



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFECTO QUIMIOSENSIBILIZANTE DE METFORMINA SOBRE
ESFERAS DERIVADAS DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO
CANINO CF41.Mg**

Andrea Loreto Ehijo Paredes

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Clínicas**

PROFESOR GUÍA: Cristian Gabriel Torres Mendoza

**Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Departamento de Ciencias Clínicas**

**SANTIAGO, CHILE
2022**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFECTO QUIMIOSENSIBILIZANTE DE METFORMINA SOBRE
ESFERAS DERIVADAS DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO
CANINO CF41.Mg**

Andrea Loreto Ehijo Paredes

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Clínicas**

CALIFICACIÓN FINAL:

	CALIFICACIÓN	FIRMA
PROFESOR GUÍA: CRISTIAN TORRES
PROFESORA CONSEJERA: DANIELA IRAGÜEN
PROFESORA CONSEJERA: LORENA AGUILAR

**SANTIAGO, CHILE
2022**

AGRADECIMIENTOS

Por fin puedo escribir esta parte, la de agradecer a las personas que me han acompañado en este largo -l a r g o- pero interesante proceso.

Primero quiero agradecer a mi familia, particularmente a mis hermanas y hermano, quienes han estado siempre preocupados de mi bienestar. Quisiera partir mencionando el coaching que me hizo mi hermana Daniela, en el cual realmente fue una coach para que me sintiera más cómoda para presentar, también agradecer a mi hermana Claudia, siempre tratando de integrar un poco la planificación en mi vida, muy al estilo capricornio por supuesto, y al querido Checho, por estar dispuesto a ayudarme en lo que sea. Agradecer también a Sebastián Contreras y Rainer Von Borries, quienes desde sus áreas y puntos de vista me pudieron comentar y aconsejar. No puedo dejar de mencionar a mi abuela Lilian Basulto, la cual siempre ha estado apoyándome y motivándome a seguir.

A mis amigas y amigos, los que son un pilar fundamental en mi vida, y que mencionaré por los nombres de los grupos de pequeñas, porque ya qué importa, las pinguinas y las CDT, junto con Héctor Ibarra y Nicolás Leyton. También a Felipe Espina, primera persona con la que hablé de la facultad, lo cual agradezco hasta el día de hoy. A Demian Sances el que me acompañó en los momentos buenos y no tan buenos, y que atesoro en el corazón.

A mi querido equipo de básquetbol Antumapu en donde conocí a personas hermosas.

Y finalmente agradecer a mi profesor guía Cristian Torres, el cual me enseñó lo bonito de la investigación y de seguir aprendiendo.

RESUMEN

El cáncer mamario canino es la neoplasia más frecuente en la hembra reproductivamente intacta. Se ha descrito que dentro de la masa tumoral mamaria hay una subpoblación celular llamada células neoplásicas troncales o iniciadoras de tumores (CNT), las que tienen capacidad de autorenovación, de diferenciación, además de exhibir resistencia a quimio y radioterapia. Las CNT *in vitro* pueden formar agrupaciones esféricas, estructuras celulares que muestran alta tumorigenicidad y resistencia a fármacos antitumorales. El mecanismo de resistencia más frecuente se relaciona con la sobreexpresión y/o aumento de la actividad de transportadores proteicos de la familia “ATP binding cassetes (ABC)”, como la glicoproteína P. Metformina es un fármaco utilizado en el tratamiento de diabetes tipo 2 en humanos, y ha mostrado efectos antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. Existe evidencia que esta droga podría inducir un efecto quimiosensibilizante sobre células tumorales mamarias humanas, no existiendo reportes en células neoplásicas animales.

En este estudio se evaluó el efecto de metformina sobre la viabilidad en esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg expuestas a doxorrubicina, así como la actividad y expresión de glicoproteína P en respuesta a esta droga.

Metformina 5 mM asociado a 500 ng/ml de doxorrubicina disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) el número de células vivas derivadas de esferas, comparado con cada fármaco por separado. Sin embargo, la actividad de glicoproteína P no fue alterada por 5 mM metformina.

Estos resultados sugieren que metformina ejerce un efecto citostático y aditivo con doxorrubicina sobre esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, y que este efecto no se relacionaría con una modulación negativa de glicoproteína P inducida por este fármaco.

Palabras clave: Cáncer mamario canino, células iniciadoras de tumores, esferas, glicoproteína P, metformina.

ABSTRACT

Canine mammary cancer is the most frequent neoplasm in the reproductively intact female. Within the mammary tumors there is a cellular subpopulation called cancer-stem cells or tumor-initiating cells (CNT), which have a capacity for self-renewal, differentiation, and resistance to chemo and radiotherapy. CNT's can form spheres *in vitro*, which are cellular structures that have high tumorigenicity and resistance to antitumor drugs. The most frequent resistance mechanism is related to overexpression and increased activity of protein transporters called "ATP binding cassettes (ABC)", such as P- glycoprotein. Metformin is a drug used in the treatment of type 2 diabetes in humans and has shown antitumor effects both *in vitro* and *in vivo*. There is evidence that this drug could induce a chemosensitizing effect on human mammary tumor cells, with no reports on animal tumor cells.

In this study, the effect of metformin on viability in spheres derived from CF41.Mg canine mammary carcinoma cells exposed to doxorubicin was evaluated, as well as the activity and expression of P-glycoprotein in response to metformin.

5 mM metformin associated with 500 ng/ml doxorubicin significantly decreased ($p < 0.05$) the number of live cells derived from spheres, compared with each drug separately. Nevertheless, P-glycoprotein activity was not altered by 5 mM metformin.

These results suggest that doxorubicin-associated metformin exerts a cytostatic effect on spheres derived from CF41.Mg cells, and that effect is not related to down-regulation of P-glycoprotein induced by this drug.

Keywords: Canine mammary cancer, tumor initiating cells, spheres, P-glycoprotein, metformin.

INTRODUCCIÓN

Los tumores de la glándula mamaria representan la neoplasia más común en hembras caninas reproductivamente intactas (Sorenmo *et al.*, 2013; Von Euler, 2014; Lutful *et al.*, 2015). Aproximadamente, el 50% de estas neoplasias son de carácter patológico maligno, lo que implica capacidad invasiva y potencial inductor de metástasis (Lutful *et al.*, 2015). Para realizar un diagnóstico adecuado se recomienda, además de la historia clínica, un examen clínico detallado, incluyendo la palpación de ambas líneas mamarias (Sorenmo *et al.*, 2011).

El tratamiento de elección es la cirugía, donde es clave obtener márgenes libres de células tumorales, los que deben ser de al menos 2 cm de tejido macroscópico normal (Von Euler, 2014). Sin embargo, no basta con la cirugía en el caso de tumores que tienen un alto riesgo de diseminación, como aquellos de gran tamaño (> 5 cm de longitud en su eje principal), alto grado histológico y/o linfonodos infiltrados con células neoplásicas. En estos casos, se recomienda además una terapia sistémica como la quimioterapia (Sorenmo *et al.*, 2013). No obstante, la eficacia de estas drogas para aumentar el tiempo libre de enfermedad y de supervivencia completa posterior a la cirugía es incierta. Uno de los factores que explicaría esta situación es el desarrollo de quimioresistencia, lo cual implica recurrencia clínica y pobre respuesta al tratamiento farmacológico (Honscha *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016; Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017). Así, se vuelve interesante evaluar otros fármacos que ayuden a disminuir esta resistencia y que generen menores efectos adversos.

Resistencia a drogas antineoplásicas

La resistencia de células neoplásicas frente a distintas clases de quimioterápicos que no tienen relación estructural ni funcional se conoce como resistencia a multidrogas (MDR) (Xue *et al.*, 2017). Las células pueden exhibir resistencia intrínseca, o bien adquirirla luego de haber estado previamente expuestas a alguna droga citotóxica. Incluso puede generarse resistencia a otros quimioterápicos diferentes, pertenecientes o no a la misma familia farmacológica (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017).

El mecanismo por el cual se desarrolla la MDR es multifactorial; puede desencadenarse por un aumento en el transporte de salida de la droga desde el interior de la

célula, un reducido consumo de la droga, arresto celular (baja tasa proliferativa) y/o control del ciclo celular alterado, secuestro lisosomal de drogas (Li *et al.*, 2016), modulación negativa de vías pro-apoptóticas y alteración estructural-funcional de moléculas blanco (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017).

