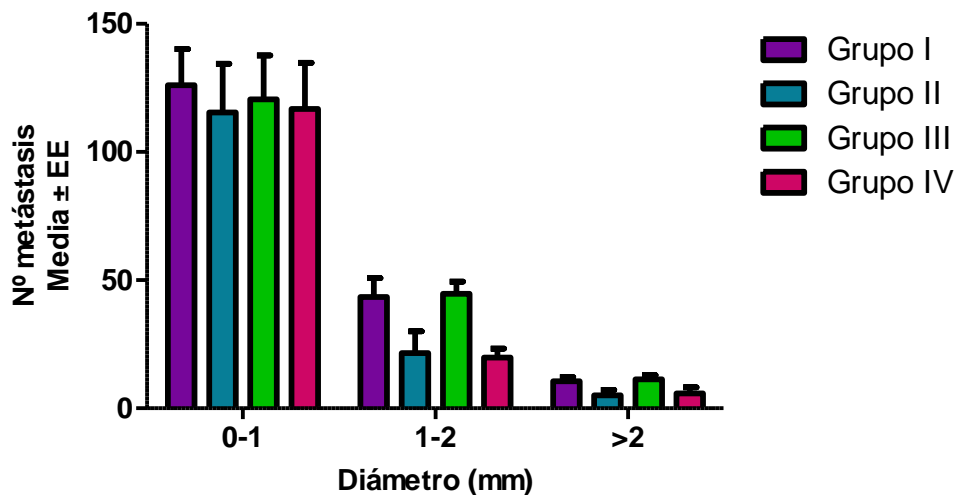


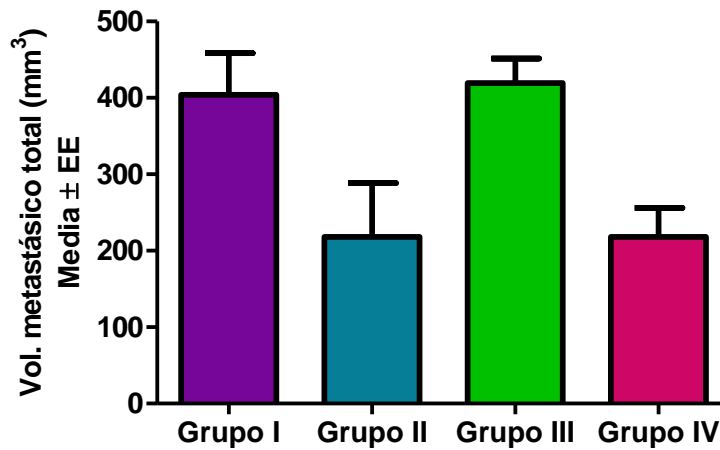
Figura 5: Tamaño metastásico [*mm*, nº de metástasis, mediana (rango)]; I: 0-1, 130 (70-184); 1-2, 36 (25-81); >2, 10 (6-19); II: 0-1, 127 (39-191); 1-2, 11 (1-60); >2, 2,5 (1-15); III: 0-1, 130 (42-181), 1-2, 46 (30-65); >2, 11 (6-20); IV: 0-1, 94 (82-195); 1-2, 18 (10-33); >2, 3 (3-15)].

Volumen Metastásico

Se obtuvo el volumen metastásico pulmonar total calculando el volumen de cada nódulo metastásico y realizando su sumatoria para cada animal. Los cuatro grupos difirieron significativamente en el volumen metastásico total ($P=0,0091$; ANOVA). Los animales del grupo III presentaron mayor volumen metastásico que los grupos II y IV ($P<0,05$; Test de

Tukey) (Figura 6-A). En las figuras 6-B y C se muestran, a manera de ejemplo, fotografías de las metástasis pulmonares evaluadas.

A)



B)



C)



Figura 6: A) Volumen Metastásico Total [mm³, media±EE; I: 404,1±54,4; II: 218,3±70,2; III: 419,2±32,3; IV: 218,2±37,8; P=0,0091 (ANOVA). III vs II y vs IV, P<0,05 (Test de Tukey)]. B) Pulmón con muchas metástasis de regular tamaño. C) Pulmón con regular cantidad de metástasis de menor tamaño.

Estudio de la toxicidad

Se analizaron diferentes variables indicadoras de posibles efectos tóxicos del tratamiento tales como peso corporal, glicemia, recuento de glóbulos blancos, así como signos y síntomas clínicos de toxicidad.

Peso Corporal

Las modificaciones del peso corporal a lo largo del experimento se expresaron como el porcentaje del peso corporal respecto al peso al iniciar el tratamiento. Se considera que existe toxicidad cuando el peso corporal desciende 20% o más con respecto al valor antes de comenzar el tratamiento. No hubo descensos significativos con respecto al valor inicial, ni tampoco se presentaron diferencias significativas entre grupos. En el grupo con doble tratamiento, se puede observar, al final del experimento, un descenso del peso corporal. Ese aparente descenso fue debido a que en esa fecha quedaba un solo animal que presentaba un volumen tumoral pequeño (Figura 7).

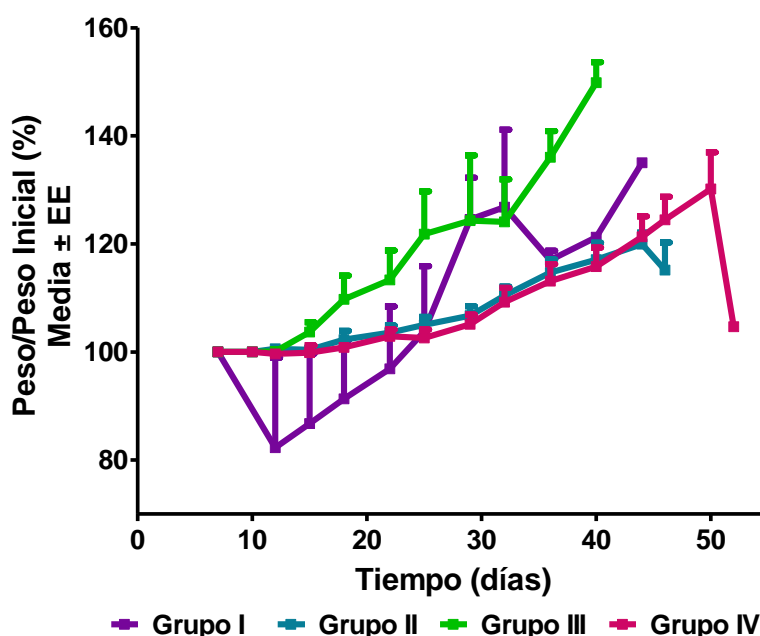


Figura 7: Peso Corporal [Día 40: %, media±EE; I: 121,3±0,0; II: 117,1±3,2; III: 149,9±3,8; IV: 115,8±3,5; P=n.s. (ANOVA)].

Glicemia

La siguiente variable analizada en los grupos tratados con Metformina, fue la glicemia. No se observaron diferencias significativas en los niveles de glicemia entre grupos, así como tampoco dentro de grupos, entre el valor inicial y el obtenido al final del tratamiento (Figura 8).

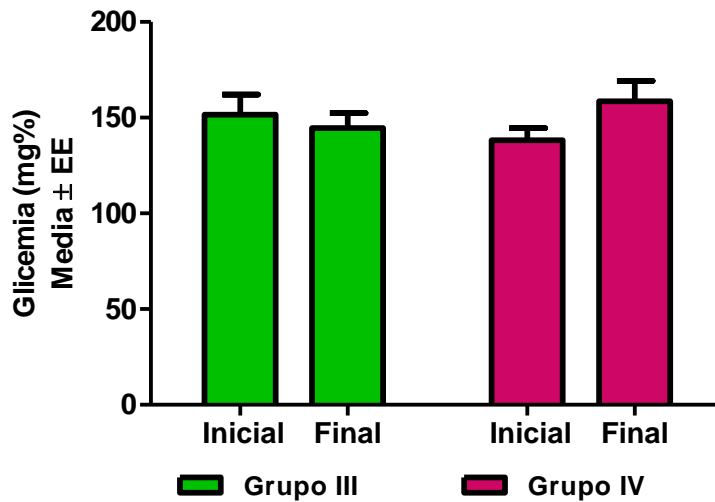


Figura 8: Glicemia [mg, media±EE; III_i: 151,6±10,5; III_f: 144,5±8,0; IV_i: 138,2±6,5; IV_f: 158,6±10,7; P=n.s. (Test t de Student)].

Recuento de Glóbulos Blancos

El tratamiento administrado podría afectar el número de glóbulos blancos (GB) circulantes, por lo que se estudió su variación en el transcurso del mismo. En la Figura 9 se muestra el porcentaje final de GB con respecto al del inicio de tratamiento, expresado en porcentaje. No se presentaron diferencias significativas entre grupos.

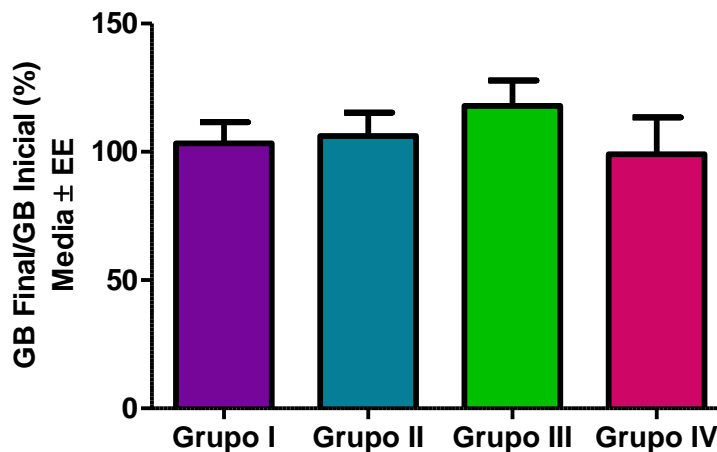


Figura 9: Glóbulos Blancos [GB final/GB inicial %, media±EE; I: 103,3±8,2; II: 106,2±9,1; III: 118,0±9,9; IV: 99,1±14,4; P=n.s. (ANOVA)].

Otros síntomas de toxicidad

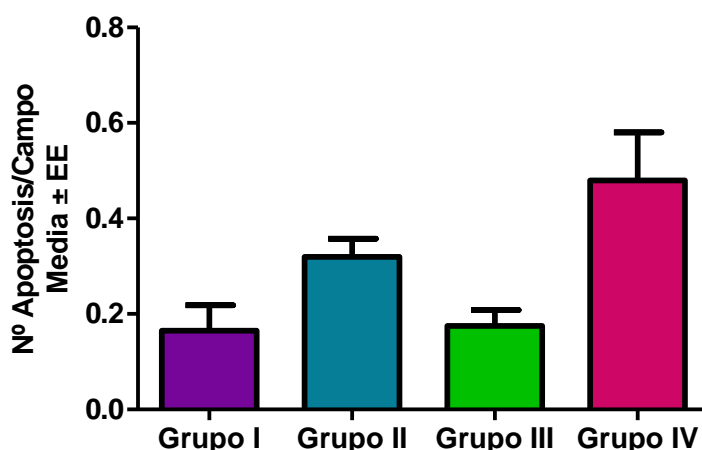
Durante toda la duración de los experimentos se monitorearon diferentes signos y síntomas que podrían indicar la presencia de toxicidad debida al tratamiento. La actividad motora, la calidad del pelaje, la ingestión de alimento, la respuesta a los estímulos y la respiración de los animales presentaron características normales a lo largo de todo el período de tratamiento.

