

**ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA CON
METFORMINA Y CICLOFOSFAMIDA EN UN MODELO DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO TRIPLE NEGATIVO EN RATONES
SOMETIDOS A UNA DIETA RICA EN GRASAS**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 27 de junio de 2022

**ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA CON
METFORMINA Y CICLOFOSFAMIDA EN UN MODELO DE
ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO TRIPLE NEGATIVO EN RATONES
SOMETIDOS A UNA DIETA RICA EN GRASAS**

Trabajo Final de Grado
de la alumna

MAGDALENA LANZILLOTTA

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Lucas R. M. Brun
Evaluador

Daniel E. A. Francés
Evaluador

Sofía Perrone
Evaluadora

Fabiana García
Co-Directora

Leandro E. Mainetti
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 27 de junio de 2022

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie (1867 - 1934)

AGRADECIMIENTOS

Me decidí a estudiar Licenciatura en Genética el día que leí, en alguna noticia al paso, que la primera graduada de la UNNOBA estaba haciendo una investigación en cáncer de mama. Terminar la carrera investigando sobre este tema es para mí un verdadero honor. Pero los sueños no se cumplen solos, se logran con pasión, esfuerzo y perseverancia, gracias al apoyo de personas que ayudan y acompañan. Es por eso que quiero agradecer a quienes estuvieron presentes de un modo u otro a lo largo de este camino. A ellos les debo este título.

En primer lugar, a la universidad pública, mi querida UNNOBA, que durante mucho tiempo se transformó en mi segunda casa, y a mis docentes, no sólo por formarme en el ámbito académico, sino también por prepararme para salir al mundo.

A mis directores Lea y Fabi, por permitirme formar parte de su equipo, por compartirme sus conocimientos, por su enorme predisposición y paciencia. A Susi, mi tutora, por ser una destacada docente y consejera para sus alumnos a lo largo de toda la carrera.

A todo el grupo del Instituto de Genética Experimental (IGE) y del Laboratorio de Fisiología Metabólica (LaFiMe) por su colaboración, sus consejos y por hacerme sentir cómoda desde un principio. Particularmente a Manu y Tincho, mis grandes maestros, por guiarme, resolver mis dudas, enseñarme, hacerme reír a carcajadas y estar al lado mío durante todo el trabajo. A Graciela, un ejemplo de mujer en la ciencia, a quien admiro muchísimo, por su calidez humana. A Jose, Vivi, Anto, Vicky, Mati, Cele, Geral y Flavia por aportar cada uno su granito de arena para permitirme lograr el objetivo.

A Juli, mi compañera de Rosario, por escuchar una y mil veces mis repasos, y por regalarme una linda convivencia que voy a recordar con mucho cariño.

A mis compañeros de cursada, un grupo de gente hermosa que me enseñó que la universidad es mucho más que estudiar. Con ellos compartí momentos que nunca voy a olvidar: tardes enteras de biblioteca, mates con algo rico, salidas, risas y llantos; principalmente a Juani, Chu y Miche. En especial a Sofi y Li, quienes hoy son importantes amigas, por pintar este camino de colores, alegría y amor, por comprenderme mejor que nadie y darme fuerzas cada vez que lo necesité.

A mi gran amiga Agus por acompañarme a lo largo de toda la carrera, por mandar su mensajito antes y después de rendir, por sus palabras de aliento y contención.

A los grandes pilares de mi vida: papá, mamá y Pancho, por impulsar este camino, dándome la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, confiando en mí y festejando cada uno de mis logros. A mi abuela Piru, por esperarme con la comida calentita entre una clase y otra, y por ser la primera en llamar luego de cada examen. A Nico, por su paciencia y amor infinitos, por ser mi escape, mi momento de alegría y mi sostén en los momentos más difíciles. A Ivita, por prestarme sus resúmenes y todo lo que tuviera; a ella y a Valen, por su cariño y apoyo incondicionales. A Nanci, por estar siempre presente, mandando su energía a través de sus velitas y sahumerios mágicos. Al resto de mi familia grande, por motivarme durante todos estos años.

Gracias a todos por acompañarme en este viaje.

RESUMEN

Las dietas altas en grasas causan obesidad con alteraciones metabólicas, y están asociadas con la progresión del cáncer de mama. En particular el cáncer de mama triple negativo es muy heterogéneo y si se asocia a alteraciones metabólicas, tiene peor pronóstico, con lo cual las estrategias terapéuticas son limitadas. La quimioterapia metronómica, en contraste con la tradicional, se caracteriza por la administración crónica, a intervalos regulares, de fármacos quimioterapéuticos en dosis significativamente menores a la dosis máxima tolerada, sin períodos de descanso prolongados, con baja toxicidad. El reposicionamiento de fármacos es la utilización de fármacos existentes en aplicaciones terapéuticas diferentes para las cuales fueron diseñados. El tratamiento del cáncer con una combinación de ambos enfoques innovadores está direccionado tanto al tumor como a su microambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida y el fármaco en reposicionamiento metformina, en un modelo de tumor de mama murino triple negativo en ratones con alteraciones metabólicas generadas por una dieta con alto contenido graso (40% de calorías de grasa bovina durante 16 semanas). Se observó que el tratamiento con ciclofosfamida resultó efectivo en ratones sin patologías previas y, como aporte de este trabajo, también en animales obesos con alteraciones metabólicas asociadas. El esquema terapéutico resultó ser seguro, sin mostrar signos de toxicidad, incluso en los animales con patología de base. Asimismo, se dilucidaron parte de los mecanismos de acción involucrados, que incluyen inhibición de la proliferación celular tumoral, disminución de la hipoxia intratumoral y estimulación de la respuesta inmune. Por su parte, metformina no mejoró los parámetros metabólicos relacionados con la obesidad y tampoco agregó efecto terapéutico sobre la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida, al menos en las dos semanas de duración del tratamiento. Estos resultados, aunque parciales y acotados, podrían contribuir a una mejor comprensión del tratamiento de los pacientes con cáncer que padecen enfermedades metabólicas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer.....	1
1.1.2. Cáncer de Mama	1
1.1.3. Microambiente tumoral.....	2
1.2. Obesidad	5
1.2.1. Obesidad y alteraciones metabólicas	6
1.2.2. Modelo animal de obesidad inducido por la dieta	7
1.2.3. Obesidad y Cáncer	8
1.3. Modalidades Terapéuticas para el tratamiento del cáncer	9
1.3.1. Quimioterapia Metronómica	10
1.4. Reposicionamiento de Fármacos	11
1.5. <i>Metronomics</i>	12
1.6. Fármacos.....	12
1.6.1. Ciclofosfamida	12
1.6.2. Metformina	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
2.1. Hipótesis de Trabajo	15
2.2. Objetivo General.....	15
2.3. Objetivos Específicos	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Animales.....	16
3.2. Tumor.....	16
3.3. Fármacos.....	16
3.4. Dietas	16
3.5. Modelo experimental	17

3.5.1. Primera etapa: instauración del modelo de obesidad.....	17
3.5.2. Segunda etapa: desafío tumoral y tratamiento metronómico	18
3.6. Evolución del crecimiento tumoral.....	20
3.7. Análisis de toxicidad.....	20
3.8. Obtención de muestras y eutanasia.....	21
3.9. Determinaciones bioquímicas	22
3.10. Estudios Inmunohistoquímicos	22
3.11. Análisis estadísticos.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Primera etapa	24
4.2. Segunda etapa	28
4.2.1. Estudio del efecto antitumoral	28
4.2.2. Estudio de la toxicidad	30
4.2.3. Estudios bioquímicos.....	32
4.2.4. Estudio del mecanismo de acción	33
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	37
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El término “cáncer” designa a un amplio grupo de enfermedades crónicas que comienzan cuando el ciclo celular se descontrola, por la adquisición de alteraciones en el material genético de una célula, que produce cambios en el crecimiento y la división normales de la misma (Puglisi et al., 2002; Shen, 2011). La carcinogénesis es un proceso multifactorial que, eventualmente, da como resultado la aparición de distintas subpoblaciones de células malignas. Se trata de un proceso dinámico que avanza a través de etapas cualitativamente diferentes que comprenden Iniciación, Promoción y Progresión. Clínicamente, un tumor se caracteriza por la presencia de una masa de tejido anormal heterogéneo que crece progresivamente, y puede o no estar acompañado por distintos signos y síntomas, dependiendo del órgano que afecta (Burrell et al., 2013).

Según las estimaciones realizadas por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés: *International Association of Cancer Registries*) en base a datos disponibles a nivel mundial en el año 2020, su incidencia fue de 19.292.789 casos detectados. En Argentina es la segunda causa principal de muerte, luego de las enfermedades cardiovasculares y seguida por las respiratorias. Su incidencia en el año 2020 fue de 130.878 casos detectados, que se corresponde con una tasa de 218 casos por 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores), cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta y la ubica en el sexto lugar en Latinoamérica. El cáncer de mayor incidencia es el de mama, siendo las mujeres las principales afectadas, con una tasa de 73 casos por cada 100.000 mujeres, seguido por los cánceres de próstata en varones (42/100.000), colorrectales (25/100.000) y de pulmón (19/100.000) en ambos sexos (IARC, 2020).

1.1.2. Cáncer de Mama

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células de la mama. Según las estimaciones del Observatorio Global de Cáncer (GCO por sus siglas en inglés: *Global Cancer Observatory*) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el

cáncer de mama es el de mayor incidencia en Argentina: con más de 22.000 nuevos casos durante 2020, representa el 17% de todos los tumores malignos y casi un tercio (32%) de los cánceres en mujeres. Es una enfermedad que afecta a hombres y mujeres, siendo más frecuente en estas últimas, con una tasa de 73 casos nuevos por cada 100.000 habitantes (IARC, 2020). Ciertos factores aumentan el riesgo de cáncer de mama, incluidos el sexo, la edad, los antecedentes familiares, los antecedentes reproductivos, las mutaciones genéticas y un estilo de vida poco saludable (Matsen & Neumayer, 2013).

El cáncer de mama comprende un grupo heterogéneo de enfermedades que varían en morfología, biología, comportamiento y respuesta a la terapia (Rakha & Ellis, 2009). Casi todos los cánceres de mama son carcinomas porque se originan en las células epiteliales del tejido mamario. Dentro de los carcinomas, los adenocarcinomas son aquellos que surgen en tejidos glandulares, ya sea en los conductos o en los lóbulos de la mama (Weigelt & Reis-Filho, 2009). Entre los distintos subtipos de cáncer de mama, los llamados “triple-negativo” (TNBC, por sus siglas en inglés: *Triple-Negative Breast Cancer*) se caracterizan por la ausencia de expresión de los receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her-2/neu), y representan entre un 15 y 20 % de los cánceres de mama reportados (Bauer et al., 2007; Morris & Carey, 2007). Comparados con otros subtipos, éstos son más agresivos, invasivos, con mayor porcentaje de desarrollo de metástasis, recurrencias y mortalidad, afectando incluso a mujeres jóvenes (Carey et al., 2010). En la actualidad, las únicas opciones de tratamiento para los pacientes con TNBC son la cirugía, la quimioterapia estándar o adyuvante, la radioterapia o combinaciones de éstas, debido a que no pueden recibir terapias hormonales ni terapias dirigidas a blancos celulares. Por lo mencionado anteriormente, los TNBC están asociados a mal pronóstico, y el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento es una necesidad clínica urgente.

1.1.3. Microambiente tumoral

Hace más de dos décadas, Hanahan y Weinberg propusieron una serie de características biológicas (“sellos”) que adquieren las células tumorales durante las

distintas etapas de la carcinogénesis, que les permiten su crecimiento y diseminación (Hanahan & Weinberg, 2000). Los tumores no son masas aisladas de células cancerosas en proliferación, sino que son tejidos complejos y heterogéneos, formados por distintos tipos celulares que incluyen células endoteliales, pericitos, fibroblastos asociados a tumor, adipocitos, células madre y poblaciones leucocitarias, que interactúan entre sí. Por consiguiente, la definición tuvo que ampliarse para incluir el aporte del "microambiente tumoral" (Hanahan & Weinberg, 2011). En una revisión publicada en el año 2022, luego de distintos avances en el estudio del cáncer, Hanahan reformuló el concepto e introdujo nuevas características y factores habilitantes al esquema previo (Hanahan, 2022). Las características distintivas del cáncer comprenden la proliferación sostenida, la resistencia a los factores inhibidores del crecimiento, la evasión de la apoptosis, el potencial de replicación ilimitado, la inducción de la angiogénesis, la invasión y desarrollo de metástasis, la reprogramación metabólica y la evasión del sistema inmune. Actualmente se propuso como características emergentes el desbloqueo de la plasticidad fenotípica y la senescencia celular (**Figura 1**). La adquisición de estos "sellos" es posible por la presencia de factores habilitantes subyacentes tales como la inestabilidad genómica, que genera mutaciones aleatorias, el estado inflamatorio establecido por el sistema inmune, que promueve la progresión tumoral mediante distintos mecanismos, y probablemente también por los nuevos factores planteados, como la reprogramación epigenética no mutacional y los microbiomas polimórficos.

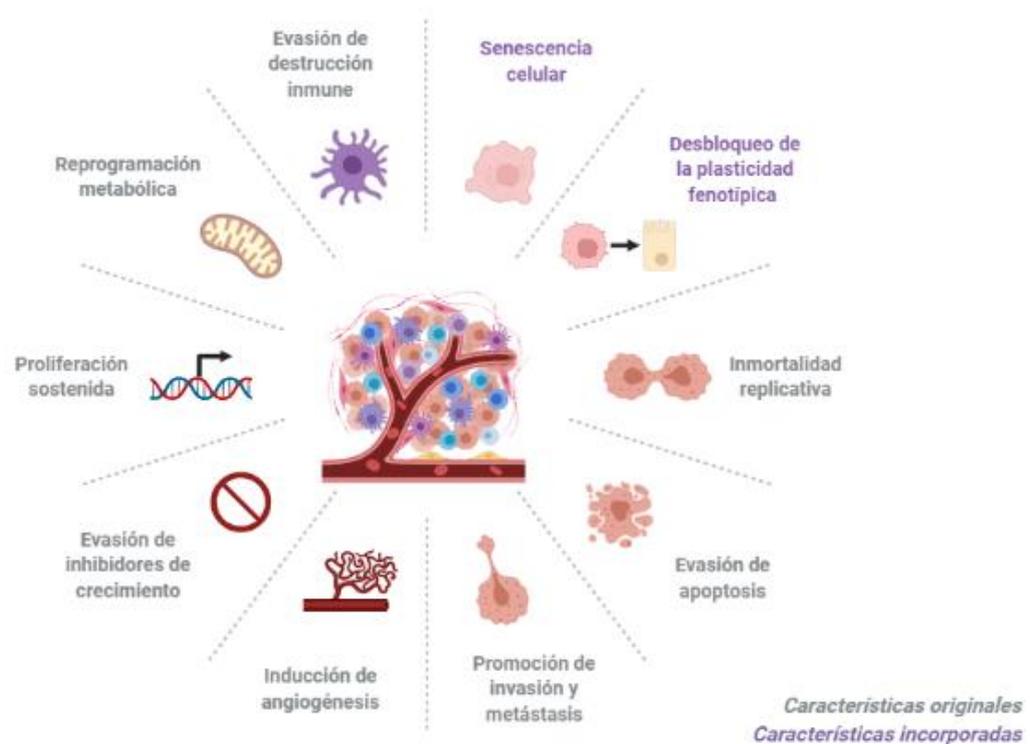


Figura 1: Características del tumor. Adaptado de (Hanahan, 2022) y modificado en BioRender.com

Una de las características principales de la célula tumoral es su alta tasa de proliferación, como consecuencia de mutaciones que ignoran las señales de control del ciclo celular y alteran el equilibrio homeostático del organismo.

Por otro lado, se sabe que el crecimiento tumoral es angiogénico-dependiente, es decir que requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales para nutrirse y oxigenarse (Folkman, 1971). La red vascular tumoral se caracteriza por vasos sanguíneos desorganizados, inmaduros y permeables, con importantes consecuencias para el microambiente tumoral, tales como hipoxia, disminución de infiltración de células inmunes y aumento de riesgo de metástasis (Viallard & Larrivé, 2017). A su vez, las condiciones hipóxicas, a través del aumento de los niveles del factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF1- α , del inglés *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*), estimulan la producción de factores angiogénicos por las células cancerosas y del estroma, que promueven la angiogénesis en un bucle de retroalimentación que se refuerza a sí mismo (Carmeliet & Jain, 2011). En este sentido, se han desarrollado estrategias anti-angiogénicas con el objetivo de inhibir la formación de nuevos vasos y/o destruir

vasos existentes para privar al tumor de sus nutrientes (Browder et al., 2000; Hanahan et al., 2000b; Jayson et al., 2016; Kerbel et al., 2002, 2013).