Dentro de los mecanismos ya mencionados, la causa predominante de la MDR es el aumento del flujo de salida de drogas desde el espacio intracelular mediante transportadores proteicos que se encuentran insertos en la membrana celular (Li *et al.*, 2016). Uno de los principales es la glicoproteína P, codificada por el gen MDR-1, perteneciente a la familia de transportadores “ATP-binding cassettes (ABC)” (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017). Estos transportadores son proteínas de transmembrana que movilizan activamente variados tipos de sustratos a través de la membrana, con el gasto pertinente de ATP (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017). Particularmente, la glicoproteína P es capaz de transportar una amplia gama de quimioterápicos (Honscha *et al.*, 2009), como antraciclina (doxorrubicina, epirubicina, mitoxantrona, entre otras), donde una vez que el fármaco se une al transportador, es conducido fuera de la célula disminuyendo su concentración intracelular, reduciendo así su efecto farmacológico y eficacia terapéutica. Para intentar contrarrestar lo anterior, es necesario evaluar el uso de drogas complementarias que ayuden a mejorar la eficacia de estos quimioterápicos, quimiosensibilizando células tumorales, y que además no aumenten los efectos adversos que ya tienen estos fármacos antineoplásicos (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017).

Células neoplásicas troncales o iniciadoras de tumores

Diversos estudios han señalado que tumores sólidos como el mamario, están compuestos por una población celular heterogénea con diferentes características fenotípicas y potenciales proliferativos, donde la mayoría de las células neoplásicas tienen una proliferación limitada, y solo una subpoblación celular cuenta con la capacidad iniciadora o de repoblamiento de nuevos tumores (Yang *et al.*, 2017). Dicha subpoblación se conoce como células neoplásicas troncales o células iniciadoras de tumores (CNT), las que exhiben características parecidas a las células troncales normales, tales como capacidad de autorrenovación y multi o unipotencialidad (Barbieri *et al.*, 2015; Michishita *et al.*, 2019), además de resistencia a quimio y radioterapia (Torres *et al.*, 2015).

El origen de las CNT, si bien aún no es claro, podría ser producto de la transformación maligna de células troncales normales residentes en la glándula mamaria, desdiferenciación de células neoplásicas maduras o la inducción de células neoplásicas pluripotentes (Kaszak *et al.*, 2018). Estas células pueden representar la subpoblación responsable de la actividad iniciadora del tumor y de la resistencia a agentes antineoplásicos (Barbieri *et al.*, 2015), lo que se relaciona en parte a una alta expresión de proteínas transportadoras de la familia *ATP-binding cassettes* (ABC), quiescencia (inactividad proliferativa) y alta capacidad de reparación de ADN (Rybicka y Król, 2016). Cabe mencionar que la quimioterapia tiene más efectividad contra células tumorales que proliferan rápidamente, por lo que la baja tasa proliferativa que presentan estas células, en conjunto con el aumento de transportadores ABC, permiten a las CNT escapar de los efectos citotóxicos de los quimioterápicos (Rybicka y Król, 2016). Por otro lado, la capacidad de autorrenovación de estas células contribuye al crecimiento, metástasis y recurrencia del tumor mamario (Yang *et al.*, 2017). Recientemente en medicina veterinaria se ha descrito la presencia de células neoplásicas troncales en diversos tipos de tumores sólidos, incluidos el osteosarcoma, carcinoma mamario, carcinoma hepatocelular, rhabdomiosarcoma, y adenocarcinoma pulmonar, entre otros (Michishita *et al.*, 2019).

Las CNT tienen la capacidad de formar esferas *in vitro*, las cuales son estructuras celulares que crecen en condiciones libres de anclaje y en ausencia de suero fetal bovino (Michishita *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015). Es relevante mencionar que esferas provenientes de líneas celulares de cáncer de mama canino han demostrado una alta tumorigenicidad en ratones inmunodeficientes, resistencia a fármacos antitumorales y una mayor expresión de genes de troncalidad (Michishita *et al.*, 2019). Así, el ensayo de esferas es uno de los métodos más utilizados para aislar, identificar y estudiar células neoplásicas troncales a nivel de laboratorio (Michishita *et al.*, 2011).

En particular, esferas de carcinoma mamario canino derivadas de la línea celular CF41.Mg exhiben la capacidad de autorenovación y quimioresistencia a diversos fármacos, como doxorubicina, paclitaxel y simvastatina, además de presentar una alta proporción del fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo} (Torres *et al.*, 2015), clásicamente asociado a CNT mamarias. CD44 pertenece a la familia de glicoproteínas transmembrana tipo 1 y es el receptor de

ácido hialurónico, pero también se puede unir a colágeno, fibronectina o condroitín-sulfato (Rogez *et al.*, 2018). Esta glicoproteína de transmembrana también participa en la regulación de la adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Rogez *et al.*, 2018). Por otro lado, CD24 es una proteína de superficie tipo mucina, que puede aumentar la proliferación, motilidad e invasividad de la célula tumoral, así como el crecimiento y la metástasis; su sobreexpresión ha sido asociada con aumento de la agresividad del cáncer, incluido cáncer de mama, ovario, pulmón y próstata (Rogez *et al.*, 2018). El fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo} de las CNT se ha asociado a carcinoma mamario canino de alto grado histológico (Kaszak *et al.*, 2018).

Metformina

Metformina es una droga que proviene de la familia de las biguanidas que se ha usado ampliamente para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en humanos (Del Barco *et al.*, 2011; Saeki *et al.*, 2015; Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017). Se caracteriza por disminuir la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática, disminuye la absorción intestinal de glucosa, reduce la liberación de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo y aumenta el ingreso de glucosa al músculo esquelético, generando un efecto reductor de glucosa en el organismo (Samuel *et al.*, 2019).

Este fármaco logra sus efectos antidiabéticos bloqueando el complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial y consecuentemente disminuyendo la fosforilación oxidativa (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017), lo que induce una disminución tanto de la oxidación de NADH, como del paso de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Además, disminuye el índice de consumo de oxígeno, generando una reducción del gradiente de protones y una regulación negativa de la síntesis de ATP a partir de ADP (Arocha *et al.*, 2017). Por consiguiente, se genera un aumento en la proporción AMP/ATP, donde el incremento del AMP puede estimular la actividad de enzimas como la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017).

La proporción AMP/ATP aumenta cuando hay estrés celular, condición que puede ser gatillada por hipoxia, isquemia, privación de glucosa o estrés oxidativo, activando AMPK, el cual es un sensor metabólico que regula la homeostasis celular energética (Del Barco *et al.*, 2011). La activación de AMPK inhibe procesos anabólicos que requieren de

energía y activa vías catabólicas que producen energía (Del Barco *et al.*, 2011; Arocha *et al.*, 2017). Es importante mencionar que AMPK es la enzima clave en la regulación de los efectos metabólicos de metformina (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017). Además de estos efectos metabólicos, se ha demostrado que la activación de AMPK inducida por metformina inhibe vías anabólicas que estimulan el crecimiento celular, tales como la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, proteínas y síntesis del ARN ribosomal (El-Ashmawy *et al.*, 2017). Por lo tanto, la actividad de AMPK antagoniza el crecimiento de células tumorales, las que requieren de un alto nivel energético debido a su capacidad de crecimiento y proliferación acelerada (El-Ashmawy *et al.*, 2017).

En ese sentido, metformina puede inhibir a la proteína mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*) tanto de forma directa como indirecta, es decir, mediante la activación de AMPK o por los niveles disminuidos de insulina o IGF-1 (Del barco *et al.*, 2011; Saini y Yang, 2017). mTOR participa en la regulación de la homeostasis celular energética, modulando procesos celulares como la síntesis de proteínas y la autofagia, por lo que es relevante en el crecimiento celular y en la tumorigénesis de diferentes neoplasias (Del barco *et al.*, 2011; Samuel *et al.*, 2019). En particular, la activación de mTOR es frecuente pesquisarla en cáncer de mama y se relaciona a un pronóstico desfavorable (Del barco *et al.*, 2011).

