

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico**

**“Efecto de un tratamiento con metformina y una mezcla de microRNAs en
la proliferación y migración de células de cáncer ovárico epitelial”**

Camila Bannura D’Angelo

Director de Tesis:

Dr. Carmen Romero Osses

Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva HCUCH

Diciembre 2023

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**



TESIS PROFESIONAL

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico**

**“Efecto de un tratamiento con Metformina y una mezcla de microRNAs
en la proliferación y migración de células de cáncer ovárico epitelial”**

Camila Bannura D’Angelo

Director de Tesis:

Dr. Carmen Romero Osses

Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva HCUCH

Diciembre 2023

Santiago, 24 de enero de 2024

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La Srta. **Camila Del Carmen Bannura D'Angelo**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el décimo semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: ***“Uso de Metformina y una mezcla de microRNAs en la proliferación, migración e invasión en células de cáncer ovárico epitelial”***, dirigida por la **Dra. Carmen Romero**, académica del Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Dra. Margarita Vega del IDIMI** y el **Dr. Alfonso Paredes**, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Dra. Margarita Vega	6.81	25%
Corrector 2 Dr. Alfonso Paredes	6.76	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	6.56	25%
Nota final tutor	6.92	25%
Nota final tesis profesional	6.76	

En consecuencia la estudiante **Camila Del Carmen Bannura D'Angelo** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Marioly Müller.
Coordinadora curso
Trabajo de Investigación



HERNÁN RODRIGO
TORRES RIVERA
15.932.579-2
26/01/2024 - 14:11
UNIVERSIDAD
DE CHILE
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
CV: b9mopg69sjszmaddkobb3mf1sw

Prof. Hernán Torres.
PEC curso
Trabajo de Investigación

Dedicatoria

A mi Pá, mi Mamita, mi Hermanito y mi Tita, por siempre estar para mí, por su amor y apoyo incondicional.

A mi Yeya y Tata, personas cultas y maravillosas, que me cuidan desde el cielo.

Los amo infinitamente.

Hay una razón para toda esta frustración.

Creo que estamos en el camino correcto.

Si alguna vez lo encontramos

Volveremos a casa de una vez como una hormiga.

(BTS, Lost)

Agradecimientos:

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al financiamiento del Proyecto FONDECYT REGULAR 1220479: Role of microRNAs mix and metformin as possible adjuvant therapy for epithelial ovarian cancer: A preclinical study. (Dr. Carmen Romero Osses).

En primer lugar, agradecer a la Dr. Carmen Romero Osses por recibirme en su laboratorio, guiarme en este trabajo y permitirme ser parte de este proyecto, esperando haber sido un aporte para lograr resultados en esta búsqueda de tratamientos para el cáncer ovárico epitelial de alta mortalidad.

A la Dr. Maritza Garrido Palma y al asistente de laboratorio Álvaro Armijo Cruz, por enseñarme con vocación y paciencia, muchas cosas prácticamente desde cero. Infinitamente agradecida de todo el conocimiento que me entregaron, por orientarme en el mundo de la investigación, el cual me daba bastante miedo. Especiales gracias a éste último, por las conversaciones, consejos y palabras de aliento.

A todo el personal del Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, que son todos unas excelentes y hermosas personas, gracias por todas las celebraciones y hacer un ambiente ameno y cálido.

A mis amiguitos de la u: Pap Lolitas, mis morfoamiguitos, por todos esos momentos en el lab, con estrés y risas, esos desayunitos eternos en el Barros Luco, los chismoseos, pero en especial por esa unión bonita que se creó, que espero se mantenga en el tiempo, como coleguitas y amigos.

TMemes, mis amiguitos desde primer año, que debido a que nos fuimos separando por las menciones y pasando menos tiempo juntos, cada junta y vez que nos vemos es como si el tiempo se hiciera nada, la conexión sigue intacta. Espero se mantenga esta bonita amistad con más juntas con comidita, chismes, conversas profundas y just dance.

A mis amigos fuera de la u: los pocos del colegio, Ale, Seba, Berni, Negro (colado acá xd) y Fran; por todos estos años de amistad y a las niñas ex USM, que son lo mejor que me quedó de ahí. A todos ustedes que, a pesar que nos veamos en cada luna azul, es como si el tiempo no pasara, que esa conexión que tenemos no se debilitara, me hacen muy feliz. Gracias por su amistad y apoyo, espero no perderlos nunca.

Y por último, pero lo más importante, a mi familia: mi papá, mamá, hermanito y tita, por estar siempre ahí para mí contra viento y marea, incondicionalmente, apoyándome en todas mis decisiones, teniéndome infinita paciencia y comprensión, darme la oportunidad con mucho esfuerzo de estudiar algo que me llena el alma, luego de un tiempo muy oscuro de confusión y de sentirme a la deriva. Gracias a ustedes y todo el amor y apoyo que me han brindado soy quien soy y estoy donde estoy. Profundamente agradecida de ustedes, los amo infinitamente.

Índice:

Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Resumen.....	6
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Hipótesis y Objetivos.....	10
Materiales y métodos.....	11
Resultados.....	13
Discusión.....	18
Conclusión.....	19
Bibliografía.....	20

Resumen:

El cáncer ovárico epitelial (COE) es una neoplasia ginecológica y presenta una alta mortalidad a nivel mundial. Uno de sus mecanismos, es la interacción del factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad, el receptor de tropomiosina quinasa A (TRKA), que contribuye a la progresión del COE, promoviendo la proliferación celular y la angiogénesis, a través de varias proteínas oncogénicas, como c-MYC, survivina y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) junto con una disminución de los microRNA (miR) 23b y 145; a su vez, estos microRNAs controlan la expresión de las oncoproteínas antes mencionadas. Estudios han demostrado que la metformina disminuye la actividad transcripcional inducida por NGF de MYC y β -catenina/factor de células T-factor enhancer linfoide (TCF-LEF), así como la expresión de c-MYC, survivina y VEGF en COE, mientras que aumenta los niveles de miR-23b y miR-145. Adicionalmente, al sobre-expresar la mezcla de miR-145 y miR-23b en líneas celulares de COE, disminuye la proliferación, migración e invasión celular. Por otro lado, al considerar los efectos de la metformina por sí sola, el objetivo de este trabajo fue evaluar un tratamiento con este fármaco, añadiendo miR-145 y miR-23b y observar los resultados del mismo sobre líneas celulares de COE (A2780), concretamente sobre la proliferación y migración de las mismas, mediante ensayos con CCK-8, inmunofluorescencia de Ki-67 y ensayos con insertos tipo transwell, con el fin de evaluar si esta opción es candidata a ser una posible terapia complementaria en el tratamiento de COE. Los resultados muestran que el tratamiento combinado de metformina más el mix de miR-145 y miR-23b disminuye la proliferación y migración en la línea celular de cáncer ovárico epitelial, A2780.

Abstract:

Epithelial ovarian cancer (EOC) is a gynecological neoplasm and has a high mortality worldwide. NGF/TRKA are involve in the progression of EOC, that contributes to EOC progression, promoting cell proliferation and angiogenesis through several oncogenic proteins, such as c-MYC, survivin and vascular endothelial growth factor (VEGF) along with a decrease in microRNAs (miR) 23b and 145; at the same time, these microRNAs control the expression of the oncoproteins mentioned before. Studies have shown that metformin decreases the NGF-induced transcriptional activity of MYC and β -catenin/T-cell factor-lymphoid enhancer-binding factor (TCF-LEF), as well as the expression of c-MYC, survivin and VEGF in EOC cells, while it increases miR-23b and miR-145 levels. Therefore, the aim of this work was to assess the effect of metformin plus miR-23b and miR-145 on EOC cells to evaluate proliferation and migration of them, through CCK-8 assays, Ki-67 immunofluorescence and

transwell assays, in order to know if this option is a candidate to be a possible complementary therapy in EOC treatment. The results show that the combined treatment of metformin plus the mix of miR-145 and miR-23b decreases proliferation and migration in the epithelial ovarian cancer cell line, A2780.

Introducción:

El cáncer ovárico es la segunda neoplasia ginecológica con mayor mortalidad a nivel mundial (1). Alrededor de un 85% al 90% de los casos malignos de este cáncer corresponde al subtipo epitelial (COE) (2). Dado que las pacientes con COE tienen síntomas inespecíficos (3), se diagnostica en etapas tardías, con bajas tasas de supervivencia (4). Además, las terapias actuales son inespecíficas para células cancerosas y han mostrado resultados modestos y tasas de reincidencia de 70–80% dentro de los primeros 2 años (5). De ahí la importancia de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Algunos marcadores de células de cáncer son una sostenida señalización proliferativa (6), así como la sobreexpresión de factores de crecimiento, que promueven la proliferación celular y la angiogénesis en COE (7), siendo estos procesos esenciales en el desarrollo y progresión del cáncer. Estudios han mostrado que la presencia y expresión del factor de crecimiento nervioso NGF, por sus siglas en inglés, y su receptor de alta afinidad TRKA (Receptor de tropomiosina quinasa A) contribuyen a estos procesos (Fig. 1), incrementando la expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), el factor de transcripción c-MYC y oncoproteínas como survivina y β -catenina (8). Por otro lado, esta interacción entre NGF y su receptor TRKA también produce una disminución en los microRNAs (miR) 23b y 145 (9).