Estudio de los mecanismos de acción

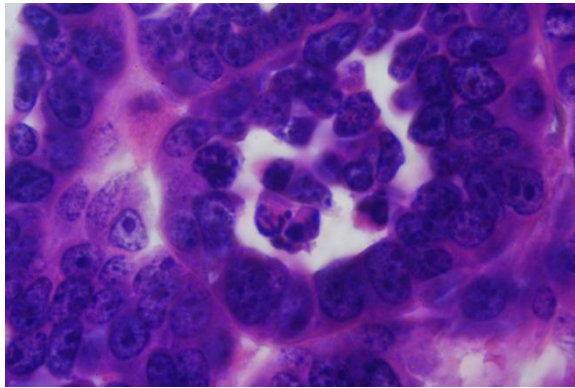
Apoptosis

Se contó el número de células en apoptosis en cortes de tejido tumoral teñidos con Hematoxilina-Eosina. Se evaluaron 50 campos por corte, con un aumento de 1000X. Las diferencias entre grupos fueron significativas ($P=0,0175$; ANOVA). En la Figura 10-A, se observa que el grupo IV fue el que presentó el mayor número de apoptosis, el cual fue significativamente mayor que los grupos I y III ($P<0,05$; Test de Tukey). La diferencia obtenida entre los grupos II y IV no alcanzó a ser significativa. Las Figuras 10-B y C son imágenes donde pueden apreciarse regiones tumorales con presencia de células en apoptosis.

A)



B)



C)

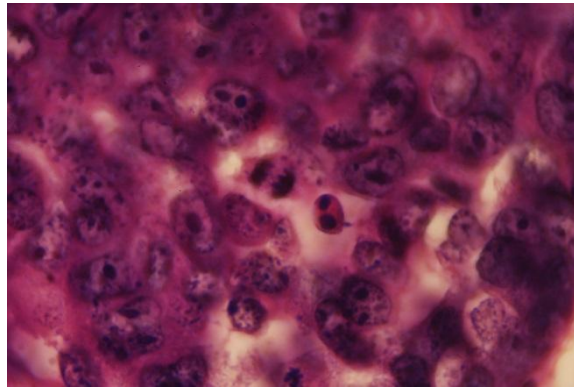
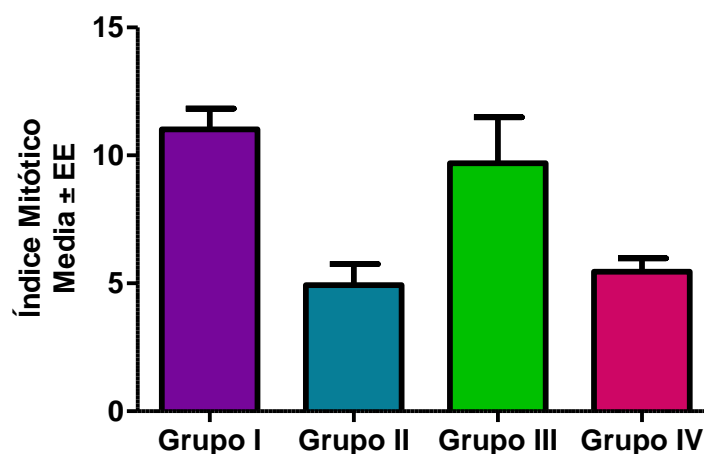


Figura 10: Apoptosis/Campo, 50 campos 1000X [nº de células apoptóticas, media±EE; I: 0,17±0,05; II: 0,32±0,04; III: 0,18±0,03; IV: 0,48±0,10; P=0,0175 (ANOVA). IV vs I y vs III, P<0,05 (Test de Tukey)].

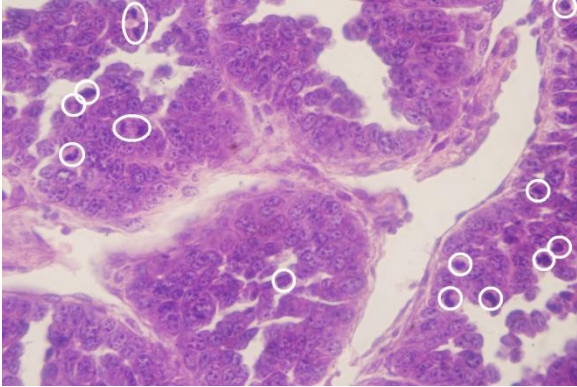
Capacidad Proliferativa

La capacidad proliferativa fue evaluada mediante tinción con Hematoxilina-Eosina. Se contó el número de células en mitosis en 10 campos por corte de tejido tumoral, con un aumento de 400X. Los grupos presentaron diferencias significativas en el índice mitótico (P=0,0015; ANOVA). Los tumores de los animales pertenecientes a los grupos II y IV tuvieron una menor capacidad proliferativa que los de los grupos I (P<0,01) y III (P<0,05); (Test de Tukey) (Figura 11-A). Las figuras 11-B y C muestran cortes de tejido tumoral con diferente índice mitótico.

A)



B)



C)

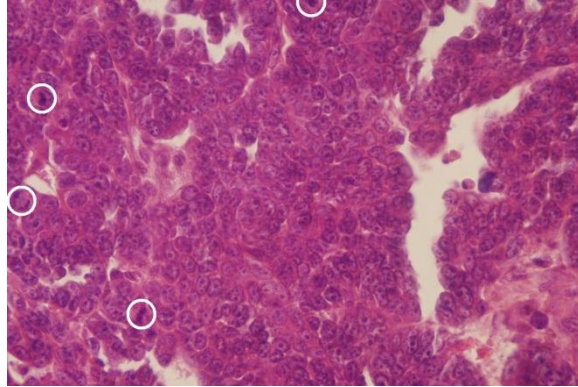
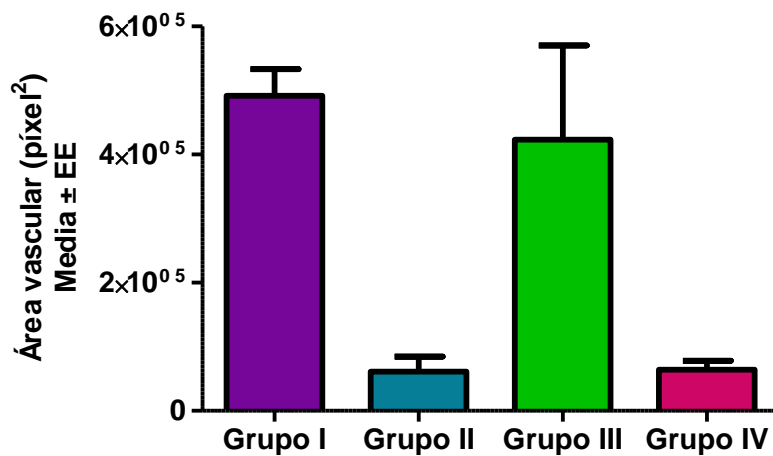


Figura 11: A) Capacidad Proliferativa, 10 campos 400X [nº de mitosis, media±EE; I: 11,0±0,8; II: 4,9±0,8; III: 9,7±1,8; IV: 5,5±0,5; P=0,0015 (ANOVA). II vs I, P<0,01; II vs III, P<0,05; IV vs I, P<0,01; IV vs III, P<0,05 (Test de Tukey)]. B) Adenocarcinoma con gran capacidad proliferativa. C) Adenocarcinoma con pocas células en mitosis.

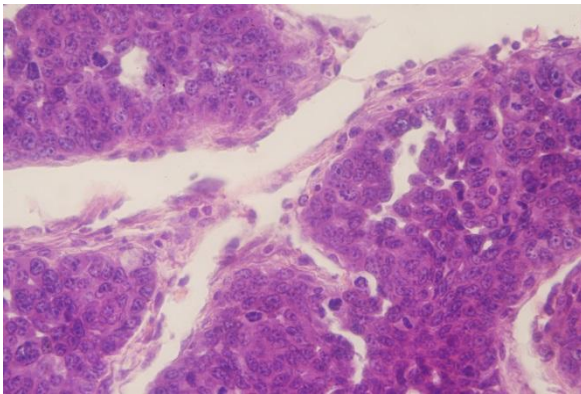
Angiogénesis

Se evaluó la densidad de vasos sanguíneos en el tejido tumoral por tinción con Hematoxilina-Eosina, calculando el área de los mismos en 20 campos por corte de tejido tumoral, con un aumento de 400X. Como puede verse en la Figura 12, la diferencia entre los grupos fue significativa (P=0,0024; ANOVA). El área vascular de los tumores de los animales del grupo I fue mayor que las de los grupos II (P<0,01) y IV (P<0,05); (Test de Tukey). A su vez, los animales pertenecientes a los grupos II y IV también presentaron valores significativamente menores que los del grupo III (P<0,05; Test de Tukey). Las Figuras 12-B y C son fotografías donde pueden apreciarse distintos estados de la vasculatura intratumoral.

A)



B)



C)

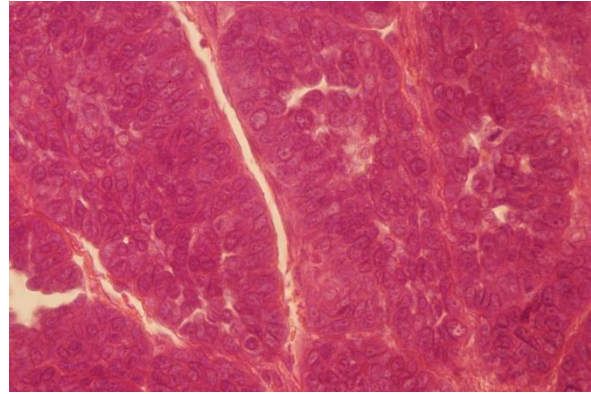


Figura 12: A) Angiogénesis, 20 campos 400X [píxel², media±EE; I: 491743±41685; II: 61375±23371; III: 423161±147042; IV: 64403± 13696; P=0,0024 (ANOVA). I vs II, P<0,01; I vs IV, P<0,05; III vs II, P<0,05; III vs IV, P<0,05 (Test de Tukey)]. B) Campo en donde puede verse una trifurcación vascular, característica de tejidos tumorales. C) Adenocarcinoma con normalización de la vasculatura.

Células Madre del Cáncer

Las células madre del cáncer (CMC) expresan un fenotipo de marcadores de superficie CD44⁺/CD24^{low}. Se analizaron, por citometría de flujo, 500.000 células, tanto de sangre como de suspensiones de tumor, de ratones CBi pertenecientes al grupo I y al grupo IV, marcándose las CMC con anticuerpos con fluorocromos BD Pharmingen™ para CD44 conjugado con FITC y para CD24 con PE, en una dilución 1:200. Como control positivo de CD44 y CD24 se utilizó tejido de bazo. Tanto en sangre como en tumor (Figuras 13-A y B) no se detectaron diferencias significativas entre grupos en los valores de esta población

de CMC. En la Figura 13-C se ven ejemplos representativos de los resultados obtenidos en la citometría de flujo.

