



FCM Facultad de Ciencias
Médicas · UNR

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Reposiciónamiento de drogas de efecto sobre vías metabólicas en el tratamiento de cáncer colorrectal

Tesis para optar al grado de
Doctor en Biomedicina

**Luciano Anselmino
Año 2020**

Dirección: Dr. Mauricio
Menacho-Márquez

Índice

RESUMEN

1. Introducción

1.1. Cáncer	1
1.1.1. Causas	2
1.1.3 Metabolismo de células tumorales.....	2
1.1.4. Migración celular, transición epitelio-mesénquima y metástasis	3
1.1.5. MACs implicadas en este trabajo	5
1.1.5.1. E-cadherina	5
1.1.5.2. β -catenina.....	6
1.1.5.3. SNAIL	6
1.1.5.4. FAK.....	7
1.1.5.5. Vinculina	8
1.2. Cáncer colorrectal.....	9
1.2.1. Tratamientos disponibles en la actualidad	11
1.2.2. Desarrollo de resistencia a los tratamientos	13
1.3. Repositionamiento de drogas.....	13
1.3.2. Repositionamiento de drogas y CCR.....	14
1.3.3. Drogas en reposicionamiento implicadas en este trabajo	17
1.3.3.1. Metformina.....	17
1.3.3.2. Propranolol	17
1.3.3.3. Cloroquina	18
1.3.3.4. Atorvastatina.....	18
1.3.3.5. DCA.....	19
1.3.3.6. Orlistat	19
1.3.3.7. Claritromicina.....	19
1.3.3.8. Pantoprazol.....	20
1.3.3.9. DHEA.....	20
1.3.3.10. Itraconazol	20
1.4. Estrategias para el reposicionamiento de drogas.....	21
1.4.1. Repositionamiento de drogas tradicional	21
1.4.2. Repositionamiento de drogas por reversión de firmas genéticas	22
1.4.2.1. Herramientas actuales para medir expresión génica.....	22
1.4.2.1.1. Microarreglos.....	22
1.4.2.1.1. RNA-seq.....	24
1.4.2.2. Bases de datos de expresión génica.....	24
1.4.2.2.1. “Gene Expression Omnibus” (GEO)	25
1.5. Análisis de datos de expresión génica de experimentos de microarreglos	26
1.5.1. Preprocesamiento	27
1.5.1.1 Análisis de calidad	27

1.5.1.2 Normalización	28
1.5.2. Análisis estadístico	29
1.5.2.1. Métodos exploratorios.....	30
1.5.2.1.1. “Veces de cambio”.....	30
1.5.2.1.2. Proporción inusual.....	30
1.5.2.2. Pruebas de hipótesis	31
1.5.2.2.1. Paramétricas	32
1.5.2.2.1.1. Modelos lineales para datos de expresión génica (Limma)	32
1.5.2.2.1.2. No paramétricas	32
1.5.2.2.2.1. Análisis de significancia de microarreglos (SAM)	32
1.5.2.2.2.2. RankProducts (RP)	32
1.5.3. Análisis funcional.....	33

2.Objetivos

2.1 Objetivo general.....	35
2.2. Objetivos específicos	35

3.Materiales y Métodos

3.1. Reposicionamiento de drogas tradicional.....	36
3.1.1. Experimentos <i>in vitro</i>	36
3.1.1.1. Drogas	36
3.1.1.2. Líneas celulares y condiciones de cultivo	37
3.1.1.3. Generación de líneas celulares resistentes a 5FU	37
3.1.1.4. Ensayos de viabilidad celular y cálculo de la IC ₅₀	38
3.1.1.5. Ensayo de sensibilidad a 5-FU.....	38
3.1.1.6. Ensayos de formación de colonias.....	38
3.1.1.7. Determinación de apoptosis.....	39
3.1.1.7.1 Ensayo TUNEL.....	39
3.1.1.7.2. Tinción con Anexina V y Ioduro de Propidio	39
3.1.1.8. Extracción y cuantificación de proteínas	39
3.1.1.9. Western Blot	40
3.1.1.10. Inmunocitoquímica.....	40
3.1.1.11. Cuantificación de adhesiones focales	41
3.1.1.12. Estudio de la capacidad migratoria celular	42
3.1.2 Evaluación del efecto de M+P <i>in vivo</i>	42
3.1.2.1. Animales.....	42
3.1.2.2. Modelo de carcinogénesis químicamente inducida	42
3.1.2.3. Modelos allográficos y xenográficos	43
3.1.2.4. Inmunohistoquímica.....	44
3.2. Reposicionamiento de drogas “ <i>in silico</i> ”	44
3.2.1. Preprocesamiento de datos.....	44

3.2.1.1. Selección de muestras.....	44
3.2.1.2. Control de calidad y análisis exploratorio	45
3.2.1.3. Normalización, sumarización y filtro	45
3.2.2. Análisis estadístico	46
3.2.2.1. Determinación de genes diferencialmente expresados	46
3.2.2.2. Análisis de enriquecimiento funcional	46
3.2.2. Búsqueda de compuestos que revierten el perfil de expresión en bases de datos.....	46

4. Resultados

4.1. Reposicionamiento de drogas tradicional.....	47
4.1.1. Experimentos <i>in vitro</i>	47
4.1.1.1. Proliferación celular	47
4.1.1.2. Combinaciones de drogas	47
4.1.1.3. Efecto de M+P sobre la línea murina CT26.....	47
4.1.1.5. Apoptosis	49
4.1.1.6. Capacidad clonogénica.....	51
4.1.1.7. Vías de señalización celular.....	52
4.1.1.8. Capacidad migratoria.....	53
4.1.1.9. Adhesiones focales	54
4.1.1.10. Transición epitelio-mesénquima.....	58
4.1.1.11. Modelos resistentes a 5-FU	59
4.1.1.12. Ensayo de sensibilización a 5-FU	61
4.1.2. Evaluación del efecto de M+P <i>in vivo</i>	61
4.1.2.2. Modelo xenográfico HCT116.....	63
4.1.2.3. Modelo alográfico CT26	66
4.1.2.4. Modelo xenográfico HCT116 ^{5FUR}	68
4.2. Reposicionamiento de drogas “ <i>in silico</i> ”	70
4.2.1. Preprocesamiento	70
4.2.1.1. Análisis de calidad de datos de expresión génica	70
4.2.1.2. Normalización	72
4.2.1.3. Filtro en base a la intensidad	72
4.2.2. Análisis estadístico	75
4.2.2. Análisis funcional.....	80
4.2.3. Búsqueda de compuestos que revierten el perfil de expresión	85

5.Discusión	87
--------------------------	-----------

6. Anexo	104
-----------------------	------------

7. Bibliografía..... 127

8. Agradecimientos 148

Índice de figuras

Figura 1. Los diez “hallmarks” del cáncer.....	1
Figura 2. Descripción general de la cascada metastásica.....	4
Figura 3. Moléculas de adhesión celular.....	9
Figura 4. Distribución de casos y muertes para los tipos más frecuentes de cáncer a nivel mundial en ambos sexos en el año 2018.....	9
Figura 5. Estructura química de la metformina	17
Figura 6. Estructura química del propranolol	17
Figura 7. Estructura química de la cloroquina	18
Figura 8. Estructura química de la atorvastatina	18
Figura 9. Estructura química del dicloroacetato de sodio	19
Figura 10. Estructura química del orlistat	19
Figura 11. Estructura química de la claritromicina.....	19
Figura 12. Estructura química del pantoprazol	20
Figura 13. Estructura química de la dehidroepiandrosterona	20
Figura 14. Estructura química del itraconazol.....	20
Figura 15. Representación gráfica de los pasos del procesamiento básicos de un microarreglo.	23
Figura 16. Estructura de un archivo “. CEL”	23
Figura 17. Estructura de un archivo “. fastq”.....	24
Figura 18. Estructura básica de la base de datos GEO.....	26
Figura 19. Estructura básica de un flujo de trabajo para el análisis de datos de expresión génica provenientes de estudios de microarreglos	27
Figura 20. Gráficos diagnósticos para detección de valores atípicos	29
Figura 21. Desarrollo de modelo de CCR químicamente inducido	43
Figura 22. Ensayos de proliferación.....	48
Figura 23. Combinaciones de drogas.....	50
Figura 24. Efecto de M+P sobre la línea celular de CCR murino CT26	50
Figura 25. Efecto de M+P sobre la apoptosis celular	51
Figura 26. Ensayo de formación de colonias.....	52
Figura 27. Efecto de M+P sobre la cinética de fosforilación de ERK.....	54
Figura 28. Ensayo de herida.....	55
Figura 29. Recuento de adhesiones focales	56
Figura 30. Tamaño y distribución de adhesiones focales.....	57
Figura 31. Inmunotinción de fibras de tubulina	57
Figura 32. Expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima	58

Figura 33. Inmunotinción de proteínas marcadoras de transición epitelio-mesénquima.....	59
Figura 34. Efecto del tratamiento M+P sobre la capacidad proliferativa y clonogénica de líneas celulares resistentes a 5-FU	60
Figura 35. Ensayo de sensibilización a 5-FU.....	61
Figura 36. Recuento de tumores en intestino	62
Figura 37. Inmunotinción de Ki67 en tejido tumoral.....	63
Figura 38. Modelo xenográfico de células HCT116.....	64
Figura 39. Inmunotincion de Ki67 y E-caderina en tejido tumoral.....	65
Figura 40. Micrometástasis y esplenomegalia en modelo xenográfico HCT116	66
Figura 41. Modelo alográfico CT26	67
Figura 42. Micrometástasis y esplenomegalia en modelo alográfico CT26.....	67
Figura 43. Modelo xenográfico HCT116 ^{5FUR}	68
Figura 44. Micrometástasis y esplenomegalia en modelo xenográfico HCT116 ^{5FUR} 69	69
Figura 45. Distancias entre matrices de expresión de la serie de datos.....	72
Figura 46. Normalización.....	74
Figura 47. Histograma de las medianas de las intensidades de expresión	75
Figura 48. Scatter plot de valores logarítmicos del FC	76
Figura 49. Transformación logarítmica de la distribución del FC	77
Figura 50. Gráfico de porcentaje de predicción falsa versus número de genes identificados (RP)	78
Figura 51. Gráfico SAM de umbral de significación con respecto al valor Δ	79
Figura 52. Diagramas de Venn de genes comunes identificados mediante los cuatro métodos estadísticos utilizados	80
Figura 53. Clasificación funcional de genes sobreexpresados	81
Figura 54. Cnplot de la via Rho GTPasas	82
Figura 55. Mapa de enriquecimiento funcional	82
Figura 56. Clasificación funcional de genes sobreexpresados según la base de datos GO.....	84
Figura 57. Clasificación funcional de genes subexpresados según la base de datos GO.....	84
Figura 58. Fármacos con una alta puntuación de reversión LINCS	86
Figura 59. Clases de perturbaciones (Cmap class) con mayor puntuación de reversión (90-40%) del perfil de expresión asociado a resistencia a 5-FU.....	87

Índice de Tablas

Tabla I. Drogas en reposicionamiento que se encuentran siendo probadas en ensayos clínicos para el tratamiento de CCR.....	16
Tabla II. Tratamientos individuales ensayados sobre líneas celulares de CCR.....	36
Tabla III. Combinaciones de drogas ensayadas	36
Tabla IV. Líneas celulares de CCR utilizadas en este trabajo	37
Tabla V. Anticuerpos primarios utilizados para Wester Blots.....	40
Tabla VI. Anticuerpos primarios utilizados para Inmunocitoquímica	41
Tabla VII. Modelos xerográficos implementados	43
Tabla VII. Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica	44
Tabla VIII. Características de las series de datos seleccionadas de la base de datos GEO	45
Tabla X. Tabla de salida del paquete “ArrayQualityMetrics” serie GSE39582.....	107
Tabla XI. Tabla de salida del paquete “ArrayQualityMetrics” serie GSE81653.....	111
Tabla XII. Genes comunes detectados como sobreexpresados	124
Tabla XIII. Genes comunes detectados como subexpresados	126
Tabla XIV. Genes seleccionados para análisis de reversión en Query LINCS	126

Abreviaturas

5-FU	5-fluorouracilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADRB2	Receptores adrenérgicos beta 2
AF	Adhesiones focales
AMPK	Quinasa activada por AMP (del inglés "AMP-activated protein kinase")
ARN	Ácido ribonucleico
ARNInc	ARN largo no-codificante (Inc, del inglés "long non-coding")
ARNm	ARN mensajero
ARNm	Micro ARN
ARNnc	ARN no codificante
ARNsh	ARN de Interferencia (sh, del inglés "short hairping")
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Area bajo la curva
BP	Procesos Biológicos (del inglés "Biological Processes")
CCR	Cancer colorrectal
cMap	Mapa de conexión (del inglés "Connectivity Map")
CQ	Cloroquina
DAPI	4 ',6-diamidino-2-fenilindol
DCA	Dicloroacetato
DEG	Gen expresado diferencialmente (del inglés "Differentially Expressed Gene")
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
FAK	Quinasa de adhesion focal (del inglés "Focal Adhesion Kinase")
FC	Veces de cambio (del inglés "Fold Change")
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
FDR	Tasa de falso descubrimiento (del inglés "False Discovery Rate")
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (del inglés "Guanine nucleotide Exchange Factor")
GEO	Base de datos de expresión de genes (del inglés "Gene Expression Omnibus")
GO	Ontología de genes (del inglés "Gene Ontology")
ID	Identificador
IP	Ioduro de propidio
LINCS	Biblioteca de firmas celulares basadas en redes integradas (del inglés "The Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures")

