



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTO DE METFORMINA SOBRE LA VIABILIDAD DE
ESFERAS DERIVADAS DE CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMARIO CANINO (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg**

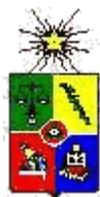
MARÍA ALEJANDRA ROMO MEDINA

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

PROFESOR GUÍA: Cristian Gabriel Torres Mendoza

PROYECTO FONDECYT 11110148

**SANTIAGO, CHILE
2016**



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO DE METFORMINA SOBRE LA VIABILIDAD DE
ESFERAS DERIVADAS DE CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMARIO CANINO (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg**

MARÍA ALEJANDRA ROMO MEDINA

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

CALIFICACIÓN FINAL:.....

	CALIFICACIÓN	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. CRISTIAN TORRES.
PROFESOR CONSEJERO: DR. IGNACIO ARIAS.
PROFESOR CONSEJERO: DRA. LORENA AGUILAR

**PROYECTO FONDECYT 11110148
SANTIAGO, CHILE
2016**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por otorgarme la posibilidad y alegría de retomar mi carrera. Porque sabiamente ha hecho de este período una experiencia de aprendizaje en muchos aspectos, los cuales atesoró con mucho cariño.

A mi profesor guía, Dr Cristian Torres por su acogida, apoyo, dedicación, disposición, paciencia, calidad humana, aportarme una visión de cuestionamiento - característica fundamental en investigación - y otorgarme herramientas de aprendizaje y valóricas en todo este proceso.

A mis profesores consejeros, Dra Lorena Aguilar y Dr Ignacio Arias por su ayuda, calidad humana, consejos, calidez y su excelente disponibilidad.

A mi amiga, Pamela Cruz por todos los conocimientos que me entregó con mucha dedicación, paciencia, cariño y profesionalismo. Además de su escucha, comprensión, sabios consejos y apoyo incondicional durante todo este proceso.

Gratitud a cada uno de los que forman parte del laboratorio BiMre, en especial a mis amigos Michelle Gallmeier, Fernando Reyes, Carolina Almendra, Consuelo Serrano, Sofía Guzmán y a María Paz Iturriaga porque más allá del espíritu de investigación que poseen, son un valioso grupo humano en el cual se forjó un ambiente de trabajo grato, enriquecedor y lleno de cariño. Simplemente, no pude haber ganado mejores compañeros y amigos.

Al Departamento de Medicina Preventiva, específicamente al personal encargado de la sala de autoclavado y al Departamento de Ciencias Biológicas Animales por la disposición y facilitación del equipo para la realización de las lecturas de placa.

A Marcela Peñaloza, Pamela Cuevas y Fernanda Urrutia pertenecientes a biblioteca de Favet por su cariño, calidad humana, apoyo y su gran disposición

Finalmente, agradezco el inmenso apoyo y amor que mi familia me ha brindado en cada momento.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Neoplasia mamaria.....	4
2. Neoplasia mamaria canina.....	5
2.1.Factores de riesgo para la neoplasia mamaria canina.....	5
2.2.Diagnóstico.....	7
2.3.Alternativas terapéuticas.....	9
3. Células neoplásicas troncales.....	11
4. Metformina y cáncer.....	13
4.1.Mecanismos de acción de metformina.....	15
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

Una de las enfermedades más frecuentes en la hembra canina es la neoplasia mamaria. Los tratamientos más utilizados son la cirugía y la quimioterapia adyuvante, las cuales en muchas ocasiones pueden resultar insuficientes debido probablemente a la existencia dentro del tumor de un subgrupo de células llamadas células neoplásicas iniciadoras de tumores (CNT), que presentan características de troncalidad favoreciendo la reaparición tumoral y metástasis. Estas células exhiben quimioresistencia, por lo cual es fundamental buscar nuevas alternativas citotóxicas para este tipo de células. Metformina, droga utilizada en humanos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, ha demostrado modular la actividad proliferativa de CNT, no obstante en caninos hay muy pocos datos pertinentes.

En este estudio se evaluó el efecto de metformina sobre la viabilidad y capacidad de formación de esferas celulares (estructuras ricas en CNT) derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg. Metformina indujo una disminución tanto del número como del tamaño de esferas celulares a 10 y 20 mM ($p < 0,0001$). Sin embargo, la droga no gatilló reducción en la viabilidad de estas células a las 48 horas de incubación respecto al grupo control. Por otro lado, en células CF41.Mg parentales, la viabilidad en presencia de la droga (10 y 20 mM por 48 horas) disminuyó ($p < 0,0001$), lo cual implica que estas células presentan mayor sensibilidad a la metformina en comparación con las esferas celulares.

Estos resultados sugieren que metformina ejercería actividad citotóxica en esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, siendo este efecto dependiente del tiempo de exposición a la droga. Metformina podría ser considerada como una droga que afecta a CNT, lo cual sustenta futuros estudios para esclarecer el potencial rol terapéutico de esta droga en la neoplasia mamaria canina.

Palabras clave: Metformina, Células CF41.Mg, Esferas celulares, Células neoplásicas mamarias troncales, Carcinoma mamario canino.

ABSTRACT

Mammary neoplasia is one of the most frequent diseases in female dogs. The most common treatment used is surgery and adjuvant chemotherapy, which may often be insufficient due to the existence of a subset of cells called tumor initiating neoplastic cells (CSC) within the tumor, that exhibit stemness characteristics, favoring tumor relapse and metastasis. These cells display chemoresistance, which supports the search for new cytotoxic alternatives. Metformin, a drug used in human diabetes mellitus type II treatment, modulates the proliferative activity on CSC, however there are scarce data about this effect in dogs. In this study, the effect of metformin on cell viability and spheres forming ability (structures rich in CSC) derived from canine mammary carcinoma cells CF41.Mg were evaluated.

Metformin induced a decrease in number and sized of spheres at 10 and 20 mM ($p < 0.0001$). However, the drug did not reduce viability of these cells at 48 hours of incubation respect to the control group. On the other hand, viability on CF41.Mg parental cells in presence of the drug (10 and 20 mM for 48 hours) decreased, which implies greater sensitivity to metformin in relation to spheres.

These results suggest that metformin exert cytotoxic activity in spheres derived from CF41.Mg canine mammary carcinoma cells. These effects are dependent on the exposure time to the drug. Metformin may be considered a drug that affects CSC, which supports future studies to clarify its potential therapeutic role in canine mammary neoplasia.

Key words: Metformin, CF41.Mg cells, Cells spheres, Mammary stem neoplastic cells, Canine mammary carcinoma.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de la glándula mamaria es una patología frecuente tanto en la especie canina como humana, interviniendo diversos factores en su desarrollo y progresión. Los tratamientos antineoplásicos que son utilizados para esta patología se basan principalmente en la cirugía y en el uso de quimioterapia adyuvante, sin embargo estas alternativas terapéuticas no son selectivas y pueden fallar, desarrollándose así recidivas tumorales. Esta enfermedad tiene un potencial metastásico, condición que junto a la quimioresistencia, podrían explicarse en parte por la presencia en el nicho tumoral de una subpoblación de células neoplásicas con características de troncalidad (CNT), las cuales pueden resistir tratamientos antineoplásicos y promover la progresión tumoral. Es así como resulta necesario ampliar las posibilidades de tratamiento frente a esta patología, estudiando potenciales nuevos agentes antineoplásicos, especialmente sobre células neoplásicas troncales.

Metformina es una droga que regula positivamente la AMP quinasa -enzima que actúa como un sensor energético celular- y es utilizada comúnmente en condiciones de resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II en humanos. Se ha descrito que el uso crónico de este fármaco disminuye el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, sugiriendo que cumpliría una función en la prevención de esta enfermedad. En Medicina Veterinaria existen escasos datos con respecto al uso de metformina en oncología, sin embargo dado sus potenciales efectos antineoplásicos, se vuelve interesante estudiar su efecto sobre células de cáncer mamario canino.

Esta memoria de título evaluó el efecto “*in vitro*” de metformina sobre la viabilidad de células neoplásicas troncales derivadas de células de carcinoma mamario canino (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg, para establecer así, si esta droga tiene una potencial utilidad como tratamiento adyuvante de la neoplasia mamaria canina de alto grado histológico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Neoplasia mamaria

El cáncer de mama corresponde a una proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células epiteliales y/o mioepiteliales del tejido mamario, frecuentemente en detrimento del hospedero. Este crecimiento se caracteriza por no responder a los controles proliferativos normales del organismo, relacionándose principalmente con un desorden de los mecanismos genéticos que controlan el crecimiento, división y diferenciación celular (Lugones y Ramírez, 2009). Esta enfermedad es de interés tanto para la oncología veterinaria como humana, debido a que tienen un comportamiento similar, en cuanto a la heterogeneidad morfológica, comportamiento biológico y curso clínico. Por ejemplo, los tipos tumorales más frecuentes en hembras caninas y en mujeres son los carcinomas mamarios en sus distintas presentaciones (Salas y Romero, 2011). Así, la enfermedad en perros es un buen modelo animal comparativo para el estudio del cáncer de mama en mujeres (Klopfleisch *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista metabólico, en general las células neoplásicas exhiben respuestas adaptativas frente a la necesidad excesiva de energía requerida para el crecimiento tumoral (Savic *et al.*, 2016). En este sentido, se describe que estas células utilizan la glicólisis como la principal vía de producción de energía, incluso en presencia de oxígeno. Este proceso es conocido como efecto “Warburg” y se considera como una reprogramación metabólica (Yuen *et al.*, 2016). Cuando el nivel de energía se vuelve insuficiente, las células incrementan la expresión de proteínas transportadoras GLUT 1, favoreciendo la captación de glucosa. Como consecuencia, se producen grandes cantidades de lactato provocando acidificación del microambiente tumoral (Yoshida, 2015).

Por otro lado, en las células neoplásicas la glucosa no solo proporciona un sustrato para la nutrición del tumor, sino que además se relaciona como una señal de malignidad (Tobar *et al.*, 2016). En este sentido, Yuen *et al.* (2016) describen que esta estrategia del metabolismo energético tendría un efecto promotor en la autorenovación e indiferenciación de células madre neoplásicas. De lo anterior se desprende que la modulación del metabolismo energético de la célula tumoral tendría alguna consecuencia sobre su comportamiento biológico.

2. Neoplasia mamaria canina

2.1 Factores de riesgo para la neoplasia mamaria canina

Dentro de los factores de riesgo más relevantes que influyen en el desarrollo de esta enfermedad se encuentran el factor endocrino y la edad (Salas y Romero, 2011). Está bien documentado que la estimulación de hormonas sexuales incrementa el riesgo de aparición de tumores mamarios en la hembra canina, así como en la mujer. Es así como se ha descrito un efecto muta y mitogénico inducido por estrógenos y un efecto proliferativo desencadenado por progesterona sobre las células de la glándula mamaria, lo cual implica un efecto iniciador y promotor carcinogénico (Antuofermo *et al.*, 2007). Lo anterior involucra una estrecha relación entre la incidencia de neoplasias mamarias con la condición reproductiva, donde el riesgo de contraer la patología es muy baja en hembras ovariectomizadas a temprana edad (Sorenmo *et al.*, 2011). Así, Schneider *et al.* (1969) describieron que las hembras sometidas a dicho procedimiento antes del primer estro presentan un riesgo de 0,5% de desarrollar tumores mamarios en comparación con un 8% y 26% de riesgo en ejemplares ovariectomizadas entre el primer y segundo ciclo estral o después del segundo estro, respectivamente. Lo anterior implica que esterilizaciones tardías no tendrían un efecto protector sobre el riesgo de desarrollar neoplasia mamaria. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la ovariectomía realizada en el momento de la mastectomía como medida terapéutica tendría un efecto beneficioso en la reducción de recidivas en aquellas hembras con altos niveles séricos de 17β -estradiol (Kristiansen *et al.*, 2016). Por otro lado, se describe una mayor frecuencia de presentación de cáncer de mama en aquellas perras tratadas con progestágenos con la finalidad de retrasar o prevenir el estro (Thompson, 2014).

Diversos autores han reportado la expresión de receptores de estrógenos y progesterona (ERs y PRs) tanto en tumores mamarios benignos y malignos (alrededor de 70% y 50%, respectivamente), así como también en el tejido mamario normal (Herms *et al.*, 2005). Aquellos tumores que presentan un mayor grado de malignidad es menor la expresión de estos receptores, presentando un mayor grado de anaplasia que los tumores que si los expresan, por lo cual su presencia tiene valor pronóstico (Antuofermo *et al.*, 2007). Los receptores de progesterona son expresados con mayor frecuencia en tumores de tipo be-

nigno y podrían asociarse a un buen pronóstico. Así, la ovariectomía realizada tardíamente pudiese reducir el riesgo de aparición de tumores benignos (Von Euler, 2014). Además, se ha observado que en ocasiones existe una progresión histológica de tumores benignos a malignos, sugiriendo como una medida de prevención la eliminación quirúrgica del tumor benigno (Von Euler, 2014).