Con respecto al metabolismo energético, las células tumorales suelen tener altos niveles de absorción de glucosa independientemente de la disponibilidad de oxígeno, lo que se conoce como efecto Warburg (Xue *et al.*, 2017). Es decir, obtienen energía a través de una glicolisis aumentada que, si bien es menos eficiente en la producción de ATP que la fosforilación oxidativa, es un proceso más rápido, lo que les podría favorecer debido a su rápido crecimiento y su elevado requerimiento energético (Del barco *et al.*, 2011). De hecho, debido a la mayor necesidad energética, las células neoplásicas son más sensibles a cambios de energía (Xue *et al.*, 2017). Además, se ha descrito que la estrategia metabólica de utilizar mayoritariamente la glicolisis fomentaría la anaplasia y autorenovación de células neoplásicas troncales (Romo, 2016).

Por otro lado, células tumorales con un fenotipo de quimioresistencia también exhiben mayor demanda de ATP, ya que uno de los mecanismos de resistencia a drogas

más reconocidos es la sobreexpresión de transportadores de membrana, en particular de la familia ABC, los que requieren de ATP para poder expulsar al sustrato y reducir la acumulación intracelular de drogas citotóxicas (Li *et al.*, 2017). De este modo, metformina como agente reductor de glucosa, podría interrumpir el suministro energético de células neoplásicas e inhibir el crecimiento tumoral, además de suprimir el funcionamiento de estos transportadores de drogas (Li *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Se ha descrito que este fármaco puede ejercer un efecto antitumoral a través de mecanismos directos e indirectos (Samuel *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). La vía directa está relacionada a la inhibición de la proliferación mediante la activación de AMPK (Zhang *et al.*, 2019). En tanto que el mecanismo indirecto estaría dado por su capacidad de reducir los niveles de insulina y glucosa (Samuel *et al.*, 2019). Cabe mencionar que, cuando los niveles de insulina aumentan, esta puede unirse y activar su receptor específico o el receptor del factor de crecimiento de insulina (IGF-1R), los cuales pueden actuar como factores de crecimiento estimulando la supervivencia celular y mitogénesis, fomentando el desarrollo y progresión del cáncer (Wang *et al.*, 2017).

En efecto, variados estudios epidemiológicos sugieren un efecto antitumoral pro-apoptótico de metformina sobre diversas neoplasias humanas como de ovario, mama, colorrectal y de próstata (Wang *et al.*, 2017). Asimismo, el consumo de metformina se ha asociado con una disminución de la mortalidad por cáncer (Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no son claros los mecanismos involucrados en la acción de metformina para lograr estos efectos (Shafiei-Irannejad *et al.*, 2017).

En medicina veterinaria, hay escasa información sobre el potencial efecto antitumoral de metformina, sin embargo, sus efectos citotóxicos también se han demostrado preliminarmente sobre cultivos celulares primarios obtenidos de neoplasias mamarias caninas (Barbieri *et al.*, 2015) y en células de carcinoma mamario canino CF41.Mg (Romo, 2016).

Recientemente, se ha demostrado que metformina tiene la capacidad de revertir la resistencia a doxorrubicina en células de carcinoma mamario humano MCF7, haciéndolas más sensibles al efecto de la quimioterapia. Estos efectos estarían mediados por una

depleción de ATP, inducción de radicales libres derivados de oxígeno y una menor expresión de glicoproteína P (Li *et al.*, 2017).

El objetivo de esta memoria de título fue evaluar el potencial quimiosensibilizante *in vitro* de metformina sobre esferas obtenidas de células de carcinoma mamario canino expuestas a doxorrubicina, una de las principales drogas utilizadas en la terapia adyuvante del carcinoma mamario canino. Se estudió adicionalmente, la expresión y actividad de glicoproteína P, proteína de transmembrana asociada a quimioresistencia a doxorrubicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos requeridos para el desarrollo de esta memoria de título fueron realizados en el laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa, del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y en el laboratorio Centralizado de Investigación Veterinaria (LaCIV) de la misma facultad.

Cultivo celular

La línea celular adherente CF41.Mg (CRL-6232, ATCC) se cultivó en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) alto en glucosa (4,5 g/L), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B. Fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ y el medio de cultivo fue cambiado cada 48 h previo lavado de las células con solución salina tamponada con fosfato de *Dulbecco* (DPBS). Todo según las especificaciones de cultivos de la línea celular.

Para la desagregación de células, una vez alcanzado un 80-90% de confluencia, fueron lavadas con DPBS y luego incubadas con Tripsina 2,5% / ETDA 0,2g/L por 10 min. La reacción fue detenida con DMEM más 10% SFB; luego las células se centrifugaron a 200 g por 10 min a 4 °C, y finalmente fueron recuperadas del pellet obtenido y resembradas. La concentración de células vivas se evaluó a través del método de exclusión con azul tripán y hemocitometría.

Cultivo de esferas

Las células parentales (CF41.Mg adherentes) fueron disgregadas, lavadas con DPBS, centrifugadas y luego sembradas en medio de cultivo para esferas constituido por DMEM-F12, el cual se diferencia del DMEM alto en glucosa en, por ejemplo, contener menores niveles de glucosa (3,1 g/L), este medio es suplementado con B27 2% (suplemento libre de suero que favorece el crecimiento celular), heparina 4 µg/ml, insulina recombinante humana (IRH) 5 µg/ml, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) 10 ng/ml, factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/ml, 20 U/ml de penicilina G, 20 µg/ml de estreptomicina y 0,05 µg/ml de anfotericina B. Los suplementos fueron agregados

cada 48 h. Estas células se cultivaron bajo condiciones libre de anclaje utilizando placas de ultra baja adherencia y en ausencia de SFB.

Ensayo de viabilidad celular post tratamiento con metformina

Células CF41.Mg estimuladas con metformina 1 mM y 10 mM:

Para evaluar la viabilidad de células adherentes CF41.Mg expuestas a metformina, se cultivaron 10.000 células por pocillo en triplicado en placas de 24 pozos. A las 48 h de la siembra se contaron los *inputs* para conocer el número de células viables post siembra, y se estimuló con metformina en concentración 1 mM y 10 mM, según lo establecido en ensayos preliminares. Las condiciones experimentales fueron: control (células sin fármaco), metformina 1 mM y 10 mM con lecturas a las 24 y 48 h post estimulación. Cumplidos los tiempos requeridos se contaron las células vivas mediante el método de exclusión de azul tripán y hemocitometría.

Esferas derivadas de CF41.Mg con estímulos de metformina 1 y 5 mM, y doxorubicina 500 ng/ml:

Para los ensayos de viabilidad de células derivadas de esferas, se sembraron en triplicado células en concentración de 8.000 células/pocillo en placas de 24 pozos, cultivadas en condiciones libres de anclaje y con medio de cultivo de esferas. Según lo ejecutado en ensayos preliminares, a las 24 h de sembradas se contó el *input* y se agregó metformina en concentración de 1 mM y 5 mM, en presencia o ausencia de 500 ng/ml de doxorubicina, también se estimularon pozos en triplicado con doxorubicina 500 ng/ml y se dejaron pozos sin fármaco para que fueran la condición control. Luego de 72 h, se contaron células vivas y muertas con el método de exclusión de azul tripán y hemocitometría.

Expresión de glicoproteína P

La expresión de glicoproteína P fue evaluada mediante citometría de flujo. Se sembraron 200.000 células derivadas de esferas por pocillo en duplicado en placas de 6 pocillos, donde las condiciones experimentales fueron: blanco (células sin fármacos ni

anticuerpos), control negativo (sin anticuerpo primario), control (células con ambos anticuerpos) y metformina 5 mM. Luego de 72 h de la estimulación, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y quedaron en incubación a 4 °C por una semana.

Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min, y se resuspendió el pellet en solución permeabilizante (PBS 1X + TRITON X100 1%) por 15 min a T° ambiente. Cumplido el tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min y resuspendidas en solución de lavado (PBS 1X + Tween 20 0,1%). Luego, se suspendió el pellet en solución de bloqueo (PBS 1X+ albúmina 3% + glicina 1,5 mg/ml) por 1 h a T° ambiente. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1.800 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante, y el blanco y control negativo fueron resuspendidos en solución de PBS 1X + BSA 3%. En cambio, las condiciones control y metformina fueron incubadas con un anticuerpo anti-glicoproteína P (clon C219, marca thermofisher) en una dilución de 1:100 a 4 °C toda la noche.