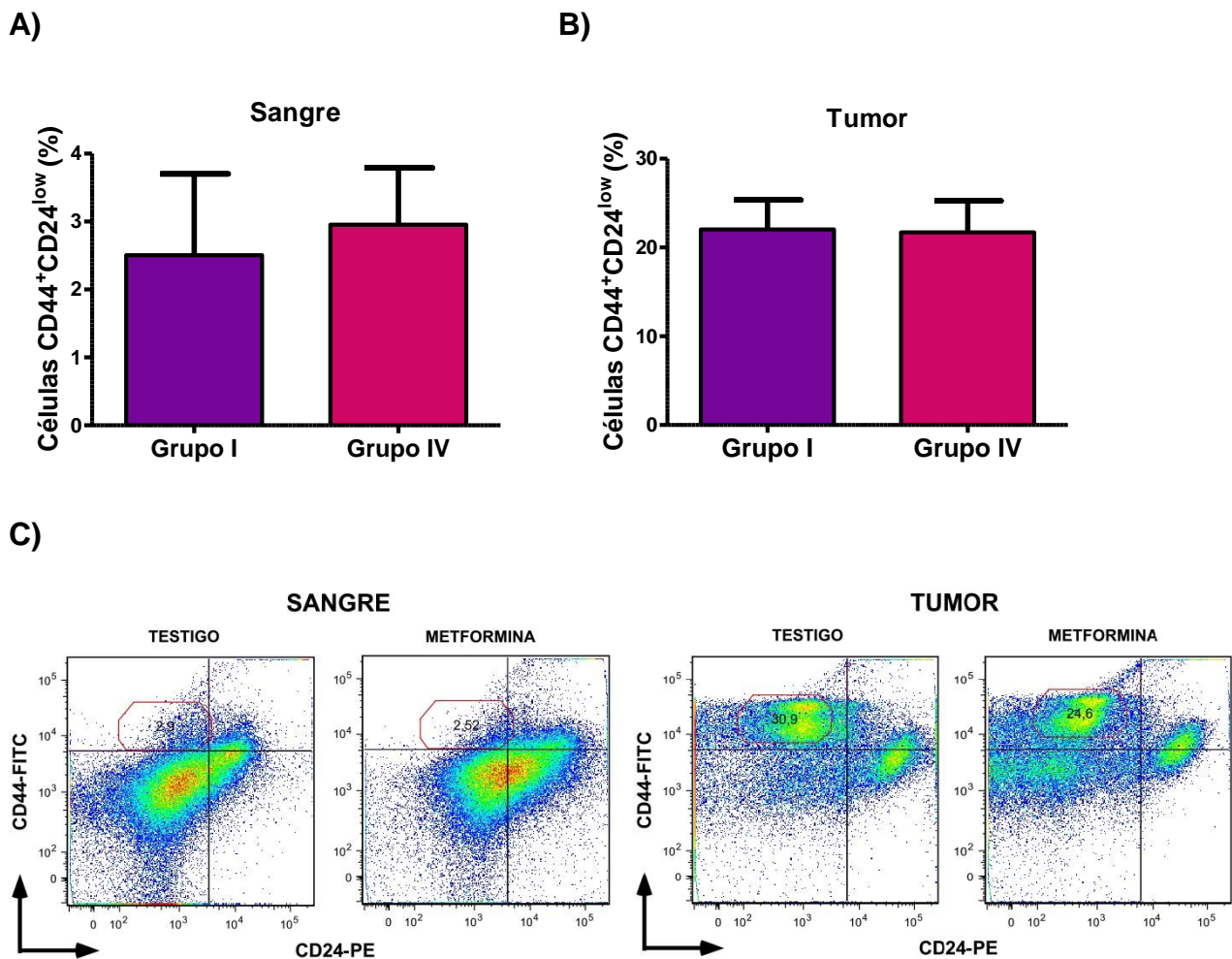


Figura 13: A) CMC en sangre [% de células, media \pm EE; I: 2,51 \pm 1,20; IV: 2,96 \pm 0,83; P=n.s. (Test t de Student)]. B) CMC en tumor [% de células, media \pm EE; I: 22,04 \pm 3,32; IV: 21,71 \pm 3,56; P= n.s. (Test t de Student)]. C) Imágenes representativas de los resultados obtenidos en la citometría de flujo para CD44-FITC y CD24-PE.

DISCUSIÓN

En la Argentina, el cáncer de mama es el cáncer de mayor incidencia en mujeres, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres. Además, la mayor mortalidad por cáncer en mujeres también se debe al cáncer de mama, con una Tasa de Mortalidad Estandarizada de 18,0 por cada 100.000 mujeres (INC, 2014). De hecho, en el 2011 fallecieron alrededor de 508.000 mujeres en el mundo por esta enfermedad (WHO, 2014). Si bien actualmente existen numerosas terapias contra el cáncer, la mayoría de las mismas causan demasiados efectos secundarios que atentan contra la calidad de vida del paciente y que, peor aún, no siempre suelen erradicar definitivamente el tumor, perdiendo la batalla contra el cáncer. No sólo es importante la estabilización y/o la recuperación completa de la enfermedad, sino la calidad de vida del paciente durante el tratamiento, ya que la toxicidad puede afectarla en diferentes niveles, tanto en la esfera familiar como en la social y en la profesional. Es de aquí que surge la necesidad de seguir investigando en terapias que conlleven gran eficacia y buena tolerabilidad, para poder aumentar el porcentaje de pacientes que superen la enfermedad y que puedan seguir con una vida normal durante el transcurso del tratamiento.

La quimioterapia metronómica se caracteriza por la administración frecuente y a intervalos regulares de drogas quimioterapéuticas en dosis significativamente menores a la dosis máxima tolerada, sin períodos de descanso prolongados. De esta manera, se reducen los efectos tóxicos, mientras que se mantiene el efecto antitumoral de las quimioterapias convencionales. Estos resultados son mediados, en parte, por efectos anti-angiogénicos e inmunomoduladores.

La Ciclofosfamida (Cy) es una droga alquilante que ejerce una acción tóxica principalmente sobre células en proliferación. Mientras que altas dosis de Cy suprimen la respuesta inmune, bajas dosis de la droga la incrementan.

La Metformina (Met) es una biguanida utilizada como hipoglucemiante oral, que ha demostrado tener acción antitumoral mediante la detención del ciclo celular, la inhibición de la angiogénesis, la estimulación de la apoptosis e, incluso, la eliminación de las células madre del cáncer (CMC) y la inhibición de la transición epitelio-mesénquima (EMT).

En el presente trabajo, se analizó la posibilidad de que el tratamiento combinado de un adenocarcinoma de mama con Cy + Met pudiera inhibir el crecimiento tumoral más eficientemente que cada droga individual intentando, a su vez, dilucidar el/los mecanismos de acción.

El efecto antitumoral del tratamiento con Cy + Met se vio reflejado en la evolución del volumen tumoral a lo largo del experimento. Los animales del grupo con tratamiento combinado fueron los que presentaron mayor inhibición del crecimiento tumoral, mostrando menores valores que los animales de los otros grupos. Además, ajustando el tamaño del tumor en cada ratón a lo largo del tiempo, a una curva de crecimiento exponencial, se pudo calcular el tiempo medio de duplicación del tumor en cada grupo (T_{DUP}). El T_{DUP} fue significativamente mayor en los grupos de tratamiento combinado y tratados con Cy que en los otros dos grupos, indicando así una menor velocidad de crecimiento tumoral. El efecto del tratamiento combinado sobre el crecimiento tumoral tuvo su correlato en la supervivencia de los animales, los cuales vivieron significativamente más tiempo que los animales de los tres grupos restantes. Estos resultados confirman el efecto antitumoral de la QTM con Cy + Met en el tratamiento del adenocarcinoma de mama murino M-406.

Los resultados obtenidos coinciden, en gran parte, con los de la bibliografía existente. Munoz R y colaboradores trabajaron en modelos murinos de cáncer de mama, utilizando QTM con Cy, en la misma dosis utilizada en el presente trabajo, junto a la administración de UFT, un fármaco pro 5-FU (5-fluorouracilo). La monoterapia con Cy mostró un retraso

del crecimiento tumoral, lo cual no sucedió con la monoterapia de UFT. En cuanto a la supervivencia, las monoterapias no causaron aumentos significativos. Sin embargo, la administración conjunta de las drogas prolongó notoriamente la supervivencia de los ratones causando, incluso, la regresión casi completa del cáncer de mama metastásico (Munoz R et al., 2006). Mainetti LE, Rico MJ y colaboradores, estudiaron el efecto de la QTM con Cy + Doxorubicina (Dox) en ratones de las líneas BALB/c y CBI, inoculados con los tumores M-234p y M-406, respectivamente. En ambas líneas, el tratamiento conjunto de Cy + Dox causó la mayor reducción del volumen tumoral en comparación con las monoterapias. Además, en ratones portadores del adenocarcinoma M-406, los animales del grupo de Cy + Dox superaron con creces la supervivencia de los grupos restantes, aunque, a su vez, la monoterapia con Cy también causó mayor supervivencia que la monoterapia con Dox (Mainetti LE et al., 2013). Estos efectos antitumorales también pudieron encontrarse en diversos ensayos clínicos que administran QTM con Cy en combinación con otras drogas como Metotrexato o Celecoxib (Cel). Pudo demostrarse una prolongación de la supervivencia de los pacientes y, a su vez, una estabilización del crecimiento tumoral, e incluso la regresión de los tumores en cáncer de mama (Colleoni M et al., 2002; Orlando L et al., 2006; Perroud HA et al., 2013).

Otros tipos de tumores, también han sido tratados exitosamente con estas formas de terapia. Shiraga E y su equipo de investigadores trabajaron con QTM en ratones con melanoma metastásico de pulmón, administrando liposomas estabilizados estéricamente que encapsulaban Dox (DXR-SL), conjuntamente con la administración de Cy. Trabajaron con inyecciones metronómicas de Cy y diferentes dosis de DXR-SL. Los tratamientos con las drogas combinadas superaron en eficacia antitumoral a la monoterapia con Cy, observándose una prolongación del tiempo medio de vida en correlación con una disminución del peso pulmonar (Shiraga E et al., 2008). Por otro lado, Fontana A y colaboradores realizaron un ensayo clínico en pacientes con cáncer de próstata

avanzado, resistente a terapia hormonal. La quimioterapia con una dosis i.v. estándar de Cy seguida inmediatamente por un régimen metronómico de Cy oral con Cel y Dexametasona (Dex), consiguió el aumento de la media de supervivencia libre de progresión (3 meses) y de la supervivencia general (21 meses) (Fontana A et al., 2009).

Met también fue responsable del efecto antitumoral, como pudo verse en las mejoras que tuvo el grupo que recibió la QTM con Cy + Met, con respecto a los tres grupos restantes. Rattan R y colaboradores estudiaron el efecto *in vivo* de Met en tumores de ovario. Ratones *nude* fueron inoculados intraperitonealmente con las células tumorales en el día 0 y a partir del día 7 recibieron, en el agua de bebida, 100 o 200 mg/kg/día de Met. A las 4 semanas, se sacrificó a los animales y los tumores fueron extraídos quirúrgicamente. Luego, se procedió a medir las circunferencias abdominales y tomar el peso de los tumores. Los tumores de los animales que habían sido tratados pesaron mucho menos que los de los controles. Además, la circunferencia abdominal, indicadora de la eliminación del tumor llevada a cabo en el peritoneo, también era mucho menor en los ratones tratados. Estas diferencias fueron más notorias con la dosis más alta de Met (Rattan R, 2011). El efecto antitumoral de Met también fue estudiado en carcinoma hepatocelular, por Qu Z y colaboradores. Trabajaron con ratones atímicos desafiados con un xenoinjerto de células tumorales humanas, los cuales recibieron 125 o 250 mg/kg/día de Met por vía i.p., mientras que el grupo control recibió, por la misma vía, solución salina. Ninguna de las dosis causó toxicidad y ambas lograron una inhibición significativa del crecimiento tumoral, del 47 y el 85 %, respectivamente (Qu Z et al., 2012). Ben Sahra I y su grupo también compararon los efectos antitumorales de distintos esquemas de Met, en cáncer de próstata. Ratones *nude* fueron inoculados subcutáneamente con células tumorales de próstata, y luego se los distribuyó en dos grupos diferentes. Al primero se le inyectó la droga diariamente por vía i.p. con una dosis de 1 mg/día. El segundo, recibió 200 µg/ml de Met en el agua de bebida. De esta manera, el crecimiento tumoral fue

inhibido en un 35 y un 55 %, respectivamente (Ben Sahra I et al., 2008). El tratamiento combinado de Met con otras drogas, también fue estudiado por algunos grupos de investigación. Ma J y colaboradores estudiaron la administración conjunta de Met y Tamoxifeno (Tam) en comparación con las respectivas monoterapias, en cáncer de mama ER⁺. Las células tumorales se inocularon en ratones *nude* y una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente los 200 mm³, los animales fueron tratados con Met (2 mg/ml en el agua de bebida), Tam (60 mg/kg por vía oro-gástrica) o ambos tratamientos de forma simultánea. La combinación Met + Tam logró un arresto sostenido del crecimiento tumoral equivalente a una disminución del 75,4 % del volumen tumoral medio, a los 24 días del inicio del tratamiento, en comparación con el grupo control. Las monoterapias de Met y Tam inhibieron el crecimiento tumoral por un 28,9 y 43,8 %, respectivamente. La terapia combinada superó a las monoterapias en el efecto antitumoral (Ma J et al., 2014). En el presente trabajo, Met también aumentó significativamente la eficacia de la monoterapia con Cy, como puede verse en la prolongación de la supervivencia y en el menor crecimiento tumoral de los animales que recibieron la QTM con Cy + Met. Por lo tanto, es de destacar la diferencia entre el grupo que recibió el tratamiento combinado y el resto de los grupos, considerando las bajas dosis de Met que fueron utilizadas, al compararla con las empleadas en los experimentos recién descritos.