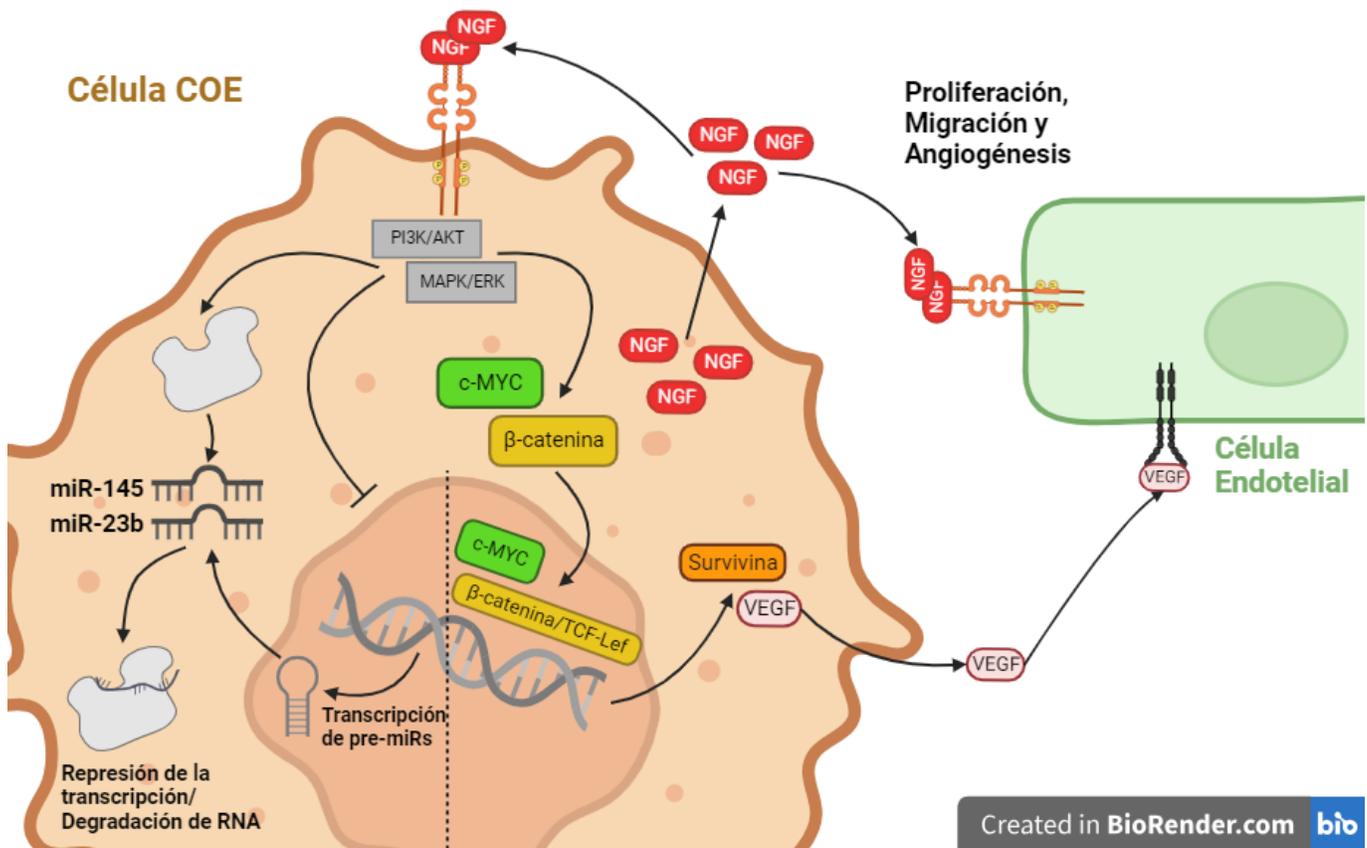


Fig 1. Efectos de NGF en células de COE y endoteliales.

La angiogénesis es un proceso fisiológico caracterizado por la generación de nuevos vasos sanguíneos desde vasos preexistentes. En la biología del cáncer, la angiogénesis es necesaria para permitir la entrega de oxígeno y nutrientes al tumor que se está generando (10). El VEGF promueve la angiogénesis, modulando la función de células vasculares y no vasculares, en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (11).

Respecto a las moléculas reguladas por NGF/TRKA:

a) c-MYC, un factor de transcripción, que regula la expresión de ciclinas y varias proteínas oncogénicas relacionadas al ciclo y muerte celular (12).

b) Survivina, la cual inhibe la apoptosis, regula la división celular y está involucrada en curación tisular, luego de una injuria (13). Su expresión aberrante está asociada con un incremento en la proliferación, progresión, angiogénesis tumoral, resistencia a la terapia y pobre pronóstico en varios

cánceres (14), incluyendo el cáncer ovárico (15), y su expresión promueve angiogénesis tumoral inducida por VEGF (16).

c) β -catenina es otra molécula regulada por la vía de NGF/TRKA y es un co-regulador transcripcional y una proteína adaptadora para adhesión celular. La unión de β -catenina a la familia TCF-LEF (factor de células T-factor enhancer linfoide) de factores transcripcionales promueve la transcripción de muchos oncogenes (17). Por ejemplo, el complejo β -catenina/TCF-LEF incrementa la expresión de proteínas asociadas a la transición epitelio-mesenquimal (EMT en inglés) (18), así como las asociadas a supervivencia y proliferación celular, incluyendo a survivina y c-MYC (19). Éstas últimas, a su vez, promueven la actividad de β -catenina/TCF-LEF, en un loop de amplificación que podría estar relacionado con crecimiento tumoral y progresión de COE.

Debido a que la señalización por NGF/TRKA regula la expresión de varias oncoproteínas, podría estar involucrado un control vía microRNAs (miRs), la familia más grande de RNAs no codificantes, cuyos blancos son RNAs mensajeros (mRNAs). La función de los miRs es inducir su degradación o bloquear la traducción de proteínas (20).

El miR-145 se considera un supresor de la migración e invasión celular (21), cuando éste está en concentraciones altas; ya que inhibe o disminuye la transcripción de onco-proteínas. Sin embargo, cuando está en concentraciones bajas, las proteínas oncogénicas se sobre-expresan y, por lo tanto, aumenta la proliferación, migración e invasión. Por otro lado, la sobreexpresión de miR-23b inhibe survivina y el crecimiento tumoral (22).

Adicionalmente, nuestro grupo ha demostrado que ambos miRs son oncosupresores y que se ven disminuidos en tejidos de cáncer ovárico y que al aumentar sus niveles en líneas celulares de cáncer de ovario, disminuye la proliferación, migración e invasión celular (9).

Por otra parte, metformina es un agente antidiabético de la familia de las biguanidas, utilizado para tratar la diabetes mellitus tipo II, además de otras afecciones como diabetes gestacional y síndrome de ovario poliquístico. Está siendo estudiada por sus posibles efectos anti-aging, neuroprotectores y anticáncer (23). Más aún, estudios observacionales han mostrado que la ingesta de metformina está asociada a una disminución en la incidencia y mortalidad de cáncer ovárico (24). Esto podría deberse

a que, entre sus efectos pleiotrópicos, se incluyen regulación de oncoproteínas a la baja, mediado por un aumento de miRs que, a su vez, regulan a estas oncoproteínas, como fue demostrado por nuestro grupo (25).

Estudios anteriores (25), revelan que la metformina disminuye fuertemente la expresión de c-MYC, β -catenina y VEGF en células de COE con poco efecto en células ováricas no tumorales, bloquea el incremento de c-MYC, survivina, VEGF, actividad transcripcional de MYC y β -catenina/TCF-LEF inducido por NGF en células de cáncer ovárico. Además, el tratamiento en células de COE incrementa los niveles de miR-145 y miR-23b, bloqueando la disminución inducida por NGF, lo que sugiere que los efectos antitumorales de la metformina podrían estar mediados por regulación de miRs.

Debido a que la metformina produce los efectos mencionados anteriormente, regulando varias oncoproteínas y miRs, se debería traducir en cambios en la proliferación, migración e invasión de células de COE y, agregando una cantidad adicional de miR-145 y miR-23b, que cumplen un papel importante igualmente, el efecto se vería incrementado y se levanta como buen candidato a terapia complementaria para tratar el COE.