En cuanto a la edad de presentación, lo más frecuente ocurre en el rango de los 8 y 11 años (Blanpain y Fuchs 2007; Branden *et al.*, 2010). Es importante señalar que algunos autores como Taylor *et al.* en 1976 (citado por Sorenmo *et al.*, 2011), describen un aumento proporcional del riesgo de enfermar al aumentar la edad a partir de los 8 años.

La obesidad es otro factor de riesgo para el desarrollo de esta patología, lo cual puede ocurrir a través de múltiples mecanismos. Uno de los más caracterizados es la conversión de andrógenos a estrógenos en el tejido adiposo debido a una alta actividad del complejo enzimático aromatasa, lo que promovería la progresión de este tipo de cáncer (Sorenmo *et al.*, 2011). El tipo de dieta también sería un factor de riesgo para la patología en cuestión. Así, se ha registrado que perras en condición obesa de 1 año de edad y alimentadas con una dieta alta en carnes rojas, presentaron mayor incidencia de tumores de glándula mamaria (Thompson, 2014). En función de lo anterior, la obesidad a temprana edad tiene una estrecha relación con la ocurrencia de tumores mamarios, así como un peor pronóstico (Salas y Romero, 2011).

Los tumores mamarios se pueden presentar en cualquier raza, no obstante existe una mayor predisposición en animales de talla pequeña, aunque se ha incrementado la ocurrencia en animales de talla grande (Von Euler, 2014). Así, las razas predispuestas son Poodle toy y miniatura, Springer spaniel, Brittany spaniel, Cocker spaniel, Beagle, Puli, Setter inglés, Pointer, Ovejero alemán, Maltes, Yorkshire terrier y Dachshund (Salas y Romero, 2011; Thompson, 2014).

Otro factor asociado a la incidencia de la patología es la exposición a contaminantes ambientales como los piretroides (Von Euler 2014).

2.2 Diagnóstico

Dentro de los recursos mayormente utilizados con la finalidad de precisar el diagnóstico de la patología, se describen:

Examen físico general: Los tumores mamarios son relativamente fáciles de detectar al examen clínico, siendo descritas las glándulas mamarias caudales como las más afectadas (Thompson, 2014). Los tumores se pueden encontrar en forma única o múltiple por glándula; también se describe que un 50% de los casos se presentan en más de una glándula (Von Euler, 2014). El examen físico general permite corroborar si el tumor presenta movilidad dentro del tejido mamario o bien, si es infiltrativo, involucrando la piel u otras estructuras adyacentes. En este sentido, se ha reportado que los tumores con características malignas (aproximadamente el 50% de los tumores mamarios) tendrían mayor probabilidad de fijarse a la pared abdominal o torácica así como exhibir ulceraciones (Sorenmo *et al.*, 2011).

Es importante evaluar si existe presencia de temperatura elevada, eritema cutáneo, secreciones en las glándulas afectadas y el estado de los linfonodos regionales (Torres y Eslava, 2007). Es imprescindible determinar el tamaño de la masa tumoral primaria, puesto que aquellos tumores menores de 3 cm de diámetro en su eje principal suelen tener un pronóstico más favorable que aquellos tumores de mayor tamaño (Herme *et al.*, 2005). Además, se debe recabar una detallada historia clínica que incluya información como pérdida de peso, letargia y anorexia, que podrían reflejar una enfermedad avanzada (Torres y Eslava, 2007).

Los sitios más comúnmente afectados por la enfermedad diseminada son los pulmones, linfonodos regionales, hígado, riñones, bazo y sistema nervioso central (Von Euler, 2014). La signología asociada con metástasis frecuentemente ocurre en forma tardía y es específica según el área afectada (Herme *et al.*, 2005).

Radiografías de tórax: Es una herramienta diagnóstica útil en pacientes con neoplasia mamaria, dado que la metástasis pulmonar es frecuente en esta enfermedad (Lockett *et al.*, 2005).

Ecotomografía abdominal: Resulta esencial en la evaluación de posibles metástasis hacia cavidad abdominal, permitiendo determinar sitio, extensión y tamaño de la masa tumoral,

así como también para establecer la relación con las estructuras adyacentes (Von Euler, 2014).

Estudio histopatológico: El examen histopatológico es el método más certero de diagnóstico. Además, posibilita identificar si el tumor presenta características invasivas, en caso que haya presencia de células tumorales dentro de vasos linfáticos y/o sanguíneos (Shafiee *et al.*, 2013). Usualmente, el muestreo se realiza posteriormente al acto quirúrgico como medida terapéutica, dado que la magnitud de esta depende de las características clínicas del tumor más que del diagnóstico histológico (Flores y Cattaneo, 2001), procedimiento denominado biopsia escisional.

Una de las características más relevantes para definir histopatológicamente una neoplasia mamaria es el grado de diferenciación (Von Euler, 2014). Dentro de los tumores malignos, aquellos que presentan un pronóstico más favorable son los que exhiben una estructura glandular altamente diferenciada, entre los que se encuentran los adenocarcinomas tubulares o túbulo-papilares. Estos además, pueden ser complejos si hay proliferación de un componente epitelial maligno y mioepitelial benigno, o simples si solo hay un componente epitelial maligno, (Goldschmidt *et al.*, 2011). Por otro lado, con un alto grado de indiferenciación está el carcinoma anaplásico, el cual presenta un aspecto heterogéneo, desorganizado y altamente invasivo (Goldschmidt *et al.*, 2011). Por su parte, Shaffie *et al.* (2013) describen como una variante especial dentro de los tumores malignos a nivel epitelial al carcinoma mamario inflamatorio que se caracteriza por ser altamente invasivo y porque sus células neoplásicas invaden y obstruyen, a modo de émbolos, vasos linfáticos dérmicos, induciendo linfedema en la región afectada. Otros criterios considerados en la evaluación histológica corresponden al grado de pleomorfismo celular, índice mitótico, presencia de necrosis e invasión vascular (Goldschmidt *et al.*, 2011; Shaffie *et al.*, 2013), siendo fundamentales en el diagnóstico, en términos del comportamiento biológico y pronóstico (Antuofermo *et al.*, 2007).

En el trabajo diagnóstico es fundamental categorizar el estado clínico-patológico del tumor, lo cual da origen a los estadios de la enfermedad (Tabla 1). Para esto se utilizan los criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Von Euler, 2014), que se basa en la extensión anatómica de la neoplasia. Luego, las siglas **TNM** dicen rela-

ción con el tamaño del tumor primario (T), potencial metástasis en linfonodos regionales (N) y a la ausencia o presencia de metástasis a distancia (M).

Tabla 1. Estadificación clínica patológica para la Neoplasia Mamaria Canina. (Hermo *et al.*, 2005).

Estadio	Tumor primario (T)	Estado linfonodo regional (N)	Metástasis (M)
I	< 3 cm	No afectado	No detectada
II	3-5 cm	No afectado	No detectada
III	> de 5 cm	No afectado	No detectada
IV	Cualquier T	Metástasis diagnóstico citológico/histopatológico	No detectada
V	Cualquier T	Cualquier N	Detectada

La aplicación de este sistema permitirá escoger el tratamiento más adecuado en relación a las características clínicas que presente el paciente, estimar el pronóstico y comparar los resultados obtenidos en función de distintos abordajes terapéuticos (Von Euler, 2014).

2.3 Alternativas Terapéuticas

Dentro de los recursos que existen para el tratamiento del cáncer de mama en la hembra canina, la principal alternativa es la cirugía, que si bien es de gran ayuda en los casos en que la neoplasia se encuentra localizada, no evita la posibilidad de reaparición posterior, especialmente en aquellos tumores malignos de gran tamaño (Sorenmo *et al.*, 2011). Además, esta opción de terapia no es curativa en presencia de enfermedad metastásica (Tran *et al.*, 2014). En el proceso de extracción del tumor es relevante la obtención de márgenes quirúrgicos libres de células tumorales de alrededor de 2 cm (Von Euler, 2014), por lo tanto es recomendable que la cirugía se realice mientras menor sea el tamaño del tumor (Torres y Eslava, 2007). En este sentido Philibert *et al.* (2003) realizaron un estudio

en el cual describen que tumores entre 2 a 3 cm de diámetro presentan aún un buen pronóstico, estimando una supervivencia mediana de 22 meses. Cuando se requiere además la remoción de linfonodos comprometidos, se sugiere la realización de mastectomías regionales, donde se extraiga el tejido mamario que contiene el tumor junto al tejido linfático adyacente (Von Euler, 2014).

En el caso que la neoplasia presente grandes dimensiones o exista compromiso de varias glándulas mamarias, Flores y Cattaneo (2001) aconsejan la mastectomía radical uni o bilateral, extirpando también los linfonodos regionales. Es importante mencionar que esto último, pudiera tener un efecto inmunosupresor (Flores y Cattaneo, 2001).

La quimioterapia se presenta como un mecanismo adyuvante a la cirugía que se utiliza en casos de neoplasias malignas con alta probabilidad de diseminación, con la finalidad de aumentar la supervivencia promedio (Salas y Romero, 2011). De este modo, la quimioterapia busca desacelerar la progresión del cáncer ya sea causando daños al ADN, impidiendo la proliferación celular, y/o induciendo apoptosis o muerte celular programada (Von Euler, 2014). Estos fármacos interactúan durante fases específicas del ciclo celular, como por ejemplo en la mitosis, impidiendo la finalización de ésta (Domínguez *et al.*, 2015). Es así como se han realizado estudios sobre la respuesta tumoral a diversas drogas como paclitaxel, doxorubicina, carboplatino, mitoxantrona, entre otras, generándose resultados controversiales en relación a la eficacia terapéutica y a los tiempos de supervivencia observados (Tran *et al.*, 2014). En este sentido, hay autores que han descrito un aumento de la supervivencia producto del uso de quimioterapia adyuvante (Karayannopoulou *et al.*, 2001). Sin embargo, en un estudio realizado por Marconato *et al.* (2008) no se evidenció mejoría en la supervivencia global en respuesta a la droga gemcitabina, observando presencia de invasión local y metástasis.

Considerando que la terapia para la neoplasia mamaria canina involucra alternativas terapéuticas no selectivas, y puede ocurrir resistencia a drogas antitumorales, resulta atractivo analizar nuevas drogas que tengan un potencial efecto antineoplásico y que sean inocuas sobre células normales.

De este modo, es desafiante estudiar nuevas alternativas de tratamiento para esta patología, puesto que actualmente los protocolos existentes son acotados y de eficacia controversial.

3. Células neoplásicas troncales

En el tejido mamario normal, se ha pesquisado y caracterizado un grupo de células madre que determinan diferentes linajes de células progenitoras mamarias, las cuales generan los compartimentos basales, mioepiteliales y lumbinales de la glándula mamaria (Stingl *et al.*, 2001). Por consiguiente, la regulación inapropiada de su microambiente, así como la transformación de estas células puede desembocar en procesos neoplásicos. Estas células expresan un fenotipo indiferenciado (Stingl *et al.*, 2001).

Como ya se ha mencionado, dentro de tumores sólidos como el mamario, pueden encontrarse distintos tipos de células, algunas de las cuales pueden ser blanco para las terapias contra el cáncer (Yuen *et al.*, 2016). Es así como se ha descrito la presencia de una pequeña subpoblación de células neoplásicas que exhiben características propias de troncalidad, denominadas células iniciadoras de tumores o células neoplásicas troncales (CNT) (Wicha *et al.*, 2006). Estas células muestran características similares a las células madre, como la capacidad de autorenovación, potencial de diferenciación en varios linajes celulares, así como la capacidad de resistencia a quimio y radioterapia (Nigam, 2013). Dado que en las CNT la capacidad de autorenovación se encuentra probablemente desregulada, su presencia podría explicar en parte la capacidad invasiva y metastásica que exhiben algunos tumores mamarios (Smith, 2002). La génesis de las CNT puede deberse a que una célula troncal normal desarrolló alguna alteración que la convierta en tumoral, o bien, que una célula somática tumoral atraviese por procesos de desdiferenciación, adquiriendo propiedades de célula troncal con un comportamiento maligno (Nigam, 2013).