Al otro día, las muestras fueron centrifugadas a 1.800 rpm por 5 min, y fueron expuestas a solución de lavado 3 veces. Luego, el blanco se resuspendió en PBS 1X + BSA 3%. Las demás condiciones fueron incubadas con anticuerpo secundario (anti-ratón hecho en cabra Alexa 488) en dilución 1/500 a T° ambiente por 1 h, en oscuridad. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 1.800 rpm por 5 min, lavadas y re-suspendidas en PBS 1X + Tween 0,1%, quedando en incubación a T° ambiente por 10 min, para luego ser centrifugadas; este proceso se repitió 2 veces. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en PBS + Tween 20 y 5 µl de Ioduro de Propidio 10 µl/ml (menos el blanco, el cual solo llevó PBS + Tween 20), por 15 min a T° ambiente. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 500 µl de PBS para ser analizadas en un citómetro de flujo BD-FACSCalibur.

Actividad de glicoproteína P

Con el propósito de determinar la actividad de glicoproteína P, se determinó la concentración de doxorrubicina intracelular, midiendo su intensidad de fluorescencia utilizando el mismo citómetro de flujo. Para esto, se cultivaron 200.000 células derivadas de esferas por pozo en placas de 6 pocillos, con las siguientes condiciones experimentales en duplicado: blanco (medio con esferas); doxorrubicina 500 ng/ml; metformina 5 mM más doxorrubicina 500 ng/ml; verapamil 200 µM (control positivo) más doxorrubicina 500

ng/ml; y, Ioduro de propidio (PI) más doxorubicina 2 µg/ml (control para programar el citómetro de flujo). Veinticuatro horas post siembra, se estimuló con 5 mM de metformina por 72 h para luego agregar 500 ng/ml de doxorubicina por 1 h. Como control positivo, se utilizó 200 µM de verapamil por 30 min, para posteriormente adicionar doxorubicina. Luego, las esferas fueron centrifugadas a 1.800 rpm por 10 min, tripsinizadas y cuantificadas mediante el método de exclusión de azul tripán y hemocitometría, Finalmente, las células fueron centrifugadas y lavadas con PBS más SFB al 2% y evaluadas en un citómetro de flujo, particularmente la doxorubicina se puede captar por el canal FL2, el cual muestra la reacción a una longitud de onda de 585 nm.

Análisis de resultados

La descripción de los resultados se hizo mediante medias y desviaciones estándar. Para determinar el tipo de distribución de los datos, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Para la determinación de diferencias estadísticas entre los grupos control y los grupos con tratamiento, se utilizó ANOVA de una vía más un análisis Post Hoc de Bonferroni, en caso de encontrar los datos normalmente distribuidos. En caso de una distribución no normal, la prueba de elección fue Kruskal Wallis. Se consideró significancia estadística con un valor de $P < 0,05$. Todos los análisis se hicieron con el software Infostat (AR), versión profesional.

RESULTADOS

Objetivo 1

Ensayo de viabilidad celular:

Para evaluar la sensibilidad de las células parentales de la línea celular CF41.Mg a la metformina, se realizaron ensayos con dos concentraciones de esta droga, específicamente 1 y 10 mM por 24 y 48 h de exposición (Figura 1).

Se observó que la condición metformina 1 mM, tanto a las 24 como a las 48 h, no indujo cambios significativos en el número de células vivas comparado con la condición control. Sin embargo, el tratamiento con metformina 10 mM generó una disminución significativa ($p < 0,05$) del número de células vivas a las 24 h de la exposición, y esto fue aún más notorio a las 48 h.

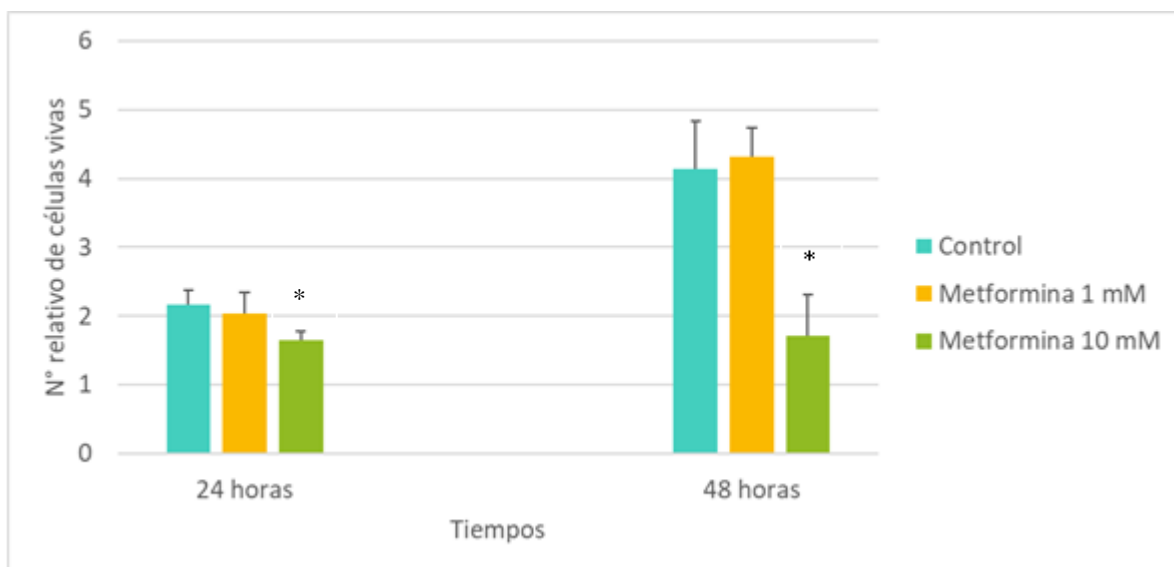


Figura 1. Las células CF41.Mg son sensibles a metformina, y su efecto es concentración y tiempo-dependiente. Se realizó la cuantificación de la viabilidad de células CF41.Mg expuestas a metformina 1 mM y 10 mM, evaluada a las 24 y 48 horas post estimulación, mediante hemocitometría y el método de exclusión de azul tripán. Los valores son medias \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. El control son

células adherentes sin exposición a metformina. *Indica que existe diferencia estadística ($p < 0,05$). Para el grupo de 24 h se usó el test ANOVA y para el de 48 h el test Kruskal Wallis.

Posteriormente, se determinó la viabilidad de células derivadas de esferas expuestas a dos concentraciones de metformina (1 y 5 mM) asociada o no a doxorrubicina 500 ng/ml durante 72 h de incubación (Figuras 2 y 3). Se observó que en la condición de metformina 5 mM combinada con doxorrubicina 500 ng/ml hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de células vivas, respecto de las condiciones de doxorrubicina 500 ng/ml y metformina 5 mM por separado (Figura 2). Por otro lado, al cuantificar células derivadas de esferas muertas en presencia de metformina y/o doxorrubicina, se observó que la condición de doxorrubicina 500 ng/ml aumentó de forma significativa ($p < 0,05$) el número de células muertas. No obstante, la asociación de metformina 5 mM y doxorrubicina 500 ng/ml no indujo cambios significativos en el número de células muertas comparado con la condición de doxorrubicina sola (Figura 3). Según estos resultados, la concentración de metformina 5 mM por 72 h en asociación con doxorrubicina genera un efecto citostático más que citotóxico sobre células derivadas de esferas CF41.Mg.

Con estos mismos datos, como se muestra en la figura 2, se observó que en la condición de metformina 5 mM combinada con doxorrubicina 500 ng/ml hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el número de células vivas, respecto de las condiciones de doxorrubicina 500 ng/ml y metformina 5 mM por separado.