El efecto del tratamiento sobre el desarrollo de metástasis fue analizado considerando la cantidad y el tamaño de los nódulos metastásicos presentes en los pulmones de los animales tratados. La QTM combinada con Cy + Met pudo inhibir la formación de metástasis en mayor medida que el resto de los tratamientos, al presentar los ratones de este grupo, el menor número de nódulos metastásicos. Al tomarse las medidas de los diferentes nódulos, también surgieron diferencias entre los grupos experimentales. Los ratones tratados con la monoterapia de Cy y con la terapia combinada, presentaron mayor cantidad de nódulos metastásicos de tamaño pequeño en comparación con los otros dos

grupos, en los cuales se encontró una cantidad más grande de nódulos de mayor diámetro. Las diferencias en cantidad y tamaño de las metástasis pulmonares en cada grupo experimental, tuvo como resultado diferencias significativas en los valores del volumen metastásico pulmonar total. La adición de los volúmenes metastásicos individuales por animal, reflejó diferencias entre grupos. Los ratones que recibieron la monoterapia con Cy o el tratamiento combinado Cy + Met, fueron los que presentaron menor volumen metastásico pulmonar total.

Existen varios estudios que relatan efectos opuestos de la quimioterapia con Cy, los cuales relacionan su administración con un incremento en la malignidad de los cánceres tratados. Yamauchi K y su grupo describieron la inducción de proliferación intravascular, extravasación y formación de colonias por células tumorales, pasos clave de la formación de metástasis, cuando realizaron un pretratamiento con Cy en ratones receptores de células humanas de fibrosarcoma. Esta reacción no sucedía en ratones sin tratar, por lo que la Cy se encontraba interfiriendo en los procesos naturales de inhibición metastásica (Yamauchi K et al., 2008). Resultados similares se obtuvieron cuando Park SI y colaboradores administraron en animales una dosis única de Cy, previa a la inoculación intra-cardíaca de células tumorales en un modelo de cáncer de próstata metastásico. La Cy favorecía la metástasis esquelética, mediante el aumento de células mieloides de médula ósea y de citoquinas mielogénicas. Esta facilitación de la formación de metástasis, se debía a la fuerte supresión de la médula ósea que causaba la alta dosis de Cy (Park SI et al., 2012). Sin embargo, estos esquemas de administración de Cy son muy diferentes al de la QTM. En estos casos donde aumentó la formación de metástasis, se trabajó con dosis únicas y elevadas de Cy. Esto favorece la inmunosupresión, por lo que el organismo queda más susceptible al desarrollo de un cáncer más maligno. En la QTM, la administración de Cy es constante y en dosis mucho menores a la máxima dosis tolerada (MDT) por lo que, a diferencia de las quimioterapias convencionales, incrementa la

respuesta inmune del organismo. Este comportamiento bimodal de Cy con respecto al sistema inmune, relacionado con su dosis de administración, es un aspecto muy importante a tener en cuenta en la quimioterapia con Cy (Matar P et al., 2002). Por esta razón, existen numerosos artículos sobre la QTM con Cy en donde se describe su efecto antimetastásico, especialmente cuando se la administra en combinación con otras drogas.

En el experimento de Munoz R y colaboradores descrito más arriba, el régimen metronómico de Cy + UFT disminuyó la velocidad de desarrollo de metástasis en un modelo experimental de cáncer de mama metastásico avanzado (Munoz R et al., 2006). Mainetti LE y colaboradores estudiaron el efecto de la QTM con Cy + Cel en los adenocarcinomas de mama M-234p y M-406, encontrando diferencias muy significativas en cuanto al número y el tamaño de nódulos metastásicos en los pulmones. El tratamiento combinado superaba en su efecto antimetastásico a las monoterapias y al grupo Testigo (Mainetti LE et al., 2011).

Este efecto inhibitor de metástasis, también se encuentra en ensayos clínicos. Licchetta A y colaboradores probaron un ensayo de fase II de terapia metronómica quimio-hormonal con Cy y Acetato de Megestrol en pacientes con cáncer de mama metastásico, incluyendo del tipo triple negativo. El tiempo medio a la progresión del tumor fue de 1,4 meses y el tiempo medio de supervivencia general fue de 13,4 meses, valores muy elevados considerando que eran pacientes con cáncer avanzado (Licchetta A et al., 2010). En cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, también se obtuvieron resultados positivos al utilizarse QTM con Cy y Dex (Dickinson PD et al., 2012).

Actualmente, existe mucha información sobre la habilidad de Met para disminuir la formación de metástasis, debido a la limitación del tamaño del tumor primario, la inhibición de la transición epitelio-mesénquima y la eliminación de CMC (Rattan R et al., 2012). En el experimento de Rattan R y colaboradores mencionado previamente, también se estudió

la acción *in vivo* de Met sobre metástasis y otras propiedades tumorales, en ratones con cáncer de ovario. Encontraron diferencias significativas entre el número de nódulos metastásicos pulmonares de los ratones control y los tratados con Met. Las dosis que utilizaron fueron de 100 y 200 mg/kg/día, siendo la segunda la más efectiva en cuanto la actividad antitumoral y antimetastásica. Además, la droga fue administrada en el agua de bebida porque así se lograba mantener una activación sostenida de AMPK en los ratones, resultando en la inhibición constante de la vía de mTOR (Rattan R et al., 2011). En un estudio de Wu B y su grupo, en un modelo murino de cáncer ovárico, se administró a los ratones 250 mg/kg de Met, día por medio, de manera i.p., durante 4 semanas. En los animales sin tratar, hubo formación de metástasis en varios sitios como peritoneo, ovario contra-lateral, mesenterio, intestino, hígado, riñón, bazo, diafragma y nódulos linfáticos mesentéricos. En contraste, el grupo que había recibido Met desarrolló menor cantidad de metástasis y sólo en peritoneo, intestino y mesenterio. Además, tanto la cantidad como el tamaño de las metástasis intestinales fueron menores que los del grupo control (Wu B et al., 2012). Orecchioni S y colaboradores también estudiaron el efecto de Met, pero además el de otra biguanida que funciona como hipoglucemiante oral, la Fenformina (Fen). Las drogas Met y Fen fueron administradas en el agua de bebida con las dosis de 2 y 1,65 mg/ml, respectivamente. Ambas biguanidas pudieron reducir significativamente el número de lesiones metastásicas pulmonares, en cánceres de mama murino tanto HER2⁺ como triple negativo. De todas formas, la eficacia de Fen fue significativamente superior que la de Met (Orecchioni S et al., 2014). Las diferencias entre esos resultados y el obtenido en el presente trabajo pueden residir en varias razones. La dosis de Met fue inferior que la de los otros experimentos y su administración no fue diaria debido a la presentación de la droga que se utilizó, la cual no podía ser disuelta en el agua de bebida sino que debía ser administrada oro-gástricamente (*gavage*). Además, se eligió utilizar una dosis baja para que los animales no sufrieran efectos tóxicos y poder asegurar una

mejor calidad de vida. Otra diferencia que cabe destacar, es que los medicamentos no siempre actúan de la misma manera en los distintos tipos de tumor. Cada tumor tiene propiedades que lo caracterizan y diferencian de otros del mismo tipo histológico. Por ejemplo, el adenocarcinoma M-406 es un tumor triple negativo (RE^- , RP^- , $HER2/neu^-$), por lo tanto, pertenece al tipo tumoral más agresivo y con menores posibilidades terapéuticas en el terreno clínico. De hecho, Cerezo M y colaboradores analizaron el efecto antimetastásico de Met en modelos murinos de extravasación y metástasis pulmonar conducidos en ratones *nude* inmunodeficientes, encontrando resultados interesantes. Primero inocularon células humanas de melanoma tratadas o sin tratar durante 24 hs con Met, en la vena de la cola de ratones hembra *nude* atímicos, para evaluar su habilidad de extravasación a través del parénquima pulmonar. Las células control fueron tratadas sólo con PBS y dieron una cantidad mucho mayor de micrometástasis pulmonares que las células tratadas con Met. Pero luego, llevaron a cabo un segundo experimento utilizando células Mewo portadoras de una mutación en p53. En este caso, Met era incapaz de inhibir la extravasación a los pulmones, confirmando la implicación de p53 en la formación de metástasis *in vivo* (Cerezo M et al., 2013). Estos resultados confirman que la respuesta de cada tumor a una terapia determinada dependerá, en gran medida, de las alteraciones genéticas que el tumor presente, como fue demostrado en otros modelos experimentales. Por lo tanto, las alteraciones genéticas propias del adenocarcinoma de mama M-406 determinarían, al menos en parte, el comportamiento del mismo ante el tratamiento administrado. En el futuro se deberán probar diferentes dosis y formas de administración de la droga con el objeto de aumentar el efecto antimetastásico en el mismo modelo tumoral.

Una de las principales características de la QTM es que, debido a las bajas dosis administradas de las diferentes drogas, se encuentra prácticamente exenta de toxicidad o presenta toxicidad leve, según los diferentes modelos. En este trabajo, quiso confirmarse

la ausencia de efectos secundarios debidos a la terapia. Se analizaron caracteres clínicos de los animales durante el transcurso de los tratamientos, y los mismos no presentaron ningún problema con respecto a la actividad motora, la calidad del pelaje, la ingestión de alimento, la respuesta a los estímulos o la respiración.

Simultáneamente, se realizó un seguimiento del peso corporal de los ratones a lo largo de todo el período experimental. Puede decirse que un tratamiento causa toxicidad, cuando el peso corporal del animal desciende 20% o más con respecto al valor inicial. Con las monoterapias de Cy y Met, así como con la terapia combinada, los ratones no descendieron de peso, ni tampoco difirieron entre sí o con respecto a los ratones del grupo testigo.

Por otro lado, debido a que Met es una droga antidiabética utilizada normalmente para el tratamiento de la diabetes tipo 2, se investigó si la misma modificaba la glicemia como efecto secundario del tratamiento antitumoral. Aunque a nivel clínico Met no posee efecto hipoglucemiante, se debía corroborar que ese comportamiento también se repetía en el modelo M-406 en ratones CBI. Efectivamente, no se observaron diferencias significativas en los niveles de glicemia entre grupos tratados con Met, así como tampoco dentro de grupos, entre el valor inicial y el obtenido al final del tratamiento.

Por último, se estudió si los tratamientos generaban inmunosupresión, mediante el recuento de glóbulos blancos circulantes. Como era de esperarse por lo obtenido en experiencias anteriores del grupo de investigación, no se presentaron diferencias significativas entre grupos, reafirmando la falta de inmunosupresión en los esquemas de QTM, en cuanto a concentración de leucocitos circulantes se refiere.