Durante el proceso neoplásico, las CNT son sometidas a divisiones de tipo simétrico, es decir producen dos células hijas idénticas a la célula madre que las originó, por lo tanto se produce una expansión clonal de ellas (Wicha *et al.*, 2006).

Estas células si bien comparten características con las células madre normales, presentan su propio perfil molecular (Li *et al.*, 2007). Esto permite su identificación mediante la utilización de marcadores de superficie. Así, las CNT de cáncer de mama se caracterizan

por exhibir el fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo}, asociado a su potencial invasivo (Shipitsin *et al.*, 2007).

Un estudio de Pang *et al.* (2011) describe al fenómeno biológico de transición epitelio-mesénquima (EMT) como un factor que se asocia con la capacidad de invasión y metástasis que presentan estas células. Estos autores observaron que la activación hacia la vía mesenquimal estaría relacionada con la mantención de las características de troncalidad en este tipo de células. En este contexto, la activación de algunas vías de señalización intracelular como Wnt, Notch y Hedgehog son muy importantes pues controlan la proliferación, diferenciación y autorenovación de este tipo de células (Malhotra *et al.*, 2011).

Liu y Tang (2011) sugieren que pequeños fragmentos de RNA no codificantes, tendrían implicancia en el fenómeno de autorenovación de las CNT y en su participación en el desarrollo de tumores. Así, estos micro-RNA serían específicos en la modulación de diferenciación, autorenovación y características invasivas. Además, tendrían un papel importante en la activación de genes que regulan el ciclo celular (Prokopi *et al.*, 2015).

Las CNT tienen la capacidad de formar esferas, estructuras celulares que crecen en suspensión en ausencia de suero fetal bovino y en condiciones libre de anclaje (Ferletta *et al.*, 2011). Este método es el que habitualmente se utiliza para aislar estas células a partir de líneas celulares o de tumores sólidos de presentación espontánea (Michishita *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2015). Estas estructuras celulares exhiben autorenovación y capacidad de iniciar tumores (Barbieri *et al.*, 2015), por lo tanto corresponden en una alta proporción a CNT.

Como ya se ha mencionado, las CNT exhiben un comportamiento invasivo y quimiorresistente en relación al resto de las células neoplásicas, siendo esta característica muchas veces una limitante en la eficacia de la terapia antineoplásica. Lo anterior puede implicar el fracaso del tratamiento y la muerte del paciente (Pang *et al.*, 2011). En la literatura veterinaria se mencionan como posibles mecanismos de lo recién expuesto, un descenso de la absorción de fármacos citotóxicos, o bien un incremento en la eliminación celular de estos (Von Euler, 2014). En este contexto, dicha resistencia es provocada por la sobreexpresión en las CNT de algunos genes de resistencia a fármaco (Nigam, 2013). De este modo, las CNT expresan altos niveles de proteínas transportadoras de membrana que expulsan

hacia el espacio extracelular xenobióticos y drogas quimioterapéuticas, explicando parcialmente el fenómeno de quimioresistencia (Balbuena *et al.*, 2011). Además, Smith (2002) menciona otros procesos relacionados con multiresistencia a fármacos como la inactivación o supresión de las vías de control de apoptosis o de daño celular que ocurre durante el desarrollo carcinogénico. Por lo tanto, considerando las características de invasión y resistencia a la quimioterapia que exhiben estas células, es que en la actualidad ha surgido la necesidad de estudiar nuevas drogas con potencial uso sobre ellas (Thompson, 2014).

Tomando en cuenta que las opciones terapéuticas existentes para esta patología no ofrecen una cura definitiva, es que se requieren alternativas terapéuticas dirigidas específicamente al subgrupo celular que induce estos inconvenientes, es decir, establecer a las CNT como potencial blanco de acción para futuras terapias antineoplásicas.

4. Metformina y cáncer

Metformina es un medicamento perteneciente a la familia de las biguanidas derivada de la hierba *Galega officinalis* (Lila francesa), desarrollada como fármaco en la década de los años cincuenta (Thompson, 2014). Es utilizada habitualmente en medicina humana para el tratamiento de la resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II, pues reduce las concentraciones plasmáticas de glucosa, mejorando la utilización periférica de ésta, inhibe el proceso de gluconeogénesis hepática y estimula la captación de glucosa a nivel muscular (Cheng y Fantus, 2005). Además, metformina ha resultado eficaz en el tratamiento del síndrome de ovario poliquístico (Cheng y Fantus, 2005).

En la actualidad se está estudiando el potencial rol de este medicamento en el tratamiento del cáncer, luego de que se evidenciara una disminución en la incidencia de esta patología en aquellos pacientes adultos diabéticos que controlaban su patología con metformina en dosis de 1.500 a 2.250 mg/día (Currie *et al.*, 2009; Thompson, 2014). Existen datos que sugieren que el uso crónico de metformina se asociaría a una disminución del riesgo de mortalidad en pacientes con diabetes y distintos tipos de cáncer como el mamario, colorrectal, ovárico y endometrial (Vallianou *et al.*, 2013).

Si bien los estudios se iniciaron en pacientes con diabetes tipo II, actualmente existen investigaciones en que se promueve el posible efecto protector de la metformina contra el cáncer en pacientes no diabéticos (Barbieri *et al.*, 2015). Complementando lo anterior,

autores como Peeters *et al.* (2013) y Landman *et al.* (2010) sugieren que el uso de este medicamento a largo plazo podría tener un efecto beneficioso en la supervivencia de pacientes con cáncer mamario. Otra situación reportada es que en aquellos pacientes con diabetes mellitus tipo II en se usó en forma concomitante el tratamiento con insulina y metformina, se indujo una disminución en el riesgo de desarrollar cáncer (Monami *et al.*, 2011). En este sentido, Zakikhani *et al.* (2006) observaron que metformina ejerce un efecto inhibitorio sobre el metabolismo de la insulina y sobre la proliferación de células tumorales. Estudios “*in vitro*” muestran que metformina disminuye el crecimiento de células de carcinoma de mama humano de una manera dependiente de su concentración (Hadad *et al.*, 2014).

Complementando lo anterior, metformina inhibió la proliferación celular en cáncer de mama, endometrio, ovario y gliomas en modelos tumorales murinos (Dowling *et al.*, 2007). Sin embargo, en Medicina Veterinaria existen escasos datos referentes al tema. Estudios realizados por Vito *et al.* (2013) y Barbieri *et al.* (2015) proponen que metformina ejerce acción citotóxica tanto *in vivo* como *in vitro*, preponderantemente sobre células neoplásicas con características de troncalidad.

Metformina activa a la enzima denominada AMPK, que corresponde a una quinasa que es activada por adenosin monofosfato (AMP) (Hadad *et al.*, 2014). La función de AMPK es sensor el contenido energético celular, regulando algunos procesos metabólicos según el estado energético orgánico (Jin *et al.*, 2007). Por consiguiente, esta proteína ha sido propuesta como un regulador metabólico durante condiciones energéticas anormales, siendo un punto de control esencial bajo estas condiciones (Sinnott y Brenman, 2014). Es así que este sensor se encuentra en todos los organismos eucariontes (Kahn *et al.*, 2005). AMPK es una enzima trimérica que se compone de una subunidad (α) catalítica y de dos subunidades ($\beta\gamma$) reguladoras (Jin *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007). La activación de AMPK ocurre en respuesta a una gran variedad de señales de stress metabólico que tienen influencia sobre los niveles de energía celular (Faubert *et al.*, 2013). En consecuencia, esta proteína se encuentra implicada en la regulación de múltiples vías metabólicas, como síntesis de proteínas, oxidación de ácidos grasos, gluconeogénesis, entre otros (Hardie *et al.*, 2012).

La estrategia que utiliza AMPK cuando el nivel de ATP intracelular es bajo, es inhibir las vías metabólicas que consumen ATP y activar las vías que producen energía. Por el contrario, si los niveles de ATP intracelular son altos, entonces la actividad de AMPK se inhibe, utilizando la energía en rutas anabólicas, como biosíntesis de macromoléculas (Miranda *et al.*, 2007).

Conociendo el rol de AMPK, es que resulta interesante comprender su implicancia en la enfermedad neoplásica, donde generalmente se establece un balance energético negativo (Thompson, 2014). En este estado, al perturbarse la actividad de este sensor, se produce una desregulación de la señalización que guía procesos metabólicos celulares como la biosíntesis y control energético, condicionando el desarrollo de neoplasias (Sinnott y Brennan, 2014). Luego, metformina al ejercer su acción sobre AMPK, modularía negativamente la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento y proliferación celular (Hadad *et al.*, 2014). De este modo AMPK es una molécula clave en la regulación de transmisión de señales en la biología del cáncer.

4.1 Mecanismos de Acción de Metformina

Metformina cumple su acción antineoplásica a través de dos vías, una directa sobre la célula tumoral y otra indirecta, la cual es dependiente de insulina, cuyo efecto sistémico tendría repercusión sobre el cáncer (Thompson, 2014). Estas vías no son excluyentes (Foretz *et al.*, 2014).

El efecto indirecto es gatillado en respuesta a incrementos en los niveles plasmáticos de insulina (Martin *et al.*, 2010). AMPK modula la inhibición de la gluconeogénesis hepática y estimula la captación de glucosa tanto a nivel hepático como muscular, (Zakikhani *et al.*, 2006) reduciendo así los niveles de glucosa e insulina en sangre. Estos efectos juegan un rol importante en la actividad antitumoral, puesto que la insulina y factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1) pueden activar señales hacia procesos proliferativos así como anti-apoptóticos en el desarrollo del cáncer (Hadad *et al.*, 2014). En este contexto, ha habido un creciente interés en el papel que cumpliría la insulina en el desarrollo del cáncer de mama. Actualmente, se describe que las mujeres con altos niveles de insulina presentan mayor riesgo de padecer la patología, así como de morir por esta causa (Thompson, 2014). De lo anterior se desprende que la vía indirecta tendría relevancia en la disminución

de hiperinsulinemia y consecuentemente aportar beneficios antiproliferativos en células neoplásicas. Sin embargo, Foretz *et al.* (2014) destacan que la disminución inducida por metformina en los niveles de insulina, sería mayor en los pacientes diabéticos que en sujetos normales metabólicamente.

Se ha descrito una relación entre obesidad, hiperinsulinemia y cáncer (Micucci *et al.*, 2016). En este sentido, Yurekli *et al.* (2009) mencionan que la insulina tiene un efecto promotor sobre la proliferación en células neoplásicas. Efecto que se perpetua en los casos de hiperinsulinemia en que se describe un aumento en la activación de los receptores de insulina en dichas células (Micucci *et al.*, 2016). Un estudio realizado en ratas por Yurekli *et al.* (2009), demostró que dietas con alto contenido energético aumenta la proliferación de células neoplásicas. Esto muestra la importancia que la dieta ejerce en los niveles de insulina y su implicancia en la presentación de cáncer.

Zakikhani *et al.* (2006) mencionan que en la vía indirecta la acción clave de metformina corresponde a la inhibición de la producción de glucosa a nivel hepático. La acción preferencial de metformina en los hepatocitos está determinada por la expresión predominante de transportadores catiónicos orgánicos OCT1, los cuales facilitan la captación celular de la droga, concentrándose mayoritariamente en el área periportal (Martin *et al.*, 2010). En este sentido, Foretz *et al.* (2014) demostraron que la supresión de estos transportadores en ratas provoca reducción drástica de metformina en hepatocitos. La acción a este nivel implica la activación de AMPK. Dicha activación es realizada por la proteína quinasa LKB1. Así, LKB1 tendría una función en la regulación de la gluconeogénesis y consecuentemente en los niveles de insulina como ya se ha mencionado.

La vía directa es inducida en respuesta al estrés energético de la célula neoplásica (Zakikhani *et al.*, 2006). Esta vía en cambio, ocurriría en los tejidos epiteliales, donde LKB1 actuaría como un gen supresor de tumores regulando la proliferación celular (Zakikhani *et al.*, 2006). Para ello, metformina induce activación a nivel mitocondrial de AMPK, lo que provoca la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones. Esta acción a nivel mitocondrial implica la inhibición de la vía m-TOR, relacionada con síntesis proteica en células neoplásicas (Hadad *et al.*, 2014; Thompson, 2014), por ende regulación y supervivencia celular (Goodwin *et al.*, 2008).

Martin *et al.* (2010) destacan que es determinante para la acción de esta vía la concentración de la droga en el tejido neoplásico, debido a que se requieren altas concentraciones para obtener alcance en tejidos periféricos. Así, la inhibición del crecimiento *in vitro* se observa en el rango milimolar, en cambio las concentraciones obtenidas habitualmente en modelos *in vivo* y en pacientes diabéticos se registran en un rango menor (micromolares) (Foretz *et al.*, 2014).