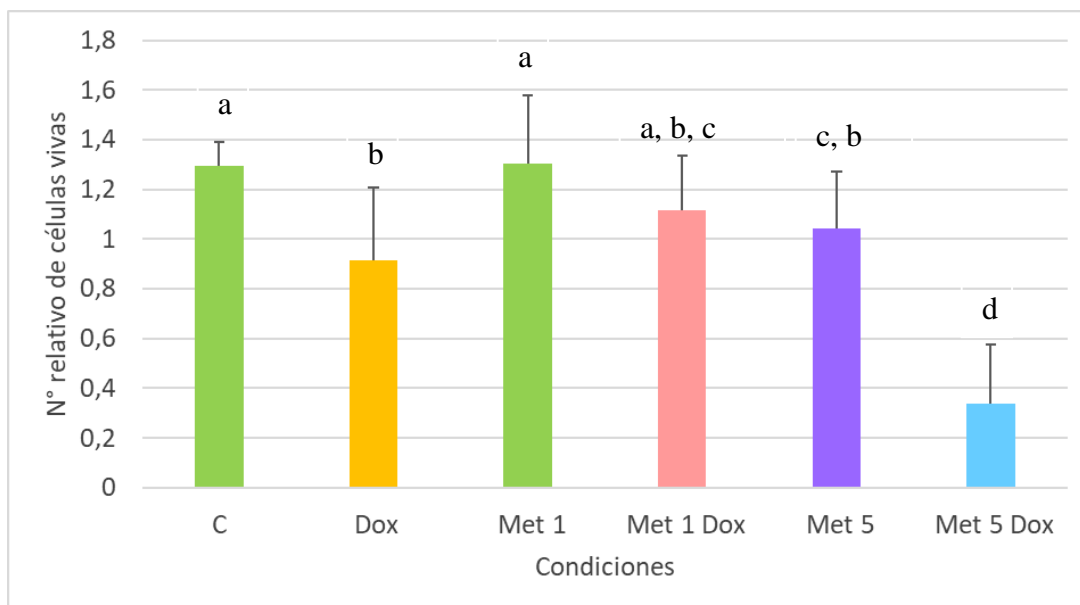


Figura 2. La combinación de Metformina 5mM y Doxorubicina 500ng/ml disminuye la sobrevida de las células CF41.Mg derivadas de esferas. Las células derivadas de esferas obtenidas de células CF41.Mg vivas fueron expuestas a distintas concentraciones de metformina (1 y 5 mM) más doxorubicina 500 ng/ml por 72 h. Las células fueron evaluadas mediante hemocitometría y el método de exclusión de azul tripán. Los valores son medias \pm DE de 4 experimentos independientes en triplicado. Letras distintas implican diferencia estadística ($p < 0,05$) (test Kruskal Wallis).

Finalmente se observó que al cuantificar células derivadas de esferas muertas en presencia de metformina y/o doxorubicina, la condición de doxorubicina 500 ng/ml aumentó de forma significativa ($p < 0,05$) el número de células muertas. No obstante, la asociación de metformina 5 mM y doxorubicina 500 ng/ml no indujo cambios significativos en el número de células muertas comparado con la condición de doxorubicina sola (Figura 3). Según estos resultados, la concentración de metformina 5 mM por 72 h en asociación con doxorubicina genera un efecto citostático más que citotóxico sobre células derivadas de esferas CF41.Mg.

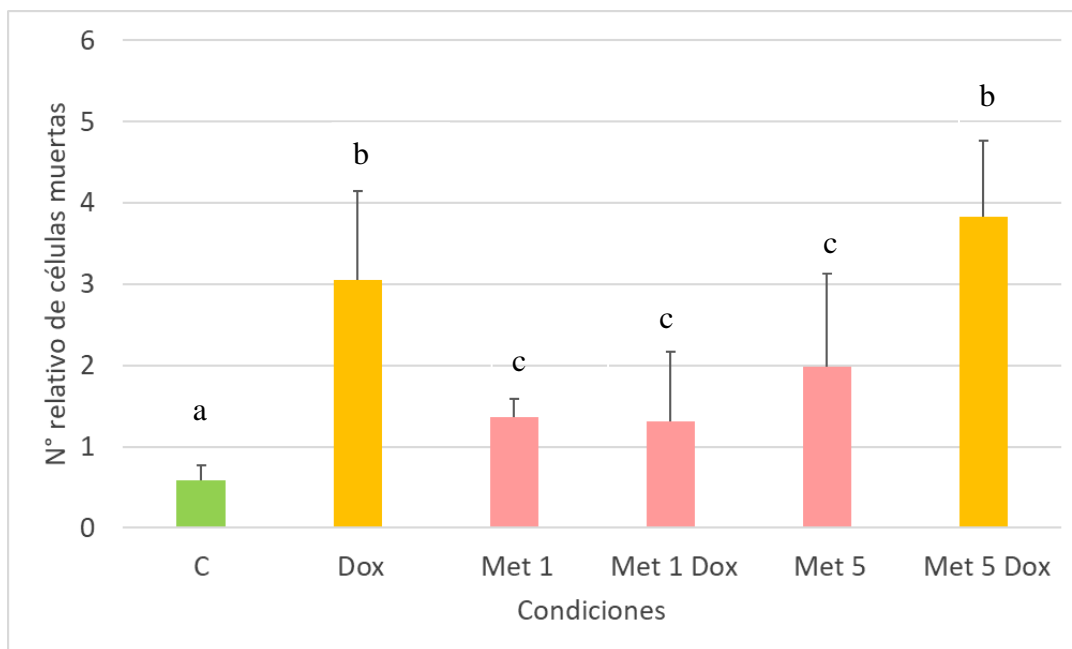


Figura 3. La combinación de Metformina 5mM y Doxorubicina 500ng/ml no aumenta la muerte de las células CF41.Mg derivadas de esferas. Las células muertas derivadas de esferas obtenidas de células CF41.Mg fueron expuestas previamente a distintas concentraciones de metformina (1 y 5 mM) más doxorubicina 500 ng/ml por 72 h. Las células fueron evaluadas mediante hemocimetría y el método de exclusión de azul tripán. Los valores son medias \pm DE de 4 experimentos independientes en triplicado. Letras distintas implican diferencia estadística ($p < 0,05$) (test Kruskal Wallis).

Objetivo 2

El ensayo de expresión y actividad de glicoproteína P fue realizado para evaluar si el uso de metformina modificaba la presencia y función de esta proteína de membrana, la cual participa en el mecanismo de quimioresistencia de las células neoplásicas troncales. En estos ensayos se utilizó la misma concentración de metformina (5 mM) de los ensayos anteriores.

Expresión de glicoproteína P

La expresión de la glicoproteína P se evaluó usando un anticuerpo anti-glicoproteína P más uno secundario conjugado con una sonda fluorescente verde. Para este ensayo solo se pudieron realizar dos repeticiones, lo que no permitió realizar un análisis estadístico que permitiese concluir que los datos obtenidos de este ensayo indican que metformina genera alguna alteración en la expresión de la glicoproteína P. Sin embargo, los resultados obtenidos y mostrados en la Figura 4 sugieren que la expresión de esta proteína disminuye en respuesta a metformina, no obstante, por ser resultados preliminares, deberán ser corroborados en experimentos posteriores.

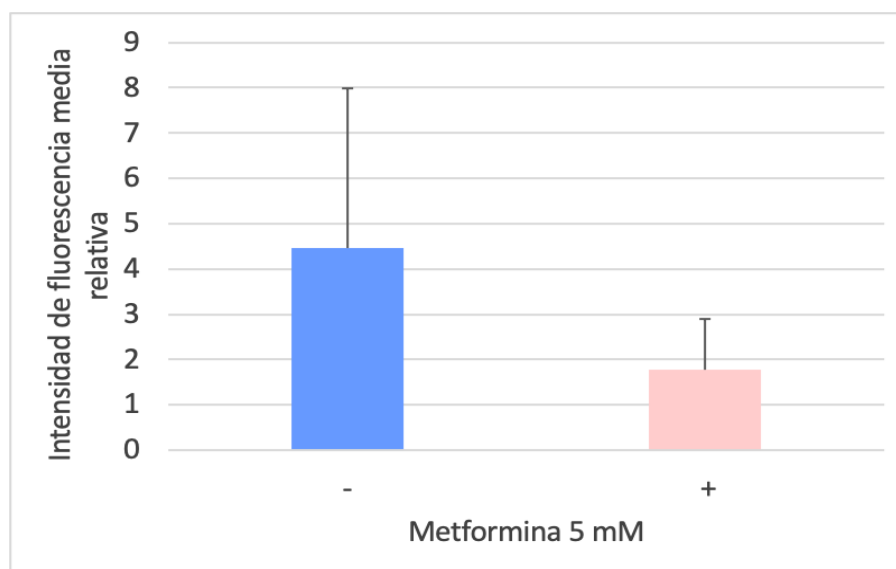


Figura 4. Metformina 5 mM disminuye la expresión de la glicoproteína P en células derivadas de esferas CF41.Mg (resultados preliminares). Expresión de glicoproteína P en células derivadas de esferas CF41.Mg en respuesta a metformina 5 mM. La células fueron expuestas a metformina, y luego se evaluó por inmunodetección la expresión a la glicoproteína P mediante citometría de flujo. Los valores son medias \pm DE de 2 experimentos independientes en duplicado.