Hipótesis: El uso de metformina y la mezcla de microRNAs miR-23b más miR-145 disminuyen la proliferación y migración en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial (COE).

Objetivo general: Evaluar proliferación y migración en una línea celular de COE, post-tratamiento con metformina y la mezcla de los microRNAs miR-23b más miR-145.

Objetivos específicos:

- Evaluar si metformina y la mezcla de miR-23b más miR-145 producen una disminución en la proliferación de la línea celular de COE, A2780.
- Determinar si metformina y la mezcla de miR-23b más miR-145 producen una disminución en la migración de la línea celular de COE, A2780.

Materiales y métodos:

Cultivos celulares: La línea celular A2780 proviene de un COE primario humano, de una paciente sin tratamiento y es obtenida de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Las células fueron evaluadas para mycoplasma, cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) y suplementadas con suero fetal bovino (FBS) 10% a 37 °C con 5% de CO₂ hasta alcanzar el 80% de confluencia.

Tratamientos y Transfección: Células de la línea celular fueron tratadas con metformina clorhidrato 20 µM y transfectadas con miR-145 30 nM y miR-23b 30 nM usando el reactivo de transfección Viafect (E498A, Promega) en una concentración final de 30 µM, previamente diluido en medio de cultivo, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (1:100). Se manejaron las siguientes condiciones experimentales:

1. Metformina + Mezcla de los miRs: Metformina durante 1 hora, luego se retiró el medio y se aplicó la mezcla de miRs durante 24 horas.
2. Basal: Células sólo con medio de cultivo durante el tiempo total del tratamiento (25 horas).
3. Viafect: Como control negativo de la transfección, células sólo con este reactivo durante el tiempo total del tratamiento.
4. Scramble: Como control negativo de la transfección, las células se transfectaron con una secuencia scramble (C-37007, Santa Cruz Biotechnology), usando el reactivo de transfección Viafect, durante el tiempo total del tratamiento.
5. Mix miR-23b + miR-145: usando el reactivo de transfección Viafect, durante el tiempo total del tratamiento.
6. Metformina: células sólo con este fármaco durante el tiempo total del tratamiento.

Ensayos de proliferación celular: Células (5.000) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos, tratadas y transfectadas como se hizo mención anteriormente. Luego, se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ y se evaluó la capacidad proliferativa de las células mediante el ensayo Cell Counting Kit-8 (CCK-8) según el protocolo del fabricante (HY-K0301, CCK8). Con esta técnica se evalúa el número de células metabólicamente activas o células vivas.

Inmunofluorescencia (Ki-67): La detección de K-67 se utiliza para evaluar proliferación celular para lo cual, se sembraron células (50.000) en cubreobjetos redondos de 12 mm depositados en placas

de 24 pocillos, tratadas y transfectadas como se mencionó previamente. Una vez que los tratamientos estuvieron listos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PBS) 1X durante 15 minutos. Luego, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,3% por 10 minutos y se bloquearon con albúmina de suero bovino 2% en PBS (PBS-BSA 2%) durante 5 minutos con el fin de evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario. Las muestras se incubaron durante toda la noche con anticuerpo primario monoclonal de ratón anti Ki-67 (sc-23900, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución de 1:300 en PBS-BSA 2%. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo fluorescente anti-ratón (A11029, Molecular Probes) en una dilución 1:200 en PBS-BSA 2% durante 1 hora y 30 minutos a 37°C. Para el montaje de los cubreobjetos se utilizó ProLong Gold Antifade con DAPI (8961S, Cell Signaling Technology) que permite además visualizar los núcleos celulares. La inmunofluorescencia se evaluó obteniendo el área marcada de 7 imágenes por condición (tanto de Ki-67 como del marcador nuclear DAPI, siendo 14 en total, en magnificación 400x), utilizando el software Fiji Image J (desarrollado por National Institutes of Health/University of Wisconsin) y luego calculando el porcentaje de Ki-67 respecto a DAPI.

Ensayos de migración: Las células (50.000) de COE fueron tratadas y transfectadas como se indica anteriormente y se agregaron a la cámara superior de transwells de 6.5 mm con insertos de membrana de policarbonato de poros de 8.0 μm (Corning Inc.) recubiertos con fibronectina (Gibco, Thermo Fisher Scientific) en la superficie inferior. Las células se dejaron migrar a 37 °C por 24 h. Luego, se tiñeron con cristal violeta durante toda la noche. Las células unidas a superficie inferior de la membrana fueron contadas. Los insertos fueron fotografiados (10 fotografías por cada condición experimental con magnificación 200x) y analizados usando Fiji Image J.

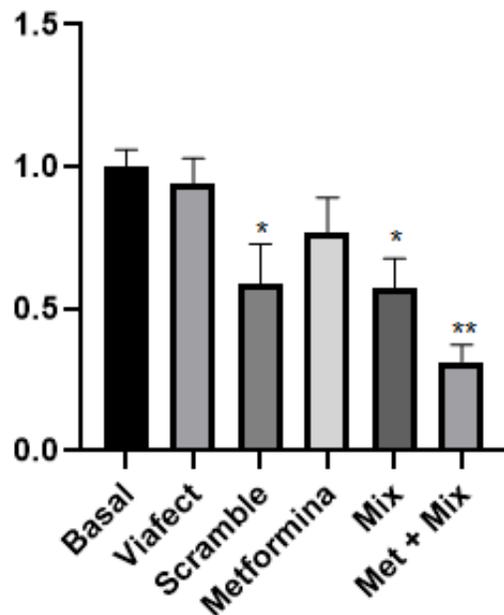
Análisis Estadístico: Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Graph Pad Prism 8.0.1. Se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar dos grupos y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos. Todos los resultados se consideraron significativos con un $p < 0.05$ y se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM).