Zakikhani *et al.* (2006) sugieren que el mecanismo directo tendría potenciales beneficios antiproliferativos en células epiteliales con características neoplásicas de órganos como mama, próstata, colon y pulmón. En este sentido, Hosono *et al.* (2010) y Zakikhani *et al.* (2006) han realizado estudios en pacientes no diabéticos en células de colon y células neoplásicas mamarias de la línea MCF-7 respectivamente, donde a través de la vía directa, metformina inhibiría la proliferación celular modulando la vía m-TOR.

Bajo esta mirada, m-TOR es una proteína que actúa en la regulación de la respuesta de las células tumorales a factores de crecimiento y nutrientes, siendo una vía descrita en muchos tipos de cáncer (Yurekli *et al.*, 2009). Frente al rol de AMPK en la regulación de esta vía metabólica, es que resulta atractivo estudiar inhibidores de esta vía como potenciales agentes antitumorales.

La realización de esta memoria de título pretendió explorar el potencial efecto de metformina sobre esferas derivadas de una línea celular de carcinoma mamario canino, puesto que la gran mayoría de los estudios han sido realizados solo en humanos.

HIPÓTESIS

Metformina disminuye la viabilidad de esferas celulares derivadas de la línea celular de carcinoma mamario canino CF41.Mg.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de metformina sobre la viabilidad de esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la eficiencia de formación de esferas derivadas de células CF41.Mg en presencia de metformina.
2. Determinar y comparar la viabilidad de esferas celulares y células parentales CF41.Mg en presencia de metformina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa (BiMre), del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Cultivo celular

La línea celular CF41.Mg (CRL-6232, ATCC) se cultivó en medio DMEM alto en glucosa 4,5 g/L, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin 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 hrs. previo lavado de las células con buffer PBS.

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

Cultivo de esferas

Células parentales (CF41.Mg adherentes) fueron disgregadas, lavadas con PBS y centrifugadas, para luego ser sembradas en medio de cultivo para esferas constituido por DMEM-F12, suplementado con B27 al 2%, 4 µg/ml de heparina, 5 µg/ml de insulina recombinante humana (IRH), 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 20 U/ml de penicilina G, 20 µg/ml de estreptomycin y 0,05 µg/ml de anfotericina B. Los factores de crecimiento fueron agregados cada 48 hrs. Estas células se cultivaron bajo condiciones libre de anclaje utilizando placas de ultra baja adherencia y en ausencia de suero fetal bovino.

Ensayo de formación de esferas

Para la formación de esferas, las células parentales se sembraron en medio de cultivo para esferas a una densidad 8.000 células/pocillo en placas de ultra baja adherencia de 24 pozos, en presencia de distintas concentraciones de metformina (Tocris) (0 a 20 mM). A

los siete días de cultivo se contó el número de esferas formadas por pocillo y se hicieron microfotografías bajo microscopía de contraste de fase, considerando como esfera a colonias de al menos 10 células íntegras, siguiendo el método descrito por Michishita *et al.* (2010). Las esferas fueron cuantificadas realizando un patrón de recuento en zigzag con la finalidad de ordenar este proceso y evitar contabilizar en más de una oportunidad las esferas que ya habían sido registradas. El experimento fue realizado tres veces en forma independiente.

Ensayo de viabilidad celular

Para ensayos de viabilidad en células adherentes, éstas se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano en una concentración de 2.000 células/pocillo. En el caso de las esferas, se utilizó una densidad de 5.000 células/pocillo que fueron sembradas en placas de 96 pocillos de ultra baja adherencia. En ambos casos se dejaron pocillos en blanco en triplicado que sólo contenía medio de cultivo. Para ambas condiciones, a las 24 horas de incubación se les aplicó, en triplicado, metformina en distintas concentraciones (0-20 mM). A las 48 hrs de incubación se analizó la viabilidad celular a través del método de reducción de MTS((3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfoxifenil)-2H-trazolium), donde se aplicó 20 µl de CellTiter 96® (Promega) cada 100 µl de medio de cultivo y se incubó por tres horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. La densidad óptica (D.O.) resultante se midió en un lector de multiplacas a 490 nm, previa agitación lenta por un minuto. La viabilidad, referida como la proporción de células vivas luego de realizado el procedimiento, se calculó como un valor relativo en relación al control no estimulado, donde el promedio de D.O. del grupo control se consideró como 100% de viabilidad. Cada experimento se realizó en triplicado.

Análisis Estadístico

La descripción de los resultados se obtuvo mediante medias y desviaciones estándar. Se utilizó el test Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos. Luego, para la determinación de potenciales diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos con tratamiento, se utilizó ANDEVA junto con un análisis Post Hoc de Tukey o un test de Kruskal-Wallis. Se consideró significancia estadística con $p < 0,05$. El análisis se realizó mediante el software Infostat (Córdoba, Argentina).

RESULTADOS

Objetivo 1

Ensayo de formación de esferas celulares: Metformina no indujo diferencias en el número de esferas contabilizadas al ser utilizada a concentraciones de 0 a 1 mM. Sin embargo, tal como se aprecia en la figura 1, la droga alteró la capacidad formadora de esferas con las mayores concentraciones utilizadas (10 y 20 mM). Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,0001$).

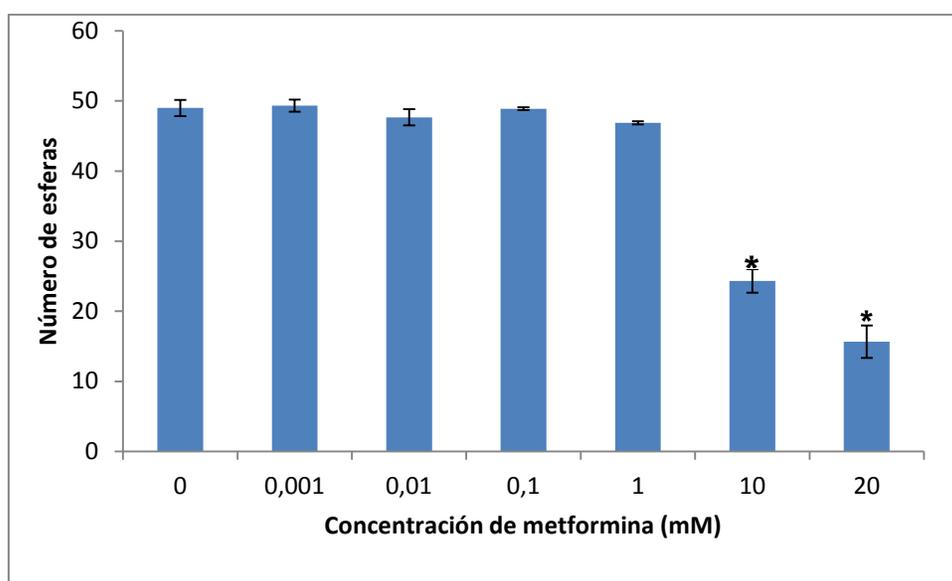


Figura 1: Concentraciones altas de metformina disminuyen el número de esferas celulares formadas. Ensayo de formación de esferas derivadas de células CF41.Mg en respuesta a metformina: Número de esferas contabilizadas tras la incubación durante 7 días con metformina (0 a 20 mM). *Indica significancia estadística respecto al grupo control (concentración 0), $p < 0,0001$ (test Kruskal Wallis).

De igual modo, no se observaron cambios en cuanto al tamaño de las esferas a concentraciones bajas (0,001 y 1 mM), respecto al grupo control. Sin embargo, al observar las esferas formadas en las condiciones que recibieron altas concentraciones de metformina (10 y 20 mM), se evidenció una disminución en la magnitud de estas (Figura 2), resultado concordante con lo mostrado en la figura anterior. En los pocillos correspondientes a las más altas concentraciones de la droga, se observó que las células se encontraron distribuidas

mayoritariamente de una manera lineal o bien formando pequeños cúmulos, de menos de 10 células. Así también, las células que conformaban esferas presentaron una apariencia más aplanada respecto a las esferas presentes en las concentraciones comprendidas en el rango de 0 a 1 mM.

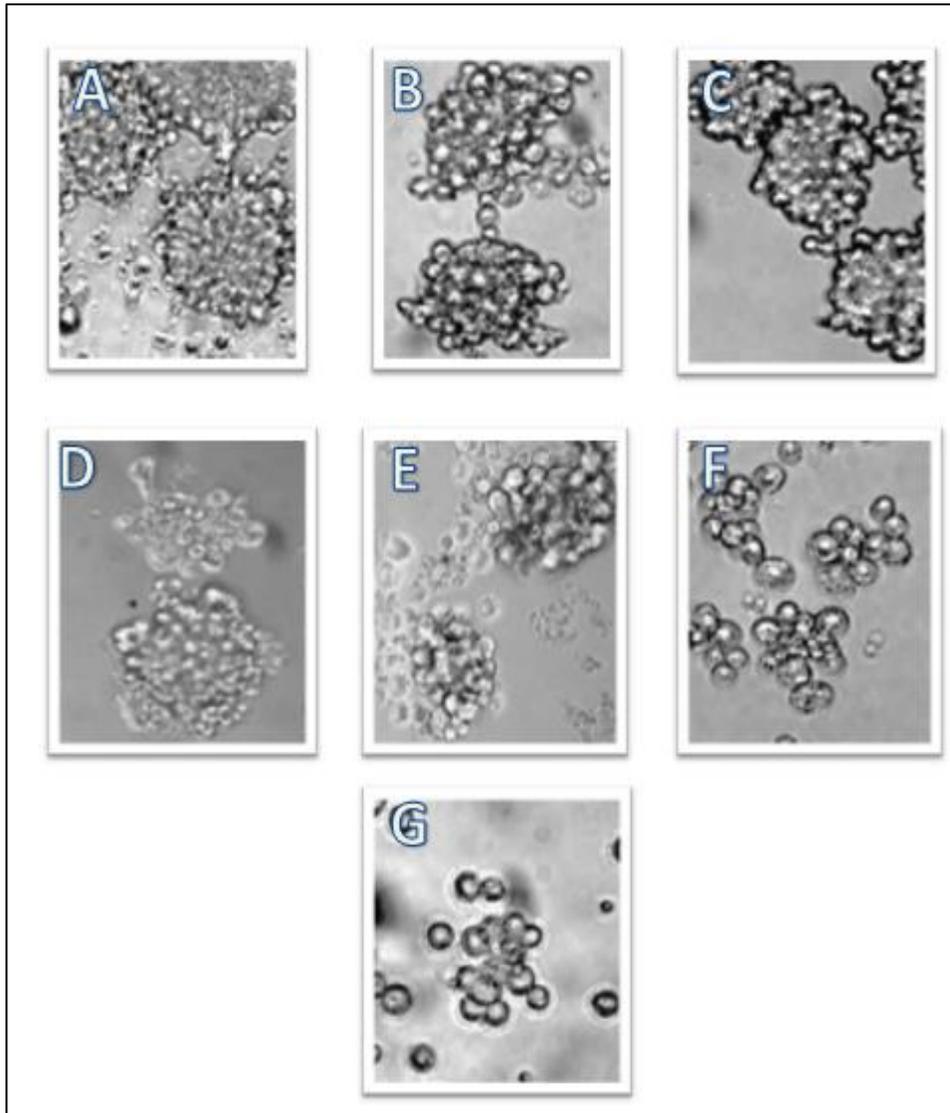


Figura 2. Concentraciones altas de metformina disminuyen el tamaño y alteran la forma de las esferas celulares. Microfotografías de la formación de esferas obtenidas al cabo de una semana de incubación con metformina en distintas concentraciones. **A:** Grupo control, **B:** 0,001 mM, **C:** 0,01 mM, **D:** 0,1 mM, **E:** 1 mM, **F:** 10 mM y **G:** 20 mM. Magnificación 400X.

Para complementar los resultados obtenidos en el ensayo de formación de esferas, se contabilizó mediante hemocitometría y tinción con azul tripan, el número de células que se encontraban vivas al término del experimento.

Como se aprecia en la Figura 3, se registró una disminución significativa de células vivas ($p < 0,0001$) en aquellos grupos que se expusieron a una mayor concentración de metformina, mientras que en el rango de 0,001 a 1 mM el número de células vivas fue similar al encontrado en el grupo control. Estos resultados son concordantes con los ya descritos en las figuras 1 y 2.