LKB1	Quinasa hepática B1 (del inglés “liver kinase B1”)
M+P	Combinación de Metformina y Propranolol
MAC	Moléculas de adhesión celular
MDSC	Células mieloides supresoras (del inglés “myeloid-derived suppressor cells”)
MEC	Matriz Extracelular
Met	Metformina
MF	Funciones Moleculares (del inglés “Molecular Functions”)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio
NGS	Secuenciación de última generación (del inglés “Next Generation Sequencing”)
ORA	Análisis de sobre-representación (del inglés “Over Representation Analysis”)
P/V	Peso/Volumen
PBS	Solución amortiguadora fosfato salina (del inglés “Phosphate Buffered Saline”)
PET-CT	Tomografía por Emisión de Positrones
PPF	Porcentaje de predicción falsa (del inglés “Percentage of False Predictions”)
Prop	Propranolol
RMA	Promedio robusto de matriz múltiple (del inglés “Robust Multi-array Average”)
RP	Rango del producto (del inglés “Rank Product”)
RPMI	Medio de cultivo (del inglés “Roswell Park Memorial Institute”)
SAM	Análisis de significancia de microarreglos (del inglés “Significance Analysis of Microarrays”)
SFB	Suero Fetal Bovino
TAMs	Macrófagos Asociados a Tumores (del inglés “Tumor Associated Macrophages”)
TBS	Solución salina tamponada con Tris (del inglés Tris-Buffered Saline”)
TEM	Transición epitelio-mesénquima
Tregs	Células T reguladoras
T-TBS	TBS-Tween 0,1% (V/V)
TUNEL	Marcaje por adición de dUTP a los extremos 3' libres de ADN fragmentado por la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (del inglés “Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling”)
U.A	Unidades Arbitrarias
UR	Proporción inusual (del inglés “Unusual Proportion”)
V/V	Volumen/Volumen (mL en 100 mL)
β-ME	β-mercaptopropanoalcohol

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) tiene una alta incidencia y mortalidad a nivel mundial, su tratamiento involucra el uso de drogas citotóxicas como el 5-fluorouracilo (5-FU). El reposicionamiento de drogas en oncología se refiere al uso de fármacos originalmente formulados para otras indicaciones que mostraron potencial antitumoral. En este trabajo, evaluamos el potencial anticancerígeno sobre líneas celulares de CCR de un grupo de fármacos con efectos sobre el metabolismo celular, todos ellos inhibieron significativamente la proliferación de las células. De las combinaciones probadas, M+P resultó atractiva ya que demostró efectos incluso a bajas dosis, modificando tanto la capacidad migratoria celular, como los niveles de apoptosis. Además, mantuvo su acción sobre líneas de CCR resistentes a 5-FU y varios modelos *in vivo*. Por otro lado, a través de enfoques computacionales identificamos otros posibles candidatos a reposicionar en CCR resistente a 5-FU. Nuestros resultados demuestran que el reposicionamiento de drogas es una herramienta con un alto potencial para el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas, ahorrando tiempo y recursos económicos en comparación con la generación de fármacos *de novo*.

1. Introducción

1.1. Cáncer

El cáncer puede ser definido como un grupo de más de 100 enfermedades complejas que implican numerosos cambios temporalmente espaciales en la fisiología celular. En los últimos años incluso se ha descubierto que dentro de un mismo tipo de cáncer pueden existir subtipos molecularmente diferentes [1]. Muchos esfuerzos han sido invertidos en encontrar patrones que permitan una definición o delimitación certera de la patología. En el año 2000 los investigadores Douglas Hanahan y Robert Weinberg propusieron que la complejidad del cáncer podía reducirse a una serie de principios subyacentes a los que denominaron “hallmarks”. Hasta la actualidad se han propuesto diez de estas características comunes a todos los tipos de cánceres existentes (**Figura 1**) [2]. Estas propiedades son adquiridas en los diversos tipos celulares por distintos mecanismos y eventos durante el proceso carcinogénico.

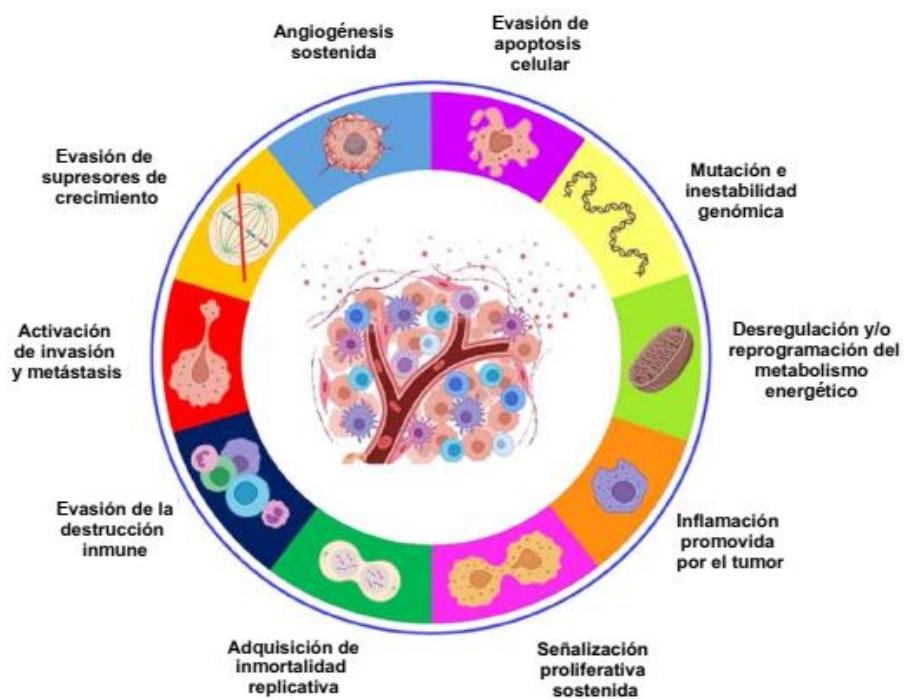


Figura 1. Los diez “hallmarks” del cáncer. Tomado y modificado de doi:10.3892/ol.2019.10458

Dependiendo del lugar donde se inicie, el cáncer puede o no formar un tumor. Si la desregulación se produce en un órgano, hueso o músculo, se forman los denominados tumores sólidos; en cambio si se desarrollan en la sangre, se produce un cáncer hematológico en el que no hay una formación tumoral observable. Los tres tipos principales de tumores son los sarcomas, linfomas y carcinomas. Los sarcomas son tumores que se forman en tejido conectivo, los linfomas en cambio surgen de células del sistema inmune. Los tumores sólidos más frecuentemente diagnosticados son los carcinomas, tumores que se forman en las células epiteliales que se encuentran en la piel, las glándulas y los revestimientos de los órganos, como por ejemplo tumores colorrectales o mamarios.

1.1.1. Causas

Aunque los procesos que subyacen a la transformación maligna son muy específicos, una gran cantidad de factores inespecíficos también puede iniciar la enfermedad, incluyendo radiación, factores químicos, virus, inflamación, entre otros. De hecho, parece que la exposición crónica a casi cualquier agente promotor del ambiente puede iniciar un proceso carcinogénico [3].

No existe en la actualidad una respuesta definida que detalle las causas que conllevan a la desregulación del ciclo celular. Algunas corrientes científicas sostienen que una célula cancerígena surge como resultado de “una acumulación prolongada de daño genético”. Décadas de análisis genéticos detallados han revelado que existen cerca de 1000 genes conocidos asociados al cáncer en humanos (~ 250 oncogenes, ~ 700 supresores de tumores). Dado que las células generalmente necesitan 2 o más mutaciones en estos genes para desarrollar un fenotipo canceroso, podrían existir más de 1 millón de genotipos de cáncer diferentes. En la última década el análisis exhaustivo de datos de secuenciación de casi 1 millón de muestras tumorales expuso un panorama aún más desalentador. Se han identificado más de 2 millones de mutaciones puntuales, 6 millones de mutaciones no codificantes, 10.000 fusiones de genes, ~ 61.000 reordenamientos del genoma, ~ 700.000 segmentos de números de copias anormales y más de 60 millones de variantes de expresión anormal [4]. Todas estas variantes hacen muy difícil predecir un origen único o un patrón causal de la enfermedad.

Por otro lado, otras escuelas científicas apoyan la idea de que el cáncer surge como resultado de una disfunción mitocondrial. Esta hipótesis nace de la observación de que las células cancerígenas presentan una cantidad significativamente menor de mitocondrias que las células normales, muchas de las cuales, además, exponen deterioro de las crestas internas mitocondriales que afectan su correcto funcionamiento. Este planteo supone que la disfunción mitocondrial crea un ambiente hipóxico que acaba por promover las mutaciones del ADN nuclear que culminan en la desregulación del ciclo celular para dar paso a la división descontrolada [5].

1.1.3 Metabolismo de células tumorales

Curiosamente, antes de 1970, la mayoría de los investigadores pensaban que el cáncer era un trastorno metabólico. En 1927, Otto Warburg notó que las células cancerosas exhibían un fenotipo metabólico distintivo, y que eran capaces de consumir 200 veces más glucosa que las células normales. Sin embargo, con la muerte de Warburg en 1970 y el descubrimiento de los oncogenes pocos años después, la mayoría de los investigadores desviaron su atención hacia la caracterización genética de la enfermedad. El "redescubrimiento" del cáncer como un trastorno metabólico se produjo en gran medida en los últimos años [6].

El surgimiento de las grandes bases de datos y las herramientas computacionales, permitió acelerar enormemente la cantidad de información analizada. El análisis funcional de oncogenes y genes supresores de tumores reveló que muchos juegan un papel clave en el metabolismo celular. De hecho, muchas de las aparentemente infinitas mutaciones y genes anteriormente nombrados que conllevan al desarrollo de cáncer en humanos afectan vías metabólicas principales, como la glucólisis aeróbica, la glutaminólisis y la ruta de pentosas fosfato [7-10]. Estas vías permiten que las células

cancerosas flanqueen entre producir solo ATP para vivir y generar grandes cantidades de aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otros intermediarios esenciales necesarios para el crecimiento rápido y la división celular acelerada.

Se ha corroborado experimentalmente que el proceso de obtención de energía en las células tumorales difiere radicalmente del de las células normales [11]. La transformación primaria y fundamental de las células cancerosas es su “retroceso” hacia un régimen anaeróbico de producción de energía. En un contexto normal, las células procesan la glucosa hasta su degradación completa a dióxido de carbono en la mitocondria; este proceso conocido como fosforilación oxidativa es una vía evolutivamente seleccionada para optimizar la obtención de ATP a partir de glucosa. Sin embargo, en las células tumorales, ciertos cambios conducen a una reprogramación del metabolismo energético hacia la glicólisis anaeróbica exclusiva, aun en presencia de abundante presión parcial de oxígeno en sangre. Esta reprogramación es conocida como “efecto Warburg”.

La fermentación anaeróbica es un proceso antiguo asociado a organismos procariotas. Cuando los científicos descubrieron estos cambios fue difícil entender su relación con la capacidad proliferativa de la célula tumoral: la glucólisis produce solo 2 ATP por cada molécula de glucosa procesada, mientras que la fosforilación oxidativa rinde 34 ATP más. Con el tiempo, los avances en la caracterización funcional de los trasfondos genéticos tumorales, permitió comprender que esta substitución de la respiración por la fermentación tiene profundas consecuencias en la fisiología celular. Para compensar la ineficiencia de su régimen de extracción de energía las células tumorales incrementan hasta 200 veces el flujo glucolítico. Esto se traduce en la hiperexpresión de muchas enzimas y proteínas, entre las que se destacan los transportadores de glucosa GLUT1 y la hexoquinasa-2.

Existe un creciente interés en el desarrollo de agentes terapéuticos para inhibir el “efecto Warburg” en tumores, sin embargo el riesgo de toxicidad es elevado ya que la glicólisis es un proceso que se produce en casi todos los tejidos humanos [12]. La alteración del metabolismo celular ha permitido el desarrollo de técnicas diagnósticas no invasivas; tal es el caso de la tomografía de emisión de positrones (PET-CT), que utiliza análogos radiomarcados de la glucosa como 18F-fluorodeoxiglucosa, que se acumula a mayor velocidad en las células tumorales y la espectroscopía por resonancia magnética que permite analizar la presencia de metabolitos específicos en tumores.

1.1.4. Migración celular, transición epitelio-mesénquima y metástasis

La metástasis se define como la diseminación de células tumorales desde el tumor primario del que surgieron hacia otros órganos adyacentes o distantes y su posterior adaptación al nuevo microambiente, y es la principal causa de muerte asociada a cáncer. Durante la progresión metastásica las células tumorales adquieren múltiples alteraciones genéticas y/o epigenéticas que les permiten sobrevivir a la transición entre distintos tejidos y colonizarlos. Al inicio de una metástasis, las células tumorales logran desprenderse del tumor primario (invasión local), luego atraviesan vasos sanguíneos (intravasación) y se translocan sistémicamente (supervivencia en la circulación sanguínea,

adhesión al tejido de un órgano distante, extravasación), para finalmente, tras una alta tasa de fallo, prosperar en otros órganos (formación de micrometástasis, colonización metastásica; **Figura 2**) [13].