Con respecto al sistema inmune, éste juega un papel central en la progresión tumoral por el infiltrado de gran cantidad de células inmunitarias que interactúan dinámicamente con el microambiente circundante. Se trata de un proceso conocido como “Inmunoedición” (Dunn et al., 2004) que consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. Durante la fase de eliminación, las células inmunes desarrollan una respuesta inmunitaria antitumoral para erradicar las células tumorales; luego se establece un equilibrio entre la contención del tumor (por la muerte de células tumorales) y la presión inmune selectiva (que promueve la supervivencia de células resistentes al ataque inmune); finalmente, las células tumorales superan la presión inmune debido a su inestabilidad genética, y los clones tumorales seleccionados evitan la respuesta inmune y progresan (Cali et al., 2017). Respecto al control de los tumores por parte del sistema inmunológico, la primera línea de defensa adaptativa la ejercen los linfocitos T citotóxicos CD8⁺, capaces de promover la apoptosis de células tumorales. Al mismo tiempo, los linfocitos citotóxicos son estimulados por los linfocitos T colaboradores CD4⁺. Una pequeña subpoblación de linfocitos T CD4⁺, los T reguladores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg), presentan mecanismos supresores que regulan la respuesta inmune e inhiben la activación y proliferación de los linfocitos T efectores. La calidad y cantidad del infiltrado inmunológico en el sitio del tumor se ha aceptado como un marcador pronóstico de la progresión en una gran variedad de cánceres humanos (Galon et al., 2006, 2014).

Los avances acerca de la complejidad del tejido tumoral y sus características, impulsaron el diseño de distintas estrategias terapéuticas, dirigidas no sólo a eliminar las células neoplásicas, sino también a modificar el microambiente tumoral (Candeias & Gaip, 2016; Lee & Hong, 2017; Viallard & Larrivé, 2017).

1.2. Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. En términos generales, la obesidad corresponde a un desequilibrio del balance

energético en el cual el consumo supera el gasto de energía y, por lo tanto, aumentan las reservas de energía en la grasa corporal, particularmente en el tejido adiposo. La obesidad y el sobrepeso se definen mediante el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC): el peso expresado en kilogramos dividido por la altura expresada en metros elevada al cuadrado. Un IMC entre 25 y 29,9 kg/m² determina sobrepeso, mientras que un valor mayor o igual a 30 kg/m² es considerado obesidad (WHO, 2021).

Según datos de la OMS, desde el año 1980 la obesidad y el sobrepeso están aumentando a casi el triple en todo el mundo, alcanzando actualmente niveles de epidemia. En 2016, el 39% de las personas adultas tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas (WHO, 2021) y se estima que, de mantenerse esos indicadores, el 60% de la población adulta del mundo tendrá sobrepeso o será obesa en el 2030.

En la Argentina, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad a lo largo de los años muestra una tendencia ascendente en todos los grupos etarios y sociales, particularmente en los grupos en situación de mayor vulnerabilidad social (Ministerio de Salud de la República Argentina, 2017). En ese marco, en el año 2018, 6 de cada 10 adultos presentaron exceso de peso (sobrepeso + obesidad) y se registró obesidad en un cuarto de la población total (Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC), 2019).

1.2.1. Obesidad y alteraciones metabólicas

La obesidad es una consecuencia natural de la sobrealimentación y el sedentarismo. La obesidad persistente desregula los procesos metabólicos, incluida la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa-ácidos grasos libres y lípidos. Así comienza un cúmulo de condiciones: hiperglucemia, dislipidemia, hipertensión, conocido como síndrome metabólico (MetS, por su abreviatura en inglés: *Metabolic Syndrome*) (Grundy, 2003; Misra & Khurana, 2008). Tales anormalidades metabólicas son consideradas factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y algunos tipos de cáncer (Gallagher et al., 2011; Hariri & Thibault, 2010).

1.2.2. Modelo animal de obesidad inducido por la dieta

Los modelos animales murinos, especialmente los ratones, muestran, al igual que los humanos, una relación positiva entre la ingesta de grasas en la dieta y la obesidad (Hariri & Thibault, 2010). Se ha reportado la inducción de obesidad en roedores mediante dietas con diferentes porcentajes y fuentes de grasas; sin embargo, una de las dietas más utilizadas para inducir obesidad en animales consiste en enriquecer el alimento comercial con 40% de calorías de grasa animal (Buettner et al., 2007), para mimetizar la alimentación occidental, caracterizada por un consumo elevado de grasas y calorías (Steck & Murphy, 2020).

Los mecanismos moleculares por los que una dieta con alto contenido graso (HFD, del inglés *High Fat Diet*) promueve alteraciones metabólicas aún no están totalmente esclarecidos. No obstante, se sabe que la resistencia a la insulina es un vínculo en común entre los factores relacionados con su fisiopatología (Gallagher et al., 2011), los cuales ocurren principalmente a nivel del tejido adiposo, hígado, músculo e intestino. La administración de dietas HFD a ratones ha sido utilizada frecuentemente para la generación de modelos animales de obesidad con resistencia a la insulina y se ha asociado con hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, así como inflamación y estrés oxidativo en diferentes tejidos (Bader et al., 2020; Ecker et al., 2019; Kim et al., 2011).

En los estudios de obesidad y desorden metabólico inducido por la dieta es necesario tener en cuenta varias condiciones importantes, además del contenido graso del alimento: la edad de los animales, el sexo, la duración de la dieta, así como el control constante de las condiciones ambientales para minimizar la variabilidad de los datos. Así mismo la evaluación de la obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas presenta criterios particulares respecto a los utilizados en los seres humanos. Se basa en parámetros morfológicos como el aumento del peso corporal y el aumento del contenido de grasa corporal, y en el estudio de distintos parámetros metabólicos en los animales alimentados con HFD, en comparación con los animales control mantenidos con dietas normales o bajas en grasas (Hariri & Thibault, 2010).

Recientemente, nuestro grupo de investigación desarrolló y caracterizó el modelo de obesidad con las alteraciones metabólicas asociadas en ratones machos endocriados de la línea CBi (Hinrichsen & Di Masso, 2010) alimentados con HFD durante 16 semanas (Habib et al., 2018).

1.2.3. Obesidad y Cáncer

Es conocida la relación entre la obesidad causada por una dieta desbalanceada y la incidencia de tumores, incluido el cáncer de mama (Arcidiacono et al., 2012; Chen et al., 2016a; Godsland, 2010; Steck & Murphy, 2020). Asimismo, se considera a la obesidad como un factor de riesgo que aumenta el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Arnold et al., 2016; Renehan et al., 2010).

Particularmente, distintos trabajos han reportado la asociación entre la obesidad y sus alteraciones metabólicas con el desarrollo de cáncer de mama triple negativo (TNBC) (Davis & Kaklamani, 2012; Ecker et al., 2019; Maiti et al., 2010; Vona-Davis et al., 2008). Asimismo, se reportó que las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad se vinculan con un mal pronóstico en aquellas mujeres que presentan TNBC (Dietze et al., 2018) ya que favorece un mayor tamaño tumoral, mayor incidencia de metástasis y riesgo de recurrencia en sitios distantes (Vona-Davis et al., 2008).

Entre los posibles vínculos entre la obesidad y el cáncer se incluyen alteraciones en procesos endocrinos y metabólicos, que comprenden la producción de hormonas y citocinas capaces de promover el desarrollo de inflamación crónica y estrés oxidativo, procesos que favorecen el establecimiento de un microambiente ideal para el desarrollo del cáncer (Herrera-Covarrubias et al., 2015). El tejido adiposo es un órgano endocrino que produce gran cantidad de factores, tales como interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), resistina, lipoproteína lipasa, proteína de unión al retinol-4 (RBP4), estrógenos, leptina, angiotensinógeno, adiponectina y factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) (Gallagher et al., 2011). Las hormonas leptina, prolactina e insulina participan en la regulación del apetito, del metabolismo, del sistema inmune y cumplen una función fundamental en la génesis tumoral. Además, participan en la cascada de señalización de vías que regulan la expresión génica y mitogénica,

estimulando la proliferación celular. Por otro lado, se ha vinculado a la obesidad con un estado inflamatorio crónico, el cual se presenta como consecuencia del incremento del tejido adiposo. Las citocinas proinflamatorias secretadas por los adipocitos (TNF α , IL-1, IL-6, IL-18) atraen células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos que, a su vez, secretan estas moléculas mediante un ciclo de regulación positiva. Además, se alteran la diferenciación, la proliferación y el metabolismo de las células adiposas, y su acumulación ha sido asociada con la resistencia a la insulina. El estado inflamatorio crónico promueve los procesos carcinogénicos, estimula el crecimiento de las células tumorales y facilita la inestabilidad de su genoma, favoreciendo así la progresión y la diseminación del tumor. Por otra parte, contribuye a la generación de radicales libres, favoreciendo con esto a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su abreviatura en inglés: *reactive oxygen species*), vinculadas con el desarrollo de diversos tipos de cáncer, debido a su capacidad de dañar el ADN y contribuir a la mutagénesis y carcinogénesis (Arcidiacono et al., 2012).

1.3. Modalidades Terapéuticas para el tratamiento del cáncer

Actualmente, existen múltiples terapias contra el cáncer que se aplican solas o combinadas para aumentar su efectividad (Lissoni et al., 2009). En términos generales, el tratamiento se clasifica en dos grandes grupos. Las estrategias de control local son aquellas dirigidas a las células tumorales en un área determinada sin afectar al resto, e incluyen cirugía y radioterapia. Por otro lado, se encuentran las estrategias de control sistémico, en las que se administran medicamentos por vía oral o endovenosa; comprenden la quimioterapia, la hormonoterapia y la bioterapia, que abarca la terapia dirigida a blancos moleculares y la inmunoterapia (Moo et al., 2018; Nandini et al., 2021; Wu et al., 2021).

La quimioterapia fue introducida hace más de medio siglo para el tratamiento de varios tipos de cánceres avanzados o metastásicos. La misma consiste en el uso de fármacos en dosis altas, cercanas a la dosis máxima tolerada por el organismo, siendo administradas en ciclos repetidos, a intervalos de tiempo definidos, determinados principalmente por el período necesario para la recuperación del paciente frente a la toxicidad derivada de la terapia. Así, si bien la acción citotóxica

de la quimioterapia permite la destrucción de las células tumorales, es de administración sistémica, con lo cual puede dañar células sanas, generando efectos adversos que afectan la calidad de vida del paciente (Hanahan et al., 2000b, 2000a). Los más comunes son: náuseas y vómitos, pérdida de cabello, cambios en la médula ósea que llevan a inmunodepresión, cambios en la vida sexual y reproductiva, en la memoria y las emociones. Los períodos de descanso favorecen el crecimiento de las variantes celulares más malignas y generan resistencia al tratamiento; es posible que el paciente genere incluso nuevas neoplasias. Este conjunto de efectos secundarios requiere la implementación de estudios y tratamientos compensatorios, y en ocasiones la re-internación del paciente. Sumado al alto costo de los fármacos comúnmente utilizados, se elevan los gastos públicos en Salud asociados con la terapia (Dasari & Tchounwou, 2014).

1.3.1. Quimioterapia Metronómica

Como alternativa a la quimioterapia convencional, hace ya dos décadas, surgió la quimioterapia metronómica (QTM) (Hanahan et al., 2000b), estrategia que se caracteriza por la administración crónica, a intervalos regulares, de fármacos quimioterapéuticos en dosis significativamente menores a la dosis máxima tolerada, sin períodos de descanso prolongados. Este nuevo enfoque que “menos es más cuando se administra crónicamente”, se opone al paradigma terapéutico tradicional y ha resultado ser eficaz y presentar una toxicidad mínima (Kerbel et al., 2002; Malik et al., 2014; Perroud et al., 2016). Desde su implementación se reportaron profusos aportes científicos a nivel experimental para su aplicación tanto en tratamientos individuales como combinados (Mainetti et al., 2011, 2013; Rico et al., 2017; Rozados et al., 2004, 2010). Actualmente, se considera una alternativa válida para pacientes que progresaron a varias líneas de quimioterapia y, muy importante, se utiliza para cáncer pediátrico en países de ingresos bajos y medianos (Bottini et al., 2006; Canello et al., 2015; Dellapasqua et al., 2011; Kerbel et al., 2002; Nasr et al., 2015; Perroud et al., 2011, 2013; Petry et al., 2015; Scharovsky et al., 2020; Soriano et al., 2009).

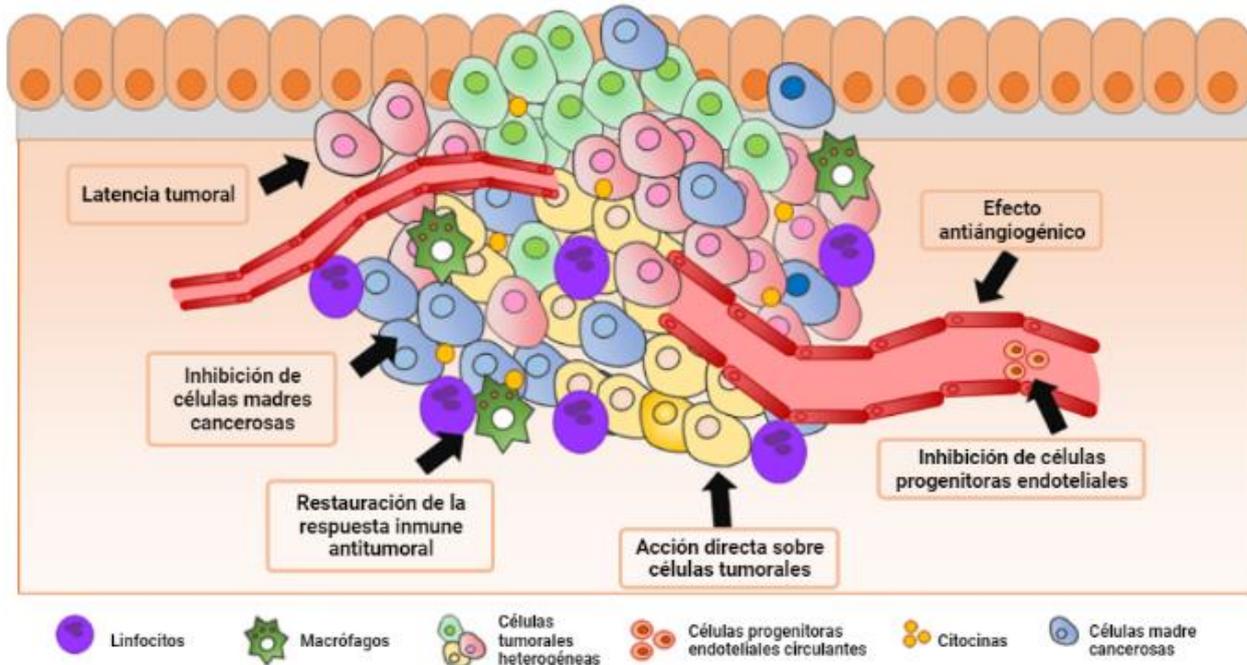


Figura 2: Mecanismos responsables del efecto terapéutico de la Quimioterapia Metronómica. Adaptado de (Scharovsky et al., 2020) y modificado en BioRender.com

El efecto terapéutico de la QTM se consigue principalmente mediante su acción antiangiogénica sobre los vasos sanguíneos tumorales, inhibiendo las células endoteliales circulantes (CEC) y las células endoteliales progenitoras (CEP). Otro mecanismo de acción consiste en la restauración de la respuesta inmune antitumoral, mediante la inhibición de las células Treg, así como de las células supresoras mieloides y la estimulación de las células dendríticas. También se han descrito como mecanismos probables del efecto terapéutico de la QTM: la inhibición de las células madre cancerosas (CSC), la inducción de la latencia tumoral e incluso un efecto antitumoral directo sobre las células tumorales **(Figura 2)** (Scharovsky et al., 2020).

1.4. Reposicionamiento de Fármacos

Hace algunos años se comenzó a utilizar una estrategia conocida como “reposicionamiento terapéutico”, que implica el uso de fármacos existentes en aplicaciones terapéuticas diferentes para las cuales fueron diseñados. El reposicionamiento de fármacos en oncología (ReDO, por sus siglas en inglés: *Repurposing Drugs in Oncology*) se refiere al uso de fármacos originalmente

formulados para otras indicaciones que mostraron potencial antitumoral. Los fármacos en reposicionamiento poseen dos ventajas fundamentales frente al desarrollo convencional: por un lado, los perfiles de farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad se conocen, hecho que reduce significativamente el tiempo y el costo necesarios para ser utilizados en la clínica; y por otro, que fueron aprobados para su aplicación en humanos (Cragg et al., 2014). Igualmente, como la mayoría de estos medicamentos tienen equivalentes genéricos, son menos costosos y más accesibles.

1.5. *Metronomics*

La QTM suele combinarse con el ReDO. Tal combinación, conocida en inglés como *metronomics*, permite la generación de tratamientos innovadores dirigidos a los tres compartimentos principales del microambiente tumoral (es decir, la vasculatura tumoral, el sistema inmune y las células tumorales) con distinta intensidad en el efecto de cada objetivo (la QTM con un efecto principalmente antiangiogénico y el ReDO directamente sobre las células tumorales) que finalmente conduce al control del cáncer (André et al., 2013).

Ambos enfoques comparten varias características que la convierten en una opción atractiva para el tratamiento del cáncer: presentan efecto terapéutico; baja toxicidad, con la consecuente mejora en la calidad de vida del paciente; menor tiempo de desarrollo y aplicación clínica, al utilizarse medicamentos conocidos y aprobados; bajo costo, al no requerir estudios e internaciones posteriores; por lo tanto y por último, pero no menos importante, la posibilidad de su uso en todos los países, incluso en aquellos con recursos económicos muy bajos (Scharovsky et al., 2020).