Existe numerosa bibliografía sobre los efectos secundarios posibles de los diversos esquemas de administración de Cy y Met. Quail MP y colaboradores estudiaron la toxicidad de la monoterapia de Met en ratas, probando diferentes dosis por administración

orogástrica, desde 200 hasta 1200 mg/kg/día, durante un período de 13 semanas. Si bien hubo graves signos de toxicidad con las dosis mayores a 900 mg/kg/día, incluyendo el aumento de la mortalidad, la toxicidad ocasionada por dosis entre 600 y 900 mg/kg/día generaba sólo pérdida de peso, mínima acidosis metabólica y algunos otros síntomas clínicos. Por otro lado, no se observaba ningún efecto adverso con la dosis de 200 mg/kg/día (Quaile MP et al., 2010). Algunos estudios sobre Met en el tratamiento de la diabetes, argumentan que una de las ventajas de la droga es que favorece la pérdida de peso, a diferencia de las sulfonilureas, sin riesgos mayores de provocar otros efectos secundarios (Del Barco S et al., 2011). Otros trabajos concluyen, también en el contexto de la diabetes y la obesidad, que el efecto de Met sobre peso y composición corporal es favorable pero, aun así, modesto (Yanovski JA et al., 2011; Berstein LM, 2012). Actualmente, existe insuficiente información sobre la asociación entre la pérdida de peso y el uso de Met, en pacientes que no padezcan diabetes mellitus o síndrome ovárico poliquístico (Levri KM et al., 2005). En el presente trabajo, la monoterapia con Met no causó diferencias entre grupos, con respecto al peso corporal. Otro de los efectos a analizar, al ser Met un agente antidiabético, fue la posible modificación de la glicemia durante el tratamiento antitumoral. Sin embargo, varios estudios concuerdan en que la administración de Met es útil para tratar la hiperglicemia, pero que no genera hipoglicemia (Busaidy NL et al., 2012). En un análisis caso-control anidado, se estudió el efecto de Met sobre la hipoglicemia, encontrándose que rara vez estaban asociados. El riesgo de tener hipoglicemia en usuarios de Met variaba entre el 0 y el 21 %, pero como Met no estimula directamente la secreción de insulina, el riesgo de tener hipoglicemia tendía a ser menor que otras drogas orales anti-diabetes. Se han detectado algunos casos de hipoglicemia más serios por Met, pero éstos suelen deberse a sobredosis (Bodmer M et al., 2008; Al-Abri SA, 2013). Todos estos resultados reafirman los del presente trabajo. Dado que se utilizaron bajas dosis de Met, su consumo no generó toxicidad de ningún tipo.

En cuanto a Cy, los efectos secundarios varían de un extremo al otro dependiendo notablemente de la dosis y la frecuencia de administración. Como es de esperarse, en las quimioterapias convencionales que utilizan altas dosis de Cy, la toxicidad ocasionada es importante. Los principales efectos tóxicos consisten en mielosupresión, disminución del peso corporal, cardiotoxicidad y otros efectos característicos de las quimioterapias que utilizan la MDT, como pudo verse en un ensayo clínico de fase III realizado por Nabholtz JM y colaboradores, en el que también detectaron neutropenia y gastrotoxicidad (Nabholtz JM et al., 2003). Sin embargo, la toxicidad de Cy se reduce considerablemente cuando el régimen de administración de la droga es metronómica. Todorova VK y su grupo estudiaron, en ratas, la eficacia y la toxicidad de un régimen metronómico de Cy en cáncer de mama, en contraste con los efectos de las quimioterapias que aplican una única dosis alta. Encontraron que la monoterapia metronómica de Cy generaba mucha menos toxicidad cardíaca y disminución del peso corporal que una única dosis alta de Cy, sin perder la eficacia antitumoral (Todorova VK et al., 2011). Resultados similares se obtuvieron cuando Rozados VR y colaboradores administraron QTM con Cy en ratas portadoras de un linfoma o de un sarcoma. Demostraron que la QTM no generaba cambios en el peso corporal ni toxicidad hematológica, renal, cardíaca o hepática (Rozados VR, 2004). Shaked Y y colaboradores también señalaron estas diferencias entre las quimioterapias de MDT y la QTM, manteniendo la administración metronómica una toxicidad mucho menor que la convencional, lo cual se veía reflejado en el mantenimiento del peso corporal de los animales (Shaked Y et al., 2005). Llamativamente, hay muchos trabajos en los que se menciona un efecto opuesto de la quimioterapia con Cy. Muchas veces la droga genera un aumento de peso corporal en los pacientes, con mayor índice de grasa en el cuerpo, incluso aumentando el riesgo de adquirir el síndrome metabólico en pacientes de cáncer de mama (Bicakli DH et al., 2014; Jeon YW, 2014). Cabe aclarar, que ninguno de estos estudios fue llevado a cabo por administración

metronómica, razón por la que obtuvieron resultados sustancialmente diferentes a los del presente trabajo. Queda demostrado, entonces, que la QTM con Cy, cuando se administra en dosis bajas, está prácticamente libre de toxicidad, como se ve reflejado en los resultados sobre el peso corporal y el recuento de glóbulos blancos, así como en la falta de sintomatología en los caracteres clínicos de toxicidad analizados.

Uno de los objetivos de este trabajo, fue definir los mecanismos de acción de las monoterapias y la QTM con Cy + Met analizando algunos aspectos esenciales de la biología de los tumores como el grado de apoptosis y de proliferación celular, la densidad de vasos sanguíneos y la cantidad de CMC en el tumor y circulantes.

El índice mitótico y el área vascular de los tumores fueron menores en los animales tratados con la monoterapia de Cy y con el tratamiento combinado, que en los que recibieron Met o los testigos sin tratamiento. Por otra parte, al analizar la muerte celular, el grupo tratado con Cy + Met presentó mayor número de células en apoptosis que los otros tres grupos, aunque la diferencia respecto al grupo tratado con Cy sola no alcanzó el significado estadístico.

Contrariamente a lo esperado, al comparar la cantidad de CMC circulantes o las intratumorales del grupo Testigo con las del grupo que recibió el tratamiento combinado, no se encontraron diferencias significativas. Este resultado podría deberse, entre otros factores, a que en este modelo tumoral no se alcanzó la dosis apropiada para eliminar CMC y/o a que se podría haber subvalorado la presencia de las mismas, dado que sólo se usaron dos marcadores para identificar esta población celular, para la cual no existe todavía un consenso general para su identificación

De estos resultados podemos deducir que el efecto antitumoral obtenido con el tratamiento combinado de Cy + Met se obtendría, al menos en parte, por la suma de los efectos que la terapia tiene aumentando la muerte celular y disminuyendo su proliferación

y la densidad de vasos sanguíneos. La modesta diferencia observada cuando se compararon los valores de estas variables del grupo tratado con las dos drogas y los del tratado solamente con Cy, sería suficiente para otorgarle al grupo de tratamiento combinado ventajas terapéuticas reflejadas en un aumento significativo de la supervivencia de los animales.

Los mecanismos de acción de las drogas utilizadas también fueron estudiados por otros grupos de investigación que obtuvieron resultados que concuerdan con los del presente trabajo y otros que difieren. En la investigación de los mecanismos de la terapia metronómica con Cy, son muchos los trabajos que demuestran su actividad pro-apoptótica antitumoral y su capacidad de inhibir tanto angiogénesis como proliferación intratumoral, demostrando de esta manera cómo ejerce su acción antitumoral y prolonga la supervivencia de los pacientes. Daenen LG y colaboradores combinaron bajas dosis metronómicas de Cy con un agente de disrupción vascular, para aumentar la eliminación de células tumorales en ratones con xenoinjertos humanos de cáncer de mama metastásico. Los animales recibieron 20 mg/kg/día de Cy en el agua de bebida y una dosis de 50 mg/kg i.p. de OXi4503 (OXi), una vez que el tumor alcanzó los 400 mm³. Las monoterapias de Cy y OXi disminuyeron la formación de vasos intratumorales, inhibieron la proliferación celular y aumentaron la cantidad de células en apoptosis. En todos los casos, ambas drogas actuaron sinérgicamente en el tratamiento combinado (Daenen LG et al., 2009). Wang R y su grupo realizaron un completo trabajo en donde se comparaba la administración metronómica de bajas dosis de Cy, su administración metronómica en combinación con Endostar (endostatina humana recombinante; Endo), y la administración de la MDT de Cy. Estudiaron estos tratamientos en ratones desafiados con xenoinjertos de cáncer de pulmón humano. A partir de los 200 mm³ de volumen tumoral, se distribuyeron en cuatro grupos. El grupo Control recibió solución salina i.p. diariamente, el segundo grupo recibió 10 mg/kg diarios de Cy por administración oro-gástrica, el tercero

recibió 4 mg/kg i.p. diarios de Endo, el cuarto recibió combinados estos dos últimos tratamientos y el quinto recibió la MDT de Cy de 100 mg/kg i.p. día por medio, durante 21 días. Para estudiar la neoangiogénesis, midieron los niveles de células endoteliales circulantes (CEC) de la sangre periférica. La MDT de Cy incrementó la frecuencia de CECs totales y viables en comparación con el grupo Control, mientras que Cy metronómica y Endo redujeron la frecuencia de las mismas. El tratamiento combinado la redujo aún más. Luego, midieron la angiogénesis por inmunofluorescencia anti-CD31, detectando resultados equivalentes a los anteriores y, por lo tanto, demostrando que la MDT de Cy tenía un efecto pro-angiogénico, mientras que la metronómica todo lo contrario. Además, las drogas actuaban de manera sinérgica (Wang R et al., 2012). Quedó así demostrado el mejor desempeño de la administración metronómica y en bajas dosis de Cy, y su efecto mejorado cuando se la suministra en combinación con ciertas drogas. Por el contrario, se demostró en un modelo de cáncer de estómago, que cuando se utiliza la MTD de Cy, los efectos beneficiosos de la terapia son mucho menores (Cejka D et al., 2008).

En conclusión, los resultados del presente trabajo, sumados a los informados en las diferentes publicaciones, confirman los mecanismos de acción anti-angiogénico, pro-apoptótico e inhibidor de la proliferación tumoral, de la QTM con Cy.

Los experimentos que analizan los mecanismos de acción de Met han obtenido resultados favorables en cuanto a su eficacia antitumoral. Luo Q y colaboradores estudiaron el efecto apoptótico de Met en modelos de ratones *nude* que habían sido desafiados con xenoinjertos de carcinoma humano de células escamosas de la cavidad oral. A partir de los 8 días de la inoculación tumoral, los animales del grupo tratado recibieron 200 µg/ml de Met en el agua de bebida. Encontraron un aumento del número de células tumorales apoptóticas en los animales tratados con Met (Luo Q et al., 2012). Feng Y y su grupo estudiaron la muerte celular inducida por Met en carcinoma de células escamosas

esofágicas en cultivo. La apoptosis, medida por marcación con Annexina V, aumentaba a medida que era mayor el tiempo de cultivo con Met comparada con la de los testigos sin tratamiento. Con la técnica de TUNEL, mostraron que la cantidad de células positivas para apoptosis aumentaba de una manera dosis-dependiente (Feng Y et al., 2014). Existen otros trabajos que estudian *in vitro* las posibles vías pro-apoptóticas utilizadas por Met, la cual actuaría por la vía MAPK/ERK, entre otras (Malki A & Youssef A, 2011; Wu N et al., 2011; Chen TW et al., 2013). En el presente trabajo, no se encontraron diferencias entre la monoterapia con Met y los testigos sin tratamiento. A pesar de esto, la QTM con Cy + Met demostró ser superior en cuanto a la estimulación de la apoptosis celular intratumoral, en comparación con la monoterapia de Cy. Por lo tanto, los efectos pro-apoptóticos de las drogas utilizadas fueron aditivos y/o Met aumentó la susceptibilidad a la apoptosis inducida por Cy, demostrando que ambas drogas actuarían mediante este mecanismo de acción. Dado que Feng Y y colaboradores demostraron que Met ejercería la estimulación apoptótica de una manera dosis-dependiente, en trabajos futuros se deberá estudiar el efecto de dosis de la droga más elevadas que las utilizadas en este proyecto.