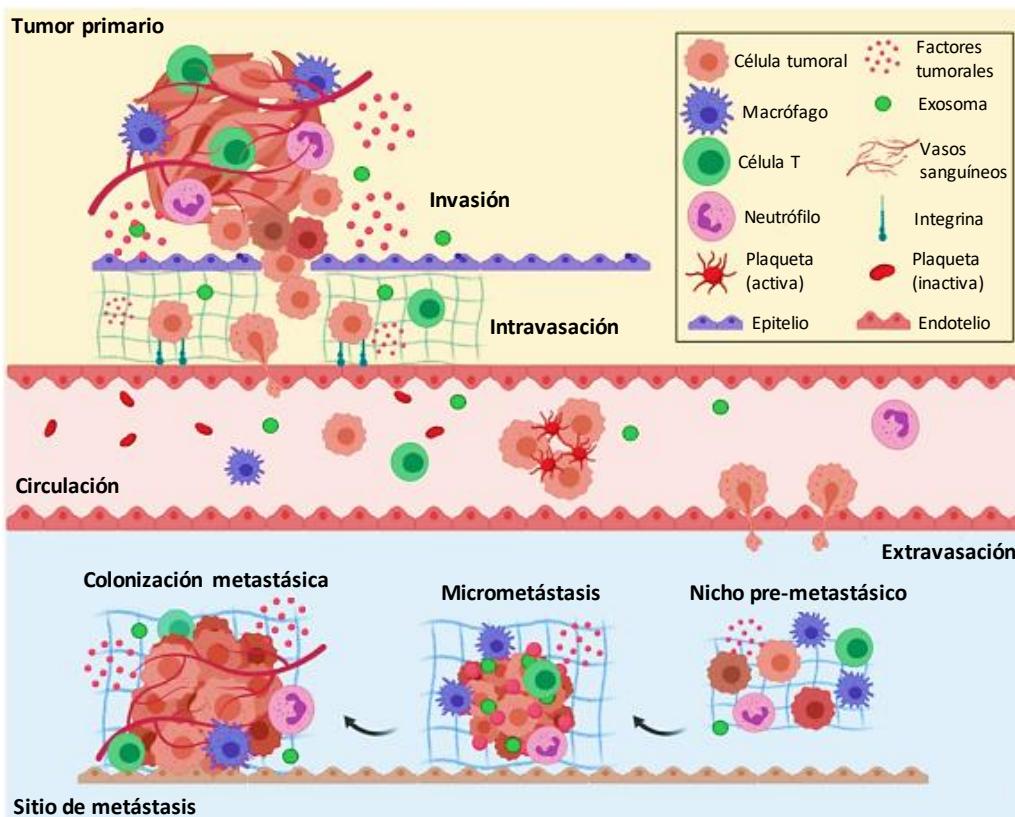


Figura 2. Descripción general de la cascada metastásica: los cinco pasos clave de la metástasis incluyen invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización. *Tomado y modificado de doi:10.3892/ol.2019.10458*

No cualquier tipo de cáncer puede producir metástasis en cualquier tejido distante. Se ha observado que existe un tropismo selectivo de las células metastásicas hacia ciertos órganos. Esta singularidad fue planteada por Stephen Paget en 1889 bajo la hipótesis de “seed and soild” (o teoría de semilla y tierra) y establece que la diseminación del cáncer no es un proceso aleatorio sino que debe existir cierta afinidad entre las células tumorales y el tejido diana [14]. Esto significa que no todos los tumores metastatizan, y si lo hacen, existe un patrón característico de metástasis de cada tipo de tumor hacia ciertos órganos. Por ejemplo, el cáncer de colon forma predominantemente metástasis en hígado y en menor medida en pulmón, pero raramente se dirige hacia los riñones o los huesos.

El proceso de migración celular se encuentra íntimamente asociado al desarrollo de metástasis; involucra la remodelación del esqueleto de actina para dar lugar a la formación de estructuras protruyentes que permiten la motilidad celular conocidas como filopodios, lamelipodios y ruffles. Estas estructuras se forman por la elongación de las fibras de actina, cuyos sitios de polimerización se sitúan cerca de la membrana plasmática. Aunque las fibras de actina no se encuentran unidas directamente a la membrana, determinadas proteínas (como las pertenecientes a la familia Rho y

proteínas G) sí lo hacen, y desde allí se encargan de dirigir la polimerización hacia una dirección determinada [15].

Durante la etapa de invasión de una metástasis se desarrolla un proceso denominado “transición epitelio-mesénquima” (TEM), que se caracteriza por la capacidad de la célula tumoral de modificar su fenotipo desde uno epitelial hacia uno mesenquimal. Las células de los tejidos epiteliales (como las del recubrimiento de los pulmones o la mucosa intestinal) desarrollan morfologías que caracterizan los distintos tipos de tejidos y sus funciones. En términos generales, las células epiteliales se encuentran fuertemente unidas unas a otras por sus bordes laterales, tienen su núcleo cercano a uno de sus polos y ciertas estructuras especializadas en el extremo opuesto (por ejemplo, las células epiteliales del lumen del intestino delgado tienen un típico borde en cepillo adaptado para la absorción de nutrientes). Para mantener una coherencia estructural las células no solo se encuentran adheridas entre sí, sino también ancladas a la membrana basal de tejido conectivo que les da sostén. De esta forma, con el fin de liberarse del tumor primario, deben primero poner en marcha un antiguo mecanismo filogenético que les permite desdiferenciarse y adquirir el fenotipo y las propiedades de otro tipo de células pluripotenciales conocidas como células mesenquimales. Estas células llevan a cabo procesos complejos pero frecuentes como la embriogénesis y la reparación de heridas. Con una morfología completamente diferente, en forma de huso, solo se contactan entre sí por medio de unas pocas uniones adherentes.

La transición epitelio-mesenquimal consiste esencialmente en la disolución de las estructuras especializadas que mantienen a las células epiteliales unidas entre sí y con la membrana basal, principalmente las uniones adherentes y las uniones focales. Esto se logra modificando los patrones de expresión de un grupo de proteínas denominadas “moléculas de adhesión celular” (MACs) que conforman estas estructuras (**Figura 3**) [16].

1.1.5. MACs implicadas en este trabajo

1.1.5.1. E-cadherina

Las cadherinas son moléculas claves en la adhesión intercelular y en la señalización celular en vertebrados. Estas proteínas median la adhesión a través de interacciones homofílicas dependientes de calcio. Las cadherinas pueden agruparse en al menos 6 subfamilias; su diversidad se debe a la presencia de múltiples genes codificantes y a la gran variedad de modificaciones postranscripcionales que las originan. Dentro de las cadherinas clásicas se destacan las E, N y P cadherinas que fueron nombradas en base al primer tipo de tejido en que fueron descubiertas (epitelial, neural y placentario). Estructuralmente presentan un dominio transmembrana, un dominio citosólico C-terminal y cinco dominios “cadherina” extracelulares que son los responsables de la adhesión celular [17].

La E-cadherina o cadherina epitelial se localiza en la membrana de las células epiteliales que revisten las superficies y las cavidades del cuerpo. Es codificada por el gen CDH1 que se ubica en el brazo largo (q) del cromosoma 16 en la posición 22.1. La E-cadherina madura tiene un tamaño molecular de 120 kDa y estructuralmente consta de 3 dominios, un dominio extracelular que se divide

a su vez en 5 subdominios repetitivos EC1- EC5, un dominio transmembrana y un dominio citosólico que presenta dos secuencias: CH2 y CH3 denominados de esta forma debido a que se encuentran muy conservados entre las cadherinas clásicas. A estos dominios se unen las proteínas citosólicas cateninas: α -catenina, β -catenina y p120-catenina, que están en contacto con el citoesqueleto de actina e implicadas en la señalización celular. Una baja expresión o mutaciones relacionadas con E-cadherina se asocian a una mayor probabilidad de metástasis y a una baja sobrevida en pacientes con varios tipos de cáncer, principalmente cáncer de colon, mama y pulmón. Por esta razón esta proteína está comenzando a utilizarse como un biomarcador pronóstico en cáncer [18-20].

1.1.5.2. β -catenina

β -catenina se descubrió inicialmente por su papel en la adhesión celular como componente de las uniones adherentes. Promueve la adhesión célula-célula al unirse al dominio intracelular de la E-cadherina y sujetarla al citoesqueleto de actina a través de la proteína adaptadora α -catenina. Adicionalmente, regula la expresión génica a través de la vía canonica de señalización Wnt/ β -catenina. Es una proteína de 92 kDa, codificada por el gen CTNNB1 que se localiza en el cromosoma 3p22. Está compuesta por 781 aminoácidos divididos en tres dominios: amino-terminal, carboxi-terminal y un domino central. El dominio amino-terminal, es la región de unión a la proteína intermedia α -catenina, clave en la interacción célula-célula. Además, en este dominio se localizan los sitios de fosforilación de las quinasas de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Por otro lado, el dominio carboxi-terminal permite la interacción de la proteína con la maquinaria transcripcional, permitiéndole actuar como co-activadora de la ruta Wnt/ β -catenina. El dominio central también conocido como “dominio armadillo” se conforma de una secuencia de 42 aminoácidos que se repite 12 veces; esta región presenta una estructura en hélice y tiene como función la interacción proteína-proteína permitiendo la interacción con E-cadherina, axina, APC y Tcf/Lef [21].

Al igual que para E-cadherina se ha observado que variaciones en la expresión o mutaciones en el gen que codifica para β -catenina se asocian con un mayor riesgo de metástasis y un peor pronóstico para el paciente. No solo por su función clave en las uniones adherentes, sino también por su importante participación en la vía de señalización Wnt/ β -catenina, donde regula procesos como la regeneración de tejidos, la diferenciación de células madre y la proliferación celular. La alteración de esta vía ha sido descrita en diversos tipos tumorales como el cáncer de colon, cáncer primario de hígado, cáncer de ovario y melanoma [22-24].

1.1.5.3. SNAIL

Como se detalló anteriormente, la proteína de adhesión E-cadherina juega un papel central en el proceso de morfogénesis epitelial. La expresión de esta proteína se regula negativamente durante la adquisición del potencial metastásico en las últimas etapas de la progresión tumoral. Este bloqueo transcripcional está mediado por el factor de transcripción Snail que se une a una región (denominada caja E2 del elemento E-pal) presente en el promotor humano de E-cadherina, y reprime su transcripción. Se ha demostrado que la inhibición de la función de Snail en líneas celulares de cáncer epitelial con expresión de E-cadherina disminuida restaura los niveles de expresión de la proteína [25].

Snail es miembro de un grupo de factores de transcripción codificado por el gen SNAI1 que se caracterizan por su estructura terciaria con motivos “dedos de zinc”. Esta familia está conformada por las proteínas Snail1 (Snail), Snail2 (Slug) y Snail3 (Smuc), todos factores transcripcionales con un papel evolutivamente conservado en el desarrollo del mesodermo en vertebrados. Estas moléculas están compuestas por una región carboxi terminal altamente conservada que contiene entre cuatro a seis dedos de zinc de tipo C2H2, que median interacciones específicas con regiones promotoras que contienen una secuencia de caja E (CAGGTG). La región amino terminal de todos los miembros de la familia Snail en vertebrados contienen el dominio SNAG (Snail/Gfi) evolutivamente también conservado, que ha demostrado ser esencial para la represión transcripcional [26].

1.1.5.4. FAK

La adhesión de las células a la matriz extracelular (MEC) es esencial para la regulación de la morfología celular, la migración, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación. Las integrinas son los receptores predominantes que median la adhesión celular a los componentes de la MEC. La agrupación de integrinas en la superficie celular actúa como una plataforma para el reclutamiento de otras proteínas adaptadoras y de señalización a la superficie interna de la membrana plasmática donde conforman estructuras denominadas adhesiones focales. Las proteínas adaptadoras de las uniones focales (como la vinculina, talina, paxilina, tensina, p130Cas y α -actinina) proporcionan fuertes vínculos con el citoesqueleto de actina y, por lo tanto, conectan las células firmemente a la MEC. Este enlace permite la generación de la tensión y la fuerza necesarias para alterar la morfología y mover el cuerpo celular durante la migración [27]. Además de las proteínas adaptadoras, la aglomeración de integrinas recluta múltiples proteínas de señalización, que incluyen quinasas y fosfatasas encargadas de transmitir señales derivadas de la MEC a las vías celulares que controlan la migración. En particular, dos tirosina quinasas bien caracterizadas, la quinasa de adhesión focal (FAK) y Src, juegan un papel central en las cascadas de señalización mediadas por integrinas. Como las integrinas no tienen actividad enzimática intrínseca, estas tirosina quinasas actúan como interruptores moleculares que transmiten señales desde las adhesiones focales hacia la maquinaria celular por procesos de fosforilación y autofosforilación [28].