1.6. **Fármacos**

1.6.1. **Ciclofosfamida**

Ciclofosfamida (Cy) es un agente alquilante que ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de diferentes tipos de tumores, así como de enfermedades autoinmunes. Este fármaco se ha utilizado durante décadas y se sigue utilizando en la quimioterapia convencional en dosis altas, y es uno de los primeros y más

estudiados fármacos en la QTM en dosis bajas, como monoterapia o en combinación con otros fármacos, tanto en modelos experimentales como en protocolos clínicos, en el IGE (Mainetti et al., 2011, 2013a, 2013b, 2020; Perroud et al., 2011, 2016; Rico et al., 2014; Rozados et al., 2004, 2010) y en otros laboratorios (Dellapasqua et al., 2011; Kerbel et al., 2002; Nasr et al., 2015; Soriano et al., 2009). Con respecto al sistema inmune antitumoral, se ha observado un efecto paradójico de Cy sobre el mismo, que depende de la dosis y del esquema de administración: dosis altas de Cy producen reducción de las masas tumorales, pero son inmunosupresoras, y, en consecuencia, favorecen infecciones oportunistas o incluso segundas neoplasias. Por otro lado, la administración de dosis bajas ha demostrado potenciar la respuesta inmune, tanto en animales como en humanos, posibilitando en algunos casos la eliminación de tumores primarios (Scharovsky et al., 2012).

1.6.2. Metformina

Metformina (1,1-dimetilbiguanida; Met) es un fármaco de administración oral de primera elección en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Dowling et al., 2015). Su uso también ha sido aprobado para el tratamiento de la hiperglucemia y el MetS y como complemento en otras indicaciones tales como el síndrome de ovario poliquístico (Barco et al., 2011).

Numerosos estudios poblacionales retrospectivos han sugerido que Met administrada en pacientes diabéticos disminuye la incidencia y mortalidad del cáncer (Evans et al., 2005; Libby et al., 2009; Morantes-Caballero et al., 2017). Por otra parte, distintos estudios clínicos y preclínicos han señalado el potencial de este fármaco como agente antineoplásico (Barco et al., 2011; De & Kuppusamy, 2020; Gonzalez-Angulo & Meric-Bernstam, 2010; León-González et al., 2021; Martín-Castillo et al., 2010; Rico et al., 2017). Este efecto antineoplásico tendría dos vías de acción posibles: una vía indirecta, a través de su efecto antidiabético a nivel sistémico, y una vía directa sobre las células de cáncer. El efecto indirecto de Met está asociado con una reducción de los niveles circulantes de insulina, con la consecuente inhibición de la gluconeogénesis en el hígado y el aumento de la captación de glucosa en el músculo (Dowling et al., 2015), que disminuye el efecto

mitogénico y antiapoptótico de la insulina. De esta manera, Met reduce el efecto estimulante de la insulina sobre las células cancerosas. Los efectos directos de Met están relacionados con la inhibición del complejo mitocondrial I (Wheaton et al., 2014). Esta inhibición interrumpe la respiración mitocondrial, disminuyendo la síntesis de ATP impulsada por protones, causando estrés energético celular y elevación de la relación AMP/ATP que, a su vez, activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), una quinasa clave que detecta la energía celular. La activación de AMPK conduce a una reducción de la señalización, síntesis y proliferación de proteínas diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) (Rico et al., 2017).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis de Trabajo

La quimioterapia metronómica con ciclofosfamida y metformina es menos efectiva en ratones inoculados con tumor y alimentados con una dieta con alto contenido graso, por el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas asociadas, en comparación con ratones con tumor y alimentados con una dieta estándar.

2.2. Objetivo General

Evaluar el efecto de la quimioterapia metronómica en un modelo de tumor de mama murino triple negativo en ratones con alteraciones metabólicas generadas por una dieta con alto contenido graso.

2.3. Objetivos Específicos

- Evaluar el crecimiento tumoral en ratones machos adultos CBI, que fueron sometidos a una dieta rica en grasas durante 16 semanas, portadores del adenocarcinoma de mama triple negativo M-406, tratados con quimioterapia metronómica con ciclofosfamida combinada con metformina.
- Evaluar la posible toxicidad del tratamiento a través de la variación en el peso corporal de los animales, el recuento de glóbulos blancos, y signos y síntomas clínicos de toxicidad.
- Evaluar los posibles mecanismos de acción involucrados en el efecto de la quimioterapia metronómica: proliferación celular, regulación de la respuesta inmune y angiogénesis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Se utilizaron ratones machos adultos (5 semanas de edad de $32,91 \pm 0,40$ g de peso corporal) de la línea endocriada CBI del Bioterio del Instituto de Genética Experimental (IGE), Facultad de Ciencias Médicas, UNR (Hinrichsen & Di Masso, 2010). Los animales recibieron agua y alimento *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 de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Comité de Bioética y el Sub-comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

3.2. Tumor

El adenocarcinoma de mama M-406 es semidiferenciado de tipo B, triple negativo, de origen espontáneo que surgió en un ratón de la línea CBI (Hinrichsen & Di Masso, 2010). Se mantiene *in vivo* por injertos vía intraperitoneal (i.p.) en su huésped singeneico. Cuando el tumor se inocula por vía subcutánea (s.c.) la incidencia tumoral es del 100%.

3.3. Fármacos

- Ciclofosfamida (Laboratorio Filaxis SA, Argentina) (Cy): se diluyó hasta una concentración stock de 20 mg/ml en agua destilada estéril.
- Metformina (clorhidrato de metformina, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (Met): se disolvió en agua destilada y se conservó a -20°C .

Las soluciones stock de los fármacos fueron diluidas en el agua de bebida a las concentraciones finales requeridas para alcanzar las dosis diarias determinadas para cada fármaco. Las dosis de ambos fármacos se eligieron según la bibliografía, considerando su rango de efectividad y baja o nula toxicidad (Mainetti et al., 2011, 2020; Rico et al., 2017; Wheaton et al., 2014).

3.4. Dietas

- Dieta estándar (DE): alimento balanceado comercial estándar para roedores.

- Dieta HFD (HFD): alimento balanceado comercial estándar para roedores enriquecido con un 40% de calorías grasas provenientes del primer jugo bovino (Lambertucci et al., 2018).

3.5. Modelo experimental

El modelo experimental se dividió en dos etapas, ilustradas y detalladas a continuación.

3.5.1. Primera etapa: instauración del modelo de obesidad

En la primera etapa del experimento se estableció el modelo de obesidad inducido por la dieta, con las alteraciones metabólicas asociadas. El procedimiento ilustrado en la **Figura 3** se describe a continuación.

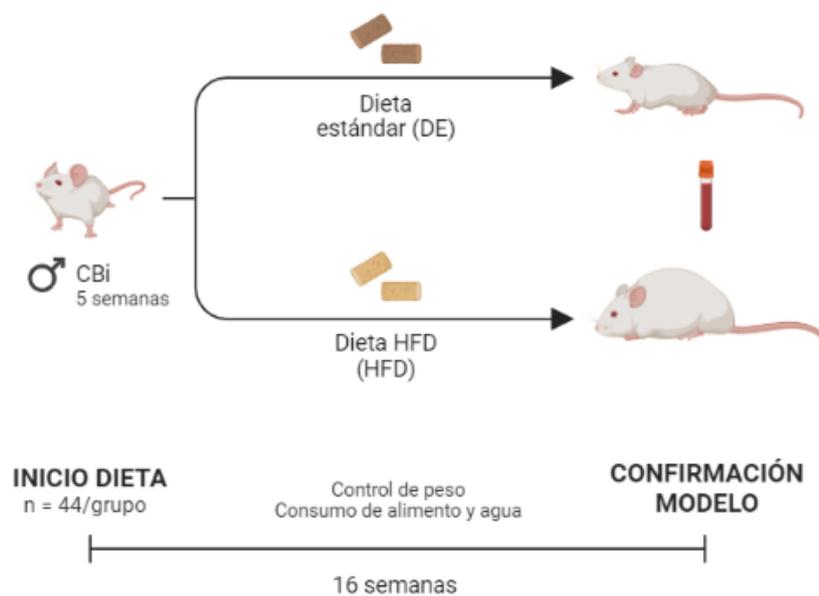


Figura 3: Esquema de la primera etapa del modelo experimental. Establecimiento del modelo de obesidad inducido por la dieta, con las alteraciones metabólicas asociadas. Creado en BioRender.com

Inicialmente los animales se distribuyeron al azar en dos grupos experimentales (n=44/grupo) según el tipo de dieta que recibieron.

- Grupo DE: alimentado con DE durante todo el experimento.
- Grupo HFD: alimentado con HFD durante todo el experimento.

Los animales se distribuyeron al azar en los dos grupos experimentales manteniendo homogeneidad en la distribución de los pesos corporales. Luego de 16 semanas de administración de la dieta se confirmó el establecimiento del modelo de obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas en el grupo HFD mediante la evaluación de parámetros morfológicos como la ganancia de peso corporal, así como de parámetros bioquímicos y metabólicos, en comparación con el grupo DE.

Las alteraciones metabólicas generadas por la dieta se evaluaron a través de una prueba de tolerancia a la insulina (ITT, por sus siglas en inglés: *insulin tolerance test*) (n=10/grupo). La prueba consistió en la inyección i.p. de insulina (0,75 UI/kg de peso corporal), previo ayuno de 6 horas, y la posterior medición de glucemia a partir de la sangre obtenida de la vena de la cola a los 15, 30, 45, 60 y 90 min luego de la inyección (glucemia basal: 0 min), utilizando un glucómetro con tiras reactivas (Accu-Chek, Roche).

Para los estudios bioquímicos y la medición del tejido adiposo (n=4/grupo), luego de 12 horas de ayuno, cuatro animales de cada grupo fueron anestesiados por vía intraperitoneal con ketamina: 87 mg/kg peso corporal; xilacina: 13 mg/kg peso corporal. Se extrajo la sangre por punción cardíaca, posteriormente, se realizó la eutanasia por dislocación cervical. Las muestras de sangre se centrifugaron (4°C, 8.000 rpm, 10 min) y el plasma obtenido se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. La glucemia fue medida con un glucómetro con tiras reactivas (Accu-Chek, Roche). Los niveles de colesterol total y triglicéridos séricos fueron determinados mediante kits comerciales (Wiener Lab., Rosario, Argentina), siguiendo las especificaciones del fabricante. Luego de una incisión abdominal, se extrajo y se pesó conjuntamente la grasa retroperitoneal y epididimal de cada animal.

3.5.2. Segunda etapa: desafío tumoral y tratamiento metronómico

Una vez establecido el modelo de obesidad con las alteraciones metabólicas asociadas inducido por la dieta, comenzó la segunda etapa del experimento. Durante este período se desafiaron los animales de ambos grupos con el tumor M-406 y posteriormente se inició el tratamiento metronómico, como se ilustra en la **Figura 4**.

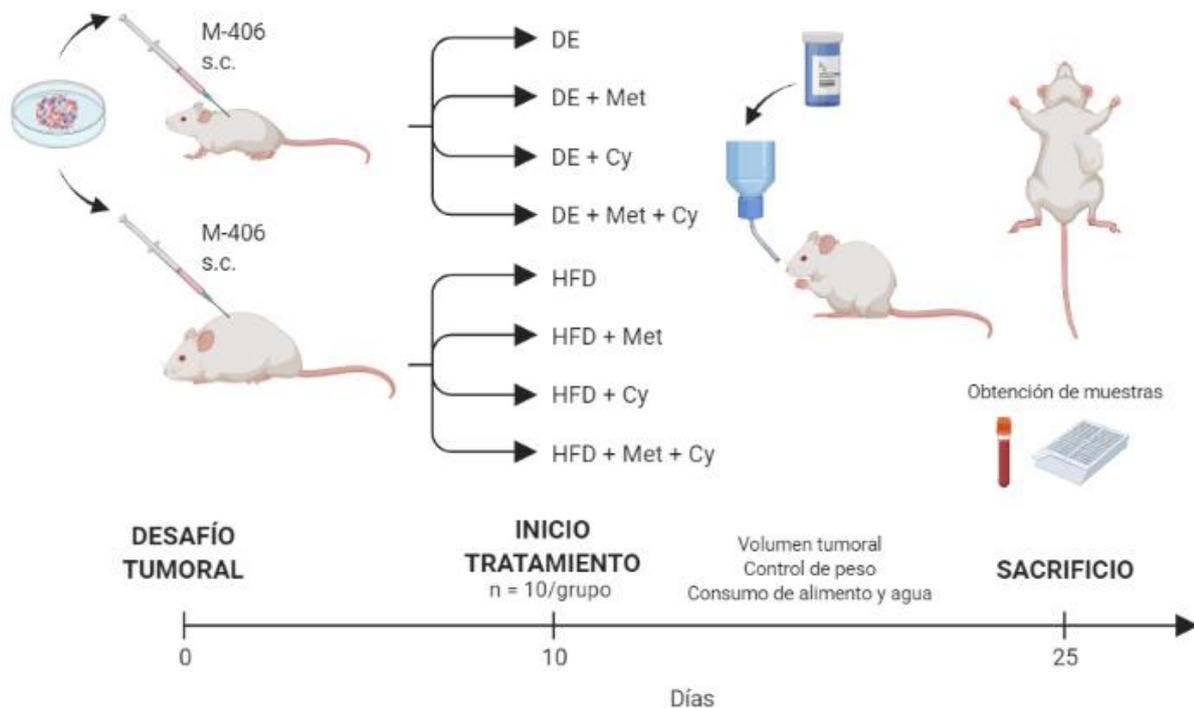


Figura 4: Esquema de la Segunda etapa del modelo experimental. Inoculación subcutánea de los tumores y posterior tratamiento metronómico de los animales. Creado en BioRender.com

En el día 0 de la segunda etapa, todos los animales fueron inoculados con M-406 en forma subcutánea con trócar en el flanco derecho. Cuando el tumor fue palpable (día 10), comenzó el tratamiento. Los ratones de cada uno de los 2 grupos anteriores (DE y HFD) fueron distribuidos al azar en 4 nuevos grupos, quedando definidos un total de 8 grupos experimentales (n=10/grupo) según la dieta y el tratamiento que recibieron en el agua de bebida.

- Grupo DE: alimentado con DE, testigo sin tratamiento ulterior.
- Grupo DE + Met: alimentado con DE, tratado con Met en el agua de bebida (dosis: 300mg/kg/día).
- Grupo DE + Cy: alimentado con DE, tratado con Cy en el agua de bebida (dosis: 25mg/kg/día).
- Grupo DE + Met + Cy: alimentado con DE, tratado con la combinación de Met + Cy en el agua de bebida.
- Grupo HFD: alimentado con HFD, testigo sin tratamiento ulterior.

- Grupo HFD + Met: alimentado con HFD, tratado con Met en el agua de bebida (dosis: 300mg/kg/día).
- Grupo HFD + Cy: alimentado con HFD, tratado con Cy en el agua de bebida (dosis: 25mg/kg/día).
- Grupo HFD + Met + Cy: alimentado con HFD, tratado con la combinación de Met + Cy en el agua de bebida.

El tratamiento, al igual que la dieta, se mantuvo en cada grupo hasta el momento del sacrificio. Se procedió al cambio de las botellas con los fármacos disueltos en el agua de bebida dos veces por semana. La dosis del fármaco ingerida por kg peso corporal se ajustó a partir de la medición del volumen restante en las botellas (Mainetti et al., 2011).

El día en que el primer ratón alcanzó el máximo volumen tumoral éticamente permitido (día 25), todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, previamente se anestesiaron y se les extrajo sangre por punción cardíaca. Se extrajo el tejido adiposo y muestras de tejido tumoral. La sangre y el tumor fueron utilizados para determinaciones serológicas, histológicas y bioquímicas.

3.6. Evolución del crecimiento tumoral

El volumen tumoral se determinó tres veces por semana. Se midió con calibre Vernier los diámetros mayor (a) y menor (b) de cada tumor para estimar el volumen tumoral (V) con la fórmula $V = (a \times b^2) \times 0,4$. El crecimiento del volumen tumoral se ajustó a una curva de crecimiento exponencial para los animales de todos los grupos, que permitió calcular el tiempo de duplicación tumoral, una variable inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento del tumor, utilizando el software GraphPad Prism® versión 7.00 (GraphPad Software, Inc). Los valores se representaron como la media \pm EE para cada grupo experimental.

3.7. Análisis de toxicidad

Se analizaron diferentes variables indicadoras de un posible efecto tóxico del tratamiento tales como la evolución del peso corporal, el recuento de glóbulos blancos, así como distintas características morfológicas y de comportamiento de los animales.

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 toxicidad cuando el peso corporal desciende 20% o más comparado con el peso antes de comenzar el tratamiento.

Por otro lado, se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola de los animales (n=5/grupo) al final del tratamiento, previo a la eutanasia, para realizar el recuento de glóbulos blancos en Cámara de Neubauer.

Asimismo, se controlaron distintas características morfológicas y de comportamiento de los ratones a lo largo de todo el experimento, tales como ingesta de comida y bebida, calidad del pelaje, actividad motora, conducta y respiración.

3.8. Obtención de muestras y eutanasia

Los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con ketamina: 87 mg/kg peso corporal; xilacina: 13 mg/kg peso corporal, con un ayuno previo de 12 horas. Luego se extrajo la sangre por punción cardíaca, posteriormente, se realizó la eutanasia por dislocación cervical para la disección y extracción de tejidos.

La sangre anticoagulada fue conservada a 4°C y centrifugada a 8.000 rpm por 10 min. El plasma obtenido se almacenó a -80°C para análisis bioquímicos posteriores.