En el experimento de Rattan R y colaboradores, sobre el estudio de las dosis de 100 y 200 mg/kg/día de Met, también analizaron proliferación y angiogénesis de un tumor de ovario. Para analizar la capacidad proliferativa de las células tumorales, realizaron una inmunohistoquímica para Ki-67 y también contaron células en mitosis mediante tinción de Hematoxilina-Eosina (HE). La tinción para Ki-67 no dio diferencias significativas entre los ratones tratados con la dosis de 100 mg/kg/día y los del grupo control, pero sí hubo diferencias cuando se utilizó la dosis de 200 mg/kg/día. Cuando contaron el índice mitótico, encontraron diferencias entre todos los ratones tratados y los controles, pero sin diferencias significativas entre las dos dosis utilizadas. Luego estudiaron la formación de nueva vasculatura intratumoral. La densidad vascular de los tumores tratados con Met fue

menor en comparación con los no tratados, como pudo verse por tinción anti-CD31 y tinción HE, y no hubo diferencias entre las dos dosis utilizadas (Rattan R et al., 2011). Shank JJ y su equipo estudiaron el rol de Met en cáncer de ovario. La droga fue estudiada como monoterapia y en combinación con Cisplatina (Cis). El análisis inmunohistoquímico de la expresión tumoral de CD31 resultó en una vasculatura reducida en los ratones tratados con Met + Cis en comparación con los tratados con Cis o en los controles. Met tuvo un comportamiento intermedio. Así mismo, las tasas de proliferación celular fueron menores en los ratones que recibieron las monoterapias y aún más reducidas en los tratados conjuntamente con Met + Cis (Shank JJ et al., 2012).

Sin embargo, existen trabajos que muestran otra cara de Met en la inhibición angiogénica. Phoenix KN y colaboradores estudiaron, tanto *in vivo* como *in vitro*, una línea celular de cáncer de mama negativa para ER α (MDA-MB-435). Ratones *nude* atímicos fueron inoculados con estas células y se distribuyeron en un grupo control y en otro que era tratado con 750 mg/kg/día de Met en el agua de bebida, continuamente desde la implantación del tumor. Midieron proliferación y angiogénesis en cortes fijados de tejido tumoral. El análisis de la capacidad proliferativa dio resultados similares a los obtenidos en los experimentos recién descritos. Contrariamente, los tumores tratados con Met demostraron tener el doble del número de vasos en comparación con los tumores controles. Este resultado fue complementado con el análisis de los valores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La tinción con anticuerpos anti-VEGF y la doble tinción anti-CD31 y anti-VEGF demostró que VEGF era casi inexistente en las áreas de buena vascularización de los tumores control, mientras que los tumores tratados tenían zonas significativas de tinción anti-VEGF directamente adyacentes a la microvasculatura tumoral (Phoenix KN et al., 2009). Un estudio novedoso de Dallaglio K y colaboradores, pareciera explicar estos resultados paradójicos de Met en células endoteliales y angiogénesis. En resumen, demostraron que Met tiene actividad anti-angiogénica *in vitro*

e *in vivo*, la cual estaría asociada con la inducción temporal de mediadores pro-angiogénicos y, simultáneamente, la inducción a largo plazo de mediadores inflamatorios. Además, descubrieron que Met inhibe las células precursoras endoteliales en la prevención contra el cáncer, pero principalmente en el contexto de obesidad. La modulación de las proteínas anti o pro-angiogénicas resultó ser diferencial entre células endoteliales y de cáncer de mama, probablemente debido, en parte, a que AMPK es regulada de forma diferente en células normales y tumorales (Dallaglio K et al., 2014). El tratamiento combinado Cy + Met demostró inhibir la capacidad proliferativa y la angiogénesis de las células tumorales del adenocarcinoma M-406, por lo que en el futuro podrán probarse diferentes dosis y esquemas de administración de Met, para poder estimular la actividad sinérgica de las drogas y conseguir un efecto antitumoral aún mayor.

La eliminación de CMC por Met también fue estudiada por varios grupos de investigación, así como su capacidad para inhibir la EMT. La mayor parte de estos trabajos fue llevada a cabo *in vitro*, a diferencia del presente trabajo. Hirsch HA y colaboradores demostraron, en cáncer de mama, que bajas dosis de Met podían inhibir la transformación celular y eliminar selectivamente las CMC. Diferentes líneas celulares fueron incubadas con Met, resultando en la eliminación selectiva de CMC del fenotipo CD44⁺CD24^{low} pero no del resto de las líneas. De hecho, si las mismas células tratadas por sólo una hora con Met eran inoculadas en ratones *nude*, no se desarrollaba ningún tumor. Luego, inocularon una línea de CMC en los ratones y éstos fueron tratados durante 15 días con inyecciones i.p. cada 5 días de 4 mg/kg de Dox, 100 µg/ml de Met o ambas. Si bien la monoterapia con Met casi no tuvo efecto sobre el volumen tumoral, Dox sí causó una disminución del volumen y el tratamiento combinado lo disminuyó mucho más, actuando las drogas sinérgicamente. Por último, midieron la población CD44⁺CD24^{low} por citometría de flujo en los tumores de los animales, y aquellos que habían sido tratados con Met + Dox ya no

tenían CMC, mientras que éstas podían ser fácilmente detectadas en los ratones que recibieron la monoterapia de Dox (Hirsch HA et al., 2009). Vázquez-Martin y colaboradores demostraron *in vitro* que Met era capaz de suprimir la EMT de las CMC de mama. Encontraron que esta droga inhibía varios factores de transcripción como TGF- β y, por lo tanto, eliminaba eficientemente las poblaciones de CMC que incluían células mesenquimales CD44⁺CD24^{low} y células epiteliales CD44⁺CD24⁺ con potencial para formación tumoral (Vázquez-Martin A et al., 2010). Los resultados del presente trabajo no presentaron diferencias significativas en los valores de la población CD44⁺CD24^{low} entre el grupo Testigo y el tratado con Cy + Met. Un amplio trabajo conducido por Liu Y y colaboradores aporta información útil que puede justificar, en parte, las discordancias obtenidas. Ellos estudiaron *in vivo*, *in vitro* y en células humanas, la falta de correlación de los marcadores de CMC en cáncer de mama. Demostraron que los marcadores individuales no siempre están expresados en todos los tipos de cáncer de mama ni se co-expresan en las mismas células. Por ejemplo, no todos los tumores contienen la población CD44⁺CD24^{low} o células enriquecidas en ALDH1. Por lo tanto, no existe ningún marcador universal que pueda identificar una población común de CMC de mama o una población resistente a terapia en todos los tipos, o incluso subtipos, de cáncer de mama (Liu Y et al., 2014). Tomando en cuenta estas observaciones junto con que las CMC de mama son una población altamente dinámica e influenciada por el microambiente que la rodea, la heterogeneidad de las CMC de mama refleja la diversidad de eventos oncogénicos, células de origen y factores del microambiente tumoral, que operan en un tipo de cáncer individual. Por estas razones, las poblaciones marcadas no deberían tener valor predictivo terapéutico. En el futuro, se deberá analizar una mayor cantidad de marcadores poblacionales, para poder sacar alguna conclusión sobre el desempeño de Met en la eliminación de las CMC.

CONCLUSIONES

El estudio de los efectos del tratamiento del adenocarcinoma de mama murino M-406 con Quimioterapia Metronómica (QTM), administrando Ciclofosfamida (Cy) y Metformina (Met), permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- El tratamiento combinado posee efecto antitumoral dado que disminuye la velocidad de crecimiento del tumor, disminuyendo también el desarrollo de metástasis pulmonares.
- El tratamiento combinado prolonga significativamente la supervivencia de los animales.
- El tratamiento con ambas drogas en dosis bajas, pero sin interrupciones, carece de toxicidad, una característica muy importante en el tratamiento oncológico, conocidas como son las toxicidades derivadas de la quimioterapia tradicional.
- Los mecanismos de acción responsables, al menos en parte, del efecto terapéutico obtenido serían tanto el incremento de la apoptosis como la disminución de la proliferación de las células tumorales. Asimismo se observó un descenso en el área ocupada por los vasos sanguíneos tumorales, confirmando el carácter anti-angiogénico de la QTM.
- No se observaron modificaciones, con el tratamiento, de la concentración de células madre del cáncer. Queda abierta la posibilidad de continuar profundizando en este tema, por medio de cambios en las dosis utilizadas de los fármacos y en las técnicas de detección de tales células.
- El tratamiento combinado fue globalmente más eficaz que los tratamientos individuales.
- Met es un fármaco reposicionado que podría tener utilidad clínica en el tratamiento del cáncer.

- El efecto terapéutico y la falta de toxicidad de la QTM con Cy + Met en un modelo de adenocarcinoma de mama, junto con la conveniencia de su administración oral y su bajo costo, sugieren su posible traslación a la clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Abri SA, Hayashi S, Thoren KL, Olson KR. Metformin overdose-induced hypoglycemia in the absence of other antidiabetic drugs. *Clin Toxicol (Phila)* 2013 Jun;51(5):444-7.
- André N, Fousseyni T, Banavali S, Pasquier E. Metronomic chemotherapy: a way forward for low income countries?. *Oncopedia* 2012. Accesible en URL: <http://metronomics.newethicalbusiness.org/Metronomic-Chemotherapy-in,184>. Consultada el 08 de octubre de 2014.
- Bach AG, Abbas J, Jasaabuu C, Schramm D, Wienke A, Surov A. Comparison between incidental malignant and benign breast lesions detected by computed tomography: a systematic review. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2013;57(5):529-33.
- Banissi C, Ghiringhelli F, Chen L, Carpentier AF. Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(10):1627-34.
- Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M, Gómez-Font R. Oral secondary effects of radiotherapy and chemotherapy in cancer of the cervicofacial region. *Med Clin (Barc)* 2013;141(2):77-81.
- Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auburger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 2008 Jun 5;27(25):3576-86.
- Berstein LM. Metformin in obesity, cancer and aging: addressing controversies. *Aging (Albany NY)* 2012 May;4(5):320-9.
- Bianco R, Melisi D, Ciardiello F, Tortora G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur J Cancer* 2006;42(3):290-4.

- Bicakli DH, Varol U, Degirmenci M, Tunali D, Cakar B, Durusoy R, Karaca B, Ali Sanli U, Uslu R. Adjuvant chemotherapy may contribute to an increased risk for metabolic syndrome in patients with breast cancer. *J Oncol Pharm Pract* 2014 Sep 17. pii: 1078155214551315.
- Billan S, Kaidar-Person O, Atrash F, Doweck I, Haim N, Kuten A, Ronen O. Toxicity of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil for advanced head and neck cancer. *Isr Med Assoc J* 2013;15(5):231-5.
- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 2005;5(11):899-904.
- Bodmer M, Meier C, Krähenbühl S, Jick SS, Meier CR. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care* 2010;33(6):1304-8.
- Bodmer M, Meier C, Krähenbühl S, Jick SS, Meier CR. Metformin, sulfonylureas, or other antidiabetes drugs and the risk of lactic acidosis or hypoglycemia: a nested case-control analysis. *Diabetes Care* 2008 Nov;31(11):2086-91.
- Bonelli P, Tuccillo FM, Borrelli A, Schiattarella A, Buonaguro FM. CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity. *Biomed Res Int* 2014;2014:361020.
- Bosco JL, Antonsen S, Sørensen HT, Pedersen L, Lash TL. Metformin and incident breast cancer among diabetic women: a population-based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(1):101-11.
- Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 2006; 29(2):254-8
- Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide enhances the

antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin Cancer Res* 2007;13(2 Pt 1):644-53.