Cabe mencionar que en los grupos en los que se encontró un menor número de células vivas, se observó una mayor cantidad de células muertas (teñidas de color azul), lo cual implica que la droga induce un efecto citotóxico y promueve la muerte celular (datos no mostrados).

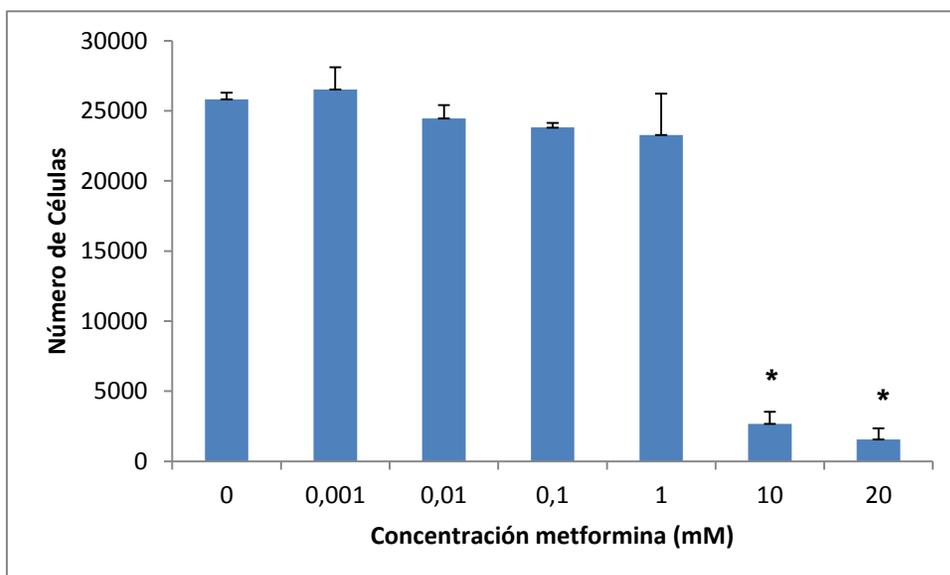


Figura 3: Metformina reduce la viabilidad celular de las esferas celulares tratadas en períodos prolongados de incubación. Número de células en esferas, contabilizadas mediante cámara de Neubauer luego de ser incubadas con metformina (0 a 20 mM) durante 7 días. * Indica significancia estadística respecto al grupo control (concentración 0), $p < 0,0001$ (test Kruskal Wallis).

Objetivo 2

Ensayos de Viabilidad Celular

Metformina no ejerció un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de esferas celulares a las 48 horas de incubación, tal como se observa en la Figura 4.

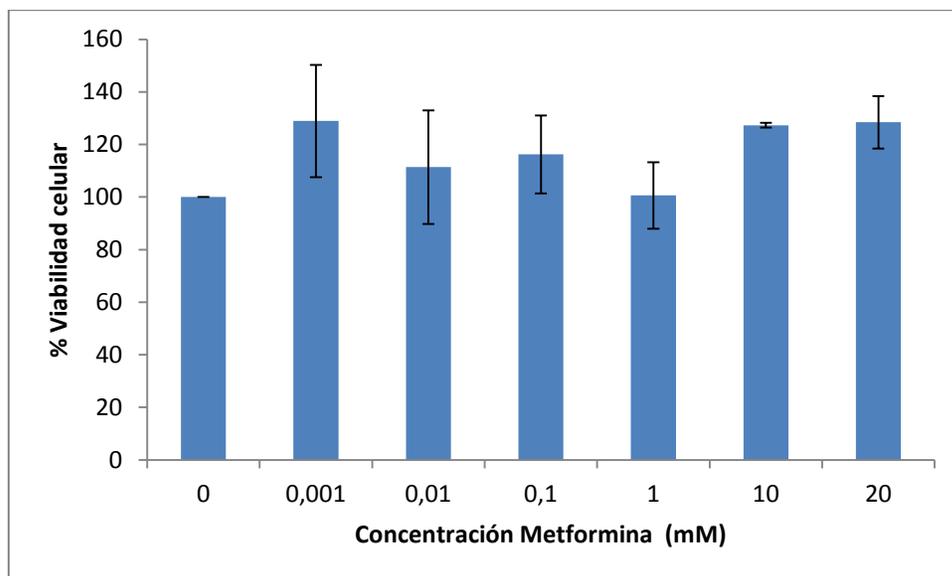


Figura 4: Metformina no reduce la viabilidad de las esferas celulares en períodos cortos de incubación. Viabilidad en esferas celulares expuestas a diferentes concentraciones de metformina (0 a 20mM), en ensayo de reducción de MTS. Lectura realizada a las 48 horas de incubación. Los resultados se obtuvieron como valores relativos respecto al grupo control (concentración 0), $p=0,05$ (test Tukey).

Al igual que lo observado en las esferas celulares, en células CF41.Mg parentales expuestas a metformina, no hubo efecto inhibitorio sobre su viabilidad en el rango de 0 a 0.1 mM. No obstante, como se muestra en la Figura 5, a partir de la concentración 1 mM se apreció un efecto citotóxico dependiente de la concentración, el cual fue significativo ($p<0,0001$) en la condición de 10 y 20 mM.

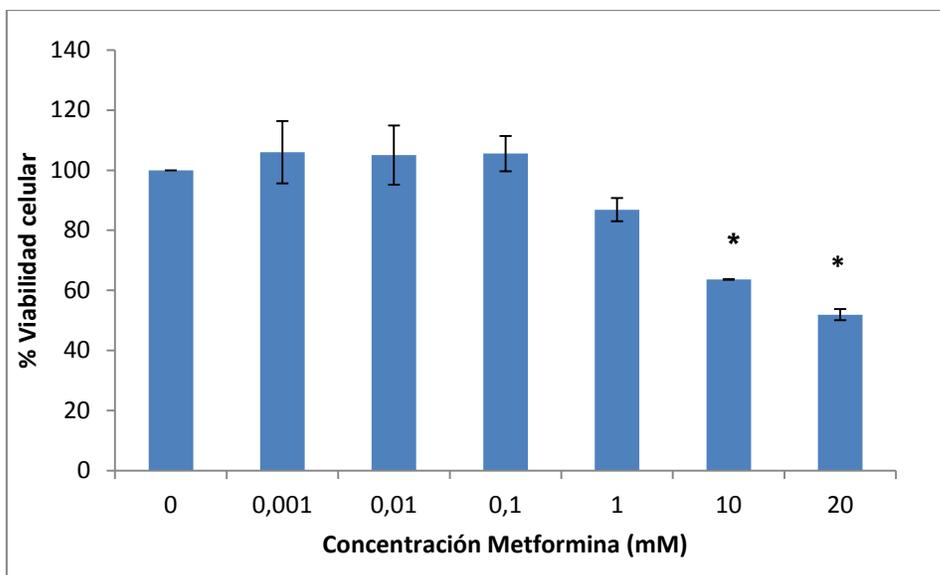


Figura 5. Altas concentraciones de metformina disminuyen la viabilidad de células CF41.Mg parentales. Ensayo de viabilidad en células CF41.Mg parentales en respuesta a metformina (0-20 mM): Método de reducción de MTS. Lectura realizada a las 48 horas de incubación. Resultados obtenidos como valor relativo respecto al grupo control. *Indica significancia estadística respecto al grupo control (concentración 0), $p < 0,0001$ (test Kruskal Wallis).

Complementando lo anterior, microscópicamente se obtuvo una mayor confluencia de las células parentales tratadas con concentraciones de 0 a 0,01 mM de metformina, no existiendo cambios en la morfología celular, tal como se aprecia en las microfotografías A, B y C de la Figura 6, respectivamente. Sin embargo, en el rango de 0,1 a 20 mM se observó pérdida paulatina de la confluencia junto con cambios morfológicos, donde las células tumorales fueron perdiendo su forma fusiforme para adquirir una más redondeada (microfotografías D a G). Estas imágenes preceden lo observado en viabilidad celular en respuesta a la presencia de metformina.

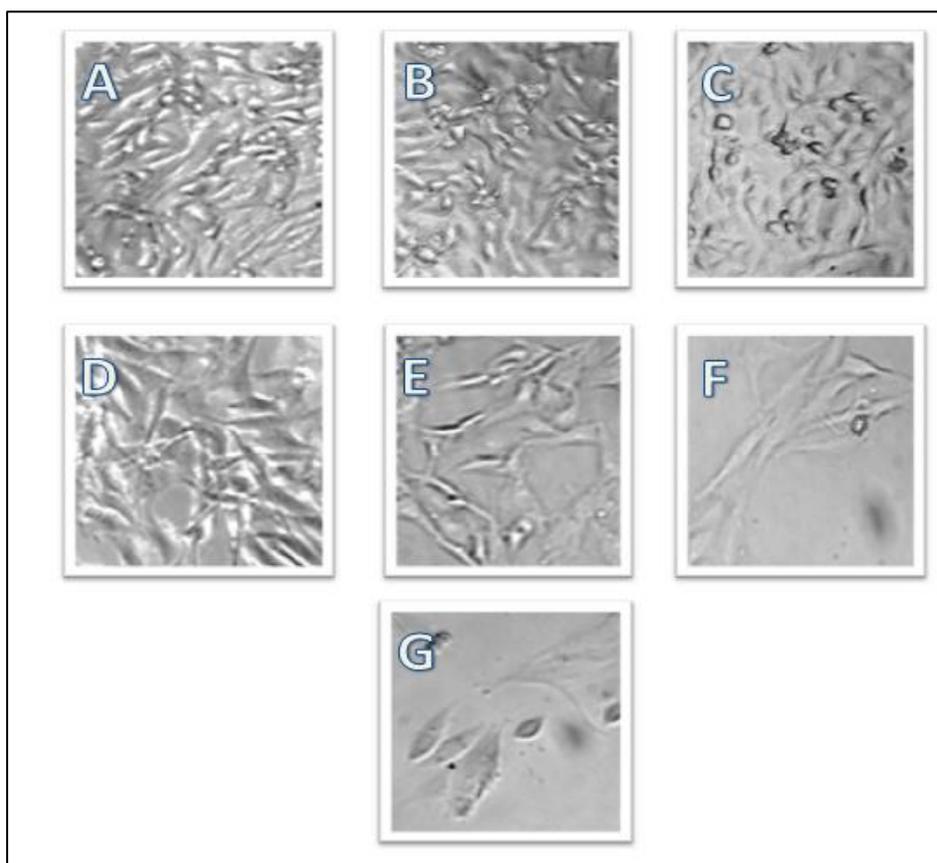


Figura 6. Altas concentraciones de metformina reducen la viabilidad de células parentales CF41.Mg. Microfotografías obtenidas al cabo de 48 horas de incubación con metformina en distintas concentraciones **A:** Grupo control, **B:** 0,001 mM, **C:** 0,01 mM, **D:** 0,1 mM, **E:** 1 mM, **F:** 10 mM y **G:** 20 mM. Magnificación 400X.

Finalmente, se obtuvieron los promedios de las viabilidades para cada concentración de metformina utilizada en las esferas y se comparó con el promedio de las viabilidades correspondientes a las concentraciones utilizadas en las células parentales, luego de 48 horas de incubación con la droga. Como se observa en la Figura 7, la mayor diferencia observada entre ambos grupos celulares responde a que las esferas celulares evidenciaron mayor resistencia a la citotoxicidad mostrada por las altas concentraciones de metformina en relación a las células parentales expuestas a las mismas concentraciones del fármaco. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,0001$).

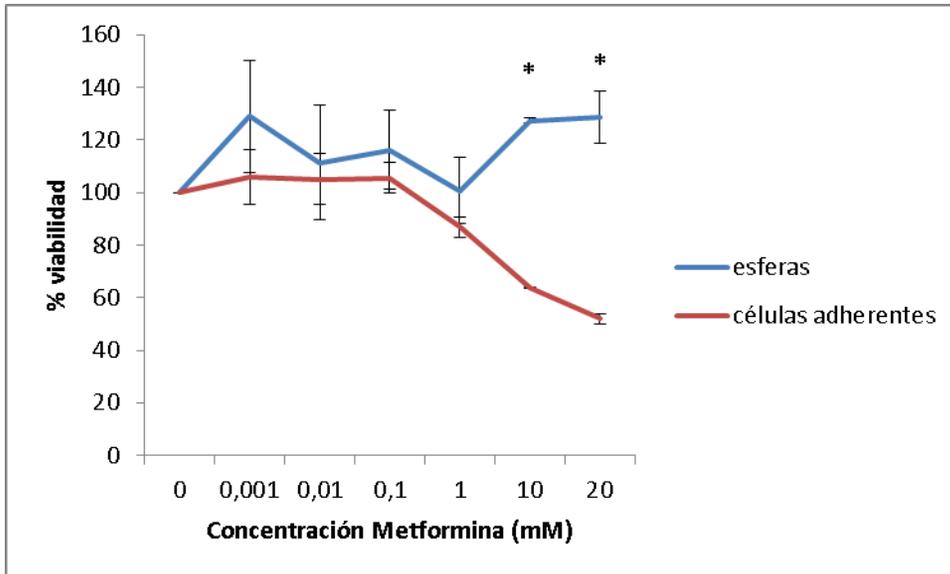


Figura 7. Tratamientos con altas concentraciones de metformina por períodos cortos de incubación disminuyen la viabilidad de células parentales y generan resistencia a la droga en esferas celulares. Comparación de viabilidad de las esferas y células parentales en respuesta a metformina. Resultados obtenidos como valor relativo respecto al grupo control (concentración 0). *Indica diferencia significativa entre ambos tipos celulares expuestos a la misma concentración de metformina, $p < 0,0001$ (test Wilcoxon Mann Whitney).