Al igual que β -catenina, la quinasa de adhesión focal (FAK) es una proteína multifuncional. La unión a ligando y la agregación de integrinas en los sitios de adhesión focal provoca un cambio conformacional en el dominio FERM de FAK que induce su activación. Una vez activa, FAK es capaz de autofosforilarse generando un sitio de enlace de alta afinidad para la tirosina-quinasas c-Src. Esta última aumenta el grado de fosforilación de FAK y genera nuevos sitios para interacciones proteína-proteína del citoesqueleto. FAK también tiene otros sitios de interacción que no requieren de fosforilaciones; uno de estos sitios se encuentra en el dominio carboxilo y permite la interacción con paxilina. Además, presenta dos regiones ricas en prolina a las que pueden unirse proteínas que contienen dominios SH3, como Ras. Por otro lado, adicionalmente a su función en el anclaje y señalización celular, hallazgos recientes revelaron que una versión nuclear de FAK activa opera como regulador de la expresión génica [29].

En cáncer, se ha demostrado que altos niveles de fosforilación de FAK se asocian con fenotipos más invasivos.

1.1.5.5. Vinculina

Vinculina es una proteína de unión a F-actina que aparece en las primeras etapas de la formación de las adhesiones focales. Se asocia de forma directa a paxilina y su interacción es importante para coordinar las señales que inducen la fuerza de contracción del citoesqueleto. Las células deficientes en vinculina presentan menor rigidez que las células normales y tienen fuerzas de tracción más bajas. Esto se debe a que la vinculina actúa como un sensor de tensión, se dirige hacia los sitios de adhesión focal en respuesta a las fuerzas mecánicas mediante la transmisión de señales desde la MEC a los filamentos de actina [30].

Además de su papel en la mecanosensibilidad, la vinculina interactúa de forma directa con un conjunto de proteínas que son esenciales para la dinámica del citoesqueleto de actina, como fosfolípidos de membrana, PIP2 y vinexina para aumentar el tamaño de las adhesiones focales en la fase de elongación durante el ensamblaje de las mismas. Por otro lado, la interacción de vinculina y talina es necesaria para la formación de enlaces resistentes entre las integrinas y el citoesqueleto. Se ha demostrado que la eliminación de vinculina en las células aumenta su capacidad migratoria debido a un aumento de la fosforilación de paxillina y FAK, así como en la velocidad de recambio de adhesiones focales [31].

Dado que recientemente se descubrió vinculina en los exosomas de células de cáncer de próstata, esta proteína está comenzando a utilizarse como un marcador pronóstico. Las microvesículas secretadas por las células pueden aislarse del suero de los pacientes para identificar la presencia de vinculina, una mayor excreción se relaciona con un peor pronóstico [32].

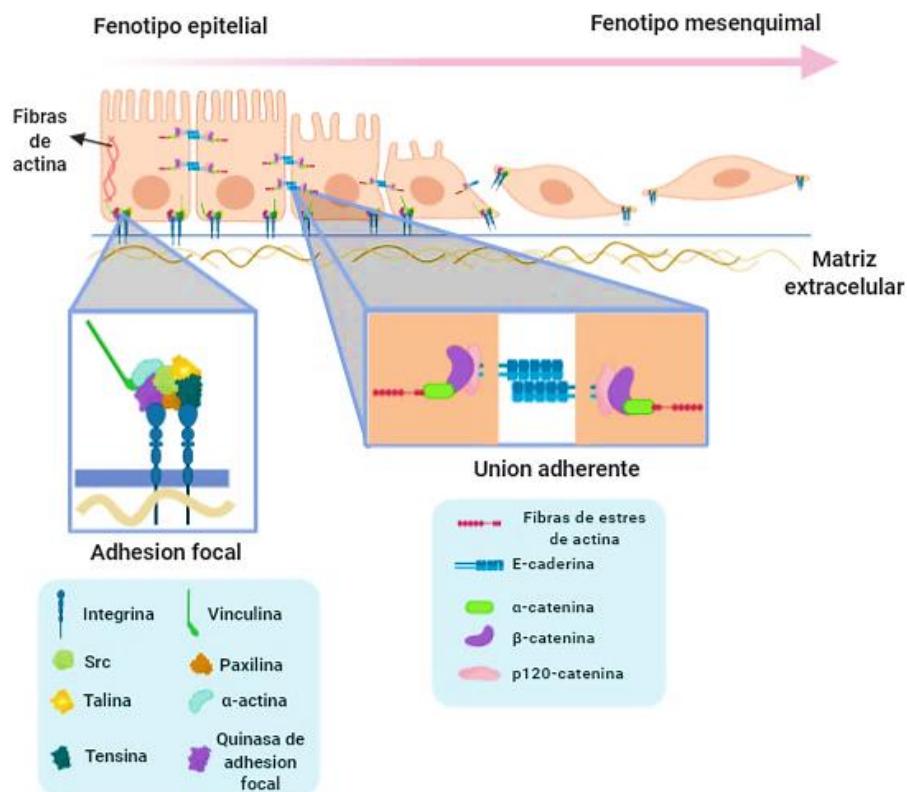


Figura 3. Las células se unen a la matriz extracelular (MEC) a través de anclajes denominados uniones focales. Estas estructuras están conformadas por varias proteínas que interactúan entre sí y con la MEC para desencadenar procesos de señalización celular que resultan en la contracción de fibras de actina. Por otra parte, las células se conectan entre sí mediante varias estructuras para dar solidez al epitelio; una de estas estructuras son las uniones adherentes. Estas uniones están conformadas principalmente por moléculas de E-cadherina y β -catenina. *Imagen creada con Biorender.*

1.2. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) hace referencia a cualquier neoplasia maligna que se origine en la última porción del intestino grueso o en el recto. La mayoría de los CCR son adenocarcinomas (cánceres que comienzan en las células secretoras). Este tipo de tumor es el tercero de “los cuatro grandes”, nombre atribuido por la Asociación Americana de Cáncer a los cuatro tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial en los últimos 20 años (pulmón, mama, colon y próstata, **Figura 4**) [33]. En 2018 presentó casi dos millones de casos nuevos en el mundo (10.2% de todos los tumores malignos) [34]. Se espera que la carga global de CRC aumente en un 60% para el año 2030 [35].

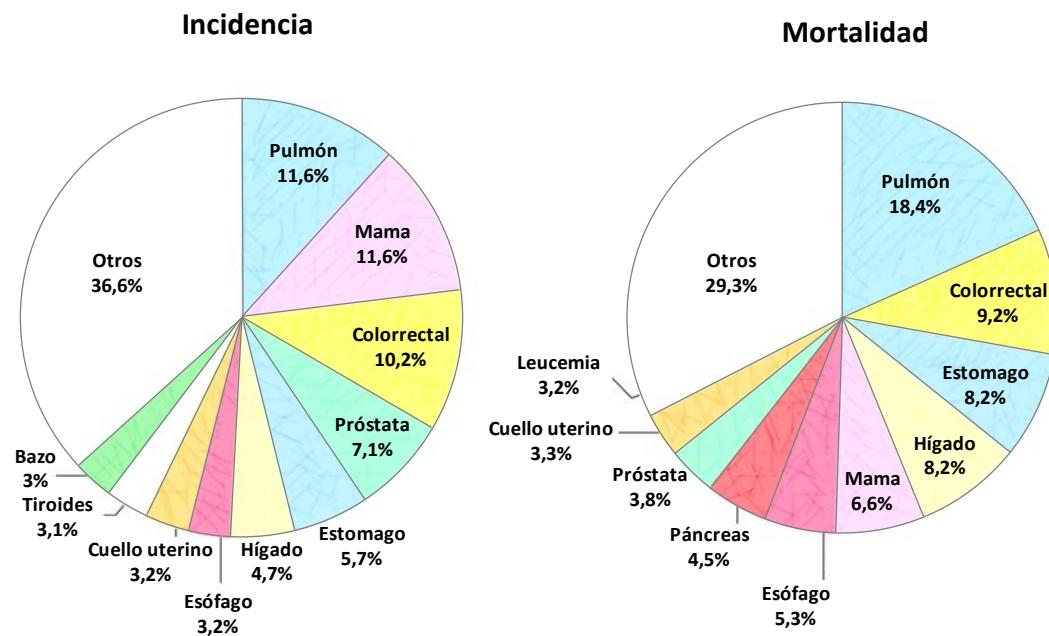


Figura 4. Gráficos circulares que representan la distribución de casos y muertes para los tipos más frecuentes de cáncer a nivel mundial en ambos sexos en el año 2018. Fuente: GLOBOCAN 2018.

En Argentina, de acuerdo a las cifras que maneja el Instituto Nacional del Cáncer, que depende del Ministerio de Salud de la Nación, el cáncer colorrectal es el segundo cáncer más frecuente en el país, representando el 13 % del total de casos en ambos sexos. Cada año se diagnostican más de 13.000 nuevos casos y mueren más de 7.000 personas.

El CCR se considera una enfermedad "silenciosa", tarda años o incluso décadas en desarrollarse. Por lo general, se requieren entre 7 a 10 años para que se produzca la transformación de un adenoma en carcinoma. Esta brecha brinda una oportunidad para su detección temprana. Sin embargo, muchas

personas no presentan manifestaciones clínicas (como sangrado intestinal o dolor abdominal) hasta que el cáncer metastatiza [36]. A pesar que los pacientes diagnosticados en etapas tempranas tienen un alto porcentaje (90%) de probabilidad de recuperación total, más del 63% son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando la probabilidad de vida dentro de los cinco años siguientes al diagnóstico es tan solo del 12% [37-39]. Aunque los indicios de CCR son fácilmente detectables por colonoscopia (que en la actualidad es la técnica diagnóstica de primera línea), la mayoría de los pacientes la consideran una técnica altamente invasiva. Esta incomodidad produce una evasión de los controles periódicos que son esenciales para un tratamiento temprano. Las últimas estadísticas también indican que los intervalos de edad de los grupos de riesgo comienzan a disminuir y que el CCR está afectando cada vez más a personas por debajo de los 50 años. Este nuevo panorama está siendo relacionado con los hábitos de vida actuales y las consecuentes variaciones en la flora intestinal [39].

Se piensa que el CCR es una enfermedad multifactorial de orígenes tanto genéticos, como epigenéticos y no genéticos. Desde el punto de vista genético y epigenético, es una enfermedad poligénica que surge debido a alteraciones en varios oncogenes, genes supresores de tumores, genes de reparación del ADN, así como genes reguladores del ciclo celular en las células de la mucosa del colon. Estudios moleculares han identificado algunas mutaciones que se dan frecuentemente en CRC; dependiendo del origen de la mutación, los carcinomas colorrectales se pueden clasificar como esporádicos (70%), heredados (5%) o familiares (25%) [40]. Hay tres vías moleculares principales que causan alteraciones genéticas que resultan en carcinogénesis en colon: inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsatélites (MSI) y el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). Dentro de estos tipos de CCR se han encontrado alteraciones en importantes vías de señalización celular como Wnt, MAPK/PI3K, TGF- β y TP53 [1], así como mutaciones específicas en los genes c-MYC, KRAS, NRAS, RAF, BRAF, PIK3CA, PTEN, SMAD2 y SMAD4, muchos de los cuales se utilizan en la actualidad como marcadores predictivos de diagnóstico (por ejemplo, en más del 80% de los casos de CCR se produce pérdida de APC, en el 40% de existe ganancia de la función oncogénica de KRAS y en el 5-15% ganancia de la función oncogénica de BRAF) [41]. Además de las mutaciones genéticas, alteraciones en los ncARN (ARNlnc y ARNmi) pueden contribuir también en diferentes pasos del proceso de carcinogénesis; muchos de ellos como TUG1, circ_001569 o miR-145 tiene valor predictivo cuando se los utiliza como biomarcadores [42].

Al igual que en todos los tipos de cáncer, la elevada heterogeneidad genética entre tumores de pacientes con CCR ha obstaculizado el establecimiento de patrones de variación en los genes asociados a la patología. En la actualidad los avances en secuenciación y herramientas bioinformáticas dieron lugar a la creación de perfiles de expresión génica (o firmas genéticas) asociados a cada paciente de forma personalizada. La caracterización molecular de los perfiles ha permitido identificar hasta seis variantes moleculares de CCR que responden diferencialmente a los tratamientos [1, 43].

1.2.1. Tratamientos disponibles en la actualidad

A grandes rasgos, el abordaje terapéutico actual de la oncología convencional consiste en tres estrategias terapéuticas que se combinan: a) una cirugía de remoción de la lesión tumoral, b) la exposición del tejido canceroso a radiación de alta energía que infinge daño oxidativo a las células y, c) intoxicación de las células tumorales con una o varias clases de compuestos con el objetivo de detener la replicación celular.

El tratamiento indicado para un tumor colorrectal depende de su estadio de desarrollo [44]. El avance del CCR se divide en cinco estadios (0, I, II, III, y IV). Los dos primeros (0 y I) corresponden a los menos agresivos, en los que el tumor aún no se ha extendido más allá del revestimiento interno del colon. En estos casos suele practicarse una cirugía de remoción para extirpar el tumor o una colectomía parcial (cirugía para extirpar la sección del colon que contiene cáncer y los ganglios linfáticos cercanos).