- Brachat A, Pierrat B, Brüngger A, Heim J. Comparative microarray analysis of gene expression during apoptosis-induction by growth factor deprivation or protein kinase C inhibition. *Oncogene* 2000;19(44):5073-82.
- Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60(7):1878-86.
- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013;501(7467):338-45.
- Busaidy NL, Farooki A, Dowlati A, Perentesis JP, Dancey JE, Doyle LA, Brell JM, Siu LL. Management of metabolic effects associated with anticancer agents targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway. *J Clin Oncol* 2012 Aug 10;30(23):2919-28.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407(6801):249-57.
- Cejka D, Preusser M, Fuehrer T, Sieghart W, Werzowa J, Strommer S, Wacheck V. mTOR inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating chemotherapy in vivo. *Anticancer Res* 2008 Nov-Dec;28(6A):3801-8.
- Cerezo M, Tichet M, Abbe P, Ohanna M, Lehraiki A, Rouaud F, Allegra M, Giaccherio D, Bahadoran P, Bertolotto C, Tartare-Deckert S, Ballotti R, Rocchi S. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. *Mol Cancer Ther* 2013 Aug;12(8):1605-15.
- Chen TW, Liang YN, Feng D, Tao LY, Qi K, Zhang HY, Wang HX, Lin QS, Kong H. Metformin inhibits proliferation and promotes apoptosis of HER2 positive breast cancer cells by downregulating HSP90. *J BUON* 2013 Jan-Mar;18(1):51-6.

- Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(1):48-53.
- Ciurea ME, Georgescu AM, Purcaru SO, Artene SA, Emami GH, Boldeanu MV, Tache DE, Dricu A. Cancer stem cells: biological functions and therapeutically targeting. *Int J Mol Sci* 2014;15(5):8169-85.
- Cohnheim J. Ueber Entzündung und Eiterung. *Path Anat Physio Klin Med* 1867; 40:1–79.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008;358(5):502-11.
- Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009;52(9):1766-77.
- Daenen LG, Shaked Y, Man S, Xu P, Voest EE, Hoffman RM, Chaplin DJ, Kerbel RS. Low-dose metronomic cyclophosphamide combined with vascular disrupting therapy induces potent antitumor activity in preclinical human tumor xenograft models. *Mol Cancer Ther* 2009 Oct;8(10):2872-81.
- Dallaglio K, Bruno A, Cantelmo AR, Esposito AI, Ruggiero L, Orecchioni S, Calleri A, Bertolini F, Pfeffer U, Noonan DM, Albini A. Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis. *Carcinogenesis* 2014 May;35(5):1055-66.
- Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer* 2009;45 Suppl 1:27-40.
- Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3(11):1451-61.
- Del Barco S, Vazquez-Martin A, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Bosch-Barrera J, Joven J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget* 2011;2(12):896-917.

- Dickinson PD, Peel DN, Sundar S. Metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and dexamethasone in patients with metastatic carcinoma of the prostate. *Br J Cancer* 2012 Apr 10;106(8):1464-5.
- Dvinge H, Git A, Gräf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, Zhao Y, Hirst M, Armisen J, Miska EA, Chin SF, Provenzano E, Turashvili G, Green A, Ellis I, Aparicio S, Caldas C. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature* 2013;497(7449):378-82.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
- Fakhrejahani E, Toi M. Antiangiogenesis therapy for breast cancer: an update and perspectives from clinical trials. *Jpn J Clin Oncol* 2014;44(3):197-207.
- Feng Y, Ke C, Tang Q, Dong H, Zheng X, Lin W, Ke J, Huang J, Yeung SC, Zhang H. Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death Dis* 2014 Feb 27;5:e1088.
- Fidler IJ, Ellis LM. Chemotherapeutic drugs--more really is not better. *Nat Med* 2000;6(5):500-2.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.
- Fontana A, Galli L, Fioravanti A, Orlandi P, Galli C, Landi L, Bursi S, Allegrini G, Fontana E, Di Marsico R, Antonuzzo A, D'Arcangelo M, Danesi R, Del Tacca M, Falcone A, Bocci G. Clinical and pharmacodynamic evaluation of metronomic cyclophosphamide, celecoxib, and dexamethasone in advanced hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009 Aug 1;15(15):4954-62.
- Ganz PA, Greendale GA. Menopause and breast cancer: addressing the secondary health effects of adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19(14):3303-5.

- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34(2):336-44.
- Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, Chauffert B. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(5):641-8.
- Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(11):736-47.
- Guo Q, Lv Z, Fu Q, Jiang C, Liu Y, Lai L, Chen Q, Shen J, Wang Q. IFN- γ producing T cells contribute to the increase of myeloid derived suppressor cells in tumor-bearing mice after cyclophosphamide treatment. *Int Immunopharmacol* 2012;12(2):425-32.
- Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2000;105(8):1045-7.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
- Hilton HN, Doan TB, Graham JD, Oakes SR, Silvestri A, Santucci N, Kantimm S, Huschtscha LI, Ormandy CJ, Funder JW, Simpson ER, Kuczek ES, Leedman PJ, Tilley WD, Fuller PJ, Muscat GE, Clarke CL. Acquired convergence of hormone signaling in breast cancer: ER and PR transition from functionally distinct in normal breast to predictors of metastatic disease. *Oncotarget* 2014;5(18).

- Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7507-11.
- Instituto Nacional del Cáncer. Estadísticas: Análisis de la situación del cáncer en Argentina. Accesible en URL: <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>. Consultada el 08 de octubre de 2014.
- Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int* 2014;2014:852748.
- Jeon YW, Lim ST, Choi HJ, Suh YJ. Weight change and its impact on prognosis after adjuvant TAC (docetaxel-doxorubicin-cyclophosphamide) chemotherapy in Korean women with node-positive breast cancer. *Med Oncol* 2014 Mar;31(3):849.
- Jiao Q, Wu A, Shao G, Peng H, Wang M, Ji S, Liu P, Zhang J. The latest progress in research on triple negative breast cancer (TNBC): risk factors, possible therapeutic targets and prognostic markers. *J Thorac Dis* 2014;6(9):1329-35.
- Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(20):3297-302.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108(2):153-64.
- Kan CW, Howell VM, Hahn MA, Marsh DJ. Genomic alterations as mediators of miRNA dysregulation in ovarian cancer. *Genes Chromosom Cancer* 2014.
- Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4(6):423-36.
- Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer?. *Science* 2006;312(5777):1171-5.

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
- Klein CA. Cancer. The metastasis cascade. *Science* 2008;321(5897):1785-7.
- Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe SW, Kastan M, Giaccia A. Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* 2001;21(4):1297-310.
- Kourelis TV, Siegel RD. Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Med Oncol* 2012;29(2):1314-27.
- Kumar M, Nagpal R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Singh S, Marotta F, Jain S, Yadav H. Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment. *Acta Biomed* 2012;83(3):220-33.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178-96.
- Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, Groenier KH, Gans RO, Bilo HJ. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care* 2010;33(2):322-6.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortés ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Lee RS, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CW, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub TR, Gordenin DA,

- Sunyaev S, Lander ES, Getz G. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013;499(7457):214-8.
- Levri KM, Slaymaker E, Last A, Yeh J, Ference J, D'Amico F, Wilson SA. Metformin as treatment for overweight and obese adults: a systematic review. *Ann Fam Med* 2005 Sep-Oct;3(5):457-61.
 - Licchetta A, Correale P, Migali C, Remondo C, Francini E, Pascucci A, Magliocca A, Guarnieri A, Savelli V, Piccolomini A, Carli AF, Francini G. Oral metronomic chemo-hormonal-therapy of metastatic breast cancer with cyclophosphamide and megestrol acetate. *J Chemother* 2010 Jun;22(3):201-4.
 - Lissoni P, Brivio F, Fumagalli L, Messina G, Meregalli S, Porro G, Rovelli F, Vigorè L, Tisi E, D'Amico G. Effects of the conventional antitumor therapies surgery, chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy on regulatory T lymphocytes in cancer patients. *Anticancer Res* 2009;29(5):1847-52.
 - Liu Y, Nenuil R, Appleyard MV, Murray K, Boylan M, Thompson AM, Coates PJ. Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *Br J Cancer* 2014 Apr 15;110(8):2063-71.
 - Lo HW, Hsu SC, Hung MC. EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocation. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95(3):211-8.
 - Lopes F, Smith R, Anderson RA, Spears N. Docetaxel induces moderate ovarian toxicity in mice, primarily affecting granulosa cells of early growing follicles. *Mol Hum Reprod* 2014;20(10):948-59.
 - López-Lázaro M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* 2010;16(3-4):144-53.
 - Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21(3):485-95.

- Luo Q, Hu D, Hu S, Yan M, Sun Z, Chen F. In vitro and in vivo anti-tumor effect of metformin as a novel therapeutic agent in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012 Nov 14;12:517.
- Lyshchik A, Moses R, Barnes SL, Higashi T, Asato R, Miga MI, Gore JC, Fleischer AC. Quantitative analysis of tumor vascularity in benign and malignant solid thyroid nodules. *J Ultrasound Med* 2007;26(6):837-46.
- Ma J, Guo Y, Chen S, Zhong C, Xue Y, Zhang Y, Lai X, Wei Y, Yu S, Zhang J, Liu W. Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive breast carcinoma. *BMC Cancer* 2014 Mar 11;14:172.
- Ma J, Waxman DJ. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Mol Cancer Ther* 2008;7(12):3670-84.
- Mainetti LE, Rozados VR, Rossa A, Bonfil RD, Scharovsky OG. Antitumoral and antimetastatic effects of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide combined with celecoxib on murine mammary adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(1):151-63.
- Mainetti LE, Rico MJ, Fernández-Zenobi MV, Perroud HA, Roggero EA, Rozados VR, Scharovsky OG. Therapeutic efficacy of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin on murine mammary adenocarcinomas. *Ann Oncol* 2013;24(9):2310-6.
- Maiti R. Metronomic chemotherapy. *J Pharmacol Pharmacother* 2014;5(3):186-92.
- Malki A, Youssef A. Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling. *Oncol Res.* 2011;19(6):275-85.
- Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG. Th2/Th1 switch induced by a single-low dose Cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2002;50: 588-596.