Resultados:

Evaluación de la proliferación celular mediante el ensayo Cell Counting Kit-8

Para evaluar si el tratamiento con metformina y la mezcla o mix de miR-23b más miR-145 produce cambios en la proliferación de la línea celular de cáncer ovárico epitelial A2780, se realizaron ensayos con CCK-8. Los hallazgos (Fig. 2) indicaron que el tratamiento, tanto completo como el fármaco y el mix por sí solos, ocasionan una disminución en la proliferación de las células de esta línea de COE. Sin embargo, esta baja no es estadísticamente significativa cuando se aplica solo metformina. En cambio, tanto la mezcla de miRs por sí sola (baja del 43%) como el tratamiento combinado de metformina más el mix provocan un descenso significativo de la proliferación, siendo éste considerablemente mayor con el tratamiento completo, correspondiendo a una baja del 69% con éste último. Por otra parte, hay que notar que Scramble, que está originalmente diseñado para funcionar como control negativo de la transfección produjo una baja significativa de la proliferación que, luego de revisar el diseño experimental, pudo deberse a que la concentración utilizada de éste era bastante mayor a la utilizada de los miRs en estudio. Debido a lo anterior, se decidió hacer los ensayos con una concentración modificada menor de Scramble (Fig. 2, B) (y considerando la condición Basal como control negativo, ya que no hubo diferencia significativa con el control Viafect, y el tratamiento en estudio. Los resultados confirmaron que el tratamiento provoca una baja significativa de la proliferación de células de COE A2780.

A) Proliferación (CCK8)



B) Sc Concentración Modificada

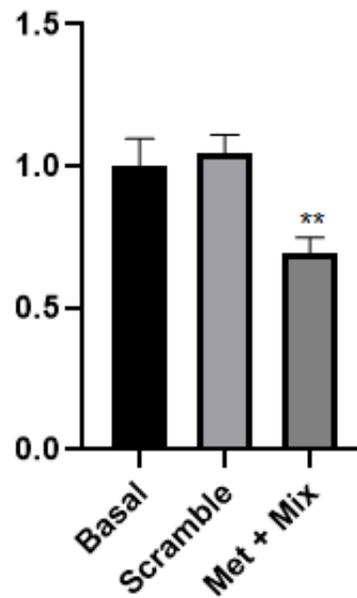
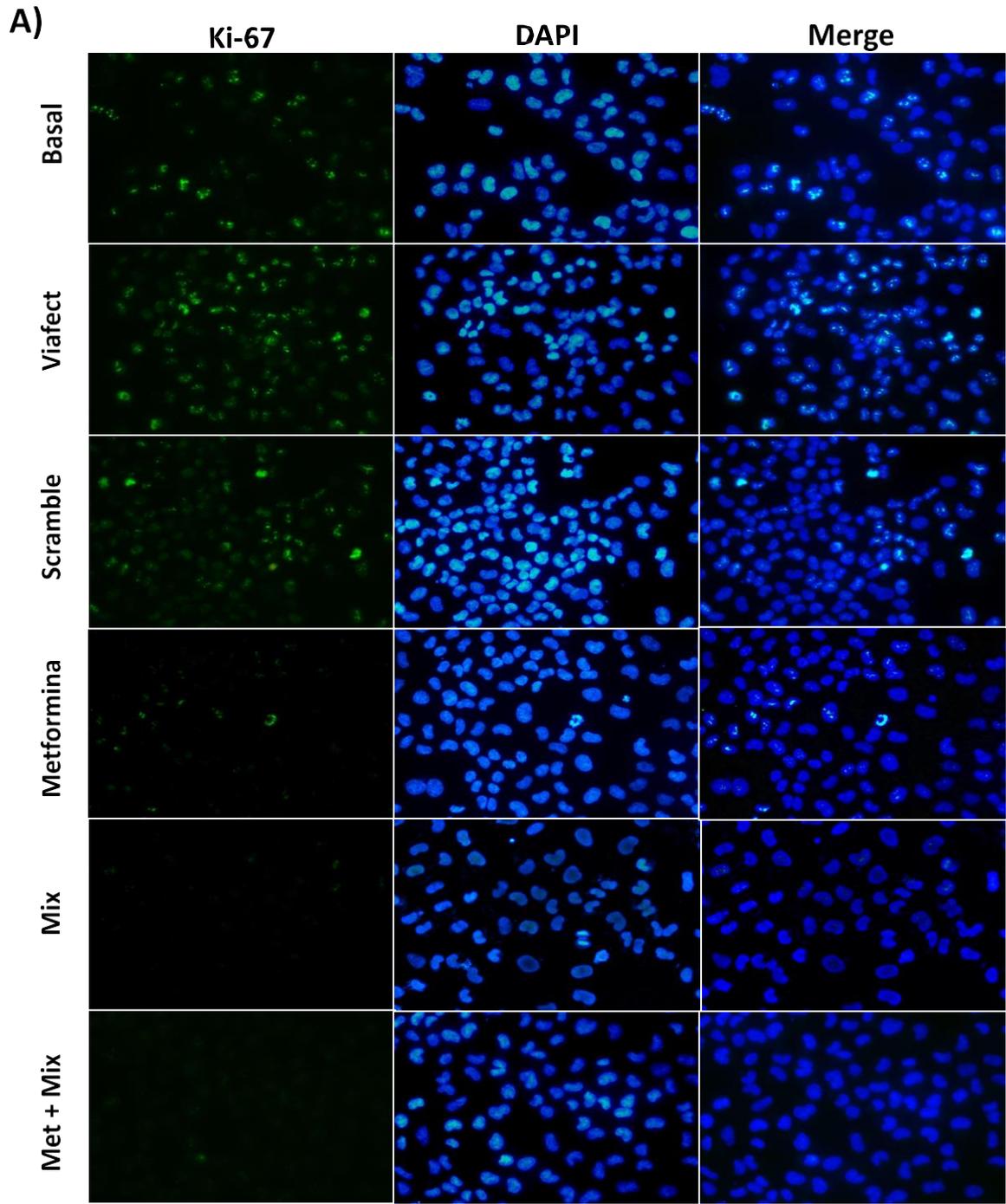


Fig 2. Efecto del tratamiento con metformina y el mix de miR-23b + miR-145 en la proliferación de células de COE A2780. Las células A2780 post-tratamiento muestran una proliferación disminuida en comparación con los controles negativos (Basal y Viafect). A) Corresponde a ensayos realizados originalmente. B) Corresponde a los ensayos hechos con una concentración modificada menor de Scramble (Sc). Los gráficos se encuentran expresados como veces de cambio. Los datos están normalizados respecto a la condición Basal. Basado en ensayos con CCK-8. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$.