Los estadios II y III son más complicados; en estas etapas el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos, pero aún no se han extendido a otras partes del cuerpo. El tratamiento convencional para estas etapas consiste en colectomía parcial y extirpación de ganglios linfáticos cercanos, seguidos de quimioterapia adyuvante y/o radioterapia.

Los tumores en etapa IV son aquellos que se han propagado desde el colon hasta órganos y tejidos distantes. Como se detalló anteriormente, los órganos blancos más comunes del CCR son el hígado y los pulmones, y con menor frecuencia el cerebro, el peritoneo y ganglios linfáticos distantes. En estos casos avanzados el éxito de la remoción quirúrgica o la colectomía es baja. Realizar una cirugía significa remover la sección del colon que contiene el tumor junto a las áreas de propagación. Si las metástasis no se pueden extirpar debido a sus tamaños o número, se puede administrar quimioterapia neoadyuvante y/o radioterapia. La quimioterapia neoadyuvante se enfoca principalmente en reducir el número y tamaño de las metástasis para habilitar al paciente a una futura cirugía; si tiene éxito y es posible extirpar el tumor primario y los focos de propagación, se indica quimioterapia adyuvante.

En caso de no lograr controlar las metástasis, la quimioterapia paliativa es el tratamiento principal. Se puede acompañar de una cirugía para extirpar el tumor primario, ya que en la mayoría de los casos este obstaculiza el colon. Dependiendo de la gravedad de la operación se toman medidas como la colocación de endoprótesis o stent u operaciones como colectomías o colostomías de derivación.

Desde sus orígenes, las quimioterapias contra el cáncer están basadas en el uso de medicamentos citotóxicos. Este tipo de terapias afecta a la maquinaria replicativa de todas las células del cuerpo, incluyendo las normales, por esta razón suelen traer asociados fuertes efectos secundarios como debilidad muscular o caída del cabello [45]. El 5-fluorouracilo (5-FU) es una droga citotóxica que se utiliza hace más de 40 años como el tratamiento estándar de primera línea para el CCR. El origen del 5-FU como quimioterapéutico está basado en la observación de que la utilización de uracilo difiere entre las células malignas y normales [46, 47]. Se trata de una droga antimetabolito que interviene en la síntesis del ADN y en menor medida en la formación de ARN. Ambos efectos se combinan para promover un desequilibrio metabólico que concluye en citotoxicidad. La actividad inhibitoria del fármaco, por su analogía con el uracilo, tiene efecto sobre el crecimiento de las células neoplásicas

que aprovechan preferentemente la molécula de uracilo para la biosíntesis de ácidos nucleicos. Su eficacia reside en que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, una pieza esencial en la síntesis de nucleótidos de timina.

Debido a que la tasa de respuesta del 5-FU como monoterapia suele ser inferior al 20% [48], se han puesto a punto diversas estrategias para aumentar su actividad antitumoral mediante la modulación de su metabolismo intracelular y bioquímico. La estrategia más utilizada es la combinación del 5-FU con otras drogas citotóxicas pero con diferentes mecanismos de acción: las terapias FOLFOX (leucovorín, 5-FU y oxaliplatino), FOLFIRI (leucovorín, 5-FU e irinotecán) y FOLFOXIRI (leucovorín, 5-FU, oxaliplatino e irinotecán) son las más utilizadas en la clínica [49]. No obstante, se ha observado que más del 50% de los pacientes de CCR desarrollan resistencia a las terapias basadas en 5-FU [50-52].

A medida que se avanza en el conocimiento sobre los cambios de los genes y las proteínas que contribuyen al desarrollo de cáncer, se producen o descubren nuevos medicamentos para combatir estos cambios de manera específica. Los medicamentos de terapia dirigida funcionan de distinta manera que los que se usan comúnmente en la quimioterapia. Una alternativa actual que se desprende de la terapia dirigida es la inmunoterapia. En CCR se utilizan anticuerpos monoclonales que inhiben la angiogénesis, como los que afectan al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). También medicamentos que atacan a las células con cambios en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB-1 o HER1), aunque estos fármacos solo funcionan en tumores sin mutaciones en los genes KRAS, NRAS o BRAF. Ademas, los medicamentos que inhiben puntos de control como PD-1 y CTLA-4 (Nivolumab y Ipilimumab, respectivamente) han demostrado dar buenos resultados [53, 54].

Otros medicamentos ampliamente utilizados en terapias dirigidas contra CCR son los inhibidores de quinasas, que bloquean específicamente la acción de una o más proteínas quinasas, importantes factores desencadenantes de cascadas de señalización celular que inducen el crecimiento y la rápida replicación de las células, un ejemplo es el Regorafenib [55].

El desarrollo de terapias en cáncer avanza a medida que avanza el conocimiento científico sobre la variación genética de los tumores y se descubren nuevos biomarcadores y objetivos terapéuticos. En la actualidad se están desarrollando diferentes paneles de genes para mejorar el pronóstico y la selección del tratamiento. De todas formas, la aplicación de una o varias terapias sigue un enfoque multimodal basado en las características intrínsecas de cada tumor.

A pesar de las diversas opciones de tratamiento disponibles, el problema de desarrollo de resistencia a los medicamentos sigue siendo un obstáculo para una terapia exitosa. Una gran parte de los pacientes no responden a los tratamientos, o responden inicialmente pero experimentan recaídas y progresión de la enfermedad después de un período de tiempo debido a resistencia primaria o adquirida. Esto eventualmente conduce al fracaso de la terapia, lo que requiere un cambio de régimen [56]. Para contrarrestar esta situación se están implementando nuevas estrategias que incluyen la mejora del diagnóstico temprano (estadificación descendente), el descubrimiento de biomarcadores predictivos confiables y el desarrollo de nuevos medicamentos/combinaciones de medicamentos.

1.2.2. Desarrollo de resistencia a los tratamientos

El cáncer es una enfermedad compleja y sigue principios evolutivos. La heterogeneidad intratumoral es uno de los principales problemas a nivel clínico. La ocurrencia de alteraciones genéticas y epigenéticas múltiples dentro de un grupo de células o en una célula, no solo dificultan el diagnóstico, sino que también plantean un desafío a la hora de determinar la opción de tratamiento apropiada para un paciente específico. Los datos de secuenciación de tumores han ayudado a identificar algunos objetivos accionables, de ellos derivan tratamientos anteriormente mencionados como los inhibidores de tirosina quinasa y los anticuerpos monoclonales que están siendo utilizados como tratamientos estándares en la clínica. Sin embargo, a pesar de que estas terapias suelen ofrecer una respuesta inicial fuerte, la resistencia secundaria es casi inevitable. Este tipo de resistencia es muy común en CCR avanzado; muchas investigaciones están proporcionando evidencia de múltiples mecanismos moleculares distintos, como la presencia de alteraciones genómicas preexistentes o “*de novo*” que facilitan el desarrollo de resistencia.

Entre los mecanismos de resistencia conocidos en células de CCR se incluyen el aumento del flujo de salida de la célula del medicamento mediado por transportadores dependientes de ATP, la disminución en la velocidad de captación del medicamento, la disminución de la absorción del medicamento o un cambio en enzimas que participan en su metabolismo. Por otro lado, la resistencia puede conferirse por modificaciones genéticas o epigenéticas, que alteran la sensibilidad a los fármacos. La resistencia a las terapias dirigidas también se produce por diferentes mecanismos, incluida la regulación positiva, la mutación o la activación de moléculas de señalización corriente abajo por una interacción cruzada entre vías de señalización [57].

Dado que los mecanismos de resistencia aún no se comprenden completamente, existen pocos biomarcadores útiles para anticiparla. El único biomarcador utilizado clínicamente es KRAS. Los pacientes que portan una mutación en KRAS quedan excluidos del tratamiento con anticuerpos anti-EGFR, ya que es menos probable que se beneficien de las terapias dirigidas [58].

1.3. Repositionamiento de drogas

En los últimos años, la idea de usar medicamentos conocidos y asignados para el tratamiento de una determinada patología para nuevas indicaciones ha ganado un impulso considerable en muchos campos de la medicina, especialmente en el tratamiento de enfermedades complejas [59, 60]. El desarrollo “*de novo*” y la comercialización de un nuevo medicamento es un proceso largo y costoso, que requiere de una inversión promedio de más de 1000 millones de dólares y puede llevar entre 10 a 15 años [61]. Estos altos gastos se traducen en un alto costo para los pacientes, ya que las compañías farmacéuticas buscan recuperar sus inversiones. Así, muchos nuevos tratamientos quedan fuera del alcance de gran parte de la población, impactando especialmente en la economía y los sistemas de salud de los países en vías de desarrollo [62-65]. Conjuntamente, desde 1995 el número de fármacos aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) ha disminuido al mismo tiempo que la inversión en producción de fármacos ha aumentado gradualmente, lo que indica que los costos seguirán incrementándose [66, 67].

En nuestro país durante el período 2000-2018 el tratamiento estándar básico para el cáncer de colon aumentó 4.692 % (pasó de \$ 12.474 a \$ 585.306); el de mama se incrementó en 986 % (de \$ 33.960 a \$ 334.707,35) y el de pulmón en 1.707% (de \$ 196.956 a \$ 3.361.600), según los datos proporcionados por la Fundación Oncológica Córdoba en las Jornadas de Farmacoeconomía 2018 [68].

En este contexto, el reposicionamiento de drogas surge como una estrategia alternativa al mecanismo tradicional de desarrollo de medicamentos, basado en el principio de la polifarmacología, un paradigma que se contrapone a la idea de “un fármaco-un objetivo” y propone que una droga puede presentar más de un mecanismo de acción dependiendo del contexto en el que actúe [69]. Las dos ventajas principales de esta estrategia son, por un lado, el conocimiento previo sobre la farmacocinética y la toxicidad de los fármacos, y por el otro, sus bajos costos y accesibilidad, ya que son en su mayoría genéricos [62].

El ejemplo más conocido de reposicionamiento de drogas es el del sildenafilo (Viagra) para el tratamiento de las disfunciones eréctiles. Este medicamento fue desarrollado originalmente para el tratamiento de enfermedades de las arterias coronarias. El efecto secundario del sildenafilo se descubrió por casualidad durante los ensayos clínicos en fase I de los pacientes con hipertensión y angina de pecho, patologías para las que demostró no ser muy efectivo [70]. Otro ejemplo bien conocido es el de la talidomida, originalmente desarrollada como un sedante para aliviar las náuseas matutinas en mujeres embarazadas. No mucho después de su introducción, se descubrió que causaba defectos congénitos graves, muchos niños nacieron con malformación en las extremidades debido a su uso, lo que llevó a su inmediata eliminación del mercado. Diez años después, varios grupos de investigación encontraron que la talidomida posee actividad anticancerígena inhibiendo la angiogénesis en modelos animales [71] y posteriormente se demostraron efectos terapéuticos prometedores sobre el mieloma múltiple refractario y el cáncer de próstata metastásico [72, 73]. En 2006, la talidomida en combinación con dexametasona recibió la aprobación de la FDA para el tratamiento del mieloma múltiple.

En los experimentos de reposicionamiento de drogas, al igual que en todos los experimentos *in vivo* e *in vitro*, la utilización de roedores y/o de células tumorales epiteliales que carecen de todos los componentes del sistema inmune humano y de sus complejas redes neuronales y hormonales, limitan la extrapolación de los resultados. Los problemas que se deben tener presentes a la hora de probar un posible fármaco en reposicionamiento sobre células en cultivo incluyen el uso de altas concentraciones de drogas que no pueden alcanzarse en pacientes, o el uso de células con resistencia a las drogas inducida experimentalmente por la exposición crónica al fármaco. Idealmente, sería necesario recopilar datos fenotípicos en múltiples niveles superpuestos, por ejemplo, molecular, celular, cultivos primarios, animales, poblaciones de pacientes distintas, para aumentar la confianza de que los resultados serán traducibles positivamente a pacientes individuales.

1.3.2. Repositionamiento de drogas y CCR

Actualmente, una gran cantidad de drogas en reposicionamiento se encuentran siendo probadas para el tratamiento de CCR. Algunas de ellas comienzan a demostrar efectos en las primeras etapas

de prueba *in vitro*, como Amantadina y Pleconaril (dos inhibidores de Retrovirus Endógenos Humanos) [74]. Mientras que otras como Diclofenac y Clotam (medicamentos antiinflamatorios no esteroideos), ya han demostrado efectos en modelos animales [75, 76]. En la **Tabla I** se presenta un resumen de las principales drogas en reposicionamiento que han superado los ensayos preclínicos y expuesto actividad anticancerígena en CCR, por lo que comenzaron a ser probadas en ensayos clínicos en humanos. Se detalla su indicación original, su fase de prueba y sus vías de efecto en CCR. De forma general, la mayoría de las drogas que están arrojando buenos resultados son inhibidores de COX-2, afectan algún paso de las vías de señalización Wnt/β-catenina o inhiben la vía mTOR.