- Matsen CB, Neumayer LA. Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA Surg* 2013;148(10):971-9.
- Mohan A, Ponnusankar S. Newer therapies for the treatment of metastatic breast cancer: a clinical update. *Indian J Pharm Sci* 2013;75(3):251-61.
- Montagna E, Canello G, Dellapasqua S, Munzone E, Colleoni M. Metronomic therapy and breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2014;40(8):942-50.
- Moore MA, Williams N, Metcalf D. In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells. *J Natl Cancer Inst* 1973;50(3):603-23.
- Munoz R, Man S, Shaked Y, Lee CR, Wong J, Francia G, Kerbel RS. Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. *Cancer Res* 2006 Apr 1;66(7):3386-91.
- Nabholz JM, Falkson C, Campos D, Szanto J, Martin M, Chan S, Pienkowski T, Zaluski J, Pinter T, Krzakowski M, Vorobiof D, Leonard R, Kennedy I, Azli N, Murawsky M, Riva A, Pouillart P; TAX 306 Study Group. Docetaxel and doxorubicin compared with doxorubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial. *J Clin Oncol* 2003 Mar 15;21(6):968-75.
- North RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* 1982;155(4):1063-74.
- Orecchioni S, Reggiani F, Talarico G, Mancuso P, Calleri A, Gregato G, Labanca V, Noonan DM, Dallaglio K, Albini A, Bertolini F. The biguanides metformin and

- phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Int J Cancer* 2014 Sep 6.
- Park SI, Liao J, Berry JE, Li X, Koh AJ, Michalski ME, Eber MR, Soki FN, Sadler D, Sud S, Tisdelle S, Daignault SD, Nemeth JA, Snyder LA, Wronski TJ, Pienta KJ, McCauley LK. Cyclophosphamide creates a receptive microenvironment for prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res* 2012 May 15;72(10):2522-32.
 - Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Fanciullino R, Pouchy C, Montero MP, Serdjebi C, Kavallaris M, André N. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* 2011;2(10):797-809.
 - Perroud HA, Rico MJ, Alasino CM, Queralt F, Mainetti LE, Pezzotto SM, Rozados VR, Scharovsky OG. Safety and therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib in advanced breast cancer patients. *Future Oncol* 2013 Mar;9(3):451-62.
 - Phoenix KN, Vumbaca F, Claffey KP. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ER α negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 2009 Jan;113(1):101-11.
 - Puglisi F, Minisini AM, Aprile G, Barbone F, Cataldi P, Artico D, Damante G, Beltrami CA, Di Loreto C. Balance between cell division and cell death as predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology* 2002;63(1):76-83.
 - Pustisek N, Situm M. UV-radiation, apoptosis and skin. *Coll Antropol* 2011;35 Suppl 2:339-41.
 - Qu Z, Zhang Y, Liao M, Chen Y, Zhao J, Pan Y. In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2012 Sep;42(9):922-33.

- Quaile MP, Melich DH, Jordan HL, Nold JB, Chism JP, Polli JW, Smith GA, Rhodes MC. Toxicity and toxicokinetics of metformin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010 Mar 15;243(3):340-7.
- Quintieri L, Selmy M, Indraccolo S. Metabolic effects of antiangiogenic drugs in tumors: therapeutic implications. *Biochem Pharmacol* 2014;89(2):162-70.
- Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 2009;41(1):40-7.
- Rass K, Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008;624:162-78.
- Rattan R, Ali Fehmi R, Munkarah A. Metformin: an emerging new therapeutic option for targeting cancer stem cells and metastasis. *J Oncol* 2012;2012:928127.
- Rattan R, Graham RP, Maguire JL, Giri S, Shridhar V. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* 2011 May;13(5):483-91.
- Reddy KB. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol* 2011;18(4): e173–e179.
- Rico MJ, Rozados VR, Mainetti LE, Zacarias Fluck MF, Matar P, Scharovsky OG. Regulatory T cells but not NKT I cells are modulated by a single low-dose cyclophosphamide in a B cell lymphoma tumor-model. *Exp Oncol* 2012;34(1):38-42.
- Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 2013;332(2):237-48.
- Rozados VR, Sánchez AM, Gervasoni SI, Berra HH, Matar P, Scharovsky OG. Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. *Ann Oncol* 2004;15(10):1543-50.

- Rozados VR, Mainetti LE, Rico MJ, Zacarías Fluck MF, Matar P, Scharovsky OG. The immune response and the therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide. *Oncol Res* 2010;18(11-12):601-5.
- Sakurai T, Kudo M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology* 2011;81 Suppl 1:24-9.
- Sánchez-Suárez P, Ostrosky-Wegman P, Gallegos-Hernández F, Peñarroja-Flores R, Toledo-García J, Bravo JL, Del Castillo ER, Benítez-Bribiesca L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutat Res* 2008;640(1-2):8-15.
- Scharovsky OG, Mainetti LE, Rozados VR. Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Curr Oncol* 2009;16(2):7-15.
- Scharovsky OG, Matar P, Rozados VR, Rico MJ, Zacarías Fluck MF, Mainetti LE, Fernández Zenobi MV, Roggero EA, Gervasoni SI, Rossa A, Perroud HA, Sánchez AM, Celoria GC, Font MT. Inmunomodulación y antiangiogénesis en la terapéutica oncológica. De la investigación básica a la clínica. *Medicina (B Aires)* 2011;71: 00-00.
- Schönthal AH. Direct non-cyclooxygenase-2 targets of celecoxib and their potential relevance for cancer therapy. *Br J Cancer* 2007;97(11):1465-8.
- Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JF. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 1975;116(3):129-38.
- Shaked Y, Emmenegger U, Francia G, Chen L, Lee CR, Man S, Paraghamian A, Ben-David Y, Kerbel RS. Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy. *Cancer Res* 2005 Aug 15;65(16):7045-51.

- Shank JJ, Yang K, Ghannam J, Cabrera L, Johnston CJ, Reynolds RK, Buckanovich RJ. Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 2012 Nov;127(2):390-7.
- Sharma BK, Srinivasan R, Kapil S, Singla B, Chawla YK, Chakraborti A, Saini N, Duseja A, Das A, Kalra N, Dhiman RK. Angiogenic and anti-angiogenic factor gene transcript level quantitation by quantitative real time PCR in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep* 2013;40(10):5843-52.
- Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J Mol Cell Biol* 2011; 3(1):1-3.
- Shimada T, Saito T, Okadome M, Shimamoto K, Ariyoshi K, Eto T, Tomita Y, Kodama K. Secondary leukemia after chemotherapy and/or radiotherapy for gynecologic neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2014;24(2):178-83.
- Shiraga E, Barichello JM, Ishida T, Kiwada H. A metronomic schedule of cyclophosphamide combined with PEGylated liposomal doxorubicin has a highly antitumor effect in an experimental pulmonary metastatic mouse model. *Int J Pharm* 2008 Apr 2;353(1-2):65-73.
- Shu Q, Li W, Li H, Sun G. Vasostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation, tube formation and induces cell apoptosis under oxygen deprivation. *Int J Mol Sci* 2014;15(4):6019-30.
- Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(9):579-90.
- Squartini F, Pingitore R. Tumours of the mammary gland. *IARC Sci Publ* 1994;(111):47-100.
- Tabruyn SP, Griffioen AW. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(1):1-5.

- Takeuchi A, Eto M, Yamada H, Tatsugami K, Naito S, Yoshikai Y. A reduction of recipient regulatory T cells by cyclophosphamide contributes to an anti-tumor effect of nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in mice. *Int J Cancer* 2012;130(2):365-76.
- Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010;70(14):5649-69.
- Tanaka H, Matsushima H, Nishibu A, Clausen BE, Takashima A. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. *Cancer Res* 2009;69(17):6987-94.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(3):231-41.
- Todorova VK, Kaufmann Y, Klimberg VS. Increased efficacy and reduced cardiotoxicity of metronomic treatment with cyclophosphamide in rat breast cancer. *Anticancer Res* 2011 Jan;31(1):215-20.
- Townson JL, Naumov GN, Chambers AF. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr Mol Med* 2003;3(7):631-42.
- Van der Most RG, Currie AJ, Cleaver AL, Salmons J, Nowak AK, Mahendran S, Larma I, Prosser A, Robinson BW, Smyth MJ, Scalzo AA, Degli-Esposti MA, Lake RA. Cyclophosphamide chemotherapy sensitizes tumor cells to TRAIL-dependent CD8 T cell-mediated immune attack resulting in suppression of tumor growth. *PLoS One* 2009;4(9):e6982.
- Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):237-51.
- Vázquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by

- transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle*. 2010 Sep 15;9(18):3807-14.
- Wang R, Qin S, Chen Y, Li Y, Chen C, Wang Z, Zheng R, Wu Q. Enhanced anti-tumor and anti-angiogenic effects of metronomic cyclophosphamide combined with Endostar in a xenograft model of human lung cancer. *Oncol Rep* 2012 Aug;28(2):439-45.
 - Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(12):718-30.
 - Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* 2013;123(8):3190-200.
 - Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011;11(7):512-22.
 - Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.
 - World Health Organization. Breast Cancer Burden. Accesible en URL: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>. Consultada el 08 de octubre de 2014.
 - Wu B, Li S, Sheng L, Zhu J, Gu L, Shen H, La D, Hambly BD, Bao S, Di W. Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. *Oncol Rep* 2012 Sep;28(3):903-8.
 - Wu N, Gu C, Gu H, Hu H, Han Y, Li Q. Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p38 MAPK pathway and GADD153. *Neoplasma* 2011;58(6):482-90.

- Xue H, Sawyer MB, Wischmeyer PE, Baracos VE. Nutrition modulation of gastrointestinal toxicity related to cancer chemotherapy: from preclinical findings to clinical strategy. *J Parenter Enteral Nutr* 2011;35(1):74-90.
- Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H. Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. *Breast Cancer* 2011;18(3):165-73.
- Yamauchi K, Yang M, Hayashi K, Jiang P, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Bouvet M, Hoffman RM. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy. *Cancer Res* 2008 Jan 15;68(2):516-20.
- Yanovski JA, Krakoff J, Salaita CG, McDuffie JR, Kozlosky M, Sebring NG, Reynolds JC, Brady SM, Calis KA. Effects of metformin on body weight and body composition in obese insulin-resistant children: a randomized clinical trial. *Diabetes* 2011 Feb;60(2):477-85.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados de esta tesis dieron origen a la publicación de los siguientes resúmenes:

- ❖ La quimioterapia metronómica (QTM) con Ciclofosfamida (Cy) y Metformina (Met) retrasa el crecimiento y aumenta la apoptosis del adenocarcinoma de mama murino M-406. Asad AS, Roggero EA, Rico MJ, Menacho-Márquez M, Rozados VR, Scharovsky OG. Resúmenes del XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. ISSN: 2314-1484. 2014.
- ❖ Metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and metformin inhibits tumor and metastasis growth M-406 murine mammary adenocarcinoma. Asad AS, Basualdo J, Micheletti L, Capello Gardenal MC, Perroud HA, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG. Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. ISSN: 0197-016X. 2014.
- ❖ Eficacia de tres esquemas de quimioterapia metronómica (QTM) con ciclofosfamida (Cy) y metformina (MET) en el tratamiento del adenocarcinoma mamario murino M-406. Basualdo J, Capello Gardenal MC, Asad AS, Micheletti L, Perroud HA, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG. Medicina (Buenos Aires) Vol. 73 (Supl.III): 186. ISSN: 0025-7680. 2013.

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

- ❖ La quimioterapia metronómica (QTM) con Ciclofosfamida (Cy) y Metformina (Met) retrasa el crecimiento y aumenta la apoptosis del adenocarcinoma de mama murino M-406. Asad AS, Roggero EA, Rico MJ, Menacho-Márquez M, Rozados VR, Scharovsky OG. XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina. Diciembre, 2014.

- ❖ Metronomic chemotherapy of mammary tumors in the pre-clinical and clinical settings. New insights for breast cancer treatment. Perroud HA, Mainetti LE, Rico MJ, Fernández Zenobi MV, Alasino CM, Pezzotto SM, Basualdo JO, Micheletti L, Rossa A, Asad AS, Rozados VR, Scharovsky OG. 4th Metronomic Chemotherapy Meeting. Milán, Italia. Junio, 2014.
- ❖ Metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and metformin inhibits tumor and metastasis growth M-406 murine mammary adenocarcinoma. Asad AS, Basualdo J, Micheletti L, Capello Gardenal MC, Perroud HA, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG. Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. San Diego, EEUU. Abril, 2014.
- ❖ Eficacia de tres esquemas de quimioterapia metronómica (QTM) con ciclofosfamida (Cy) y metformina (Met) en el tratamiento del adenocarcinoma mamario murino M-406. Basualdo J, Capello Gardenal MC, Asad AS, Micheletti L, Perroud HA, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS), XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Argentina. Noviembre, 2013.