DISCUSIÓN

El descubrimiento y posterior investigación sobre las CNT ha evidenciado que este subgrupo de células son las responsables, al menos en parte, de la progresión y recurrencia tumoral (Li *et al.*, 2007). Aunque existen diversas hipótesis respecto a los orígenes de las CNT, todas involucran la adquisición de características tumorales mediante alteraciones genéticas específicas (Nigam, 2013). Dichas alteraciones hacen que estas células sean más resistentes a las terapias antineoplásicas convencionales, en relación al resto de las células que conforman el tumor (Clarke *et al.*, 2006), por lo tanto es fundamental estudiar potenciales nuevas terapias dirigidas contra este tipo celular.

Entre las técnicas propuestas para identificar y aislar a las CNT, se describen la tinción de Hoeshst, expresión de proteínas específicas de superficie y ensayos de formación de esferas, entre otros. Este último se asocia con la capacidad de autorenovación y tumorigenicidad que tienen este tipo de células (Fillmore y Kuperwasser, 2008).

En este estudio, las figuras 1, 2 y 3 se asocian al proceso de formación de las esferas celulares, así como en su tamaño y estructura. En este sentido, el efecto citotóxico exhibido por metformina en el ensayo de formación de esferas concuerda con los resultados descritos por Jung *et al.* (2011), quienes observaron un efecto similar en esferas derivadas de la línea MCF-7 de carcinoma mamario humano. En este sentido, se confirma una acción directa de metformina sobre la célula tumoral, ya descrita por otro trabajo, debido a que se trabajó en condiciones *in vitro*, lo cual descarta un efecto indirecto de la droga sobre el crecimiento tumoral por una acción a nivel sistémico (mecanismo indirecto) (Hosono *et al.*, 2010). El efecto directo ocurriría a través de la vía m-TOR, mediante la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones, limitando la producción de energía producida por las mitocondrias de las CNT (Cazzaniga y Bonanni, 2015). Según lo observado en las Figuras (1 y 2), este efecto es dependiente del tiempo, por lo que los tratamientos *in vitro* prolongados con metformina tendrían efectos citotóxicos más marcados (Rajh *et al.*, 2016). Por lo tanto, el factor tiempo de incubación con el fármaco es importante en la obtención de estos resultados.

En el rango de las concentraciones utilizadas en este estudio, los mayores efectos obtenidos se observaron a partir de la concentración de 10 mM, resultado que concuerda

con el estudio realizado por Jung *et al.* (2011), en el que con esta misma concentración se indujo una disminución del tamaño y número de esferas derivadas de células de carcinoma mamario humano.

En este contexto, Wheaton *et al.* (2014) sugieren que la acción de metformina podría deberse a su relación con el nivel de glucosa del cual disponga la célula. En presencia de altas concentraciones de glucosa, metformina induciría una reducción en la velocidad de división de las células neoplásicas enlenteciendo su crecimiento, mientras que en condiciones de privación de glucosa, metformina causaría la muerte de estas células. Por ende, la cantidad de glucosa disponible modularía el crecimiento de las células neoplásicas en respuesta a metformina. Lo mismo se afirma en otra investigación, donde se plantea que incubaciones con la droga por tiempos prolongados, produce un agotamiento de glucosa (Marinello *et al.*, 2016) creando un microambiente que favorece la acción de metformina sobre AMPK (Faubert *et al.*, 2013).

Otro de los factores que podría incidir en la citotoxicidad observada, corresponde a la acción de metformina sobre microRNAs. En este aspecto, diversos microRNAs cumplen un papel en la regulación de la expresión génica en células tumorales (Liu y Tang, 2011). Los micro-RNA involucrados en la neoplasia mamaria canina estarían relacionados con la malignidad de esta (Pawlowski *et al.*, 2013). Más específicamente, el micro RNA-181 sería uno de los factores presentes en las CNT involucrados en la capacidad de estas para formar esferas (Oliveras *et al.*, 2011). Metformina entonces, modularía algunos de estos fragmentos de RNA no codificante regulando genes que controlan vías metabólicas oncogénicas (Zhou *et al.*, 2015).

La disminución en la formación de esferas (Figuras 1 y 2) podría asociarse con la modulación que ejercería metformina sobre la EMT, que permite a células epiteliales tumorales adquirir propiedades de células mesenquimales favoreciendo el desarrollo de invasión y metástasis (Koeck *et al.*, 2016). Metformina disminuye la expresión de factores claves en la maquinaria de EMT, como los factores de transcripción ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1), TWIST1 (Twist family BHLH transcription factor 1), SNAI2 (Snail family zinc finger 2), así como de la citoquina TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), impidiendo la formación de esferas (Vazquez *et al.*, 2010).

Barbieri *et al.* (2015) y Vito *et al.* (2013) han descrito que CNT mamarias caninas exhiben una mayor sensibilidad a metformina que células parentales. En contraste, en este estudio la mayor sensibilidad se observó en células adherentes parentales (Figuras 5 y 6) evidenciándose quimioresistencia en esferas, reflejada en la alta viabilidad observada en respuesta a metformina (Figura 4). Una resistencia similar fue observada por Torres *et al.* (2015), quienes describieron resistencia de esferas derivadas de células CF41.Mg a otra droga antineoplásica, simvastatina.

Así, nuestros resultados no son concordantes con los reportados anteriormente (Barbieri *et al.*, 2015; Vito *et al.*, 2013) donde utilizaron cultivos primarios derivados de neoplasias mamarias, a diferencia de esta tesis donde se usó como modelo una línea celular. En este sentido, las líneas celulares se utilizan ampliamente en investigación oncológica, representando una fuente autorenovable ilimitada (Wang *et al.*, 2014), además favorece el trabajo con una población celular homogénea en morfología y composición, con lo que se supera el problema de la heterogeneidad en la composición genética y epigenética de las muestras de tejido, asociado al uso de animales de experimentación (Burdall *et al.*, 2005). En este contexto, Kluwe *et al.* (2016) refiere que la homogeneidad de la muestra en estudio es importante puesto que permite verificar de manera más eficiente la citotoxicidad de fármacos que se utilizan para el estudio contra el cáncer, privilegiando así la utilización de líneas celulares. Además, Wang *et al.* (2014) determinaron una mayor proporción de CNT en líneas celulares que en muestras provenientes de cultivos primarios, sugiriendo que las líneas celulares podrían ser más tumorigénicas que las procedentes de cultivos primarios. Lo cual podría indicar que en esta tesis se utilizó una línea celular con características de mayor malignidad que los trabajos que contraponen estos resultados.

Lo anterior involucra que líneas celulares exhiben distinta capacidad de respuesta a los fármacos que cultivos primarios de células tumorales (Lee *et al.*, 2006). Así, estos antecedentes permiten sustentar que el trabajo con líneas celulares puede resultar beneficioso para explorar la citotoxicidad de drogas contra células neoplásicas.

Respecto al proceso de la resistencia a fármacos citotóxicos en las CNT, encontramos la expresión de proteínas dependientes de ATP de la familia ABC (del inglés ATP-binding cassette), que permite a la célula excretar agentes quimioterapéuticos (Meissner *et*

al., 2006). Esto podría explicar el mecanismo por el cual las CNT hayan exhibido una menor sensibilidad a metformina (Figura 7).

Por otra parte, está bien establecido que metformina requiere de los transportadores catiónicos orgánicos OCT1, OCT2 y OCT3 para ingresar a la matriz mitocondrial e inhibir el complejo I de la cadena transportadora de electrones (Cazzaniga y Bonanni, 2015). Se describe que alteraciones genéticas que afecten la expresión de alguno de estos transportadores también podría generar resistencia a esta droga (Shu *et al.*, 2007), y por lo tanto, si en nuestra línea celular se determinase la existencia de dichas alteraciones génicas, podrían explicar nuestros resultados (Figuras 4 y 7).

Entre las CNT, un gran número de ellas permanece en estado de quiescencia, que corresponde a la fase de detención proliferativa, que es reversible, a diferencia del proceso de senescencia y diferenciación que no lo son (Harmes y Dizenzo, 2009). Esta detención del ciclo celular ofrece la posibilidad de conservar la capacidad de autorenovación, asegurando ciclos futuros, y por lo tanto, es un mecanismo que les permite prolongar su vida útil y resistir citotoxicidad inducida por drogas que usualmente destruyen células que proliferan (Coller *et al.*, 2006). En estas células Flores *et al.* (2005) describieron la sobreexpresión de una subunidad catalítica de telomerasa, que es sugerente de actividad sintética de telómeros, aumentando su sobrevivencia celular. Además, pueden permanecer en estado de reposo por largos períodos hasta recibir algún stress y pasar a un estado activo (Harmes y Dizenzo, 2009). En las CNT aisladas de tumores de mama en humanos, un 75% de ellas se encuentran en este estado, lo cual explicaría parcialmente la resistencia a drogas citotóxicas que ellas exhiben (Al-Hajj *et al.*, 2003).

Actualmente, se propone que la quiescencia se compone de dos fases, G0 y una etapa intermedia entre el estado de quietud y activación denominado G alerta, en el cual las células en este estado de alerta presentan un mayor contenido de ATP y una mayor actividad mitocondrial (Rodgers *et al.*, 2014). Lo anterior podría explicar la alta resistencia al efecto citotóxico de la droga obtenida en las esferas celulares derivadas de células CF41.Mg (Figura 4), puesto que el proceso de reducción del reactivo presente en el MTS es realizado a nivel mitocondrial, evidenciando en este caso, alta viabilidad. En este sentido, además, Fillmore y Kuperwasser (2008), sugieren la existencia de una relación entre la ca-

pacidad del flujo de salida de xenobióticos y el estado de quiescencia en las CNT, que les permitiría generar una alta resistencia a agentes citotóxicos. Este efecto también podría ser causante de la alta viabilidad obtenida en esta tesis en las esferas celulares en períodos cortos de incubación con la droga (Figura 4).

Otro antecedente importante que nos permite establecer el estado en que se encontraría las CNT es la expresión de marcadores moleculares. Entre los más estudiados están CD44 y CD24 (Lhemann *et al.*, 2012). Así, la presencia del fenotipo CD44 es importante en el proceso de metástasis (Fillmore y Kuperwasser, 2008), proliferación celular y resistencia a fármacos (Lhemann *et al.*, 2012). Además, Shipitsin *et al.* (2007) observaron que CD44 se expresa en células con características progenitoras y CD24 en células diferenciadas. En cáncer mamario humano, se describe que las CNT exhiben el fenotipo CD44⁺/CD24⁻, característica similar a lo que ocurre en la especie canina (Magalhaes *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2015). Torres *et al.* (2015) describieron que esferas derivadas de la línea celular CF41.Mg mostraban características de troncalidad debido a la alta proporción del fenotipo CD44⁺/CD24⁻, exhibiendo características de autorenovación y quimioresistencia.

Adicionalmente, se ha reportado que algunas alteraciones en diversas vías de señalización, tales como Notch, Wnt y Hedgehog podrían contribuir a la resistencia a fármacos en las CNT mamarias (Charafe *et al.*, 2008). La vía Wnt se relacionaría con la decisión sobre el destino que tomarían las CNT en cuanto a diferenciarse o mantener la posibilidad de autorenovarse (Rajh *et al.*, 2016), mientras que la vía Notch y Hedgehog regulan el proceso mismo de autorenovación (Dontu *et al.*, 2004).