Droga	Uso original	Objetivo en CCR	Fase en CT	Ejemplo NCT	Nº de CT probando esta droga
Aspirina	Analgesico, antifebril	a) Inhibidor de la expresión de TLR4 b) Inhibidor de COX-2 c) Incrementa la secreción de TGF-β1	III	NCT02394769 NCT02467582 NCT02647099	27
Celecoxib	Tratamiento de la osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y menstruación dolorosa	Inhibidor selectivo de COX-2	III	NCT00005094 NCT03645187	27
Ciclosporina	Inmunosupresor utilizado para evitar el rechazo de los trasplantes	Modulador de la vía Wnt/calcio	II	NCT00003950	3
Doxiciclina	Antibiótico	Inhibidor de la biogénesis mitocondrial	III	NCT02201381	1
Etodolac	Medicamento antiinflamatorio no esteroideo (NSAID)	Inhibidor de COX-2	III	NCT00888797	1
Everolimus	Inmunosupresor utilizado para evitar el rechazo de los trasplantes.	Inhibidor de la vía PI3K/mTOR	II	NCT00390364 NCT01154335 NCT01149434	22
Indometacina	Medicamento antiinflamatorio no esteroideo (NSAID)	Inhibidor no selectivo de COX	I	NCT01719926	1
Lamivudina	Tratamiento de HIV y Hepatitis B	Inhibidor nucleósido de la transcriptasa inversa (INTI)	II	NCT03144804	1
Mebendazol	Bencimidazol de amplio espectro antihelmíntico	Bajo estudio. Algunas actividades conocidas: a) Agente disruptor de microtúbulos por fosforilación de BCL2 b) Inhibidor de XIAP c) Inhibidor de VEGFR-2, PDGFRα y PDGFRβ	III	NCT02201381	1

Droga	Uso original	Objetivo en CCR	Fase en CT	Ejemplo NCT	Nº de CT probando esta droga
Metformina	Tratamiento de la diabetes tipo II	Inhibidor de la vía mTOR y la proteína IGF1R	III	NCT01930864 NCT03359681 NCT03359681	10
Nelfinavir	Antiretroviral de la familia de inhibidores de proteasas. Tratamiento de VIH-1 y VIH-2	Inhibidor de la vía PI3K	II	NCT00704600	1
Niclosamida	Tratamiento de parásitos intestinales	a) Inhibidor de la proteína de unión al calcio A4 b) Modulador de las vías de señalización Wnt / β-catenina, mTORC1, STAT3, NF-κB y Notch	II	NCT02519582	2
Pentamidina	Antimicrobiano utilizado para tratar la tripanosomiasis africana, la leishmaniosis, la babesiosis y el tratamiento de la neumonía por pneumocystis	Inhibidor de fosfatasas PRL	II	NCT00809796 NCT01378143	2
Propanolol	β-bloqueador, tratamiento de hipertensión	Bajo estudio. Actividades conocidas: a) Inhibidor de la actividad PAP de las lipinas b) Afecta la vía β-adrenérgica	III	NCT00888797	1
Rapamicina	Inmunosupresor para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos	Inhibidor de mTOR	II	NCT03439462	3
Simvastatina	Tratamiento del colesterol	Inhibidor de la HMG-CoA	II	NCT02026583	4
Trifluridina	Medicamento antiviral contra el virus del herpes, usado principalmente en ojos	Inhibidor de la timidina fosforilasa	III	NCT02848443 NCT03274882	15
Valproato	Tratamiento de epilepsia, trastorno bipolar y migraña	Inhibidor de la HDAC	II	NCT01898104	2
Sulindac	Medicamento antiinflamatorio no esteroideo (NSAID)	a) Subexpresión de proteínas factores de transcripción específicas b) Inhibidor de COX-1 y 2 c) Inhibición de la expresión de EGFR y VEGF	III	NCT00118365	1
Mesalamine	Antiinflamatorio	Inhibidor de COX-2	II	NCT03070574	4

Tabla I. Drogas en reposicionamiento que se encuentran siendo probadas en ensayos clínicos para el tratamiento de CCR. **CT:** “Clinical Trial”. **NTC:** “Clinical Trial Number”

1.3.3. Drogas en reposicionamiento implicadas en este trabajo

1.3.3.1. Metformina

La metformina ($C_4H_{11}N_5$; **Figura 5**) es una biguanida insulino-sensibilizante que disminuye los niveles glucémicos sin afectar en forma directa la secreción de insulina. Bloquea la producción hepática de glucosa, aumenta la sensibilidad insulínica en el músculo y disminuye la absorción intestinal de glucosa y otros azúcares análogos. Fue extraída de la hierba *Galega officinalis*, y se prescribió originalmente para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y el síndrome de ovario poliquístico [77, 78]. Estudios epidemiológicos y metanálisis han revelado que los pacientes con DMT2 tratados con metformina presentan una menor incidencia de tumores y que el tratamiento de pacientes oncológicos con este fármaco se asocia con menores tasas de mortalidad [79-81]. En cuanto a su mecanismo de acción, la metformina afecta el metabolismo bioenergético celular a partir de la inhibición de la ruta mTORC1 por activación de las proteínas ATM (ataxia telangiectasia mutada), LKB1 (quinasa hepática B1) y la quinasa activada por AMP (AMPK), previniendo la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y afectando de forma directa importantes rutas metabólicas como la β -oxidación de los ácidos grasos, la glucólisis y la gluconeogénesis [82, 83]. La metformina también puede inducir la expresión de p53 a partir de la activación de AMPK y, en consecuencia, detener el ciclo celular [84]. Existe evidencia de que esta droga además de reducir la incidencia y la mortalidad por cáncer, puede sensibilizar las células cancerosas a la radioterapia y quimioterapia, y reducir la probabilidad de relapso tumoral [85-87].

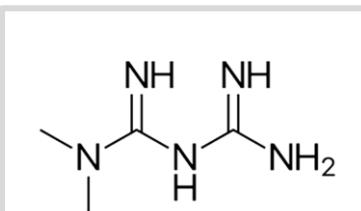


Figura 5. Estructura química de la metformina

1.3.3.2. Propranolol

El propranolol ($C_{16}H_{21}NO_2$; **Figura 6**) es un compuesto sintético antagonista de los receptores adrenérgicos $\beta 1$ y $\beta 2$, que compite a nivel del receptor con las catecolaminas (dopamina, norepinefrina y adrenalina) que se liberan en la sangre principalmente bajo situaciones de estrés [88]. Clínicamente, el propranolol se usa para atacar sitios periféricos del sistema noradrenérgico en el tratamiento de la hipertensión, enfermedades de las arterias coronarias y las taquiarritmias [89]. Además, dado que es un compuesto lipofílico supera fácilmente la barrera hematoencefálica y puede bloquear los receptores β -adrenérgicos en el sistema nervioso central, por lo que también se utiliza para tratar trastornos de ansiedad y pánico [90].

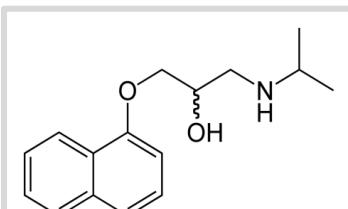


Figura 6. Estructura química del propranolol

En un principio el propranolol junto a otros betabloqueantes fueron probados sobre tumores hormodependientes, como cáncer de mama y próstata, bajo la hipótesis de que tendrían un efecto sobre la recepción e interpretación de mensajes hormonales que podría inhibir su proliferación. Sin embargo, pronto comenzaron a probarse en otros tipos tumorales debido a que se descubrió que las catecolaminas cumplen un papel fundamental en el desarrollo tumoral en general mediante la

inhibición de la ruta cAMP-PKA que promueve la producción de VEGF, MMP 2 y 9, NF- κ B y conlleva al aumento de los niveles de proliferación y metástasis a través de la regulación de los niveles de angiogénesis [91]. Los efectos sobre la angiogénesis del propranolol despertaron el interés en la investigación en cáncer cuando demostró ser eficaz en intervenir en el desarrollo y vascularización de hemangiomas infantiles, formaciones tumorales no cancerosas causadas por el crecimiento anormal de vasos sanguíneos [92]. En la última década, una gran cantidad de investigaciones científicas han reportado un efecto beneficioso del propranolol como quimioterapéutico en modelos de cáncer de páncreas, mama, próstata y melanoma [93-96]. Uno de sus principales mecanismos de acción es la inhibición de la autofagia debido a que se lo ha identificado como un inhibidor de la función fosfatidato fosfatasa de las lipinas [97, 98]. Otros estudios en modelos celulares de cáncer de mama han reportado que la droga afecta el metabolismo de la glucosa a través de la activación de ADRB2 que regula la hexoquinasa 2 a nivel posttraduccional [99]. Adicionalmente se encontraron importantes efectos de la droga sobre componentes inmunes, como la inhibición de la polarización de los macrófagos M2, desencadenada por la activación de ADRB2 [100].

1.3.3.3. Cloroquina

La cloroquina ($C_{18}H_{26}N_3Cl$; **Figura 7**) es una droga sintética conocida por su uso en el tratamiento de la malaria. También se utiliza para tratar algunos trastornos autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico [101]. En los últimos años, el medicamento ha atraído el interés de los científicos como agente anticancerígeno. Se han demostrado varios mecanismos asociados a las propiedades anticancerígenas de la cloroquina, el más conocido es su acción como inhibidor de la autofagia tardía [102, 103]. Además, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* la cloroquina puede estabilizar la proteína p53 y aumentar la transcripción de genes pro-apoptóticos [104, 105]. También se demostró que el medicamento actúa sobre el metabolismo celular afectando la actividad de la glutamato deshidrogenasa, que tiene una fuerte correlación con el crecimiento y la homeostasis tumoral [106, 107].

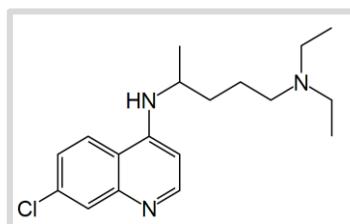


Figura 7. Estructura química de la cloroquina

1.3.3.4. Atorvastatina

La atorvastatina ($C_{33}H_{35}FN_2O_5$; **Figura 8**) es una estatina sintética utilizada para disminuir los niveles de colesterol en sangre y en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Mediante mecanismos antiinflamatorios también previene la embolia. Se caracteriza por la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, que controla la velocidad de la ruta del mevalonato, la vía metabólica que produce colesterol y otros isoprenoides. Varios estudios recientes comienzan a discutir la acción de esta droga en cáncer. Se han reportado efectos principalmente en cáncer de próstata, mama, colon y pulmón [108-110].

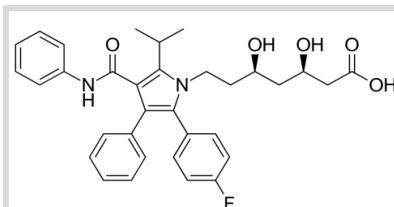


Figura 8. Estructura química de la atorvastatina

1.3.3.5. DCA

El dicloroacetato de sodio (DCA; $C_2H_2Cl_2O_2$; **Figura 9**) es un compuesto sintético resultante de la desinfección clorina del agua. A finales del siglo 20, se encontró que el DCA reduce los niveles elevados de azúcar en la sangre en diabéticos [111] ya que inhibe la expresión de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), clave en la ruta glucolítica [112]. Debido a sus efectos sobre la utilización del azúcar, el fármaco comenzó a prescribirse para el tratamiento de algunas enfermedades metabólicas como la acidosis láctica. Estudios recientes reportan que el DCA presenta efecto anticancerígeno [113, 114]. Con respecto a su mecanismo de acción, la droga revierte la glucólisis aeróbica que conduce a una disminución en la producción de lactato. También se ha demostrado su capacidad de reactivar la función mitocondrial revirtiendo la supresión de la apoptosis dependiente de las mitocondrias [115].

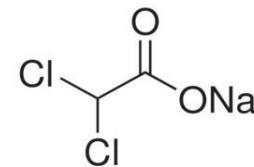


Figura 9. Estructura química del dicloroacetato de sodio

1.3.3.6. Orlistat

Orlistat o tetrahidrolipstatina ($C_{29}H_{53}NO_5$; **Figura 10**) es una droga sintética diseñada para tratar la obesidad mediante la inhibición selectiva de las lipasas gástricas y pancreáticas, y la enzima ácido graso sintasa (FASN). Los efectos anticancerígenos del Orlistat han sido reportados en varios tipos de cáncer como colon [116], próstata [117] y melanoma [118], y se encuentran relacionados con una de las alteraciones características de las células cancerosas que es la lipogénesis mejorada, un proceso que proporciona gran cantidad de lípidos para la formación de la membranas celulares. Varios autores han informado sobreexpresión de FASN en tejidos de CCR [119].

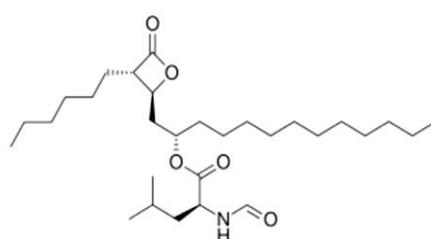


Figura 10. Estructura química del orlistat

1.3.3.7. Claritromicina

La claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$; **Figura 11**) es un antibiótico de la familia de los macrólidos utilizado para el tratamiento de varios tipos de infecciones bacterianas, principalmente cutáneas, de las vías respiratorias (como la neumonía atípica y la bronquitis) e infecciones causadas por *Helicobacter pylori*. Dentro de sus mecanismos conocidos en células normales, la claritromicina es un inhibidor de la enzima CYP3A4, fuertemente involucrada en el metabolismo de una gran cantidad de fármacos [120]. Se ha demostrado que ejerce actividad antitumoral en varios modelos preclínicos en los que actúa bloqueando el flujo autofágico [121], induciendo apoptosis [122] o inhibiendo la angiogénesis [123]. El beneficio clínico de la combinación de claritromicina con quimioterapéuticos convencionales se confirmó en estudios clínicos en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico y mieloma múltiple [124, 125].