Evaluación de la proliferación celular mediante inmunofluorescencia de Ki-67

Se detectaron los niveles de Ki-67 mediante inmunofluorescencia y se calculó su porcentaje respecto al total nuclear con DAPI. Los resultados de esto, indican que los tratamientos generan una baja estadísticamente significativa en la proliferación de las células de COE A2780 y que ésta se ve potenciada cuando se aplica ambos tratamientos en conjunto en comparación a cuando se hace cada uno por separado. Este descenso fue en un 50% con metformina, 52% con el mix y 90% con el tratamiento completo.



B) Inmunofluorescencia Ki-67

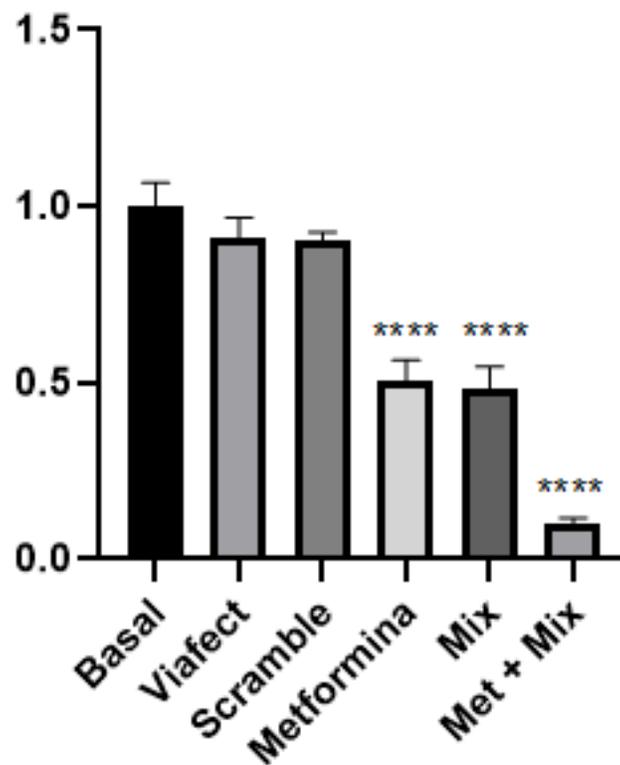


Fig 3. Efecto del tratamiento con metformina y el mix de miR-23b + miR-145 en la proliferación de células de COE A2780. Las células A2780 post-tratamiento presentan un descenso en la proliferación en comparación con los controles negativos (Basal, Viafect y Scramble). A) Corresponde a imágenes representativas de cada condición (Aumento 400×). B) Corresponde al gráfico de la semi-cuantificación de la fluorescencia. Se encuentra expresado como veces de cambio. Los datos están normalizados respecto a la condición Basal. Basado en los niveles de inmunofluorescencia de Ki-67. **** = $p \leq 0.0001$.

Evaluación de la migración mediante ensayos con insertos transwell

Además de presentar una activa proliferación, las células cancerosas poseen la capacidad de migrar, facilitando la diseminación de éstas a otros tejidos y favoreciendo la progresión del cáncer.

Para determinar si el tratamiento con metformina más el mix de miRs genera efectos en la habilidad de migración de las células de COE, se realizaron ensayos utilizando insertos transwell (Fig. 4). Luego de los tratamientos, se registró un descenso en la migración, siendo éste estadísticamente

significativo para las condiciones del mix por sí solo (23%) y del tratamiento completo de metformina más la mezcla (48%). Cabe destacar también que esta disminución es notablemente mayor cuando se aplica el tratamiento completo.