Respecto a los efectos de la metformina sobre las células parentales (Figuras 5 y 6), resultados similares fueron encontrados por Takahashi *et al.* (2014), quienes evaluaron la utilización de metformina sobre la viabilidad en células de carcinoma de endometrio de mujeres. Los autores observaron una disminución significativa en la viabilidad de las células parentales al cabo de 48 horas de incubación, efecto que resultó ser más notorio en las mayores concentraciones que ellos evaluaron (10 y 20 mM). Si bien es una línea celular distinta a la utilizada en este trabajo, refleja la mayor labilidad que presentan estas células a los efectos citotóxicos de metformina.

Investigaciones en células de carcinoma mamario de ratas, describen que el comportamiento de nuestro fármaco en estudio es dependiente del tiempo de exposición más que la concentración utilizada, puesto que a diferentes concentraciones de metformina se ejercía la misma acción (García, 2013). Esta observación se contrapone a lo detectado en este trabajo (Figura 7) y a las investigaciones previas de Hadad *et al.* (2014) donde si bien el tiempo de exposición al fármaco incidió en los resultados, también es determinante la concentración utilizada de la droga, diferencia que podría deberse a el uso de líneas celulares distintas, así como la asociación de otros fármacos en el estudio.

Dado que metformina disminuye la viabilidad de las células neoplásicas cultivadas *in vitro* (Figuras 3, 5, 6 y 7), efecto que concuerda con lo descrito por Menendez *et al.* (2012) y Anisimov *et al.* (2005) quienes mencionan que son necesarias concentraciones en el rango entre 10 y 40 mM para obtener efecto citotóxico. Además, Birsoy *et al.* (2014) muestran que para la obtención de efecto en la viabilidad sobre las CNT, se requiere incubación con el fármaco por tiempos prolongados. Lo anterior concuerda con lo obtenido por Anisimov *et al.* (2005) quienes relacionaron que el tratamiento crónico con metformina en ratas, redujo de manera significativa la incidencia y el tamaño de carcinomas mamarios.

Si bien esta tesis pretendió estudiar el efecto de metformina sobre la viabilidad en células de carcinoma mamario canino, podrían ser varios los factores que estén involucrados, como ya se ha mencionado, y por lo tanto han sido numerosas las preguntas que han surgido. Como futuras perspectivas para esta investigación sería importante determinar la participación de la proteína AMPK, sensor energético que participa en múltiples vías de señalización celular, ya que si bien se describe a la vía m-TOR como parte del mecanismo de acción de la metformina sobre la célula tumoral, podría haber otras moléculas blanco o vías de señalización relacionadas con la AMPK, que podrían modularse producto de la acción de metformina para posteriormente establecer estudios a nivel clínico.

Este estudio constituye y promueve una nueva posibilidad en la prevención y tratamiento de la neoplasia mamaria canina, sugiriendo además auspiciosos beneficios en pacientes oncológicos que presenten resistencia a la insulina.

Por otro lado, considerando las escasas alternativas terapéuticas en Medicina Veterinaria para el cáncer, este trabajo abre potenciales líneas de investigación con esta droga, como estudios comparativos y/o sinérgicos de metformina con otros quimioterápicos, así como su estudio en otros tipos de neoplasias tanto en caninos como en humanos.

CONCLUSIONES

- 10 y 20 mM de metformina inhibieron la eficiencia de formación de esferas derivadas de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg.
- Metformina no indujo efectos en la viabilidad sobre esferas derivadas de células CF41.Mg, en períodos cortos de incubación.
- Células CF41.Mg parentales exhibieron mayor sensibilidad a la acción citotóxica de metformina que esferas celulares en períodos cortos de incubación.
- Estos resultados sugieren que metformina modula la actividad citotóxica de esferas derivadas de células CF41.Mg, lo cual sustenta futuros estudios que permitan robustecer estas observaciones.

BIBLIOGRAFÍA

-AL-HAJJ, M.; WICHA, M.; HERNÁNDEZ, B.; MORRISON, S.; CLARKE, M. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(7):3983-88.

-ANISIMOV, V.; BERSTEIN, L.; EGORMIN, P.; PISKUNOVA, T.; POPOVICH, I.; ZABEZHINSKI, M.; KOVALENKO, I.; POROSHINA, T.; SEMENCHENCO, A.; PROVINCIALI, M.; RE, F.; FRANCESCHI, C. 2005. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp. Gerontol.* 40(8-9):685-93.

-ANTUOFERMO, E.; MILLER, M.; PIRINO, S.; XIE, J.; BADVE, S.; MOHAMMED, S. 2007. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs- A model of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(11):2247-56.

-BALBUENA, J.; PACHON, G.; LÓPEZ - TORRENTS, G.; ARON, J.; CASTRESANAT, S.; PETRIZ, J. 2011. ABCG2 is required to control the sonic hedgehog pathway in side population cells with stem-like properties. *Cytometry A.* 79(9):672-83.

-BARBIERI, F.; THELLUNG, S.; RATTO, A.; CARRA, E.; MARINI, V.; FUCILE, C.; BAJETTO, A.; PATAROZZI, A.; WURTH, 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):1235-38.

-BIRSOY, K.; POSSEMATO, R.; LORBEER, F.; BAYRAKTAR, E.; THIRU, P.; YUCEL, B.; WANG, T.; CHEN, W.; CLISH, C.; SABATINI, D. 2014. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanidas. *Nature.* 508(7494):108-12.

-BLANPAIN, C.; FUCHS, E. 2007. P63 Revving up epithelial stem-cell potential. *Nat. Cell. Biol.* 9(7):731-33.

- BRANDEN, L.; NIELSEN, S.; TOFT, N.; KRISTENSEN, A.** 2010. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Vet. Rec.* 166(19):586-90.
- BURDALL, S.; HANBY, A.; LANSDOWN, M.; SPEIRS, V.** 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res.* 5(2):89-95.
- CAZZANIGA, M.; BONANNI, B.** 2015. Breast cancer metabolism and mitochondrial activity: the possibility of chemoprevention with metformin. *Biomed. Res. Int.* doi:10.1155/2015/972193. .
- CLARKE, M.; DICK, J.; DIRKS, P.; EAVES, C.; JAMIESON, C.; JONES, D.; VISVADER, J.; WEISSMAN, I.; WAHL, G.** 2006. Cancer stem cells- perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. 2006. *Cancer. Res.* 66(19):9339-44.
- COLLER, H.; SANG, L.; ROBERTS, J.** 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS. Biol.* 4(3). doi:10.1371/journal.pbio.0040083.
- CURRIE, C.; POOLE, C.; GALE, E.** 2009. The influence of glucose lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetología.* 52:1766-77.
- CHARAFE, E.; MONVILLE, F.; GINESTIER, C.; DONTU, G.; BIRNBAUM, D.; WICHA MS.** 2008. Cancer stem cell in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology.* 75(2):75-84.
- CHENG, A.; FANTUS, I.** 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ.* 172(2):213-26.
- DONTU, G.; JACKSON, K.; Mc NICHOLAS, E.; KAWAMURA, M.; ABDALLAH, W.; WICHA, M.** 2004. Role of notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/ progenitor cells. *Breast. Cancer. Res.* 6(6):605-15.
- DOMINGUEZ, C.; THU, K.; MASON, J.; BLASER, H.; BRAY.; M.; MAK, T.** 2015. Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. *Mol. Cell.* 60(4):524-36.

- DOWLING, R.; ZAKIKHANI, M.; FANTUS, I.; POLLAK, M.; SONENBERG, N.** 2007. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* 67(22):10804-12.
- FAUBERT, B.; BOILY, G.; IZREIG, S.; GRISS, T.; SAMBORSKA, B.; DONG, Z.; DUPUY, F.; CHAMBERS, C.; FUERTH, B.; BENOIT, V.; MAMER, O.; AVIZONIS, D.; DE BERARDINIS, R.; SIEGEL, P.; JONES, R.** 2013. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell. Metabolic.* 17(1):113-24.
- FERLETTA, M.; GRAWE, J.; HELLMEN, E.** 2011. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *Int. J. Dev. Biol.* 55(7-9):791-9.
- FILLMORE, C.; KUPERWASSER, C.** 2008. Human breast cancer cell lines contain stem –like cells that self- renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 10(2). R25. doi:10.1186/bcr1982.
- FLORES, E.; CATTANEO, U.** 2001. Tumores mamarios en caninos domésticos, epidemiología, criterios de diagnóstico, y enfoque terapéutico. *Monografías de Medicina Veterinaria.* 21(1):67-78.
- FLORES, I.; CAYUELA, M.; BLASCO, M.** 2005. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science.* 309(5738):1253-56.
- FORETZ, M.; GUIGAS, B.; BESTRAND, L.; POLLAK, M.; VIOLLET, B.** 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell. Metab.* 20(6):953-66.
- GARCIA, V.** 2013. Evaluación de la Metformina y el F3 como posible terapia coadyuvante en un modelo in vivo de cáncer de mama. Tesis para optar al grado de Maestra en Biología Experimental. D.F, México. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. 165p.
- GODWIN, P.; PRITCHARD, K.; ENNIS, M.; CLEMONS, M.; GRAHAM, M.; FANTUS, I.** 2008. Insulin- lowering effects of metformin in women with early breast cancer. *Clin. Breast Cancer.* 8(6):501-5.
- GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.** 2011. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 48(1):117-31.

- HADAD, S.; HARDIC, D.; APPLEYARD, V.; A, THOMPSON.** 2014. Effects of metformin on breast cancer cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle. *Clin. Transl. Oncol.* 16(8):746-52.
- HARDIE, D.; ROSS, F.; HAWLEY, S.** 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(4):251-62.
- HARMES, D.; DI RENZO, J.** 2009. Cell quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 14(1):19-27.
- HERMO, G.; GARCIA, M.; TORRES, P.; GOBELLO, C** 2005. Tumores de mama en la perra. *Ciencia Veterinaria.* 7(1):1-25.
- HOSONO, K.; ENDO, H.; TAKAHASHI, H.; SUGIYAMA, M.; SAKAI, E.; UCHIYAMA, T.; SUZUKI, K.; LIDA, H.; SAKAMOTO, Y.; YONEDA, K.; KOIDE, T.; TOKORO, C.; ABE, Y.; INAMORI, M.; NAKAGAMA, H.; NAKAJIMA, A.** 2010. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev. Res.* 3(9):1077-83.
- JIN, X.; TOWNLE, R.; SHAPIRO, L.** 2007. Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. *Cell. Press.* 15(10):1285-95.
- JUNG, J.; PARK, S.; LEE, S.; SEO, M.; TROSKO, J.; KANG, K.** 2011. Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression. 2011. *PLoS. One.* 6(11). doi:10.1371/journal.pone.0028068.
- KAHN, B.; ALQUIER, T.; CARLING, D.; HARDIE, D.** 2005. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell. Metab.* 1(1):15-25.
- KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS T.; DESIRIS, A.** 2001. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48(2):85-96.

- KLOPFLEISCH, L.; VON EULER, H.; SARLI, G.; PINHO, S.; GARTNER, F.; GRUBER, A.** 2011. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: New from an old disease. *Vet. Pathol.* 8(1):98-116.
- KLUWE, L.; JIANG, W.; ALSTER, I.; HANEN, H.** 2016. A novel genetic- and cell-based tool for assessing the efficacy and toxicity of anticancer drugs in vitro. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomuc Czech. Repub.* 160(1):64-69.
- KOECK, S.; AMANN, A.; HUBER, J.; GAMERITH, G.; HILBE, W.; ZWIERZINA, H.** 2016. The impact of metformin and salinomycin on transforming growth factor B- induced epithelial - to- mesenchymal transition in non- small cell lung cancer cell lines. *Oncol. Lett.* 11(4):2946-52.
- KRISTIANSEN, V.; PEÑA, L.; DIEZ, L.; ILLERA, J.; SKJERVE, E.; BREEN, A.; COFONE, M.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; SORENMO, K.** 2016. Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. *J. Vet. Intern. Med.* 30(1):230-41.
- LANDMAN, G.; KLEEFSTRA, N.; VAN HATEREN, K.; GROENIER, K.; GANS, R.; BILO, H.** 2010. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care.* 33(2):322-26.
- LEE, J.; KOTLIAROV, I.; LI, A.; SU, Q.; DONIN, N.; PASTORINO, S.; PUROW, B.; CRISTOPHER, N.; ZHANG, W.; PARK, J.; FINE, H.** 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell.* 9(5):391-403.
- LEHMANN, C.; JOBS, G.; THOMAS, M.; BURTSCHER, H.; KUBBIES, M.** 2012. Established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int. J. Oncol.* 41(6):1932-42.
- LI, F.; TIEDE, B.; MASAGUE, J.; KANG, Y.** 2007. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell. Res.* 17 (1):3-14.
- LIU, C.; TANG, D.** 2011. Micro RNA regulation of cancer stem cells. *Cancer Res.* 71(18):5950-54.