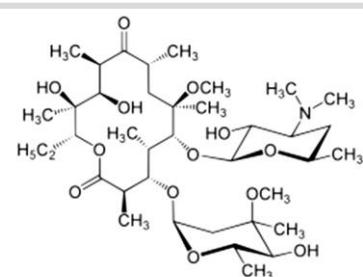


Figura 11. Estructura química de la claritromicina

1.3.3.8. Pantoprazol

El pantoprazol ($C_{16}H_{15}N_3F_2O_4S$; **Figura 12**) es un inhibidor de la enzima adenosina trifosfata de hidrógeno/potasio (H^+/K^+ -ATPasa). Clásicamente se usa para el tratamiento del reflujo gastroesofágico, como protector gástrico, para prevenir la recurrencia de úlceras estomacales y para el tratamiento de afecciones hipersecretoras patológicas. El efecto anticancerígeno del pantoprazol se observó en cáncer gástrico donde inhibe irreversiblemente la bomba de protones lo que evita la extrusión intracelular de protones en las células reduciendo su supervivencia en condiciones ácidas [126]. Conjuntamente a su efecto sobre la bomba de protones, estudios recientes reportaron que el pantoprazol afecta la transición epitelio-mesenquimal en células de cáncer gástrico resistentes a quimioterapéuticos convencionales a través de la modulación de la ruta Akt/GSK-3 β / β -catenina [127].

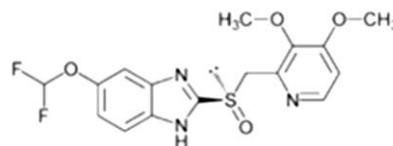


Figura 12. Estructura química del pantoprazol

1.3.3.9. DHEA

La dehidroepiandrosterona ($C_{19}H_{28}O_2$; DHEA; **Figura 13**), también conocida como “hormona de la juventud” es una hormona derivada del colesterol que forma parte del metabolismo de los esteroides sexuales adrenales. Es sintetizada y secretada por la porción cortical de las glándulas suprarrenales y en menor medida por las gónadas y el cerebro. Se utiliza para el tratamiento de la obesidad, problemas de infertilidad en mujeres y el tratamiento del envejecimiento prematuro. Se ha observado que el compuesto induce la remisión de la hiperglucemia aumentando la sensibilidad a la insulina, protege las arterias de los cambios ateroscleróticos y regula el sistema inmunitario a través de su acción sobre las células T [128-131]. La acción antitumoral de DHEA se ha reportado en cáncer de mama y colon [132-134]; en el primero algunos estudios clínicos ya han probado la acción del compuesto en pacientes [135]. Aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual DHEA produce disminución de la proliferación de células tumorales, su actividad anticancerígena se le atribuye principalmente a su efecto inhibidor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de los mamíferos, enzima limitante de la velocidad de la vía pentosa fosfato, la mayor fuente de NADPH extramitocondrial [136].

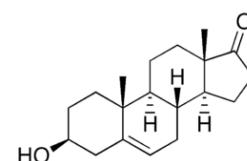


Figura 13. Estructura química de la dehidroepiandrosterona

1.3.3.10. Itraconazol

El itraconazol ($C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$; **Figura 14**) es un antimicótico de amplio espectro utilizado clínicamente durante casi 35 años para el tratamiento de infecciones fúngicas, incluidas la candidiasis, la aspergilosis y la histoplasmosis, y para la profilaxis de los trastornos inmunosupresores,

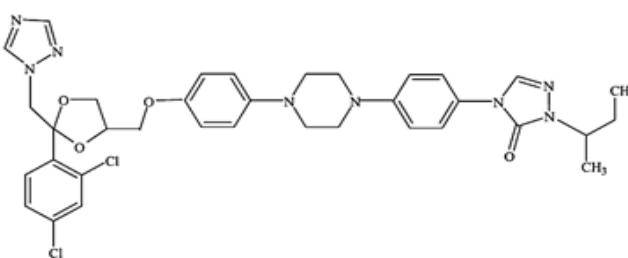


Figura 14. Estructura química del itraconazol

principalmente mediante la inhibición de la lanosterol 14- α -desmetilasa que produce una reducción de ergosterol en hongos y colesterol en mamíferos. Una gran cantidad de investigaciones han demostrado que el itraconazol posee propiedades anticancerígenas. Sus efectos han sido comprobados en carcinoma de células basales [137], cáncer de próstata [138], cáncer gástrico [139] y cáncer de pulmón no microcítico [140]. Los principales efectos observados por el tratamiento con itraconazol en cáncer incluyen la supresión de la inflamación, la detención del ciclo celular, la inducción de apoptosis y autofagia, la inhibición de la angiogénesis y la reversión de resistencia a los medicamentos [141].

1.4. Estrategias para el reposicionamiento de drogas

La mayoría de las drogas que han sido reposicionadas son resultado de serendipias más que de procesos sistemáticos basados en hipótesis. A medida que se descubrían nuevos blancos terapéuticos asociados a determinadas enfermedades o se observaban ciertos efectos secundarios relacionados a determinados tratamientos, los científicos proponían azarosamente el uso de fármacos existentes para nuevas indicaciones. Sin embargo, el surgimiento de herramientas computacionales y bioinformáticas en los últimos 20 años ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias e incluso el sistematizado del proceso de reposicionamiento para lo cual ya se han propuesto ciertos protocolos a seguir [142-144].

El reposicionamiento de drogas se ha utilizado en la búsqueda de tratamientos efectivos para pacientes con una variedad de enfermedades muy diferentes. Exige una extensa investigación bibliográfica sobre el perfil del fármaco y los mecanismos específicos de la enfermedad. Todas las tecnologías como la genómica, la proteómica, la transcriptómica y las bases de datos que incluyen datos ómicos de fármacos y enfermedades están interconectadas en el diseño de la metodología para proponer un fármaco a ser reutilizado. Las estrategias de reposicionamiento pueden basarse en 4 grandes enfoques: similitud estructural entre compuestos, similitud estructural entre objetivos, reversión de firmas genéticas y el método tradicional a través del estudio de la literatura y/o resultados de ensayos clínicos. En lo que concierne a este trabajo, es necesario conocer más en profundidad las últimas dos.

1.4.1. Repositionamiento de drogas tradicional

Se trata de la primera estrategia utilizada en reposicionamiento. A grandes rasgos, consiste en una búsqueda literaria exhaustiva sobre características de un fármaco: su modo de acción, sus efectos secundarios asociados y la interpretación de estudios epidemiológicos y de incidencia de enfermedades en subpoblaciones que lo consumen de forma crónica. Toda esta información permite al investigador generar hipótesis sobre el uso de un determinado medicamento en otra patología. Un ejemplo de un fármaco que fue propuesto como posible droga a reposicionar para el tratamiento de cáncer bajo esta estrategia es la metformina: su postulación surgió como resultado de un estudio de incidencia de cáncer en pacientes con diabetes tipo II [81] en el que se observó que un grupo de pacientes diabéticos tratados crónicamente con metformina tenía una menor incidencia de cáncer y una menor mortalidad asociada a la enfermedad en comparación con pacientes diabéticos bajo otros

tratamientos. Actualmente, para este tipo de enfoques también se están comenzando a utilizar técnicas computacionales, como la “minería de literatura” donde ciertos buscadores especializados localizan en grandes bases de datos médicas términos asociados a un fármaco (como dianas, efectos secundarios, mecanismo de acción) a partir de los cuales pueden crearse “redes relacionales” que asocian medicamentos a patologías y dianas y los proponen como posibles candidatos. Independientemente de la metodología que se haya utilizado para proponer el fármaco, la selección siempre es seguida por técnicas de detección *in vitro* que permiten confirmar los resultados.

1.4.2. Repositionamiento de drogas por reversión de firmas genéticas

Esta estrategia saca partido de la gran cantidad de información de expresión génica que se ha generado en los últimos años. La expresión diferencial de genes bajo determinadas condiciones permite crear “perfiles de expresión génica” o “firmas genéticas” asociadas a una enfermedad, un tratamiento o condición. Muchas bases de datos se han encargado de exponer diferentes líneas celulares a una gran cantidad de fármacos, hacer extracciones de ARN, análisis bioinformáticos y crear perfiles de expresión de respuesta a fármacos. De esta forma, si un investigador descubre un perfil de expresión asociado a una enfermedad o condición puede comparar este perfil con los albergados en la base de datos para localizar fármacos que generen un perfil opuesto o que reviertan la mayoría del perfil de expresión observado. Este fármaco o conjunto de fármacos pueden considerarse entonces posibles candidatos a reposicionar.

1.4.2.1. Herramientas actuales para medir expresión génica

Los datos transcriptómicos reflejan diferencias en la expresión de determinados genes que se activan o inactivan en respuesta a ciertos procesos, como por ejemplo durante la carcinogénesis o la exposición a un determinado quimioterapéutico. Actualmente existen tecnologías para medir la forma en que se expresan estos genes y la proporción en que modifican su expresión. Al patrón de expresión de un grupo de genes asociados a un tejido o condición particular se le denomina “perfil de expresión génica” o “firma genética”. Las firmas genéticas crean una imagen global de la función celular en un momento determinado. En la actualidad las dos herramientas principales utilizadas para medir expresión génica y construir firmas genéticas son los microarreglos y la secuenciación de ARNm.

1.4.2.1.1. Microarreglos

Los microarreglos (o chips de ADN) permiten evaluar la expresión diferencial de varios genes de forma simultánea. Consisten en una pequeña superficie que puede ser de vidrio, plástico o silicona sobre la cual se imprimen pequeños puntos o “spots”. Dentro de cada punto se sintetiza un fragmento pequeño de ADN (oligonucleótido) llamado sonda (o “probe” en inglés). Cada sonda representa un fragmento de un gen; pueden también colocarse diferentes sondas que representan distintos fragmentos de un mismo gen con la finalidad de estudiar su expresión de una forma más robusta. Luego de colocar las sondas dentro de los puntos, se agrega sobre la superficie del microarreglo el ADNc resultante de la retrotranscripción del ARNm extraído de una muestra biológica

marcado con un fluoróforo. Si se produce hibridación entre la sonda en un punto y la secuencia objetivo en el ADNc, el fluoróforo se libera y emite color. A mayor intensidad de color en un punto, mayor expresión de esa secuencia en la muestra. Actualmente, la compañía que lidera la producción de microarreglos es Affymetrix. Sus chips más recientes permiten medir la expresión de más de 54.000 genes simultáneamente.

Una vez producida la hibridación entre la sonda y la secuencia objetivo, el microarreglo se coloca en un scanner especializado que excita cada marcador fluorescente de su superficie mediante una luz monocromática y colecta la señal convirtiendo la corriente de fotones en valores digitales que pueden ser almacenados en una computadora (**Figura 15**).



Figura 15. Representación gráfica de los pasos del procesamiento básicos de un microarreglo.

Los valores de intensidad global en cada punto del microarreglo se organizan en un archivo en formato “.CEL”, en el que el código de cada sonda se muestra en la primera columna y cada columna siguiente representa una muestra biológica o paciente. En la intersección de cada sonda y cada muestra se hallan los valores de expresión génica, medidos como intensidad de color para esa sonda (**Figura 16**).

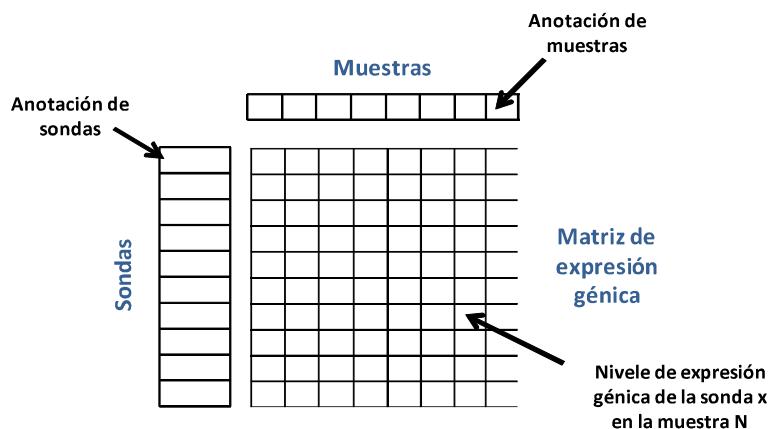


Figura 16. Estructura general de un archivo que contiene datos de expresión génica provenientes de estudios de microarreglos, se presentan con extensión “.CEL”

1.4.2.1.1. RNA-seq

La secuenciación masiva de ARNm se basa en convertir un conjunto de ARNm en una librería de fragmentos de ADNc con adaptadores en uno o ambos extremos. Este ADNc se introduce en una plataforma de secuenciación de última generación (NGS) que proporciona representaciones lineales de la molécula secuenciada. Estas pequeñas secuencias de nucleótidos se denominan lecturas o “reads” y corresponden a cada fragmento perteneciente a la librería de fragmentos de ADNc obtenida. El número de lecturas varía en función de la expresión de un determinado gen: si un gen se expresa más, se asociará a él una mayor cantidad de ADNc y, por ende, es más probable que tenga un mayor número de lecturas.