Luego de una incisión abdominal, se extrajo y se pesó conjuntamente la grasa retroperitoneal y epididimal de cada animal. Asimismo, las muestras de tumores fueron fijadas en solución salina formolada al 10% por 24 horas a 4°C e incluidas en parafina. Se realizaron cortes con micrótopo de 5-6 µm de espesor, los cuales fueron sometidos posteriormente a tinciones con hematoxilina-eosina (HE) y análisis inmunohistoquímicos (IHC, por su abreviatura en inglés: *Immunohistochemistry*).

Los cortes de tejido tumoral teñidos con HE fueron utilizados para realizar una evaluación histológica, mediante la cual se analizó la integridad del tejido, regiones necróticas y presencia de infiltrado linfocitario, con el objetivo de seleccionar las zonas más aptas y/o las muestras mejor conservadas para realizar los análisis IHC.

3.9. Determinaciones bioquímicas

El plasma almacenado a -80°C fue utilizado para la determinación de distintos parámetros bioquímicos. La concentración de glucosa en plasma se midió utilizando un glucómetro con tiras reactivas (Accu-Chek, Roche). Para determinar los niveles de colesterol total y triglicéridos séricos se utilizaron kits comerciales (Wiener Lab., Rosario, Argentina), siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.10. Estudios Inmunohistoquímicos

Con el fin de realizar los análisis inmunohistoquímicos se desparafinaron los cortes histológicos de tejido tumoral previamente obtenidos ($n=4-6/\text{grupo}$). Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (Cicarelli) al 10% en H_2O_d durante 15 min y luego se bloquearon las reacciones no específicas con suero normal de caballo (Vectastain, Vector Laboratories) por 20 min. Para los lavados se utilizó H_2O_d , TBST (TBS1X, 0,1% Tween) o buffer Tris (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7,6) según correspondiera. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C con los anticuerpos primarios anti-CD4 (Santa Cruz Biotechnology, 1:400), anti-CD8 (Santa Cruz Biotechnology, 1:400), anti-Ki67 (Cell Signaling, 1:400), anti-HIF1 α (Invitrogen, USA, 1:5000) y anti-Foxp3 (eBioscience, 1:50). Al día siguiente, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario universal y reactivo ABC (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories), se revelaron con *DAB Substrate Kit* (BD PharmingenTM) y se realizó contratinción con hematoxilina. Finalmente se deshidrataron las muestras, se montaron con bálsamo y se visualizaron bajo el microscopio óptico.

Para llevar a cabo las IHC de los marcadores HIF1 α y Foxp3, al tratarse de factores de transcripción nucleares, requirió la permeabilización del tejido previo a comenzar, la cual se llevó a cabo mediante una solución de 0,2% Tritón-X100 en PBS durante 10 min. Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica con buffer citrato (10 mM citrato de sodio, pH 6) a 95°C durante 30 min. En el caso de Ki67, el primer paso fue el mencionado anteriormente, es decir, la recuperación antigénica con buffer citrato. Los protocolos para medir HIF1 α , Foxp3 y Ki67

continuaron con el bloqueo de la actividad peroxidasa y los sucesivos pasos, tal como se describió previamente.

Para cada marcador, se realizó el conteo de células positivas en 30 campos microscópicos consecutivos por corte de tejido tumoral, con una magnificación 1000X. Se evaluó la proliferación celular a través de la proporción de células Ki67+, la angiogénesis, mediante el marcador de hipoxia HIF-1 α y las distintas poblaciones linfocitarias CD4, CD8 y Foxp3. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism® versión 7.00 (GraphPad Software, Inc). Los resultados se expresan como mediana-rango del número de células positivas por campo.

3.11. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente según el tipo de variable en cuestión mediante el software GraphPad Prism® versión 7.00 (GraphPad Software, Inc). Para la comparación de variables paramétricas se empleó el test t-Student o el Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido por el test de Tukey, dependiendo del número de grupos experimentales a analizar (dos grupos o más de dos, respectivamente). La comparación de variables no paramétricas se llevó a cabo utilizando el test de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn, dependiendo del número de grupos experimentales a evaluar (dos grupos o más de dos, respectivamente). Se consideró que las diferencias son estadísticamente significativas a partir de un valor $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Primera etapa

Durante la primera etapa del experimento se controló semanalmente el peso corporal de los animales y dos veces por semana, el consumo de alimento y bebida. A partir de estos datos se calculó la ganancia de peso corporal y el consumo de calorías totales por animal. Estos resultados junto con los estudios bioquímicos y metabólicos fueron los parámetros considerados para el establecimiento del modelo de obesidad con las alteraciones metabólicas asociadas inducidas por la dieta.

El peso corporal inicial de los animales no difirió entre los grupos de estudio al inicio del experimento (n=44/grupo); DE ($33,38 \pm 0,51$ g) y HFD ($32,45 \pm 0,61$ g) (**Figura 5 y Tabla 1**). Los grupos DE y HFD presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el peso corporal a partir del día 78 (semana 11) en el que pesaron ($41,06 \pm 0,47$ g) y ($43,03 \pm 0,73$ g), respectivamente. Al final de esta etapa, los animales del grupo HFD presentaron mayor peso corporal ($46,76 \pm 0,86$ g) respecto a los del grupo DE ($41,03 \pm 0,45$ g) ($P < 0,0001$) (**Figura 5 y Tabla 1**). Para el análisis estadístico del peso corporal se utilizó el test t-Student.

En la **Figura 6** se muestra la ganancia de peso al final de la primera etapa, en la semana 16 (día 112), expresada como el porcentaje de peso corporal relativo al peso antes de iniciar la dieta. El grupo HFD presentó mayor ganancia de peso ($144,21 \pm 3,09$ %) respecto al grupo DE ($123,60 \pm 1,74$ %), con un valor $P < 0,0001$, analizado por el test de Mann-Whitney (**Tabla 1**).

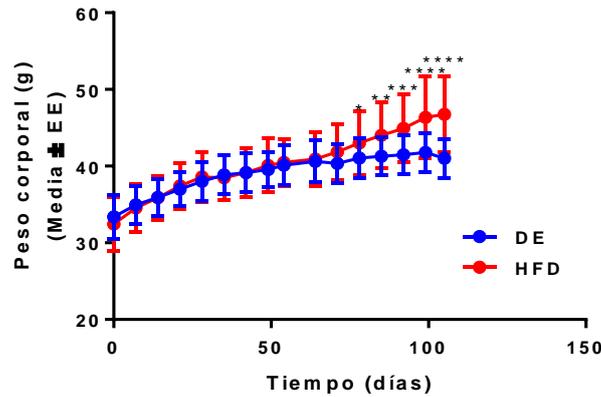


Figura 5: Evolución del peso corporal durante la primera etapa. Los datos se expresan como media \pm EE del peso corporal de 44 animales por grupo en función del tiempo de administración del alimento (16 semanas). Se empleó el test estadístico t-Student. Día 78: *, significativamente diferente de DE $P < 0,05$. Día 85: **, significativamente diferente de DE $P < 0,01$. Día 92: ***, significativamente diferente de DE $P < 0,001$. Días 99 y 112: ****, significativamente diferente de DE $P < 0,0001$. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido graso.

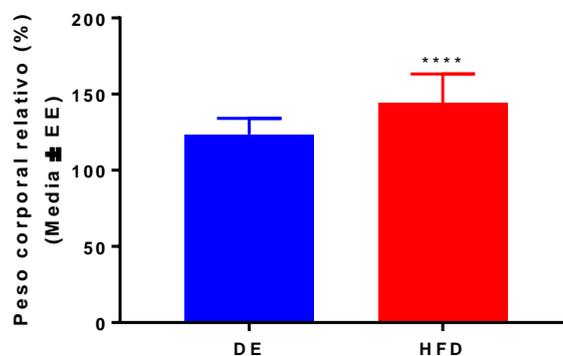


Figura 6: Ganancia de peso corporal al final de la primera etapa. Los datos se expresan como el porcentaje del peso corporal al finalizar las 16 semanas respecto al peso inicial de 44 ratones por grupo (media \pm EE). Se empleó el test estadístico de Mann-Whitney, ****, significativamente diferente de DE $P < 0,0001$. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido graso.

El consumo de alimento no mostró variaciones entre los grupos a lo largo de la primera etapa (**Figura 7A y Tabla 1**). No obstante, los animales del grupo HFD consumieron mayor cantidad de calorías ($3604 \pm 201,5$ kcal totales/animal) en comparación con los del grupo DE ($1575 \pm 36,06$ kcal totales/animal) ($P < 0,0001$) por el contenido de grasa del alimento suministrado (**Figura 7B y Tabla 1**). La ingesta de agua fue significativamente menor ($P < 0,0001$) en el grupo HFD ($6,29 \pm 0,07$ ml agua/día/animal) respecto del grupo DE ($8,09 \pm 0,09$ ml agua/día/animal)

(Figura 7C), posiblemente relacionado con el mayor contenido de humedad del alimento HFD. Para el análisis estadístico se utilizaron la prueba t-Student o el test de Mann-Whitney, dependiendo de la homogeneidad de las varianzas. Durante el tratamiento QTM realizado en la segunda etapa, las dosis de fármacos administradas no difirieron entre los grupos tratados (datos no mostrados), dado que se ajustaron periódicamente en función del agua consumida.

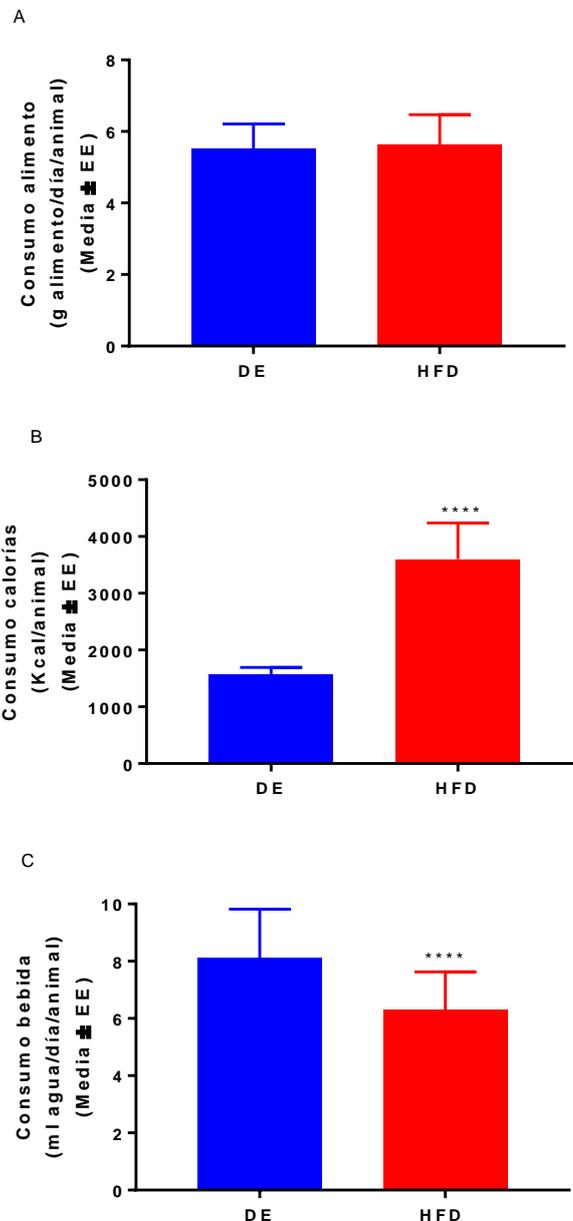


Figura 7: Consumo de alimento, calorías y bebida durante las 16 semanas de dieta. Los datos se expresan como media \pm EE de 44 ratones por grupo. Se empleó el test estadístico t-Student. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido de grasa. **A) Consumo de alimento** expresado como gramos de alimento consumidos por día, por animal. **B) Consumo de calorías** expresado como kilocalorías totales ingeridas por

animal. **C) Consumo de bebida** expresada como mililitros de agua bebidos por día, por animal. ****, significativamente diferente de DE $P<0,0001$.

Al finalizar la primera etapa se tomaron fotografías representativas de los ratones de ambos grupos experimentales. Se puede observar un aumento notable del tamaño corporal en el ratón alimentado con HFD en comparación con el animal alimentado con DE durante 16 semanas (**Figura 8**).



Figura 8: Fotografías representativas de los ratones CBI tomadas después de la administración durante 16 semanas de una dieta estándar DE (A) o dieta con alto contenido graso HFD (B).

El establecimiento del modelo se confirmó con la evaluación de parámetros bioquímicos y metabólicos al final de la primera etapa. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**, se puede observar que el grupo HFD presentó mayor contenido porcentual de tejido adiposo blanco (grasa total: retroperitoneal + epididimal) ($P<0,0001$), mayores niveles de glucemia ($P<0,0001$), colesterol total ($P<0,05$) y triglicéridos ($P<0,0005$) en relación con el grupo DE. La ITT mostró un menor descenso porcentual de la glucemia en los animales HFD respecto al grupo DE ($P<0,05$). El nivel de significancia de los datos se analizó mediante la prueba t-Student o el test de Mann-Whitney, dependiendo del tipo de distribución de los datos.

PARÁMETROS	GRUPO DE (media ± EE)	GRUPO HFD (media ± EE)	
PESO CORPORAL INICIAL (g)	33,38 ± 0,51	32,45 ± 0,61	P ns
PESO CORPORAL FINAL (g)	41,03 ± 0,45	46,76 ± 0,86	P<0,0001
GANANCIA DE PESO (%)	123,60 ± 1,74	144,21 ± 3,09	P<0,0001
GRASA TOTAL (%)	2,40 ± 0,54	7,45 ± 0,67	P<0,0001
CONSUMO ALIMENTO (g/día/animal)	5,51 ± 0,04	5,62 ± 0,05	P=ns
CONSUMO CALORÍAS (kcal totales/animal)	1575,00 ± 36,06	3604,00 ± 201,50	P<0,0001
GLUCEMIA (mg/dL)	89,00 ± 17,59	138,60 ± 16,09	P<0,0001
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	115,30 ± 42,67	165,00 ± 34,51	P<0,05
TRIGLICÉRIDOS (mg/dL)	52,22 ± 11,67	81,89 ± 19,07	P<0,0005
ITT (%)	33,09 ± 21,18	22,06 ± 13,84	P<0,05

Tabla 1: Parámetros morfológicos y bioquímicos analizados al final de las 16 semanas de administración de la dieta. Los resultados se presentan como media ± EE. Se utilizó la prueba estadística no paramétrica U de Mann Whitney o la prueba paramétrica T-Student según corresponda. ns: no significativo. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido graso.

4.2. Segunda etapa

Durante la segunda etapa del experimento se desafió a los animales con el tumor M-406 y se sometieron al tratamiento metronómico con Cy y/o Met. Durante este período se evaluaron diferentes aspectos de la terapia: el efecto antitumoral, la toxicidad, estudios bioquímicos y un posible mecanismo de acción del tratamiento.

4.2.1. Estudio del efecto antitumoral

- Volumen tumoral

La evolución del volumen tumoral de los diferentes grupos se encuentra graficada en la **Figura 9** como la curva de ajuste exponencial para cada grupo. Los datos se expresan en cm³ (media ± EE). Para el análisis estadístico se realizó la prueba de

Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. Al final del tratamiento (día 25), el grupo DE + Cy presentó un volumen tumoral medio ($1,32 \pm 0,23 \text{ cm}^3$) menor en comparación con el grupo testigo DE ($4,20 \pm 0,77 \text{ cm}^3$) ($P < 0,01$) (**Figura 9A**). Por el contrario, el grupo DE + Met + Cy no presentó diferencias significativas en el volumen tumoral ($2,38 \pm 0,41 \text{ cm}^3$) con respecto al grupo DE ($4,20 \pm 0,77 \text{ cm}^3$). Por otra parte, los grupos HFD + Cy ($1,11 \pm 0,18 \text{ cm}^3$) y HFD + Met + Cy ($1,57 \pm 0,29 \text{ cm}^3$) presentaron menores volúmenes tumorales al finalizar el tratamiento respecto al grupo HFD testigo ($5,50 \pm 0,67 \text{ cm}^3$) ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente) (**Figura 9B**). Diferencia que se mostró estadísticamente significativa a partir del día 21 ($P < 0,05$). Con respecto a Met, no se observó un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral en los grupos de estudio durante el tratamiento.

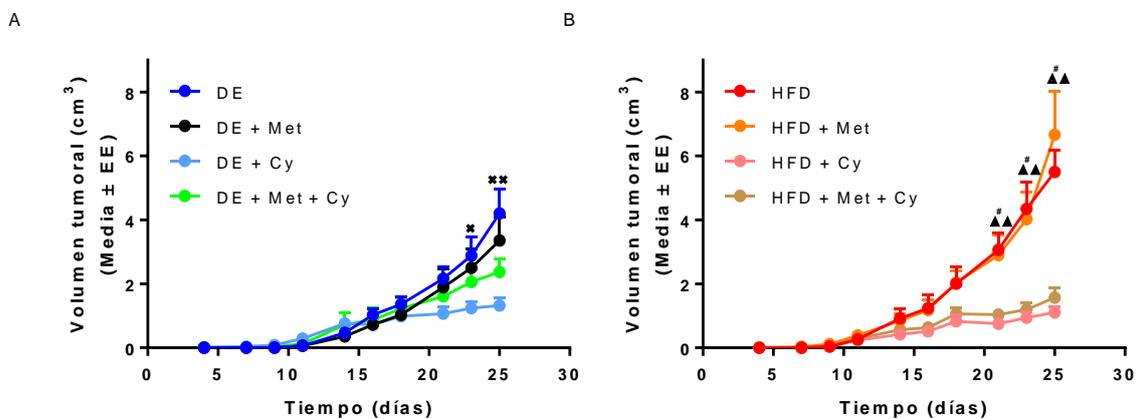


Figura 9: Evolución del volumen tumoral de los grupos alimentados con dieta estándar DE (A) o alta en grasas HFD (B). En ambos casos se graficó la evolución del volumen tumoral a lo largo del tiempo para 10 ratones de cada grupo. Los datos se expresan como (media \pm EE) cm^3 . Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. Met: metformina. Cy: ciclofosfamida. A) Día 23: *, DE+Cy significativamente diferente de DE $P < 0,05$. Día 25: **, DE+Cy significativamente diferente de DE $P < 0,01$. B) Días 21, 23 y 25: #, HFD+Met+Cy significativamente diferente de DE $P < 0,05$. $\Delta\Delta$, HFD+Cy significativamente diferente de DE $P < 0,01$.