Actividad de glicoproteína P

La glicoproteína P, al ser una proteína de transmembrana, es capaz de transportar a doxorubicina hacia el espacio extracelular, por lo tanto, a mayor actividad de esta proteína

habría menor concentración intracelular del quimioterápico. La actividad de glicoproteína P se evaluó por medio de la detección y cuantificación de fluorescencia intracelular emitida por doxorubicina.

Los resultados muestran que las células derivadas de esferas tratadas con metformina 5 mM no ven afectada la actividad de glicoproteína P comparado con el control negativo (Figura 5). Por el contrario, el control positivo indujo una alta fluorescencia media intracelular ($p < 0,05$) comparado con las otras condiciones, ya que verapamil al ser un inhibidor de la glicoproteína P, impide la excreción de doxorubicina del espacio intracelular.

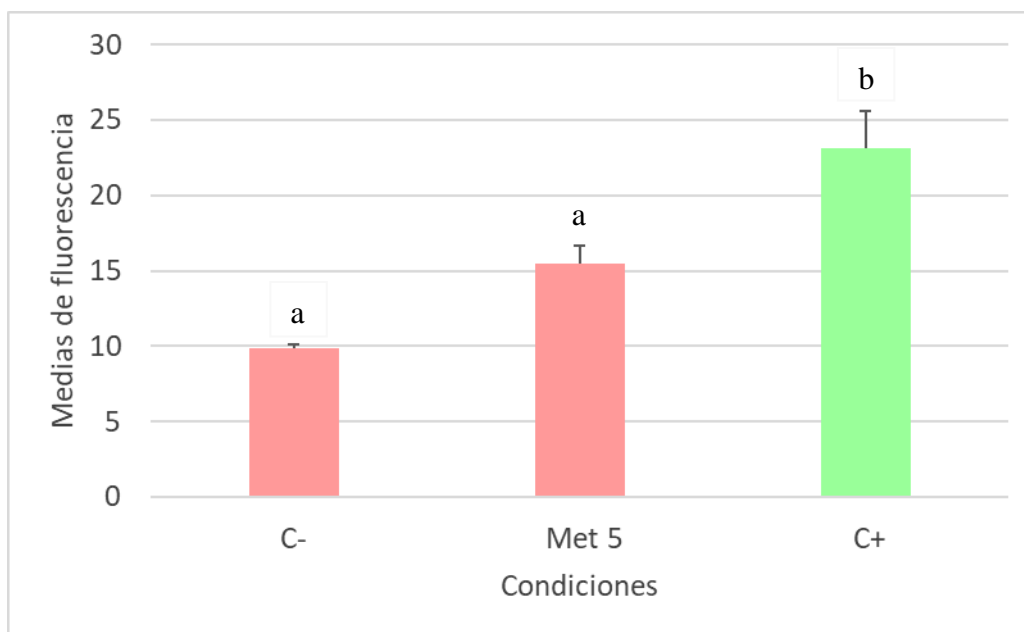


Figura 5. Metformina 5mM no afecta la actividad de la glicoproteína P en células derivadas de esferas CF41.Mg. Las células fueron expuestas a doxorubicina por 1 h en presencia y ausencia de metformina 5 mM. Luego se midió fluorescencia intracelular asociada a la presencia de doxorubicina. Las barras indican las medias \pm DE de 3 experimentos independientes en duplicado. Letras diferentes implican diferencia estadística ($p < 0,05$) (test ANOVA).

DISCUSIÓN

La mayoría de los tratamientos antitumorales, incluyendo la quimioterapia, no son totalmente efectivos en prevenir la recurrencia tumoral (Michishita *et al.*, 2011), lo que podría explicarse en parte por la presencia en el microambiente tumoral de las CNT, que como ya se ha descrito, exhiben capacidad de autorenovación e iniciación de tumores, además de resistencia a tratamientos antitumorales (Torres *et al.*, 2015). Una de las formas para poder aislar a las CNT es mediante la formación de esferas, y si bien es un método útil, tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, el medio *in vitro* puede no reflejar completamente condiciones *in vivo* y podría llevar a la selección de grupos de células diferentes de las CNT (Rybicka y Król, 2016).

Uno de los mecanismos de resistencia a drogas más reconocidos es la sobreexpresión de proteínas transportadoras de la familia ABC, las que tienen la capacidad de expulsar sustratos desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular (Luque-Bolivar *et al.*, 2020). En ese contexto, estos transportadores ABC son considerados biomarcadores de CNT (Levi *et al.*, 2019). La glicoproteína P pertenece a la familia de estos transportadores ABC y puede movilizar una amplia gama de sustratos, dentro de los cuales se describen algunos quimioterápicos (Xue *et al.*, 2016), como doxorrubicina, la cual es una de las drogas más utilizadas para tratar tumores sólidos, incluyendo los de origen mamario (Marinello *et al.*, 2019).

En este estudio, al evaluar células parentales de la línea CF41.Mg, se observó que metformina 10 mM disminuyó significativamente el número de células vivas a las 48 horas de exposición a la droga (Figura 1). Esto coincide con lo descrito por Romo (2016), quien observó una menor viabilidad en células CF41.Mg a partir de la concentración 10 mM, definiendo así que las células parentales son sensibles a esta droga en un corto periodo de incubación.

Por otro lado, Romo (2016) al exponer esferas derivadas de células CF41.Mg por 48 h a altas concentraciones de metformina (10 y 20 mM), no apreció cambios en la viabilidad de estas, lo cual sugiere una resistencia relativa a la droga, comparado con células parentales. En esta tesis, metformina 5 mM disminuyó significativamente el número de

células vivas derivadas de esferas a las 72 h, indicando que el tiempo de exposición a metformina es relevante. Como describen Roshan y cols. (2019), las propiedades anti-proliferativas de metformina dependen tanto de la concentración utilizada como del tiempo de incubación en que las células se exponen al fármaco. Según señalan Mallik y Chowdhury (2018), metformina podría inhibir a CNT, mediante la activación de AMPK y supresión de mTOR. La acción de metformina sobre esferas también ha sido reportada por Shi y cols. (2017), donde indujo una disminución significativa del número de esferas formadas a partir de líneas celulares de cáncer de mama humano. En dicho ensayo, se expuso a las células por 24 h a concentraciones de 20 y 50 mM de metformina. Por otro lado, se ha observado que metformina afecta de forma selectiva a CNT mamarias, reduciendo significativamente el crecimiento tumoral y aumentando el tiempo de remisión cuando su uso se asocia con quimioterapia (Shi *et al.*, 2017). Particularmente, Shi y cols. (2017) detectaron que metformina suprime parcialmente a CNT derivadas de una línea celular de cáncer de mama humano, mediante la inhibición del factor de transcripción KLF5, el cual es relevante en las células troncales derivadas de cáncer de mama de tipo basal. La disminución en la viabilidad celular gatillada por metformina podría deberse a un efecto mayoritariamente citostático (Barbieri *et al.*, 2015). En ese sentido, metformina bloquea algunas proteínas reguladoras del ciclo celular, como ciclina D1 y E2F1, las cuales promueven la progresión desde la fase G1 del ciclo celular a la fase S. Así, la droga ralentiza el crecimiento (Alimova *et al.*, 2009) y la tasa de división celular (Anttila *et al.*, 2019). Además, metformina al inhibir el complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial, detiene la síntesis de varios intermediarios del ciclo de Krebs, que son requeridos para el crecimiento y proliferación de células neoplásicas (Rajh *et al.*, 2016).

Como ya se ha descrito aquí, la asociación de metformina 5 mM con doxorrubicina indujo un efecto citostático sobre esferas derivadas de CF41.Mg, comparado con ambas drogas por separado. Es relevante mencionar que esferas derivadas de células CF41.Mg han mostrado quimioresistencia relativa a doxorrubicina (Torres *et al.*, 2015). Estos efectos son coherentes con lo descrito por Marinello y cols. (2019), quienes, para evaluar el efecto de metformina sobre células resistentes a doxorrubicina, expusieron a dos líneas celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-231) a concentraciones bajas de metformina

(6 μM) por 7 sem y luego con concentraciones crecientes de doxorubicina, mientras se mantenía la adición de metformina. Los autores observaron que el uso previo de metformina disminuyó la resistencia a doxorubicina, sensibilizando a las células al estrés oxidativo y apoptosis inducidas por el quimioterapéutico (Marinello *et al.*, 2019). La sensibilización de las células mediante metformina fue relacionada con la capacidad de esta droga de disminuir el nivel de ATP intracelular e inhibir la resistencia a multidrogas mediada por glicoproteína P (Samuel *et al.*, 2020). En ese contexto, se ha demostrado que metformina modula negativamente la resistencia a multidrogas, resensibilizando células tumorales mediante la activación de las vías de AMPK y mTOR (Ugwueze *et al.*, 2020). AMPK es una proteína quinasa con actividad sensora metabólica, que al ser activada previene el crecimiento celular al inhibir la síntesis de lípidos, proteínas y ARN ribosomal, e induce arresto del ciclo celular en G1 y un aumento del estrés oxidativo, evitando la duplicación del ADN (Paz *et al.*, 2016). Se ha descrito que metformina disminuye la expresión de varios genes que están involucrados en la mitosis, como kinesinas, tubulinas, histonas, entre otras, por lo que la activación crónica de AMPK disminuye la mitosis, y activa el gen supresor de tumores p53 y la senescencia celular (Del Barco *et al.*, 2011).