- LOCKETT, B.; MERLO, W.; ROSCIANI, A.; MACCIO, O.; GUAIMAS, L.** 2005. Evaluación radiológica en caninos para detección de metástasis de tumores mamarios malignos en tórax y abdomen. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen V-025.
- LUGONES, M.; RAMÍREZ, M.** 2009. Aspectos históricos y culturales sobre el cáncer de mama. *Med. Gen. Integr.* 25(3):160-66.
- MAGALHAES, G.; TERRA, E.; DE OLIVEIRA, V.; DE BARROS, B.; MOREIRA, P.; ROSOLEM, M.** 2013. Immunodetection of cells with a CD44+/CD24- phenotype in canine mammary neoplasms. *BMC. Vet. Res.*9(205). doi:10.1186/1746-6148-9-205.
- MALHOTRA, G.; ZHAO, X.; BAND, V.** 2011. Shared signaling pathways in normal and breast cancer stem cells. *J. Carcinog.* 10(38). doi:10.4103/1477-3163.91413.
- MARCONATO, L.; LORENZO, R.; ABRAMO, F.; RATTO, A.; ZINI, E.** 2008. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 6 (2):90-101.
- MARINELLO, P.; DA SILVA, T.; PANIS, C.; NEVES, A.; MACHADO, K.; BORGES, F.; GUARNIER, F.; BERNARDES, S.; DE FREITAS, J.; MORGADO, J.; LUIZ, R.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.** 2016. Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA, damage and transforming growth factor B1induction. *Tumour Biol.* 37(4):5337-46.
- MARTIN, B.; VAZQUEZ, A.; OLIVEROS, C.; MENENDEZ, J.** 2010. Metformin and cancer: doses, mechanisms and hormetic phenomena. *Cell Cycle.* 9(6):1057-64.
- MEISSNER, K.; HEYDRICH, B.; JEDLITSCHKY, G.; MEYER, Z.; SCHWABEDISSEN, H.; MOSYAGIN, I.; DAZERT, P.; ECKEL, L.; VOGELGESANG, S.; WARZOK, R.; BOHM, M.; LEHMANN, C.; WENDT, M.; CASCORBI, I.; KROEMER, H.** 2006. The ATP- binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J. Histochem. Cytochem.* 54(2):215-21.

- MENENDEZ, J.; OLIVERAS, C.; CUFÍ, S.; COROMINAS, B.; JOVEN, J.; MARTIN, B.; VAZQUEZ, A.** 2012. Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle*. 11(15):2782-92.
- MICHISHITA, M.; AKIYOSHI, R.; YOSHIMURA, H.; KATSUMOTO, T.; ICHIKAWA, H.; OHKUSU-SUKADA, K.; NAKAGAWA, T.; SASAKI, N.; TAKAHASHI, K.** 2010. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Res. Vet. Sci.* 91(2):254-60.
- MICUCCI, C.; VALLI, D.; MATAACCHIONE, G.; CATALANO, A.** 2016. Current perspectives between metabolic síndrome and cancer. *Oncotarget*. 7(25):38959-72.
- MIRANDA, N.; TOVAR, A.; PALACIOS, B.; TORRES, N.** 2007. La AMPK como un sensor de energía celular y su función en el organismo. *Rev. Invest. Clin.* 59(6):458-69.
- MONAMI, M.; COLOMBI, C.; BALZI, D.; DICEMBRINI, I.; GIANNINI, S.; MELANI, C.** 2011. Metformin and cancer occurrence in insulin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 34(1):129-31.
- NIGAM, A.** 2013. Breast cancer stem cells, pathways and therapeutic perspectives. 2011. *Indian J. Surg.* 5(3):170-80.
- OLIVERAS, C.; CUFÍ, S.; VAZQUEZ, A.; TORRES, V.; DEL BARCO, S.; MARTIN, B.; MENENDEZ, J.** 2011. Micro (mi) RNA expression profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti-diabetic drug metformin: induction of the tumor suppressor miRNA let-7a and suppression of the TGF β - induced oncomiR miRNA-181a. *Cell Cycle*. 10(7):1144-51.
- PANG, L.; CERVANTES, A.; ROD, W.; ARGYLE, E.; ARGYLE, D.** 2011. Canine mammary cancer stem cells are radio-and chemo-resistant and exhibit an epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Cancer*. 3(2):1744-62.
- PAWLOWSKI, K.; MACIEJEWSKI, H.; MAJCHRZAK, K.; DOLKA, I.; MOL, J.; MOTYL, T.; KROL, M.** 2013. Five markers useful for the distinction of canine mammary malignancy. *BMC. Vet. Res.* 9(138). doi:10.1186/1746-6148-9-138.

- PEETERS, P.; BAZELIER, M.; VESTERGAARD, P.; LEEYKENS, H.; SCHMIDT, M.; DE VRIES, F.; DE BRUIN, M .** 2013. Use of metformin and survival of diabetic women with breast cancer. *Curr. Drug. Saf.* 8(5):357-63.
- PHILIBERT, J.; SNYDER, P.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L.; KNAPP, D.; WATERS, D.** 2003. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 17(1):102-106.
- PROKOPI, M.; KOUSPAROU, C.; EPENETOS, A.** 2015. The secret role of micro RNAs in cancer stem cell development and potential therapy: a notch- pathway approach. *Front. Oncol.* 4(389). doi:10.3389/fonc.2014.00389.
- 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). doi:10.1371/journal.pone.0154747.
- RODGERS, J.; KING, K.; BRETT, J.; CROMIE, M.; CHARVILLE, G.; MAGUIRE, K.; BRUNSON, C.; MASTEY, N.; LIU, L.; TSAI, C.; GOODELL, M.; RANDO, T.** 2014. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G (Alert). *Nature.* 510(7505):393-96.
- SALAS, Y.; ROMERO, L.** 2011. Cáncer de mama en perras (canis lupus familiaris): Causas, factores de riesgo y marcadores moleculares en su clasificación y pronóstico. Similitud con el cáncer de mama humano. *Gaceta de Ciencias Veterinarias.* 16(2):56-64.
- SAVIC, L.; CHAPIRO, J.; DUWE, G.; GESCHWIND, J.** 2016. Targeting glucose metabolism in cancer: new class of agents for loco-regional and systemic therapy of liver cancer and beyond. *Hepat. Oncol.* 3(1):19-28.
- SCHNEIDER, R.; DORN, C.; TAYLOR, D.** 1969. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical. *J. Natl. Cancer. Inst.* 43(6):1249-61.
- SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; KHERADMAND, P.; KHERADMAND, D.; BAHRAMI, A.; DARALI, H.; KHADIVAR, F.** 2013. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an clinic- cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell. International.* 13(79):1-11.

-SHIPITSIN, M.; CAMPBELL, L.; ARGANI, P.; WEREMOWICZ, S.; BLOUSH-TAIN, N.; YAO, J.; NICOLSKAYA, T.; SEREBRYSCAYA, T.; BEROUKHIM, R.; HU, M.; HALUSHKA, M.; SUKUMAR, S.; PARKER, L.; ANDERSON, K.; HARRIS, L.; GARBER, J.; RICHARDSON, A.; SCHNITT, S.; NICOLSKY, Y.; GELMAN, R.; POLYAC, K. 2007. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 11(3):259-73.

-SHU, Y.; SHEARDOWN, S.; BROWN, C.; OWEN, R.; ZHANG, S.; CASTRO, R.; LANCULESCU, A.; YUE, L.; LO, J.; BURCHARD, E.; BRETT, C.; GIACOMINI, K. 2007. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1(OCT1) on metformin action. *J. Clin. Invest.* 117(5):1422-31.

-SMITH, G. 2002. Mammary cancer and epithelial stem cells: a problem or a solution?. *Breast Cancer Res.* 4(2):47-50.

-SINNETT, S.; BRENMAN, J. 2014. Past strategies and future directions for identifying AMP-activated protein kinase (AMPK) modulators. *Pharmacol. Ther.* 143(1):111-18.

-SORENMO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, H. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasm. *Vet. Pathol.* 48(1):85-97.

-STINGL, J.; EAVES, C.; ZANDICH, I.; EMERMAN, J. 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* 67(2):93-109.

-TAKAHASHI, A.; KIMURA, F.; YAMANAKA, A.; TAKEBAYASHI, A.; KITA, N.; TAKAHASHI, K.; MURAKAMI, T. 2014. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell. Int.* 14(53). doi:10.1186/1475-2867-14-53.

-TAYLOR, G.; SHABESTARI, L.; WILLIAMS, J.; MAYS, C.; ANGUS, W.; MC FARLAND, S. 1976. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res.* 36(8):2740-43.

-THOMPSON, A. 2014. Molecular pathways: Preclinical models and clinical trials with metformin breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 20(10):2508-15.

- TOBAR, P.; SMITH, P.; BARROS, L.; MARTINEZ, J.** 2016. Modulation of mammary stromal cell lactate dynamics by ambient glucose and epithelial factors. *J. Cell. Physiol.* doi/10.1002/jcp.25398.
- TORRES, G.; ESLAVA, P.** 2007. Tumores mamarios en caninos: adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. 2007. *Rev. Orinoquia.* 11(1):99-110.
- TORRES, C.; OLIVARES, A.; STOORE, C.** 2015. Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 33(5):2235-44.
- TRAN, C.; MOORE, A; FRIMBERGER, A.** 2014. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs without postoperative chemotherapy. *Vet. Comp. Oncol.* 12(2):1-11.
- VALLIANOU, N.; EVANGELOPOULOS, A.; KAZAZIS, C.** 2013. Metformin and cancer. *Diabetic Stud.* 10(4):228-35.
- VAZQUEZ, A.; OLIVERAS, C.; CUFÍ, S.; DEL BARCO, S.; MARTIN, B.; MENENDEZ, J.** 2010. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial – mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle.* 9 (18):3807-14.
- VIOLLET, B.; GUIGASS, B.; SANZ, N.; LECLERC, J.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F.** 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. (Lond).* 122(6):253-70.
- VITO, G.; FERRARI, A.; CAMPANELLA, C.; RATTO, A.; BARBIERI, F.; THEL-LUNG, S.; GATTI, M.; PATTAROZZI, A.; WURTH, R.; FLORIO, T.** 2013. Efficacy of metformin in targeting cancer stem cells from canine mammary carcinoma. **In:** Annual Congress of European Society of Veterinary Oncology. Lisboa, Portugal. 30 may-1 june 2013. pp 36.
- VON EULER, E.** 2014. Tumores de las glándulas mamarias. **In:** Dobson, J.; Duncan, B. Manual de oncología en pequeños animales. 3ed. Ediciones Lexus. Madrid, España. pp. 351-65.

- WANG, R.; LV, Q.; MENG, W.; TAN, Q.; ZHANG, S.; MO, X.; YANG, X.** 2014. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J. Thorac Dis.* 6(6):829-37.
- WHEATON, W.; WEINBERG, S.; HAMANAKA, R.; SOBERANES, S.; SULLIVAN, L.; ANSO, E.; GLASAUER, A.; DUFOUR, E.; MUTLU, G.; BUDIGNER, G.; CHANDEL, N.** 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife.* 3. doi:10.7554/eLife.02242.
- WICHA, M.; LIU, S.; DONTU, G.** 2006. Cancer stem cells: an old idea- a paradigm shift. *Cancer Res.* 66(4):1883-90.
- YOSHIDA, G.** 2015. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34(111). doi:10.1186/s13046-015-0221-y.
- YUEN, C.; ASUTHKAR, S.; GUDA, M.; TSUG, A.; VELPUTA, K.** 2016. Cancer stem cell molecular reprogramming of the warburg effect in glioblastomas: a new target gleaned from an old concept. *CNS. Oncol.* 5(2):101-8.
- YUREKLI, B.; KARACA, B.; CETINKALP, S.; USLU, R.** 2009. Is it the time for metformin to take place in adjuvant treatment of HER-2 positive breast cancer? Teaching new tricks to old dogs. *Medical Hypotheses.* 73(4):606-7.
- ZAKIKHANI, M.; DOWLING, R.; FANTUS, I.; SONENBERG, N.; POLLAK, M.** 2006. Metformin is an AMP kinase- dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 66(21):10269-73.
- ZHOU, J.; XU, B.; LI, L.** 2015. A new role for an old drug: metformin targets microRNAs in treating diabetes and cancer. *Drug. Dev. Res.* 76(6):263-69.