- Tiempo de duplicación tumoral

A partir de las curvas de ajuste del crecimiento exponencial se calculó el tiempo medio de duplicación del volumen tumoral, el cual varía en forma inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento del tumor (**Figura 10**). Los datos se

expresan como (media \pm EE) días. El análisis de los datos dentro de cada dieta mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn confirmó que el tiempo de duplicación del tamaño tumoral fue mayor en el grupo DE + Cy ($7,61 \pm 0,86$ días) en comparación con el grupo testigo DE ($3,93 \pm 0,19$ días) ($P < 0,01$) (**Figura 10A**), y en los grupos HFD + Cy ($6,53 \pm 0,62$ días) y HFD + Met + Cy ($6,33 \pm 0,50$ días) respecto del grupo testigo HFD ($3,94 \pm 0,37$ días) ($P < 0,05$ en ambos casos) (**Figura 10B**).

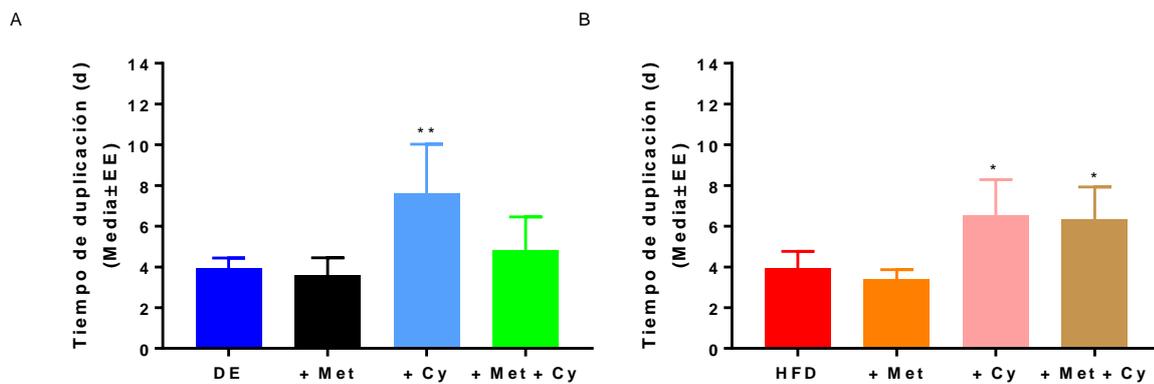


Figura 10: Tiempo de duplicación tumoral de los grupos alimentados con dieta estándar DE (A) o alta en grasas HFD (B). Los datos se expresan como (media \pm EE, 10 ratones por grupo) días. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. A) **, significativamente diferente de DE $P < 0,01$. B) *, significativamente diferente de HFD $P < 0,05$. Met: metformina. Cy: ciclofosfamida.

4.2.2. Estudio de la toxicidad

Para evaluar la posible toxicidad del tratamiento se analizaron distintos parámetros indicadores, como disminución del peso corporal, recuento de glóbulos blancos, y determinadas características morfológicas y de comportamiento de los ratones. En relación con esto último, no se observaron cambios evidentes en la ingesta de comida y bebida, actividad motora, conducta y frecuencia respiratoria de los animales tratados con los fármacos durante la QTM.

Es importante mencionar que la calidad del pelaje desmejoró en todos los grupos alimentados con HFD en relación a los alimentados con DE debido al alto contenido graso de la dieta, pero no fue indicador de toxicidad del tratamiento QTM (datos no mostrados).

● Evolución del peso corporal

Las modificaciones en el peso corporal de los ratones a lo largo del tratamiento se expresaron como el porcentaje del peso corporal respecto al peso al iniciar la terapia. Se considera toxicidad cuando el peso corporal desciende 20% o más comparado con el peso antes de comenzar el tratamiento. En la **Figura 11** se muestra la representación gráfica de la evolución del peso relativo de los ratones, se observa un descenso de peso menor al 10% en el grupo DE + Cy hacia el final del experimento (**Figura 11A**). Asimismo, el grupo HFD + Met + Cy disminuyó un 10% su peso corporal desde el inicio de la terapia (**Figura 11B**), porcentaje que no reflejaría signo de toxicidad.

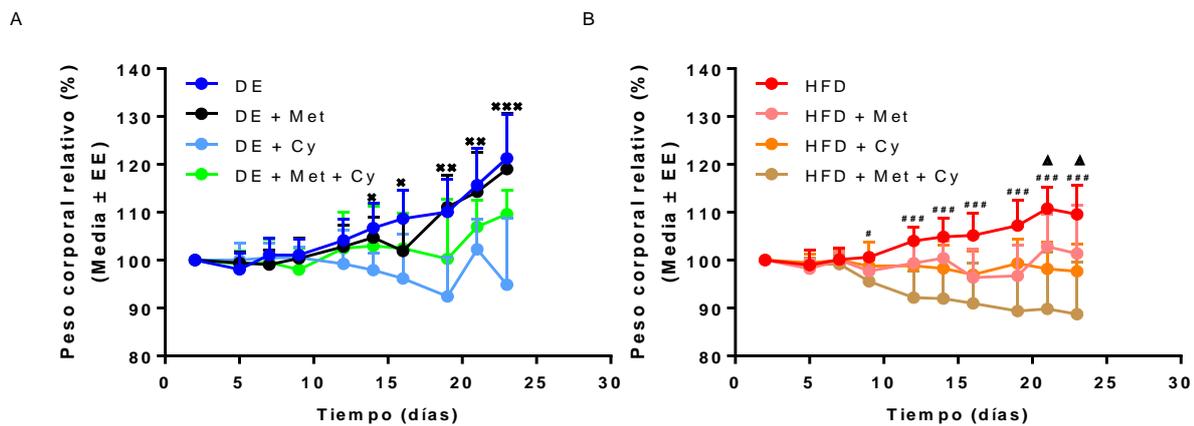


Figura 11: Evolución del peso corporal de los ratones alimentados con dieta estándar DE (A) o alta en grasas HFD (B) y tratados con QTM. Los datos se expresan como media ± EE del porcentaje de peso corporal respecto al peso inicial (100%) de 10 ratones por grupo. Se realizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido por el test de Tukey. Met: metformina. Cy: ciclofosfamida. A) Días 14 y 16: *, DE+Cy significativamente diferente de DE P<0,05. Días 19 y 21: **, DE+Cy significativamente diferente de DE P<0,01. Día 23: ***, DE+Cy significativamente diferente de DE P<0,001. B) Día 9: #, HFD+Met+Cy significativamente diferente de DE P<0,05. Días 12 a 23: ###, HFD+Met+Cy significativamente diferente de DE P<0,001. Días 21 y 23: Δ, HFD+Cy significativamente diferente de DE P<0,05.

● Recuento de glóbulos blancos

Otro parámetro de toxicidad del tratamiento metronómico fue el recuento del número de glóbulos blancos circulantes entre los grupos al final de la terapia. En la **Figura 12** se muestra la cantidad de glóbulos blancos presentes expresada como

número de células por ml de sangre. Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos para esta variable.

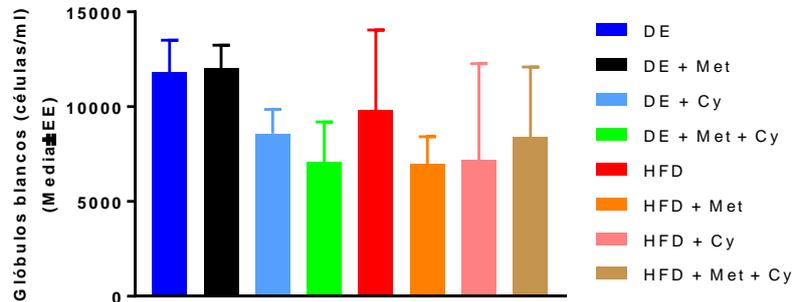


Figura 12: Recuento de glóbulos blancos al final del tratamiento. Los datos se expresan como (media \pm EE) cantidad de células por ml de sangre de 5 ratones por grupo. Se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido de grasa.

4.2.3. Estudios bioquímicos

Con el objetivo de determinar si el tratamiento metronómico tuvo algún efecto sobre los parámetros bioquímicos y fisiológicos inducidos por la dieta se procedió a determinar la glucemia, colesterolemia, trigliceridemia y el contenido de grasa total (retroperitoneal + epididimal) al final del experimento. En todos los casos se utilizó el test t-Student como análisis estadístico para comparar el efecto de la dieta HFD respecto a la alimentación estándar entre los valores obtenidos de los 4 grupos experimentales agrupados dentro de cada dieta. Se observó que tanto los parámetros bioquímicos como los depósitos lipídicos totales no se vieron modificados respecto del análisis realizado previo a la inoculación tumoral, es decir que se mantuvieron altos los niveles de glucemia, colesterolemia, trigliceridemia y la masa adiposa blanca en los grupos de animales con dieta rica en grasas en relación con aquellos alimentados con dieta comercial estándar (**Figura 13**).

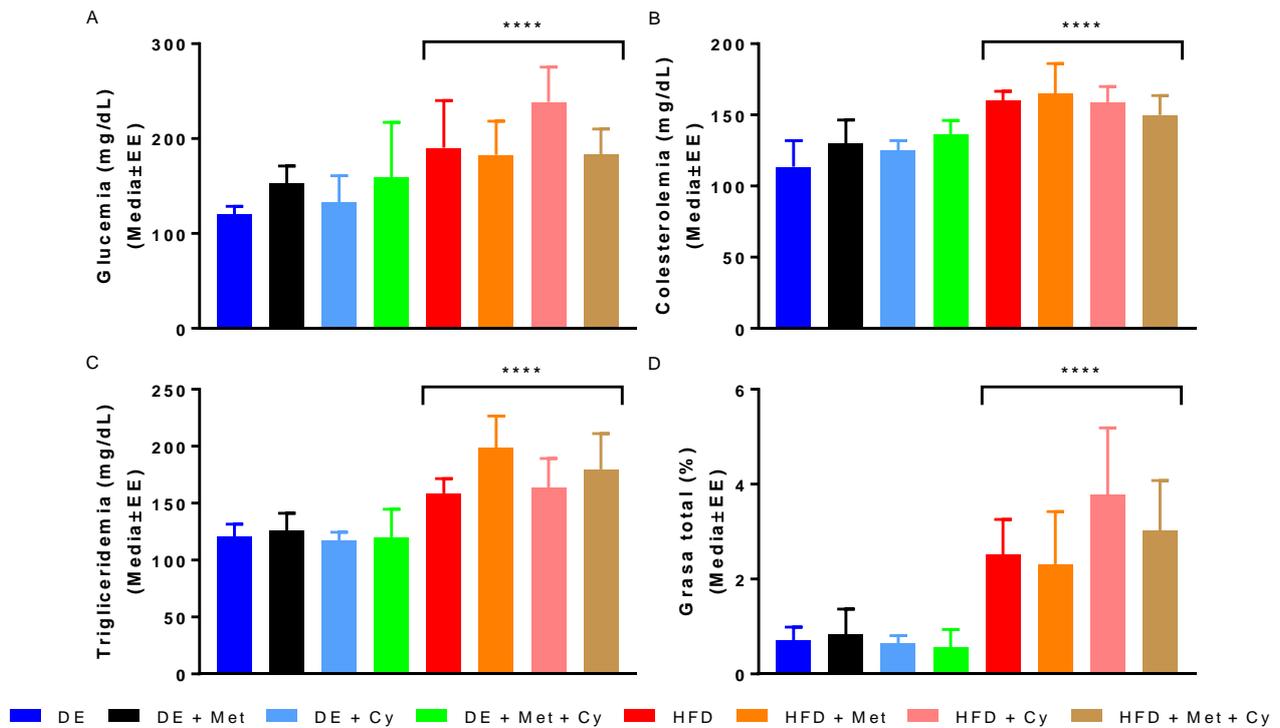


Figura 13: Parámetros bioquímicos y fisiológicos al final del tratamiento. Los resultados se expresan como media \pm EE de 40 ratones por dieta. En todos los casos se realizó el test t-Student para la comparación entre los 4 grupos experimentales agrupados dentro de cada dieta. ****, significativamente diferente de DE $P < 0,0001$. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido de grasa.

4.2.4. Estudio del mecanismo de acción

Para evaluar el posible mecanismo de acción de la terapia metronómica, al finalizar el experimento, se llevaron a cabo técnicas inmunohistoquímicas (IHC) sobre cortes histológicos del tumor con distintos anticuerpos primarios, como se mencionó en el apartado 3.10. La proliferación celular se evaluó a través de la proporción de células Ki67⁺, la angiogénesis, mediante el marcador de hipoxia HIF-1 α y para evaluar las infiltraciones de poblaciones linfocitarias se utilizaron CD4⁺, CD8⁺ y Foxp3⁺. Para cada marcador se contaron las células positivas en 30 campos microscópicos consecutivos por corte de tejido tumoral, con una magnificación 1000X y se empleó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn para el análisis estadístico de los datos.

- Determinación de la proliferación celular

Ki67 es un marcador de proliferación celular cuya expresión en tumores mamarios se ha relacionado con peor pronóstico y por tal motivo es utilizado como indicador de la respuesta al tratamiento con quimioterapia (Yerushalmi et al., 2010). En la **Figura 14** se grafica mediana;rango del número de células Ki67⁺ por campo. Se registró un menor número de células Ki67⁺ en los tumores del grupo DE + Cy (48 ; 39-68,5 células positivas/campo) en comparación con el grupo testigo DE (94 ; 80,5-129,5 células positivas/campo) ($P < 0,01$), y en los grupos HFD + Cy (55 ; 40,5-78,5 células positivas/campo) y HFD + Met + Cy (64 ; 48,5-80,5 células positivas/campo) respecto del grupo testigo HFD (99 ; 90,5-125 células positivas/campo) ($P < 0,05$ en ambos casos), resultados que indican una menor capacidad proliferativa de las células tumorales en esos grupos experimentales.

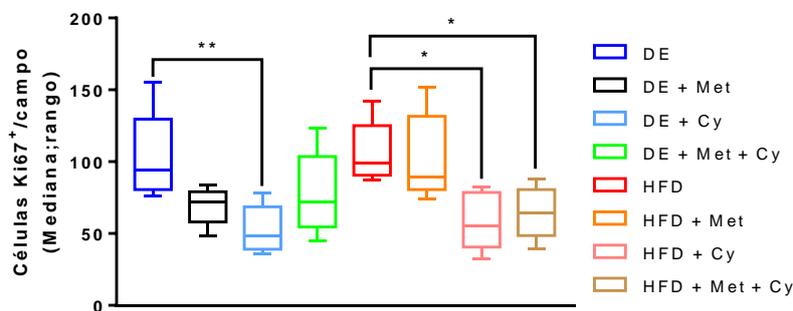


Figura 14: Cuantificación de células Ki67⁺ en el tumor. Se cuantificaron 30 campos consecutivos en microscopio óptico. Los datos se expresan como mediana;rango del número de células Ki-67⁺/campo de 4-6 ratones por grupo. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. **, significativamente diferente de DE $P < 0,01$; *, significativamente diferente de HFD $P < 0,05$; DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido graso.

- Medición de la hipoxia tumoral como indicador de angiogénesis

La angiogénesis resulta un blanco importante en el tratamiento del cáncer porque la generación de nuevos vasos sanguíneos es el medio que utiliza el tumor para nutrirse y crecer. Las células tumorales secretan altos niveles de factores proangiogénicos que contribuyen a la creación de una red vascular anormal caracterizada por vasos sanguíneos desorganizados, inmaduros y permeables, que da como resultado tumores con perfusión deficiente. El factor de transcripción HIF-1 α , activa genes implicados en la adaptación celular frente a la hipoxia, en

procesos tales como la angiogénesis, la supervivencia, la proliferación celular y el metabolismo de la glucosa (Viallard & Larrivé, 2017).

Con el fin de evaluar si el tratamiento metronómico en estudio afecta la angiogénesis, se realizaron pruebas IHC para el marcador de hipoxia tumoral HIF-1 α sobre cortes histológicos de tumor. El número de células HIF-1 α ⁺ por campo (mediana;rango) fue menor en el grupo DE + Cy (0,27 ; 0,24-0,35 células positivas/campo) en comparación con el grupo testigo DE (0,93 ; 0,65-1,12 células positivas/campo) ($P < 0,01$), así como en el grupo HFD + Cy (0,3 ; 0,27-0,45 células positivas/campo) en relación con el grupo testigo HFD (1,13 ; 0,85-1,39 células positivas/campo) ($P < 0,05$) (**Figura 15**). Si bien se observó un menor número de células positivas por campo en el grupo DE + Met + Cy (0,40 ; 0,33-0,55 células positivas/campo) comparado con el grupo DE (0,93 ; 0,65-1,12 células positivas/campo) y en el grupo HFD + Met + Cy (0,37 ; 0,29-0,48 células positivas/campo) respecto del grupo HFD (1,13 ; 0,85-1,39 células positivas/campo), las mismas no fueron estadísticamente significativas.