En esta memoria se observó que la asociación de metformina y doxorubicina no generó un incremento significativo en el número de células muertas comparado con doxorubicina sola. Al contrario de lo informado por Shafiei-Irannejad y cols. (2017), donde se observó que la co-incubación de metformina 10 mM con doxorubicina aumentó significativamente la citotoxicidad sobre células de carcinoma mamario humano resistente a doxorubicina (MCF-7/DOX). Dicha discrepancia podría tener relación con la concentración utilizada, ya que se ha descrito que se requieren concentraciones superiores a 10 mM de metformina para generar un efecto citotóxico (Barbieri *et al.*, 2015). Otro factor que podría influir sobre los resultados expuestos aquí es la concentración de glucosa en el medio donde se cultivan las células, ya que se ha informado que, en condiciones de deficiencia de glucosa, aumenta significativamente la citotoxicidad gatillada por metformina (Rajh *et al.*, 2016). Por el contrario, en condiciones de alta concentración de glucosa, se reduce la citotoxicidad de metformina (Li *et al.*, 2017) y se limita su capacidad de acción, al provocar una detención de la proliferación celular en vez de muerte celular

(De y Kuppusamy, 2019). El exceso de glucosa en el medio permite a las células neoplásicas proliferar a una tasa más alta que células normales, ya que mediante glicolisis aeróbica pueden generar la energía suficiente para esto (Varghese *et al.*, 2019). Así mismo, la glucosa promueve un fenotipo agresivo en células de carcinoma y reduce la eficacia de metformina (De y Kuppusamy, 2019), ya que, se disminuiría su eficacia de inhibir la vía mTOR (Varghese *et al.*, 2019). En este contexto, en el presente estudio fue ocupado un medio alto en glucosa (DMEM/F12 con una concentración de glucosa de 3,15 g/L), lo cual podría haber influido en los resultados descritos.

Respecto de la actividad de la glicoproteína P en esferas CF41.Mg, metformina no afectó su actividad bajo las condiciones estudiadas. Este resultado se contrapone a lo descrito por Li y cols. (2017), donde metformina aumentó la acumulación intracelular de doxorubicina en células MCF7/ADR resistentes a ella. Del mismo modo, en otro estudio se encontró que metformina aumentó la acumulación intracelular de rodamina 123, molécula que también es sustrato de glicoproteína P, lo cual indica una disminución de la actividad de esta proteína (Kim *et al.*, 2010).

Esta diferencia entre los resultados observados y lo descrito en la literatura podría explicarse por la concentración estudiada, ya que se describe que, desde una concentración de 6 mM, metformina disminuiría de forma significativa los niveles de ATP celular, aumentando los niveles de radicales libres derivados del oxígeno (ROS) intracelular, e interrumpir entonces el funcionamiento normal de la mitocondria (Li *et al.*, 2017). Por consiguiente, la concentración de 5 mM de metformina pudo ser insuficiente para generar un cambio significativo en la actividad de glicoproteína P, cuya función es dependiente de ATP.

Otro antecedente relevante de mencionar al analizar los resultados obtenidos con metformina, es que corresponde a un fármaco hidrofílico y catiónico, que necesita de transportadores específicos para traspasar la membrana celular (Cai *et al.*, 2019). En consecuencia, entre otros factores, los efectos farmacológicos de metformina se pueden atribuir a la actividad y expresión de los transportadores OCT1 y OCT3, para ingresar a la célula, donde el predominante en cáncer de mama humano es OCT3 (Ugwueze *et al.*,

2020). Así, células de tumores mamarios que expresan estos transportadores catiónicos son más sensibles a los efectos antiproliferativos de metformina (Cai *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta la fecha, no hay información respecto de la expresión de estos transportadores en células CF41.Mg, por lo que los resultados expuestos en nuestro estudio podrían asociarse a una baja expresión de estas proteínas, lo cual debe ser estudiado en un futuro.

Es posible concluir que metformina quimiosensibiliza a esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, mediante mecanismos distintos a los relacionados a glicoproteína P, los que aún son necesarios de esclarecer. En particular, podemos mencionar que metformina asociada a doxorubicina genera un efecto citostático sobre esferas derivadas de CF41.Mg. De este modo, es relevante seguir estudiando los mecanismos mediante los cuales metformina induce su efecto citostático sobre esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg.

BIBLIOGRAFÍA

ALIMOVA, I.; LIU, B.; FAN, Z.; EDGERTON, S.; DILLON, T.; LIND, S.; THOR, A. 2009. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle*. 8(6): 909-915.

ANTTILA, J.; SHUBIN, M.; CAIRNS, J.; BORSE, F.; GUO, Q.; MONONEN, T.; VÁZQUEZ-GARCÍA, I.; PULKKINEN, O.; MUSTONEN, V. 2019. Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLoS Comput Biol*. 15(11): 1-18.

AROCHA, J.I.; NAVAS, T.; AURE, G.; PALACIOS, A. 2017. Metformina, el fármaco paradigma del siglo XXI. *Med. Interna (Caracas)*. 33(1): 4-18.

BARBIERI, F.; THELLUNG, S; RATTO, A.; CARRA, E.; MARINI, V.; FUCILE, C.; BAJETTO, A.; PATTAROZZI, A.; WÜRTH, R.; GATTI, M.; CAMPANELLA, C.; VITO, G.; MATTIOLI, F.; PAGANO, A.; DAGA, A; FERRARI, A.; FLORIO, T. 2015. In vitro and in vivo antiproliferative activity of metformin on stem-like cells isolated from spontaneous canine mammary carcinomas: translational implications for human tumors. *BMC Cancer*. 15(228):1-17.

CAI, H.; EVERETT, R.S.; THAKKER, D.R. 2019. Efficacious dose of metformin for breast cancer therapy is determined by cation transporter expression in tumours. *Br. J. Pharmacol*. 176: 2724–2735.

DE, A.; KUPPUSAMY, G. 2019. Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Curr. Probl. Cancer*. 3(8): 1-17.

DEL BARCO, S.; VAZQUEZ-MARTIN, A.; CUFÍ, S.; OLIVERAS- FERRAROS, C.; BOSCH-BARRERA, J.; JOVEN, J.; MARTIN-CASTILLO, B.; MENENDEZ, J.A. 2011. Metformin: Multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget*. 2(12): 896-917.

EL-ASHMAWY, N.E.; KHEDR, N.F.; EL-BAHRAWY, H.A.; ABO MANSOUR, H.E. 2017. Metformin augments doxorubicin cytotoxicity in mammary carcinoma trough

activation of adenosine monophosphate protein kinase pathway. *Tumor Biology*. 39(5): 1-9.

FAN, Y.; REN, X.; WANG, Y.; XU, E.; WANG, S.; GE, R.; LIU, Y. 2021. Metformin inhibits the proliferation of canine mammary gland tumor cells through the AMPK/AKT/mTOR signaling pathway *in vitro*. *Oncol Lett*. 22(852): 1-7.

HONSCHA, K.U.; SCHIRMER, A.; REISCHAUER, A.; SCHOON, H.A.; EINSPANIER, A.; GÄBEL, G. 2009. Expression of ABC-Transport Proteins in Canine Mammary Cancer: Consequences for Chemotherapy. *Reprod. Domest. Anim.* 44(2): 218-223.

KASZAK, I.; RUSZCZAK, A.; KANAFKA, S.; KACPRZAK, K.; KRÓL, M.; JURKA, P. 2018. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet. Scand.* 60(66): 1-13.