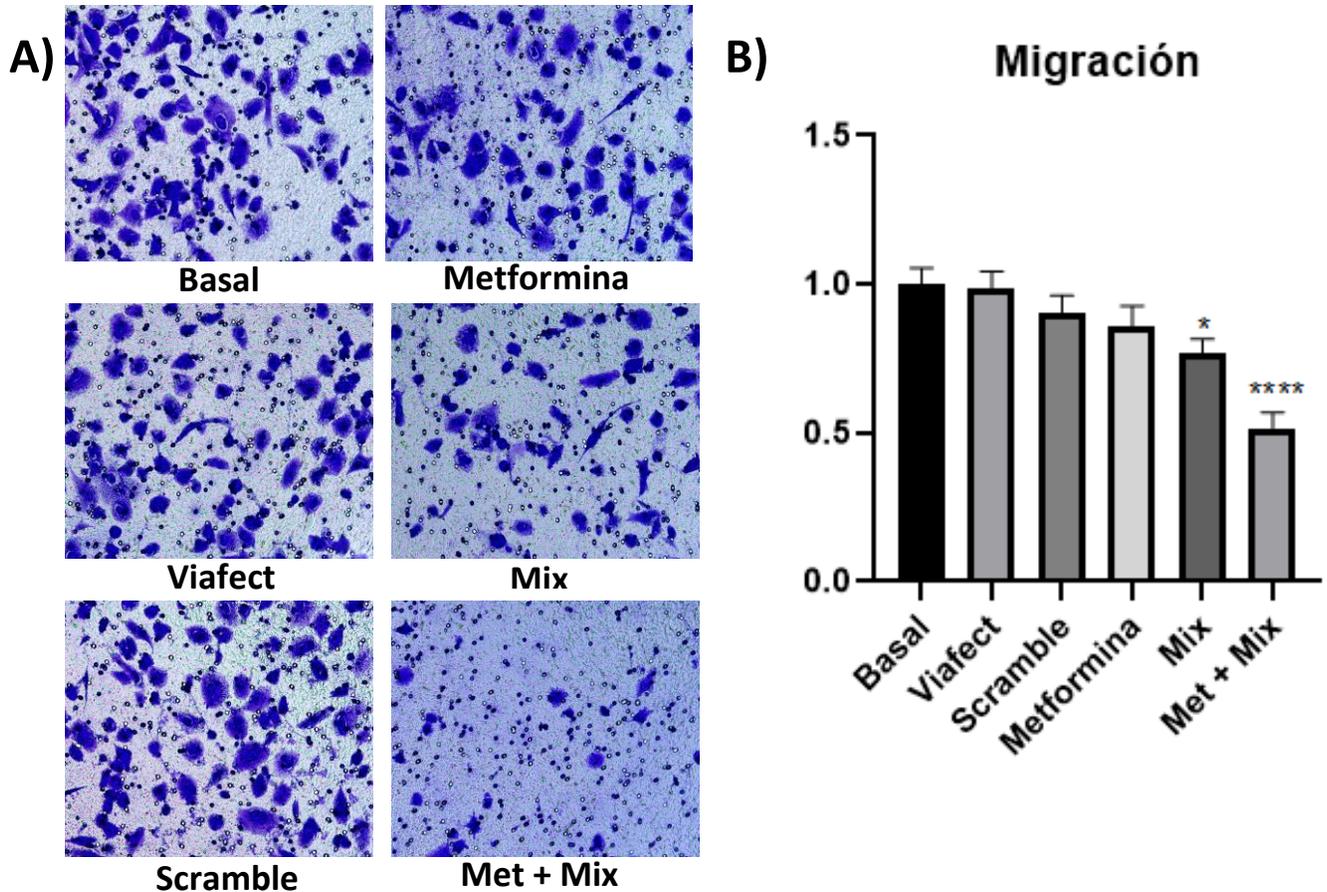


Fig 4. Efecto del tratamiento con metformina y el mix de miR-23b + miR-145 en la migración de células de COE A2780. Los ensayos de migración con insertos transwell se realizaron en células A2780 tratadas con metformina y/o el mix de miRs o un control negativo (Basal, Viafect o Scramble). Células A2780 post-tratamiento mostraron una migración disminuida en comparación con los controles negativos. A) Corresponde a imágenes representativas de cada condición (Aumento 200×). B) Corresponde al gráfico del conteo celular y está representado como veces de cambio. Los datos están normalizados respecto a la condición Basal. Basado en ensayos con insertos transwell. * = $p \leq 0.05$, **** = $p \leq 0.0001$.

Discusión:

El cáncer ovárico epitelial (COE) se caracteriza por su alta mortalidad. Esto, debido a que carece de síntomas específicos y herramientas diagnósticas precisas que ayuden a su detección, lo que dificulta ésta y una vez que se logra identificar, generalmente ya se encuentra en un estado avanzado (3). Sumado a esto, las terapias actualmente disponibles para este tipo de cáncer son inespecíficas y tienen altas tasas de reincidencia (5). Esto podría explicarse por la existencia de elementos moleculares que actualmente no se están teniendo en cuenta como objetivos en la quimioterapia actual y que podrían estar contribuyendo al avance del cáncer de ovario.

La vía de señalización TRKA estimulada por NGF se ha relacionado anteriormente con cáncer. Se ha demostrado que una desregulación en la señalización de NGF promueve la proliferación, migración, angiogénesis y metástasis en diferentes cánceres, incluidos el cáncer de mama, el melanoma y el cáncer de páncreas. Respecto a esto, nuestro grupo pudo establecer que cuando NGF activa el receptor TRKA en células de COE, aumenta la expresión de las proteínas proangiogénicas survivina, c-MYC y VEGF, así como la actividad transcripcional dependiente de c-MYC y β -catenina/TCF-Lef, además de actuar directamente como factor angiogénico al activar TRKA en células endoteliales (7, 8). Sumado a esto, NGF/TRKA regula a la baja los miRs 23b y 145, los cuales actúan como oncosupresores, por lo tanto, al estar disminuidos dejan de reprimir a los RNAs mensajeros que traducen a proteínas oncogénicas y éstas proteínas aumentan, entre varias otras (9, 26).

Considerando lo anterior, miR-23b y miR-145 se presentan como buenos candidatos para una terapia adyuvante contra el COE y en nuestro laboratorio se pudo corroborar que realizando una co-transfección de ambos se produce una disminución significativa en lo que respecta proliferación, migración e invasión de células de este tipo de cáncer, además de regular a la baja proteínas oncogénicas, tomando en consideración también que el efecto es mayor cuando se aplican ambos miR en conjunto (27).

Por otro lado, tenemos al fármaco metformina, el cual se ha estado estudiando por tener efectos anticáncer y, específicamente en COE, su ingesta está asociada a una disminución en la incidencia y mortalidad de este cáncer (24). Relacionado a esto, nuestro equipo pudo determinar que este medicamento disminuye los efectos pro-tumorales de NGF y, asimismo, aumenta los niveles de miR-

23b y miR-145 (25). Debido a esto, es que metformina surge como otro buen candidato a terapia complementaria.