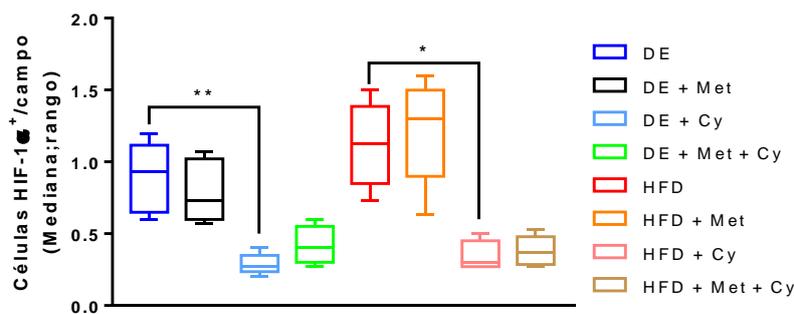


Figura 15: Cuantificación de células HIF1- α ⁺ en el tumor. Se cuantificaron 30 campos consecutivos en microscopio óptico. Los datos se expresan como número de células HIF1- α ⁺/campo (mediana;rango) de 4-6 ratones por grupo. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. **, significativamente diferente de DE $P < 0,01$; *, significativamente diferente de HFD $P < 0,05$. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido graso.

- Cuantificación de los linfocitos intratumorales

Algunos tumores se encuentran muy infiltrados por células del sistema inmune mientras que otros presentan infiltraciones sutiles. Está reportado que en TNBC una mayor infiltración linfocitaria se correlaciona con mejor pronóstico clínico (Adams et al., 2015) por lo tanto se evaluó la presencia de distintas poblaciones de

células linfocíticas en el tumor por IHC. Para ello se determinó el contenido de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y Foxp3⁺ sobre cortes histológicos del tejido tumoral. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (**Figura 16A y B**). Con respecto al marcador Foxp3, se encontró una menor cantidad de células positivas por campo (mediana;rango) en el grupo DE + Cy (0,1 ; 0,02-0,13 células positivas/campo) respecto al grupo testigo DE (0,29 ; 0,24-0,32 células positivas/campo) (P<0,01), y en el grupo HFD + Cy (0,07 ; 0,07-0,115 células positivas/campo) en comparación con el grupo testigo HFD (0,33 ; 0,28-0,39 células positivas/campo) (P<0,05) (**Figura 16C**).

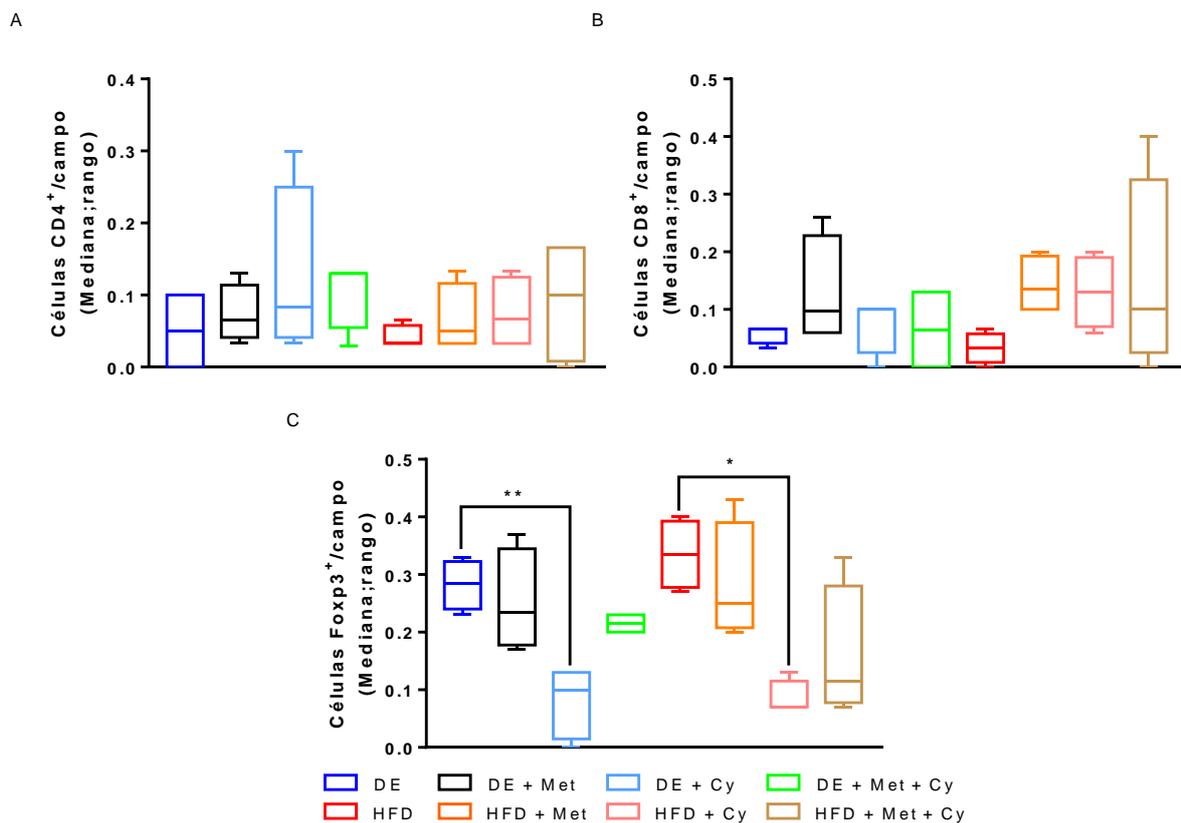


Figura 16: Cuantificación de linfocitos infiltrantes en el tumor. En todos los casos se grafica el número de células positivas/campo (mediana;rango) de 4-6 ratones por grupo. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido graso. **A) Promedio de linfocitos CD4⁺ infiltrantes. B) Promedio de linfocitos CD8⁺ infiltrantes. C) Promedio de linfocitos Foxp3⁺ infiltrantes.** **, significativamente diferente de DE P<0,01; *, significativamente diferente de HFD P<0,05. DE: dieta estándar. HFD: dieta con alto contenido graso.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres. Diversos estudios han asociado su incidencia con la obesidad y el síndrome metabólico (Arnold et al., 2016; Chen et al., 2016b), patologías que tienen una alta prevalencia mundial. Asimismo, han sido identificados como factores de mal pronóstico en el cáncer de mama (Chan et al., 2014; Mendonça et al., 2015), incluido el cáncer de mama triple negativo (Maiti et al., 2010; Zhu et al., 2017), el cual tiene una peor respuesta a la quimioterapia, la radioterapia y la terapia hormonal. Por ello, continuamente se desarrollan nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad. En particular, para el tratamiento de los tumores de mama triple negativos, se utilizan desde terapias dirigidas a receptores expresados por estos tumores, hasta estrategias de inteligencia artificial (Medina et al., 2020). Algunas de las potenciales terapias en estudio consisten en inhibidores de vías de señalización específicas, incluidos inhibidores de poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), inhibidores de angiogénesis, inhibidores de PI3K/AKT/mTOR, inhibidores del receptor androgénico (AR) e inmunoterapia (Wu et al., 2021). Sin embargo, hasta ahora ninguna ha demostrado ser efectiva en ensayos clínicos y la enfermedad continúa planteando un reto para la investigación innovadora del cáncer.

El conjunto de efectos adversos de la quimioterapia convencional y el alto costo de los fármacos regularmente utilizados elevan el gasto público en Salud asociados con la terapia. En este sentido, la combinación de la quimioterapia metronómica junto con el reposicionamiento de fármacos, definida por el grupo del Dr. André como “*metronomics*” (André et al., 2013) permitió la generación de tratamientos innovadores dirigidos tanto al tumor como a su microambiente, con un bajo costo y mínima toxicidad, mejorando la calidad de vida de los pacientes.

En el presente Trabajo Final de Grado en una primera etapa se generó un modelo de obesidad y alteraciones metabólicas mediante la administración de una dieta comercial estándar enriquecida con 40 % de grasa bovina a ratones de la línea CBI durante 16 semanas. En línea con reportes anteriores (Ainslie et al., 2000; Ghibaudi et al., 2002; Woods et al., 2003), los resultados muestran que el tratamiento incrementó el peso corporal de los animales, el tamaño corporal, el

contenido de tejido adiposo blanco (epididimal más retroperitoneal), la ingesta calórica y los valores séricos de glucemia, colesterol total y triglicéridos. Asimismo, se presentó un menor descenso porcentual de la glucemia en los animales alimentados con dieta rica en grasas respecto a aquellos alimentados con dieta estándar evaluados mediante la prueba de tolerancia a la insulina a las 16 semanas.

Los animales con ambas dietas consumieron la misma cantidad de alimento, pero aquellos que recibieron dieta con alto contenido graso efectivamente recibieron mayor cantidad de calorías totales respecto al grupo control. El papel de la grasa dietética en la susceptibilidad a la obesidad se evaluó en una investigación realizada por Ghibaudi y colaboradores (Ghibaudi et al. 2002). En la misma se alimentaron ratas con dietas que contenían tres porcentajes de contenido graso (10%, 32% y 45%) desde el destete hasta los 7 meses de edad. La ingesta de energía, el aumento de peso, la masa grasa y los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, leptina e insulina aumentaron de forma dependiente con el aumento de la grasa en la dieta. No se observaron diferencias en la masa magra absoluta entre los tres grupos. Se concluyó que las diferencias en el aumento de peso se debían principalmente a una mayor acumulación de grasa. Para profundizar en este último aspecto alimentaron ratas resistentes y propensas a la obesidad con una dieta con 45% de grasas. Las ratas propensas a la obesidad presentaron un balance energético positivo y un cociente respiratorio elevado, indicando un cambio en el uso de sustratos energéticos de grasas a carbohidratos, que promovió la acumulación de grasa corporal en comparación con el grupo de animales relativamente resistentes a la obesidad.

En los trabajos sobre la fisiopatología de la dieta alta en grasas en animales (Aydin et al., 2014; Ellies et al., 2013; Gallagher et al., 2011; Hariri & Thibault, 2010) los resultados bioquímicos mostrados son consecuencia principalmente de la resistencia a la insulina desarrollada como resultado del aumento del tejido adiposo y de la inflamación crónica asociada al mismo. Para concluir los resultados de esta primera etapa, el aumento significativo de peso observado en los ratones alimentados con dieta de alto contenido graso respecto de los controles se asocia con un incremento del volumen abdominal de los ratones, generado como

consecuencia de un aumento de la masa adiposa blanca, por un mayor consumo de calorías.

Una vez generado el modelo murino de obesidad y desorden metabólico, se llevó a cabo la segunda etapa, en la cual se desafiaron a los animales con el tumor M-406 y cuando el mismo fue palpable se inició el tratamiento con ciclofosfamida y/o metformina. Primeramente, se evaluó el crecimiento tumoral en los grupos alimentados con dieta estándar y con dieta rica en grasas sin tratamiento. Curiosamente, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos alimentados con ambas dietas en la evolución del volumen tumoral, así como tampoco en el volumen de los tumores al final del experimento ($P=ns.$, datos no mostrados). Este fue un resultado imprevisto ya que se especulaba un mayor crecimiento tumoral en el grupo alimentado con dieta alta en grasa en relación con el grupo control. Trabajos similares al nuestro, en los cuales se desarrollaron modelos de obesidad y desorden metabólico con tumores de mama (Buss et al., 2018; Cowen et al., 2015; Cranford et al., 2019; Kim et al., 2011; Zhu et al., 2017) o de colon (Bader et al., 2020) mostraron que los ratones alimentados con dieta rica en grasas presentaron un crecimiento tumoral mayor al de los controles. En el estudio experimental del grupo de Kim (Kim et al. 2011) ratones hembra BALB/c de 4 semanas de edad fueron alimentados con dieta alta en grasas (60 % de kcal de grasa) o dieta control (10 % de kcal de grasa) durante 16 semanas. Posteriormente, se inyectaron células de carcinoma mamario 4T1 en las almohadillas de grasa mamaria inguinal de los ratones alimentados con sus respectivas dietas. En los animales alimentados con la dieta rica en grasas el crecimiento de los tumores mamarios y las metástasis fueron mayores en comparación con ratones que recibieron la dieta control. Si bien estos resultados son contradictorios a los mostrados en este Trabajo Final de Grado es importante destacar que el tumor, la cepa de animales y el sexo de los animales son diferentes, que podrían explicar el diferente comportamiento del tumor.

Posteriormente, se analizó el efecto antitumoral de los tratamientos utilizados. Se corroboró que ciclofosfamida fue efectiva en ambas dietas. Los ratones alimentados con dieta estándar y tratados con ciclofosfamida presentaron menor volumen tumoral al final del experimento respecto de su grupo control sin

tratamiento, además la evolución del tumor fue más lenta. Esto último se confirmó a través de la determinación del tiempo medio de duplicación tumoral, en el cual el tumor tratado con ciclofosfamida demoró más tiempo en crecer que el grupo que recibió la misma dieta, pero sin tratamiento. Sin embargo, el grupo con dieta estándar tratado con la combinación de ambos fármacos no se diferenció significativamente de su grupo sin tratamiento para estas variables. Por otro lado, en lo que respecta a los animales alimentados con dieta rica en grasas, y en contraste con los anteriores, se observó un efecto significativo de ciclofosfamida tanto en forma individual como combinada con metformina a partir del día 21 (luego de 11 días de tratamiento). En ambos grupos tratados se observó un menor volumen tumoral al final del tratamiento y un mayor tiempo medio de duplicación tumoral en comparación con el grupo sin tratamiento.

Ciclofosfamida se ha utilizado durante décadas y se sigue utilizando en la quimioterapia convencional en dosis altas, y es uno de los primeros y más estudiados fármacos en la quimioterapia metronómica en dosis bajas, como monoterapia o en combinación con otros fármacos, tanto en modelos experimentales como en protocolos clínicos (Bottini et al., 2006; Canello et al., 2015; Dellapasqua et al., 2011; Nasr et al., 2015; Perroud et al., 2011, 2016; Petry et al., 2015; Soriano et al., 2009). El efecto antitumoral de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida ha sido demostrado experimentalmente en el Instituto de Genética Experimental en sucesivas oportunidades y en diferentes esquemas metronómicos. La administración de ciclofosfamida de forma oral en ensayos clínicos implica una ventaja ya que se trata de una vía de administración menos invasiva que la vía parenteral, y no requiere personal médico para su suministro.

Con respecto al fármaco metformina, no se encontraron diferencias significativas en el volumen de los tumores al final del experimento y tampoco en el tiempo medio de duplicación tumoral entre los grupos tratados con este fármaco como monoterapia o en combinación con ciclofosfamida en comparación con sus controles sin tratamiento, con ambas dietas utilizadas. Estos resultados indican que metformina no tendría efecto terapéutico siendo administrada en forma individual y tampoco agregaría efecto sobre la quimioterapia metronómica con

ciclofosfamida, al menos en estas condiciones experimentales. Incluso aparentaría tener algún efecto negativo sobre el tratamiento con ciclofosfamida en los animales alimentados con dieta estándar. Dentro del grupo de trabajo (Rico et al., 2017) se evaluó el efecto antitumoral del tratamiento metronómico con una combinación de metformina y propranolol, otro fármaco en reposicionamiento, en modelos de cáncer de mama triple negativo. Mediante estudios *in vivo* se confirmó el potencial de esta combinación para reducir el crecimiento tumoral y prevenir la metástasis. En este experimento, el efecto de metformina sobre el volumen tumoral se observó luego de 17 días de tratamiento con dosis de 400 mg/kg/día, en ratones jóvenes y sin patologías previas. Por el contrario, en nuestra investigación se trató a ratones añosos y con patologías previas (en el caso de los grupos alimentados con dieta HFD) con metformina en dosis de 300 mg/kg/día durante 15 días. Una posible explicación a la falta de efecto de metformina en nuestro trabajo podría ser la menor dosis utilizada y la corta duración del tratamiento, resultando insuficiente para observar un efecto significativo de este fármaco sobre el crecimiento tumoral.

En otro trabajo recientemente publicado se evaluaron los efectos antimetastásicos de metformina en modelos de cáncer de mama murino 4T1 *in vitro* e *in vivo*. A los ratones se les inyectó 200 mg/kg de crocina, 150 mg/kg de metformina o su combinación, tres veces por semana durante 4 semanas. Las dosis de crocina, metformina y su combinación redujeron significativamente el tamaño del volumen tumoral y mejoraron la tasa de supervivencia animal en el modelo de cáncer de mama murino (Farahi et al., 2021). En este trabajo, si bien utilizaron dosis considerablemente menores a las nuestras para metformina, la vía de administración fue parenteral. Estos resultados se obtuvieron luego de un tratamiento de 4 semanas de duración, reforzando que metformina requiere un tratamiento más prolongado para ejercer un efecto sobre el volumen tumoral de los animales.