KIM, H.G.; HIEN, T.T.; HAN, E.H.; HWANG, Y.P.; CHOI, J.H.; KANG, K.W.; KWON, K.; KIM, B.; KIM, S.K.; SONG, G.Y.; JEONG, T.C.; JEONG, H.G. 2010. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *Br. J. Pharmacol.* 162(5): 1096–1108.

LEVI, M.; PEÑA, L.; ALONSO-DÍEZ, A.; BRUNETTI, B.; MUSCATELLO, L.; BENAZZI, C.; PÉREZ-ALENZA, M.; SARLI, G. 2019. P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Canine Inflammatory and Noninflammatory Grade III Mammary Carcinomas. *Vet. Pathol.* 56(6): 1-8.

LI, W.; ZHANG, H.; ASSARAF, Y.G.; ZHAO, K.; XU, X.; XIE, J.; YANG, D.H.; CHEN, Z.S. 2016. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug. Resist. Updat.* 27: 14-29.

LI, Y.; WANG, M.; ZHI, P.; YOU, J.; GAO, J. 2017. Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein in MCF7/ADR cells and xenograft models. *Oncotarget*. 9(2): 2158-2174.

LUQUE-BOLIVAR, A.; PÉREZ-MORA, E.; VILLEGAS, V.E.; RONDÓN-LAGOS, M. 2020. Resistance and Overcoming Resistance in Breast Cancer. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 12: 211-229.

LUTFUL, F.M.; ALVAREZ, C.E.; CURTIS, R. 2015. Canine Mammary Carcinomas: A Comparative Analysis of Altered Gene Expression. *Vet. Sci.* 3(1): 1-21.

MALLIK, R.; CHOWDHURY, T. 2018. Metformin in cancer. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 143: 409-419.

MARINELLO, P.C.; PANIS, C.; SILVA, T.N.X.; BINATO, R.; ABDELHAY, E.; RODRIGUES, J.A.; MENCALHA, A.L.; LOPES, N.M.D.; LUIZ, R.C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. 2019. Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. *Sci. Rep.* 9(5864): 1-11.

MICHISHITA, M.; AKIYOSHI, R.; YOSHIMURA, H.; KATSUMOTO, T.; ICHIKAWA, H.; OHKUSU-TSUKADA, K.; NAKAGAWA, T.; SASAKI, N.; TAKAHASHI, K. 2011. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res. Vet. Sci.* 91: 254–260.

MICHISHITA, M.; SAITO, N.; NOZAWA, S.; FURUMOTO, R.; NAKAGAWA, T.; SATO, T.; OCHIAI, K.; AZAKAMI, D.; KATAYAMA, K.; NAKAHIRA, R.; TAZAKI, H.; MACHIDA, Y.; ISHIWATA, T. 2019. Metabolite profiling in sphere-forming cells from canine mammary adenocarcinoma cell lines using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Vet. Med. Sci.* 81(9): 1238–1248.

PAZ, M. V.; COTÁN, D.; MARAVER, J. G.; OROPESA-ÁVILA, M.; MATA, M.; PAVÓN, A. D.; LAVERA, I.; GÓMEZ, E. A.; CÓRDOBA, M. A.; ALCÁZAR, J. S. 2016. AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. **In:** Cordero, M.; Viollet, B. (Eds). *AMP-activated Protein Kinase*. Springer. Suiza. pp. 45-71.

RAJH, M.; DOLINAR, K.; MIS, K.; PAVLIN, M.; PIRKMAJER, S. 2016. Medium Renewal Blocks Anti-Proliferative Effects of Metformin in Cultured MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. PLoS One. 11(5): 1-18.

RYBICKA, A.; KRÓL, M. 2016. Identification and characterization of cancer stem cells in canine mammary tumors. Acta Vet. Scand. 58(86): 1-7.

ROGEZ, B.; PASCAL, Q.; BOBILLIER, A.; MACHURON, F.; LAGADEC, C.; TIERNY, D.; LE BOURHIS, X.; CHOPIN, V. 2018. CD44 and CD24 Expression and Prognostic Significance in Canine Mammary Tumors. Vet. Pathol. 56(3): 1-12.

ROMO M. 2016. Efecto de metformina sobre la viabilidad celular de esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 44 p.

ROSHAN, M.; SHING, Y.; PACE, N. 2019. Metformin as an adjuvant in breast cancer treatment. SAGE Open Med. 7: 1-16.

SAEKI, K.; WATANABE, M.; TSUBOI, M.; SUGANO, S.; YOSHITAKE, R.; TANAKA, Y.; ONG, S.M.; SAITO, T.; MATSUMOTO, K.; FUJITA, N.; NISHIMURA, R.; NAKAGAWA, T. 2015. Anti-tumour effect of metformin in canine mammary gland tumour cells. Vet. J. 205(2): 297- 304.

SAINI, N.; YANG, X. 2017. Metformin as an anti-cancer agent: actions and mechanisms targeting cancer stem cells. Acta Biochim. Biophys. Sin. 50(2): 133–143.

SAMUEL, S. M.; VARGHESE E.; KUBATKA, P.; TRIGGLE, C. R.; BÜSSELBERG, D. 2019. Metformin: The Answer to Cancer in a Flower? Current Knowledge and Future Prospects of Metformin as an Anti-Cancer Agent in Breast Cancer. Biomolecules. 9(846): 1-33.

SHAFIEI-IRANNEJAD, V.; SAMADI, N.; YOUSEFI, B.; SALEHI, R.; VELAEI, K.; ZARGHAMI, N. 2017. Metformin enhances doxorubicin sensitivity via inhibition of

doxorubicin efflux in P-gp-overexpressing MCF-7 cells. *Chem. Biol. Drug. Des.* 91(1): 269-276.

SHI, P.; LIU, W.; TALA; WANG, H.; LI, F.; ZHANG, H.; WU, Y.; KONG, Y.; ZHOU, Z.; WANG, C.; CHEN, W.; LIU, R.; CHEN, C. 2017. Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation. *Cell Discov.* 3(17010): 1-13.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; V. ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. 2011. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet. Pathol.* 48(1): 85-97.

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHMIDT, M.H. 2013. Tumors of the Mammary Gland. **In:** Withrow, S.; MacEwen's, D.; Page, R. *Small Animal Clinical Oncology.* 5^a ed. Elsevier. St Louis, United State. pp. 538-556.

TORRES, C.; OLIVARES, A.; STOORE, C. 2015. Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 33(5): 2235-2244.

UGWUEZE, C.; OGAMBA, O.; YOUNG, E.; ONYENEKWE, B.; EZEOKPO, B. 2020. Metformin: A possible option in cancer chemotherapy. *Anal Cell Pathol. (Amst).* 2020: 1-10.

VARGHESE, S.; SAMUEL, S. M.; VARGHESE, E.; KUBATKA, P.; BÜSSELBERG, D. 2019. High Glucose Represses the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effect of Metformin in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Biomolecules.* 9(16): 1-16.

VON EULER, E. 2014. Tumores de las glándulas mamarias. **In:** Dobson, J.; Duncan, B. *Manual de oncología en pequeños animales.* 3^{ra} ed. Ediciones Lexus. Madrid, España. pp. 351-365.

WANG, Y.W.; HE, S.J.; FENG, X.; CHENG, J.; LUO, Y.T.; TIAN, L.; HUANG, Q. 2017. Metformin: a review of its potential indications. *Drug. Des. Devel. Ther.* 11: 2421-2429.

XUE, C.; WANG, C.; SUN, Y.; MENG, Q.; LIU, Z.; HUO, X.; SUN, P.; SUN, H.; MA, X.; MA, X.; PENG, J.; LIU, K. 2017. Targeting P-glycoprotein function, p53 and energy metabolism: Combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of MCF-7/Dox cells to doxorubicin. *Oncotarget.* 8(5): 8622-8632.

YANG, Z.; SUN, N.; CHENG, R.; ZHAO, C.; LIU, J.; TIAN, Z. 2017. Hybrid Nanoparticles Coated with Hyaluronic Acid Lipoid for Targeted Co-delivery of Paclitaxel and Curcumin to Synergistically Eliminate Breast Cancer Stem Cells. *J. Mater Chem. B.* (33):1-14.

ZHANG, Z.; YUAN, J.; BI, Y.; WANG, C.; LIU, Y. 2019. The effect of metformin on biomarkers and survivals for breast cancer a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Pharmacol. Res.* 141: 551-555.