Tomando en cuenta todo lo anterior, es de esperar que, combinando ambas propuestas de terapias adyuvantes, se debiera observar un efecto potenciado y es lo que se pretende demostrar en este trabajo. Los experimentos realizados demostraron que la aplicación del tratamiento combinado de metformina sumado al mix de miR-145 más miR-23b producen una disminución en la proliferación y migración de células de COE de la línea celular A2780, efecto que considerablemente es más acentuado cuando se administran juntos, primero metformina durante una hora y posteriormente la mezcla durante 24 horas, que cuando se utilizan por sí solos durante un tiempo equivalente. En consiguiente, se puede asegurar que el tratamiento combinado surge como un buen candidato a terapia adyuvante para COE.

No obstante, es importante considerar que los experimentos se realizaron en la línea celular de COE A2780, la cual se considera menos metastásica en comparación a otras líneas celulares de cáncer de ovario y, teniendo en cuenta que el COE se detecta habitualmente en un estado avanzado, es recomendable probar este tratamiento en líneas celulares que representen modelos de COE más agresivos.

Otra recomendación para investigaciones futuras, es evaluar otras características de las células cancerígenas, como su capacidad de invasión y angiogénesis, para estudiar si esta terapia produce más cambios también en estos otros aspectos.

Conclusión:

El tratamiento combinado de metformina más el mix de miR-145 y miR-23b disminuye la proliferación y migración en la línea celular de cáncer ovárico epitelial, A2780.

Bibliografía:

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. The American Cancer Society medical and editorial content team. What is ovarian cancer: Ovarian tumors and cysts [Internet]. American Cancer Society, última revision: 11 Abr 2018. [consultado Nov 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/what-is-ovarian-cancer.html>
3. Bankhead CR, Collins C, Stokes-Lampard H, Rose P, Wilson S, Clements A, et al. Identifying symptoms of ovarian cancer: A qualitative and quantitative study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 28 Jun 2008;115(8):1008–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01772.x>
4. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 29 May 2018;68(4):284–96. <https://doi.org/10.3322/caac.21456>
5. Gadducci A, Guarneri V, Peccatori FA, Ronzino G, Scandurra G, Zamagni C, et al. Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status. *Journal of Ovarian Research*. 28 En 2019;12(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0484-6>
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 4 Mar 2011;144(5):646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
7. Vera C, Tapia V, Vega M, Romero C. Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. *Journal of Ovarian Research*. 10 Ag 2014;7(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0082-6>
8. Garrido MP, Hurtado I, Valenzuela-Valderrama M, Salvatierra R, Hernández A, Vega M, et al. NGF-Enhanced Vasculogenic Properties of Epithelial Ovarian Cancer Cells Is Reduced by Inhibition of the COX-2/PGE2 Signaling Axis. *Cancers* 2019;11:1970. <https://doi.org/10.3390/cancers11121970>
9. Retamales-Ortega R, Oróstica L, Vera C, Cuevas P, Hernández A, Hurtado I, et al. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18:507. <https://doi.org/10.3390/cancers18030507>

10. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6. <https://doi.org/10.1056/nejm197111182852108>
11. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology.* 10 Dic 2005;23(5):1011–27. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.06.081>
12. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* May 2015;1849(5):506–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.013>
13. Chiou S-K, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin – an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Medical Science Monitor.* 2003;9(4):43–7.
14. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cancer.* 2016;7(3):314–23. <https://doi.org/10.7150%2Fjca.13332>
15. Cohen C, Lohmann CM, Cotsonis G, Lawson D, Santoianni R. Survivin expression in ovarian carcinoma: Correlation with apoptotic markers and prognosis. *Modern Pathology.* 1 Jun 2003;16(6):574–83. <https://doi.org/10.1097/01.mp.0000073868.31297.b0>
16. Fernández JG, Rodríguez DA, Valenzuela M, Calderon C, Urzúa U, Munroe D, et al. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/AKT enhanced β -catenin/TCF-lef dependent transcription. *Molecular Cancer.* 9 Sept 2014;13(1). <https://doi.org/10.1186%2F1476-4598-13-209>
17. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996Aug15;382(6592):638–42. <https://doi.org/10.1038/382638a0>
18. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation.* 1 Jun 2009;119(6):1429–37. <https://doi.org/10.1172/jci36183>
19. Bu H, Liu D, Cui J, Cai K, Shen F. Wnt/ β -catenin signaling pathway is involved in induction of apoptosis by Oridonin in colon cancer COLO205 cells. *Translational Cancer Research.* Sept 2019;8(5):1782–94. <https://doi.org/10.21037%2Ftcr.2019.08.25>
20. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)

21. Xu WX, Liu Z, Deng F, Wang DD, Li XW, Tian T, Zhang J, Tang JH. MiR-145: a potential biomarker of cancer migration and invasion. *American Journal of Translational Research*. 15 Nov 2019;11(11):6739-6753.
22. Yan J, Jiang J, Meng XN, et al. MiR-23b targets cyclin G1 and suppresses ovarian cancer tumorigenesis and progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2016;35(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0307-1>
23. Corcoran C, Jacobs TF. Metformin. [Actualizado 2 May 2022]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; En 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518983/>
24. Shi J, Liu B, Wang H, Zhang T, Yang L. Association of metformin use with ovarian cancer incidence and prognosis: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2019Jan7;29(1):140–6. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2018-000060>
25. Garrido MP, Salvatierra R, Valenzuela-Valderrama M, Vallejos C, Bruneau N, Hernández A, et al. Metformin Reduces NGF-Induced Tumour Promoter Effects in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Pharmaceuticals*. 2020;13(10):315. <https://doi.org/10.3390%2Fph13100315>
26. Garrido MP, Torres I, Avila A, Chnaiderman J, Valenzuela-Valderrama M, Aramburo J, et al. NGF/TRKA Decrease miR-145-5p Levels in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20):7657. <https://doi.org/10.3390%2Fijms21207657>
27. Fredes A. Efecto de la sobreexpresión de miR-145 más miR-23b, en la proliferación, migración e invasión de líneas celulares de cáncer ovárico epitelial: bases para el desarrollo de una nanoformulación [Internet]. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2023 [citado: 2023, diciembre]. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/192421>