Como se mencionó previamente, una característica importante a considerar a la hora de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento del cáncer es que sean efectivas y sin toxicidad. En particular, la quimioterapia convencional, si bien mata las células tumorales, su efecto citotóxico no es específico, y puede también afectar a células sanas, generando efectos adversos en los pacientes (Hanahan et al.,

2000b, 2000a). Por tal motivo, se decidió evaluar la posible toxicidad del tratamiento administrado,

Se estudiaron distintos parámetros indicadores de toxicidad, la evolución del peso corporal, el recuento de glóbulos blancos y diversas características morfológicas y de comportamiento en los animales. Respecto a estas últimas, se constató que no hubo alteraciones en la ingesta de comida y bebida, actividad motora, conducta y frecuencia respiratoria de los ratones a lo largo de todo el experimento. Como ya fue mencionado, se considera que existe toxicidad cuando el peso corporal de los animales desciende 20% o más respecto de su valor previo al tratamiento. En nuestro trabajo, los animales alimentados con dieta estándar y tratados con ciclofosfamida como monoterapia sufrieron un leve descenso de peso (menor al 10%) en la última parte del tratamiento. Del mismo modo, el grupo alimentado con dieta rica en grasas y tratado con la combinación de fármacos tampoco mostró descenso de peso relevante. Es importante mencionar que el aumento de peso de los animales en esta etapa depende también del volumen tumoral alcanzado y por lo tanto es esperable que los grupos en los que se inhibió el crecimiento tumoral presenten una menor ganancia de peso corporal respecto al grupo sin tratamiento. Las dosis de los fármacos empleadas en el agua de bebida, ciclofosfamida 25mg/kg/día, así como una dosis mayor de metformina 400 mg/kg/día, fueron utilizadas previamente de forma individual en distintos trabajos del grupo, en los cuales demostraron ser efectivas sin signos de toxicidad (Mainetti et al., 2020); particularmente en este trabajo se las utiliza por primera vez en forma conjunta.

Otro indicador de toxicidad que se evaluó en nuestro experimento fue el recuento de glóbulos blancos circulantes al final del tratamiento. Los grupos experimentales no difirieron entre ellos con respecto a esta variable. En resumen, el esquema terapéutico planteado no mostró signos de toxicidad en los grupos en estudio, considerando que estos animales son añosos, obesos y con desórdenes metabólicos.

Al final del experimento, se evaluó el posible efecto del tratamiento metronómico sobre las variables bioquímicas y morfológicas inducidas por la dieta. Los parámetros bioquímicos no se vieron modificados por el tratamiento, independientemente del grupo analizado, observándose mayores niveles de

glucemia, colesterol total y triglicéridos séricos en todos los animales alimentados con dieta alta en grasas en comparación con aquellos alimentados con dieta estándar. Metformina no mejoró las alteraciones metabólicas generadas por la obesidad en los 15 días de tratamiento.

Otro de nuestros objetivos fue evaluar los posibles mecanismos de acción involucrados en el efecto de la quimioterapia metronómica: proliferación celular, regulación de la respuesta inmune y angiogénesis. Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para Ki67 con el fin de comprobar el efecto de la quimioterapia metronómica sobre la proliferación celular. Se encontró, efectivamente, una reducción en el número de células Ki67⁺ por campo en los tumores de ratones tratados con ciclofosfamida de forma individual, tanto en los alimentados con dieta alta en grasas como con dieta estándar. Aunque no se observó un efecto de metformina administrada individualmente sobre la proliferación, sí se registró cuando se combinó con ciclofosfamida. Sin embargo, tal resultado no difirió significativamente del obtenido con el tratamiento individual de ciclofosfamida. Es por ello que inferimos que el efecto observado en los grupos tratados con la combinación de ambos fármacos sobre la proliferación celular se debe exclusivamente al efecto de ciclofosfamida. Estos resultados indican una menor capacidad proliferativa de las células tumorales en dichos grupos experimentales como un efecto de la terapia recibida.

Estos resultados difieren con los obtenidos en el trabajo de Anselmino y colaboradores (Anselmino et al. 2021), en el cual encontraron un menor número de células Ki67⁺ por campo en los tumores M-406 de ratones hembras adulto CBI que habían sido tratados con metformina en el agua de bebida, en comparación con ratones que no recibieron tratamiento. En contraste con nuestro diseño experimental, en este caso se administró una dosis mayor de metformina (400 mg/kg/día) y con un tratamiento más largo.

Uno de los efectos terapéuticos de la quimioterapia metronómica se obtiene a través de su acción antiangiogénica. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos tumorales es inhibido por la administración crónica de dosis bajas de fármacos, efecto que se ha ratificado desde que se utiliza esta estrategia (Browder et al., 2000; Hanahan et al., 2000b; Kerbel et al., 2002, 2013; Rozados et al., 2010). Es

decir, que su efectividad terapéutica se basa indirectamente en la eliminación de las células tumorales a través de la disminución del aporte de oxígeno y nutrientes de la sangre. En nuestro trabajo, se estudió el efecto de la terapia sobre la hipoxia tumoral, la cual está relacionada positivamente con la angiogénesis. Se encontró un efecto significativo de ciclofosfamida sobre la hipoxia tumoral con una disminución de células HIF1- α^+ en los tumores de los animales tratados con este fármaco con ambas dietas. Metformina como monoterapia no mostró una disminución significativa de la hipoxia intratumoral y tampoco aumentó el efecto mostrado por ciclofosfamida en el tratamiento combinado. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores (Mainetti et al., 2020) y sugieren que el tratamiento con ciclofosfamida de forma individual produciría una normalización vascular que disminuiría la hipoxia y aumentaría la oxigenación intratumoral, mejorando la llegada de fármacos al tumor, alcanzando un mejor resultado terapéutico.

Otro importante mecanismo de acción de la quimioterapia metronómica consiste en la estimulación de la respuesta inmune antitumoral (Scharovsky et al., 2009), a través de la inhibición de las células T reguladoras (Ghiringhelli et al., 2007), las células mieloides supresoras (Peereboom et al., 2019) y la estimulación de las células dendríticas (Pastina et al., 2017). Las células inmunes que se encuentran con mayor frecuencia en el microambiente tumoral son los macrófagos y los linfocitos T. Estos últimos se clasifican en citotóxicos (CD8⁺), reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) y colaboradores (CD4⁺), y su infiltración diferencial en el tumor ha sido asociada con la progresión tumoral. En nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ pero sí se encontró una disminución en el número de células Foxp3⁺ por campo en los animales de ambas dietas tratados con ciclofosfamida de forma individual. En un ensayo clínico llevado a cabo por Ghiringhelli y colaboradores (Ghiringhelli et al. 2007) se evaluó el efecto de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida sobre la restauración de la respuesta inmune antitumoral. Para tal fin, se administró ciclofosfamida de forma oral en pacientes con cáncer avanzado. Luego de un mes de tratamiento se observó una importante disminución en el número de células CD25⁺Foxp3⁺ respecto de los valores previo al tratamiento, concluyendo que el esquema favoreció un mejor

control de la progresión tumoral. En línea con nuestros resultados, estos datos respaldan la administración de ciclofosfamida como un tratamiento válido para reducir la tolerancia inmunitaria inducida por los tumores. Para comprender mejor el efecto de nuestro esquema terapéutico sobre la respuesta inmune antitumoral sería interesante evaluar las distintas poblaciones de células inmunes innatas, tales como macrófagos y células NK.

Como conclusiones de este Trabajo Final de Grado:

A) Se obtuvo satisfactoriamente el modelo de obesidad y alteraciones metabólicas asociadas inducido por la dieta. Los animales CBI mostraron cambios fisiológicos y metabólicos similares a los observados en humanos, entre ellos aumento del peso corporal y de la masa adiposa blanca, con altos niveles de glucemia, colesterolemia, trigliceridemia y resistencia a la insulina en el grupo de animales con dieta rica en grasas respecto a aquellos alimentados con dieta comercial estándar. Este modelo resulta útil para el estudio de la interacción entre la obesidad y sus alteraciones metabólicas con el cáncer.

B) Ciclofosfamida administrada metronómicamente en dosis bajas fue efectiva para el tratamiento del tumor de mama triple negativo en ratones sin patologías previas, así como también en animales obesos con alteraciones metabólicas asociadas. En ambos casos, el efecto antitumoral se debió al menos en parte a la inhibición de la proliferación de las células tumorales, la acción antiangiogénica sobre los vasos sanguíneos tumorales y la restauración de la respuesta inmune antitumoral. Aunque estos animales al inicio de la terapia metronómica eran añosos, el esquema terapéutico resultó ser seguro, sin mostrar signos de toxicidad, incluso en los animales con patología de base.

C) El fármaco de reposicionamiento metformina no mejoró los parámetros metabólicos relacionados con la obesidad y tampoco agregó efecto terapéutico sobre la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida, al menos en las dos semanas de duración del tratamiento.

Como fuera mencionado es importante el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que sean efectivas, seguras y accesibles para el tratamiento de los pacientes con tumores de mama triple negativo que padecen enfermedades

metabólicas, ya que ambas plantean un serio riesgo para la salud humana y en conjunto se asocian con peores pronósticos para la progresión tumoral. Si bien la investigación que aquí se plantea es básica, estos resultados podrían contribuir a una mejor comprensión del tratamiento de los pacientes con cáncer que padecen enfermedades metabólicas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, S., Goldstein, L. J., Sparano, J. A., Demaria, S., & Badve, S. S. (2015). Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) improve prognosis in patients with triple negative breast cancer (TNBC). *OncoImmunology*, 4(9), 1–3. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.985930>

Ainslie, D. A., Proietto, J., Fam, B. C., & Thorburn, A. W. (2000). Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 438–442. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.438>

André, N., Banavali, S., Snihur, Y., & Pasquier, E. (2013). Has the time come for metronomics in low-income and middle-income countries? In *The Lancet Oncology* (Vol. 14, Issue 6). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70056-1)

Anselmino, L. E., Baglioni, M. V., Malizia, F., Laluce, N. C., Etichetti, C. B., Marignac, V. L. M., Rozados, V., Scharovsky, O. G., Girardini, J., Rico, M. J., & Márquez, M. M. (2021). Repositioning metformin and propranolol for colorectal and triple negative breast cancers treatment. *Scientific Reports*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87525-z>

Arcidiacono, B., Iiritano, S., Nocera, A., Possidente, K., Nevolo, M. T., Ventura, V., Foti, D., Chiefari, E., & Brunetti, A. (2012). Insulin resistance and cancer risk: An overview of the pathogenetic mechanisms. In *Experimental Diabetes Research* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/789174>

Arnold, M., Leitzmann, M., Freisling, H., Bray, F., Romieu, I., Renehan, A., & Soerjomataram, I. (2016). Obesity and cancer: An update of the global impact. *Cancer Epidemiology*, 41, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.01.003>

Aydin, S., Aksoy, A., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Kuloglu, T., Cital, C., & Catak, Z. (2014). Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. In *Nutrition* (Vol. 30, Issue 1, pp. 1–9). <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.05.013>

Bader, J., Carson, M., Enos, R., Velazquez, K., Sougiannis, A., Singh, U., Becker, W., Nagarkatti, M., Fan, D., & Murphy, A. (2020). Oncotarget 4554 www.oncotarget.com High-fat diet-fed ovariectomized mice are susceptible to accelerated subcutaneous tumor growth potentially through adipose tissue inflammation, local insulin-like growth factor release, and tumor associated macrophages. In *Oncotarget* (Vol. 11, Issue 49). www.oncotarget.com

Barco, S. Del, Vazquez-Martin, A., Cufí, S., Oliveras-Ferraros, C., Bosch-Barrera, J., Joven, J., Martín-Castillo, B., & Menéndez, J. A. (2011). Metformin: Multi-faceted protection against cancer * Denotes equal contribution DIABETES AND CANCER: FROM EPIDEMIOLOGY TO CELL BIOLOGY. In *Oncotarget* (Vol. 2, Issue 12). www.impactjournals.com/oncotarget/www.impactjournals.com/oncotarget

Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative,

and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer*, 109(9), 1721–1728. <https://doi.org/10.1002/cncr.22618>

Bottini, A., Generali, D., Brizzi, M. P., Fox, S. B., Bersiga, A., Bonardi, S., Allevi, G., Aguggini, S., Bodini, G., Milani, M., Dionisio, R., Bernardi, C., Montruccoli, A., Bruzzi, P., Harris, A. L., Dogliotti, L., & Berruti, A. (2006). Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 24(22), 3623–3628. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.5773>

Browder, T., Butterfield, C. E., Kräling, B. M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M. S., & Folkman, J. (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Research*, 60(7), 1878–1886.

Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4), 798–808. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>

Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338–345. <https://doi.org/10.1038/nature12625>

Buss, L. A., Mandani, A., Phillips, E., Scott, N. J. A., Currie, M. J., & Dachs, G. U. (2018). Characterisation of a mouse model of breast cancer with metabolic syndrome. *In Vivo*, 32(5), 1071–1080. <https://doi.org/10.21873/invivo.11348>

Calì, B., Molon, B., & Viola, A. (2017). Tuning cancer fate: The unremitting role of host immunity. *Open Biology*, 7(4). <https://doi.org/10.1098/rsob.170006>

Canello, G., Bagnardi, V., Sangalli, C., Montagna, E., Dellapasqua, S., Sporchia, A., Iorfida, M., Viale, G., Barberis, M., Veronesi, P., Luini, A., Intra, M., Goldhirsch, A., & Colleoni, M. (2015). Phase II study with epirubicin, cisplatin, and infusional fluorouracil followed by weekly paclitaxel with metronomic cyclophosphamide as a preoperative treatment of triple-negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 15(4), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2015.03.002>

Candeias, S. M., & Gaip, U. S. (2016). The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(1), 101–107. <https://doi.org/10.2174/1871520615666150824153523>

Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D., & Gianni, L. (2010). Triple-negative breast cancer: Disease entity or title of convenience? In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 7, Issue 12, pp. 683–692). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.154>

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(6), 417–427. <https://doi.org/10.1038/nrd3455>

Chan, D. S. M., Vieira, A. R., Aune, D., Bandera, E. V., Greenwood, D. C., McTiernan, A., Navarro Rosenblatt, D., Thune, I., Vieira, R., & Norat, T. (2014). Body mass index

and survival in women with breast cancer—systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. *Annals of Oncology*, 25(10), 1901–1914. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu042>

Chen, Y., Wen, Y. Y., Li, Z. R., Luo, D. L., & Zhang, X. H. (2016a). The molecular mechanisms between metabolic syndrome and breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(4), 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.034>

Chen, Y., Wen, Y. Y., Li, Z. R., Luo, D. L., & Zhang, X. H. (2016b). The molecular mechanisms between metabolic syndrome and breast cancer. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 471, Issue 4, pp. 391–395). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.034>

Cowen, S., Mclaughlin, S. L., Hobbs, G., Coad, J., Martin, K. H., Olfert, M. I., & Vona-Davis, L. (2015). High-fat, high-calorie diet enhances mammary carcinogenesis and local inflammation in mmtv-pytm mouse model of breast cancer. *Cancers*, 7(3), 1125–1142. <https://doi.org/10.3390/cancers7030828>

Cragg, G. M., Grothaus, P. G., & Newman, D. J. (2014). New horizons for old drugs and drug leads. In *Journal of Natural Products* (Vol. 77, Issue 3, pp. 703–723). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/np5000796>

Cranford, T. L., Velázquez, K. T., Enos, R. T., Sougiannis, A. T., Bader, J. E., Carson, M. S., Bellone, R. R., Chatzistamou, I., Nagarkatti, M., & Murphy, E. A. (2019). Effects of high fat diet-induced obesity on mammary tumorigenesis in the PyMT/MMTV murine model. *Cancer Biology and Therapy*, 20(4), 487–496. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1537574>

Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

Davis, A. A., & Kaklamani, V. G. (2012). Metabolic Syndrome and Triple-Negative Breast Cancer: A New Paradigm. *International Journal of Breast Cancer*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/809291>

De, A., & Kuppusamy, G. (2020). Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Current Problems in Cancer*, 44, 147–272.

Dellapasqua, S., Mazza, M., Rosa, D., Ghisini, R., Scarano, E., Torrisi, R., Maisonneuve, P., Viale, G., Cassano, E., Veronesi, P., Luini, A., Goldhirsch, A., & Colleoni, M. (2011). Pegylated liposomal doxorubicin in combination with low-dose metronomic cyclophosphamide as preoperative treatment for patients with locally advanced breast cancer. *Breast*, 20(4), 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.02.014>

Dietze, E. C., Chavez, T. A., & Seewaldt, V. L. (2018). Obesity and Triple-Negative Breast Cancer: Disparities, Controversies, and Biology. *American Journal of Pathology*, 188(2), 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.018>

Dowling, R. J. O., Niraula, S., Chang, M. C., Done, S. J., Ennis, M., McCready, D. R.,

- Leong, W. L., Escallon, J. M., Reedijk, M., Goodwin, P. J., & Stambolic, V. (2015). Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: A prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Research*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0540-0>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, *22*(4), 329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Ecker, B. L., Lee, J. Y., Sterner, C. J., Solomon, A. C., Pant, D. K., Shen, F., Peraza, J., Vaught, L., Mahendra, S., Belka, G. K., Pan, T. C., Schmitz, K. H., & Chodosh, L. A. (2019). Impact of obesity on breast cancer recurrence and minimal residual disease. *Breast Cancer Research*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1087-7>
- Ellies, L. G., Johnson, A., & Olefsky, J. M. (2013). Obesity, inflammation and cancer. *Obesity, Inflammation and Cancer*, 1–433. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6819-6>
- Evans, J., Donnelly, L., Emslie-Smith, A., Alessi, D., & Morris, A. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *British Medical Journal*, *330*(7503), 1304–1305. <https://doi.org/10.1136/bmj.38393.572188.EB>
- Farahi, A., Abedini, M. R., Javdani, H., Arzi, L., Chamani, E., Farhoudi, R., Talebloo, N., & Hoshyar, R. (2021). Crocin and Metformin suppress metastatic breast cancer progression via VEGF and MMP9 downregulations: in vitro and in vivo studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *476*(9), 3341–3351. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04043-8>
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Eng J Med*, *285*(21), 1182–1186.
- Gallagher, E. J., LeRoith, D., & Karnieli, E. (2011). The Metabolic Syndrome—from Insulin Resistance to Obesity and Diabetes. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 95, Issue 5, pp. 855–873). <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.06.001>
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, *313*(5795), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
- Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., Nagtegaal, I. D., Palmqvist, R., Masucci, G. V., Botti, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Maio, M., Laghi, L., Grizzi, F., ... Pagès, F. (2014). Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *Journal of Pathology*, *232*(2), 199–209. <https://doi.org/10.1002/path.4287>
- Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., van Heek, M., & Hwa, J. J. (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats.

Obesity Research, 10(9), 956–963.
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=12226145>

Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L., & Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4 +CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(5), 641–648. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0225-8>

Godsland, I. F. (2010). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. In *Clinical Science* (Vol. 118, Issue 5, pp. 315–332). <https://doi.org/10.1042/CS20090399>

Gonzalez-Angulo, A. M., & Meric-Bernstam, F. (2010). Metformin: A therapeutic opportunity in breast cancer. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 16, Issue 6, pp. 1695–1700). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1805>

Grundy, S. M. (2003). Inflammation, Hypertension, and the Metabolic Syndrome. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(Supplement), S1. <https://doi.org/10.1249/00005768-200405001-00003>

Habib, M. J., Barranco, M. M., Di Carlo, B., Sigal, N., Begnis Sylvestre, M., Zechinatti, F., Del Giúdice, A., Rico, M. J., Rozados, V. R., Scharovsky, O. G., Villanueva, S. S., García, F., & Mainetti, L. E. (2018). EFECTO DE LA QUIMIOTERAPIA METRÓNOMICA EN RATONES CON SÍNDROME METABÓLICO PORTADORES DE UN ADENOCARCINOMA MAMARIO. *Sociedad de Biología de Rosario*, 63.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., Bergers, G., & Bergsland, E. (2000a). *Chemotherapeutic drugs, long the mainstay of cancer treatment, cause DNA damage and disrupt DNA replication in proliferating cells*. <http://cancertrials.nci>.

Hanahan, D., Bergers, G., & Bergsland, E. (2000b). Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 1045–1047. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC300842/#>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 270–299. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>

Herrera-Covarrubias, D., Coria-Avila, G. A., Fernández-Pomares, C., Aranda-Abreu, G. E., Manzo Denes, J., & Hernández, M. E. (2015). La obesidad como factor de riesgo en el desarrollo de cáncer. *Rev Peru Med Exp Salud Publica LA*, 32(4), 766–

776.

Hinrichsen, L. I., & Di Masso, R. J. (2010). Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 21(2).

Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). (2019). *4º Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Resultados definitivos*. https://www.indec.gob.ar/ftp/cuadros/publicaciones/enfr_2018_resultados_definitivos.pdf

International Agency for Research on Cancer. (2020). *Cancer Fact Sheets*. GLOBOCAN 2020. <https://gco.iarc.fr>

Jayson, G. C., Kerbel, R., Ellis, L. M., & Harris, A. L. (2016). Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *The Lancet*, 388(10043), 518–529. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01088-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01088-0)

Kerbel, R. S., Guerin, E., Francia, G., Xu, P., Lee, C. R., Ebos, J. M. L., & Man, S. (2013). Preclinical recapitulation of antiangiogenic drug clinical efficacies using models of early or late stage breast cancer metastasis. *Breast*, 22(S2), S57–S65. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.011>

Kerbel, R. S., Klement, G., Pritchard, K., & Kamen, B. (2002). Continuous low-dose anti-angiogenic/metronomic chemotherapy: From the research laboratory into the oncology clinic. In *Annals of Oncology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 12–15). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf093>

Kim, E. J., Choi, M. R., Park, H., Kim, M., Hong, J. E., Lee, J. Y., Chun, H. S., Lee, K. W., & Yoon Park, J. H. (2011). Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Research*, 13(4). <https://doi.org/10.1186/bcr2927>

Lambertucci, F., Arboatti, A., Sedlmeier, M. G., Motiño, O., Alvarez, M. de L., Ceballos, M. P., Villar, S. R., Roggero, E., Monti, J. A., Pisani, G., Quiroga, A. D., Martín-Sanz, P., Carnovale, C. E., Francés, D. E., & Ronco, M. T. (2018). Disruption of tumor necrosis factor alpha receptor 1 signaling accelerates NAFLD progression in mice upon a high-fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.013>

Lee, H. Y., & Hong, I. S. (2017). Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Science*, 108(10), 1939–1946. <https://doi.org/10.1111/cas.13334>

León-González, A. J., Jiménez-Vacas, J. M., Fuentes-Fayos, A. C., Sarmiento-Cabral, A., Herrera-Martínez, A. D., Gahete, M. D., & Luque, R. M. (2021). Role of metformin and other metabolic drugs in the prevention and therapy of endocrine-related cancers. *Current Opinion in Pharmacology*, 60, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.06.002>

Libby, G., Donnelly, L. A., Donnan, P. T., Alessi, D. R., Morris, A. D., & Evans, J. M. M. (2009). New users of metformin are at low risk of incident cancer: A cohort study

among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32(9), 1620–1625. <https://doi.org/10.2337/dc08-2175>

Lissoni, P., Brivio, F., Fumagalli, L., Messina, G., Meregalli, S., Porro, G., Rovelli, F., Vigorè, L., Tisi, E., & D'Amico, G. (2009). Effects of the conventional antitumor therapies surgery, chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy on regulatory T lymphocytes in cancer patients. *Anticancer Research*, 29(5), 1847–1852.

Mainetti, L. E., Rico, M. J., Fernández-Zenobi, M. V., Perroud, H. A., Roggero, E. A., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2013). Therapeutic efficacy of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin on murine mammary adenocarcinomas. *Annals of Oncology*, 24(9), 2310–2316. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt164>

Mainetti, L. E., Rico, M. J., Kaufman, C. D., Grillo, M. C., Guercetti, J., Baglioni, M. V., Giúdice, A. Del, Capitani, M. C., Fusini, M., Rozados, V. R., & Graciela Scharovsky, O. (2020). Losartan improves the therapeutic effect of metronomic cyclophosphamide in triple negative mammary cancer models. *Oncotarget*, 11(32), 3048–3060. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27694>

Mainetti, L. E., Rozados, V. R., Rossa, A., Bonfil, R. D., & Scharovsky, O. G. (2011). Antitumoral and antimetastatic effects of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide combined with celecoxib on murine mammary adenocarcinomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(1), 151–163. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0869-9>

Maiti, B., Kundranda, M. N., Spiro, T. P., & Daw, H. A. (2010). The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(2), 479–483. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0591-y>

Malik, P. S., Raina, V., & André, N. (2014). Metronomics as maintenance treatment in oncology: Time for chemo-switch. In *Frontiers in Oncology: Vol. 4 APR*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00076>

Martín-Castillo, B., Vázquez-Martín, A., Oliveras-Ferraros, C., & Menéndez, J. A. (2010). Metformin: A pharmacological approach integrating hyperinsulinemia breast cancer at the molecular, cellular clinical levels. *Avances En Diabetologia*, 26(2), 79–94. [https://doi.org/10.1016/S1134-3230\(10\)62003-0](https://doi.org/10.1016/S1134-3230(10)62003-0)

Matsen, C. B., & Neumayer, L. A. (2013). Breast cancer: A review for the general surgeon. *JAMA Surgery*, 148(10), 971–979. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2013.3393>

Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Hernández, J. M. H., Rotello, V. M., & Ramirez, J. T. (2020). Triple-negative breast cancer: A review of conventional and advanced therapeutic strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>

Mendonça, F. M., De Sousa, F. R., Barbosa, A. L., Martins, S. C., Araújo, R. L., Soares, R., & Abreu, C. (2015). Metabolic syndrome and risk of cancer: Which link? In *Metabolism: Clinical and Experimental* (Vol. 64, Issue 2, pp. 182–189). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.008>

Ministerio de Salud de la República Argentina. (2017). *Sobrepeso y Obesidad en Argentina*.

https://www.msal.gov.ar/images/stories/ryc/graficos/0000001137cnt-2017-09_cuadernillo-obesidad.pdf

Misra, A., & Khurana, L. (2008). Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11 SUPPL. 1), 9–30. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1595>

Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics*, 13(3), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>

Morantes-Caballero, J. A., Londoño-Zapata, G. A., Rubio-Rivera, M., & Pinilla-Roa, A. E. (2017). Metformina: más allá del control glucémico. *Revista Médicas UIS*, 30(1), 57–71. <https://doi.org/10.18273/revmed.v30n1-2017005>

Morris, S. R., & Carey, L. A. (2007). *Gene expression profiling in breast cancer*. www.cancer.gov/

Nandini, D., Jennifer, A., & Pradip, D. (2021). Therapeutic strategies for metastatic triple-negative breast cancers: From negative to positive. *Pharmaceuticals*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/ph14050455>

Nasr, K. E., Osman, M. A., Elkady, M. S., & Ellithy, M. A. (2015). Metronomic methotrexate and cyclophosphamide after carboplatin included adjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer: A phase III study. *Annals of Translational Medicine*, 3(19), 1–10. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.11.14>

Pastina, P., Nardone, V., Croci, S., Battaglia, G., Vanni, F., Bellan, C., Barbarino, M., Ricci, V., Costantini, S., Capone, F., Botta, C., Zarone, M. R., Misso, G., Boccellino, M., Caraglia, M., Giordano, A., Paladini, P., Tassone, P., Tagliaferri, P., ... Correale, P. (2017). Anti-cancer activity of dose-fractioned mPE +/- bevacizumab regimen is paralleled by immune-modulation in advanced squamous NSLC patients. *Journal of Thoracic Disease*, 9(9), 3123–3131. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.08.68>

Peereboom, D. M., Alban, T. J., Grabowski, M. M., Alvarado, A. G., Otvos, B., Bayik, D., Roversi, G., McGraw, M., Huang, P., Mohammadi, A. M., Kornblum, H. I., Radivoyevitch, T., Ahluwalia, M. S., Vogelbaum, M. A., & Lathia, J. D. (2019). Metronomic capecitabine as an immune modulator in glioblastoma patients reduces myeloid-derived suppressor cells. *JCI Insight*, 4(22), 1–15. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130748>

Perroud, H. A., Alasino, C. M., Rico, M. J., Mainetti, L. E., Queralt, F., Pezzotto, S. M., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2011). *METASTATIC BREAST CANCER PATIENTS TREATED WITH LOW DOSE METRONOMIC CHEMOTHERAPY WITH CYCLOPHOSPHAMIDE AND CELECOXIB. CLINICAL OUTCOMES AND BIOMARKERS OF RESPONSE*.

Perroud, H. A., Alasino, C. M., Rico, M. J., Mainetti, L. E., Queralt, F., Pezzotto, S. M., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2016). Metastatic breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and

celecoxib: Clinical outcomes and biomarkers of response. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(2), 365–374. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2947-9>

Perroud, H. A., Rico, M. J., Alasino, C. M., Queralt, F., Mainetti, L. E., Pezzotto, S. M., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2013). Safety and therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib in advanced breast cancer patients. *Future Oncology*, 9(3), 451–462. <https://doi.org/10.2217/fon.12.196>

Petry, V., Gagliato, D. M., Leal, A. I. C., Arai, R. J., Longo, E., Andrade, F., Ricci, M. D., Piato, J. R., Barroso-Sousa, R., Hoff, P. M., & Mano, M. S. (2015). Metronomic chemotherapy in the neoadjuvant setting: Results of two parallel feasibility trials (TraQme and TAME) in patients with HER2+ and HER2– locally advanced breast cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(5), 479–485. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144354>

Puglisi, F., Minisini, A. M., Aprile, G., Barbone, F., Cataldi, P., Artico, D., Damante, G., Beltrami, C. A., & Loreto, C. Di. (2002). Balance between Cell Division and Cell Death as Predictor of Survival in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. In *Laboratory/Clinical Translational Research Oncology* (Vol. 63). www.karger.com/journals/ocl

Rakha, E. A., & Ellis, I. O. (2009). Triple-negative/basal-like breast cancer: Review. *Pathology*, 41(1), 40–47. <https://doi.org/10.1080/00313020802563510>

Rehman, A. G., Soerjomataram, I., & Leitzmann, M. F. (2010). Interpreting the epidemiological evidence linking obesity and cancer: A framework for population-attributable risk estimations in Europe. *European Journal of Cancer*, 46(14), 2581–2592. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.07.052>

Rico, M. J., Baglioni, M. V., Bondarenko, M., Lalueze, N. C., Rozados, V. R., André, N., Carré, M., Scharovsky, O. G., & Menacho Márquez, M. (2017). Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 2). www.impactjournals.com/oncotarget/

Rico, M. J., Perroud, H. A., Mainetti, L. E., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2014). Comparative effectiveness of two metronomic chemotherapy schedules—our experience in the preclinical field. *Cancer Investigation*, 32(3), 92–98. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.877480>

Rozados, V. R., Mainetti, L. E., Rico, M. J., Zacarías Fluck, M. F., Matar, P., & Scharovsky, O. G. (2010). The immune response and the therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide. *Oncology Research*, 18(11–12), 601–605. <https://doi.org/10.3727/096504010X12777678141662>

Rozados, V. R., Sánchez, A. M., Gervasoni, S. I., Berra, H. H., Matar, P., & Scharovsky, O. G. (2004). Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. *Annals of Oncology*, 15(10), 1543–1550. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh384>

Scharovsky, O. G., Mainetti, L. E., & Rozados, V. R. (2009). M E D I C A L O N C O L O

G Y Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. In *Current OnCOlogy* (Vol. 16, Issue 2).

Scharovsky, O. G., Matar, P., Rozados, V. R., Rico, M. J., Fluck, M. F. Z., Mainetti, L. E., Virginia, M., Zenobi, F., Roggero, E. A., Gervasoni, S. I., Rossa, A., Perroud, H. A., Sánchez, A. M., Celoria, G. C., & Font, M. T. (2012). ARTÍCULO ESPECIAL INMUNOMODULACIÓN Y ANTIANGIOGÉNESIS EN LA TERAPÉUTICA ONCOLÓGICA DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA CLÍNICA. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 72(1), 47–57.

Scharovsky, O. G., Rico, M. J., Mainetti, L. E., Perroud, H. A., & Rozados, V. R. (2020). Achievements and challenges in the use of metronomics for the treatment of breast cancer. *Biochemical Pharmacology*, 175(March), 113909. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113909>

Shen, Z. (2011). Genomic instability and cancer: An introduction. In *Journal of Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 1, pp. 1–3). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq057>

Soriano, J., Lima, M., González, J., Batista Albuerne, N., López Soto, M. V, Rodríguez Menéndez, M., Loys Fernández, J. L., & Montejo Viamontes, N. (2009). Quimioterapia metronómica con ciclofosfamida y metotrexato en pacientes con cáncer de mama metastásico en progresión. *Revista Cubana de Medicina*, 48(2), 0–0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232009000200002

Steck, S. E., & Murphy, E. A. (2020). Dietary patterns and cancer risk. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0227-4>

Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>

Vona-Davis, L., Rose, D. P., Hazard, H., Howard-McNatt, M., Adkins, F., Partin, J., & Hobbs, G. (2008). Triple-negative breast cancer and obesity in a rural appalachian population. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 17(12), 3319–3324. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0544>

Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: Is there a unifying taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(12), 718–730. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.166>

Wheaton, W. W., Weinberg, S. E., Hamanaka, R. B., Soberanes, S., Sullivan, L. B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G. M., Scott Budigner, G. R., & Chandel, N. S. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *ELife*, 2014(3), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.02242>

WHO. (2021). *Obesidad y Sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., & Tso, P. (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *Journal of Nutrition*, 133(4), 1081–

1087. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1081>

Wu, Q., Siddharth, S., & Sharma, D. (2021). Triple negative breast cancer: A mountain yet to be scaled despite the triumphs. *Cancers*, *13*(15). <https://doi.org/10.3390/cancers13153697>

Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., Hayes, M. M., & Gelmon, K. A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*, *11*(2), 174–183. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70262-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70262-1)

Zhu, Y., Aupperlee, M. D., Haslam, S. Z., & Schwartz, R. C. (2017). Pubertally Initiated High-Fat Diet Promotes Mammary Tumorigenesis in Obesity-Prone FVB Mice Similarly to Obesity-Resistant BALB/c Mice. *Translational Oncology*, *10*(6), 928–935. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.09.004>

7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados de este Trabajo Final de Grado dieron origen a la siguiente presentación en Congreso Nacional:

Lanzillotta, Magdalena; Barranco, María M.; Habib, Martín J.; Sylvestre Begnis, María; Massuh, Greta; Sigal, Nicolás; Del Giúdice, Antonela; Rico, María J.; Rozados, Viviana R.; Scharovsky, O. Graciela; García, Fabiana; Mainetti, Leandro E. "Eficacia de la quimioterapia metronómica con metformina y ciclofosfamida en un modelo de adenocarcinoma de mama murino triple negativo en ratones sometidos a una dieta rica en grasas" XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario, noviembre 2019. ISSN: 2314-1484.