Las lecturas obtenidas del secuenciador son recogidas en archivos “.fastq”, que generalmente incluyen un identificador, la secuencia de nucleótidos de longitud variable, un separador (+), la calidad de secuenciación de cada nucleótido y la secuencia en sí (**Figura 17**).

```
@sequence_id
GAAAATGGCTTCGAAATTGGTTTTAGCTCCCCACTTATGACACACTTCTCTGTAAATGA
+
CCCFEEHGGHCG:GA:DHHE>EEHHHCDBD?B@FFFHHHHIJIJEHCFHGDEHGIJGIGII
```

Figura 17. Estructura de un archivo “.fastq”. La primera línea contiene el identificador de la lectura. La segunda contiene una secuencia de nucleótidos de longitud variable. La tercera es un separador (+). La cuarta contiene la calidad de cada nucleótido de la secuencia anterior codificada como un carácter ASCII del 33 al 126. Esta calidad es determinada por el secuenciador en base a los resultados del experimento de secuenciación.

A diferencia de los microarreglos, la secuenciación es una herramienta más reciente que permite la identificación de nuevos genes no anotados, alteraciones a nivel de secuencia (como fusiones génicas o mutaciones de regiones codificantes), detección de isoformas alternativas y la obtención de perfiles de expresión de organismos no referenciados [145].

1.4.2.2. Bases de datos de expresión génica

En los últimos veinte años, la rápida evolución de las técnicas experimentales de alto rendimiento, como la secuenciación de ADN, la cristalografía de rayos X y los microarreglos de ADN, produjeron un crecimiento exponencial en la cantidad de datos biológicos, generando la necesidad de contar con formas eficientes de almacenar toda esta nueva información. Las bases de datos de expresión génica, son repositorios de archivos de expresión de genes obtenidos por microarreglos o RNA-seq resultantes de diversos experimentos científicos llevados a cabo en distintos laboratorios de todas partes del mundo.

Muchas bases de datos de acceso público contienen datos de estudios ya publicados, dado que muchas revistas requieren que estos datos estén disponibles para análisis confirmatorios. La publicación de esta información asegura la transparencia y reproducibilidad de las investigaciones y puede ser utilizada para varios propósitos además del originalmente propuesto, como para la combinación con otras muestras obtenidas con la misma plataforma de secuenciación, el reanálisis de

los datos en otro contexto o con otro objetivo, y/o el uso del conjunto de datos para validar un resultado de forma independiente.

Otro punto importante, es que las bases de datos permiten organizar la información de forma eficiente. El objetivo de las mismas es asociar la información de expresión génica con la mayor cantidad de metadatos posibles (en cáncer los datos de expresión génica suelen estar acompañados de información sobre edad del paciente, etnia, etapa del tumor, mutaciones importantes, quimioterapia suministrada, entre otros), de forma que todo este volumen de datos sea fácil de dividir en grupos para realizar comparaciones. Dado su reciente desarrollo, algunos archivos obtenidos por técnicas de RNA-seq aún no contienen metadatos asociados. Sin embargo, como los microarreglos ya son utilizados en clínica para diagnóstico, existe una normativa estandarizada para su uso (Guías y Requisitos sobre la Información Mínima en Experimento de Microarreglos, también conocidas como reglas MIAME) por lo que la mayor parte de estos estudios se encuentran bien caracterizados [146].

Las bases de datos públicas de expresión génica más conocidas son “*Gene Expression Omnibus*” (GEO), un proyecto mantenido por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, Maryland) [147] y “*ArrayExpress*”, un repositorio de información genética creado por el Instituto Europeo de Bioinformática (Hinxton, Reino Unido) [148].

Además de las bases de datos provenientes de muestras de pacientes como las mencionadas anteriormente, existen otras librerías de expresión que utilizan cultivos celulares u organismos modelo para generar perfiles de expresión de respuesta a fármacos, como es el caso de la Librería de Firmas Celulares Integradas en Red (“*Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures*”, LINCS) del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH), o “*Connectivity Map*” (CMAP) del “*Broad Institute*” [149].

1.4.2.2.1. “*Gene Expression Omnibus*” (GEO)

Para los fines que conciernen al desarrollo de este trabajo, es necesario conocer la organización de esta base de datos. GEO almacena exclusivamente datos de expresión procedentes de microarreglos, experimentos de secuenciación de última generación y otros tipos de datos de genómica funcional que son enviados por la comunidad científica. En GEO existen dos tipos de entradas de datos: 1) conjuntos de datos crudos de un experimento que se almacenan en el formato original enviado por los autores, llamados “*GEO series*” (GSE) y 2) conjuntos de datos del mismo experimento o fusiones de datos de diferentes experimentos que fueron procesados y analizados por expertos de la base de datos, llamados “*GEO datasets*” (GDS). Ya sea una serie de datos o un “*dataset*”, todo conjunto de datos que provenga de un mismo experimento debe tener un código GSE o GDS que lo representa (por ejemplo, “GSE81653” o “GDS5439”). Este código se asocia a una descripción completa del estudio y a los datos de su origen, autores y publicaciones asociadas si las hubiere. Además dentro del conjunto de datos, cada muestra también tiene un código “*GEO sample*” (GSM); este código identifica al paciente y al archivo “.CEL” que contiene los valores de expresión. Asociado a este código se encuentra un archivo de metadatos que describe el protocolo experimental utilizado para procesar la muestra y las características del paciente. También, por una cuestión de organización de estudios, GEO asocia cada GSE o GDS a un código “*GEO plataforma*” (GPL) que describe la plataforma de

secuenciación utilizada o el tipo y modelo de microarreglo con el cual se llevó a cabo el experimento y sus características. De esta manera todos los experimentos llevados a cabo en una determinada plataforma o un determinado modelo de secuenciador se encuentran agrupados, y en el caso de utilizarse microarreglos, también se adjunta una planilla con el código de las sondas que representa a cada gen en el dispositivo (**Figura 18**).

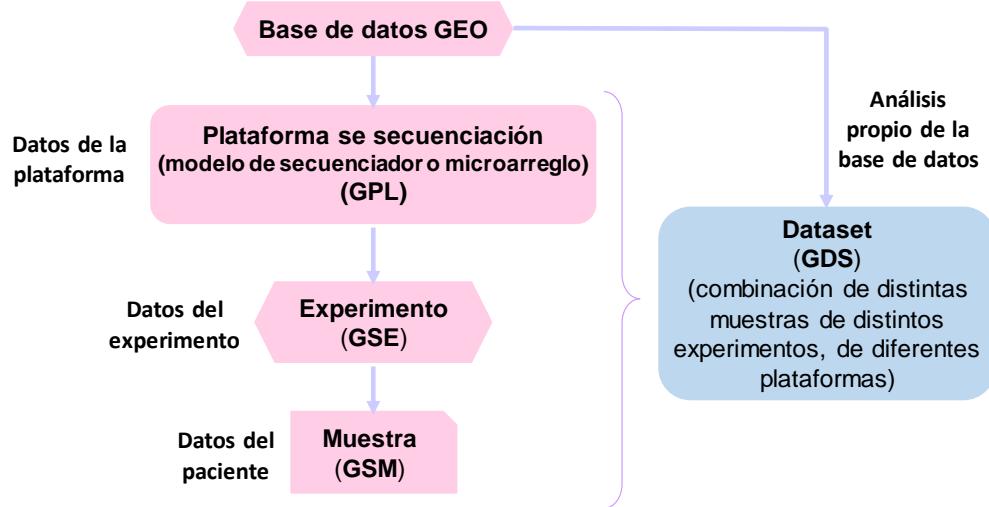


Figura 18. Estructura básica de la base de datos “Gene Expression Omnibus” (GEO).

1.5. Análisis de datos de expresión génica de experimentos de microarreglos

Los microarreglos y las plataformas de secuenciación masiva de última generación arrojan una cantidad muy grande de datos numéricos ya que evalúan de forma simultánea la expresión de miles de genes. Toda esta información se analiza de manera computacional, pero dado su tamaño, es muy difícil de procesar en los softwares estadísticos tradicionales como Excel. En respuesta a estos inconvenientes se han desarrollado un gran número de softwares especializados. En la actualidad el más conocido es Bioconductor [149].

Bioconductor es un proyecto de código abierto para el análisis de datos genómicos. Surgió en el año 2001 y está basado en el lenguaje de programación R. Básicamente, agrupa una serie de paquetes informáticos que permiten crear “*peplines*” o “*workflows*” (o procedimientos de análisis). Cada paquete se encarga de una tarea particular en el análisis de los datos. En la **Figura 19** se observa un “*pepline*” básico tradicional para analizar datos de microarreglos y los principales (o más utilizados) paquetes que se aplican en cada etapa.

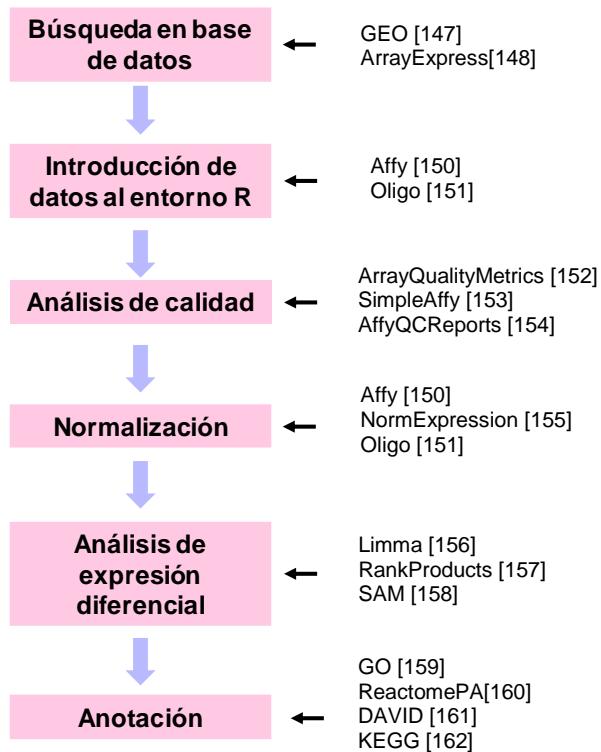


Figura 19. Estructura básica de un flujo de trabajo para el análisis de datos de expresión génica provenientes de estudios de microarreglos. A la derecha se observan los principales paquetes estadísticos que se utilizan en Bioconductor en cada etapa del análisis.

Los experimentos de microarreglos son una de las herramientas más populares para realizar análisis de expresión génica a gran escala. A nivel bioinformático se recibe una matriz de intensidad con la que se calcula una matriz numérica normalizada (preprocesamiento) para luego determinar qué genes están más expresados (estadística inferencial) e identificar, si es posible, patrones de comportamiento comunes a distintos genes (estadística exploratoria y métodos de clasificación).

1.5.1. Preprocesamiento

1.5.1.1 Análisis de calidad

El primer paso después de la importación de datos al entorno donde serán estadísticamente analizados es el control de calidad de los mismos. El análisis de calidad permite estudiar la relación y estructura de los datos mediante resúmenes numéricos y gráficos para determinar si son válidos para el estudio o presentan errores que limitan el resultado. Tiene como principal objetivo localizar posibles valores atípicos y explorar el agrupamiento y distancia entre las muestras. Dado que el volumen de datos que arroja un experimento de microarreglos tiene una alta dimensionalidad, es muy difícil encontrar tendencias o reconocer patrones a simple vista. Bioconductor permite emplear varios tipos de paquetes para la etapa de control de calidad. Sin embargo, es de crucial importancia

tener en cuenta que descartar del análisis una muestra es una decisión que se debe tomar cuidadosamente, especialmente cuando se analizan patrones de expresión humanos que son altamente variables y heterogéneos. Los paquetes de análisis de calidad generan gráficas que le permiten al investigador visualizar los datos en conjunto para tomar una decisión que se adapte a su diseño experimental.

1.5.1.2 Normalización

El objetivo de la normalización es eliminar fuentes de variación sistemática que no sean debidas a diferencias de expresión génica como diferente eficiencia en el marcaje de color, diferentes parámetros de escaneado, efectos espaciales del chip, entre otros. El procedimiento puede rescatar muestras que de otra forma hubieran tenido que eliminarse del análisis. Normalizar los datos permite que los valores correspondientes a genes individuales puedan compararse directamente de una matriz a otra.

Aunque en la actualidad existe un gran número de métodos para normalizar datos trascriptómicos [260], el más utilizado en experimentos de microarreglos es la normalización por cuantiles. En base a este método, la compañía Affymetrix ha desarrollado un proceso de normalización denominado “*Robust Multichip Average*” (RMA) [163].

Al finalizar la normalización se realizan algunos gráficos diagnósticos, principalmente gráficos de cajas y de densidad (histogramas) para corroborar que las muestras han adquirido una distribución de intensidades similar.

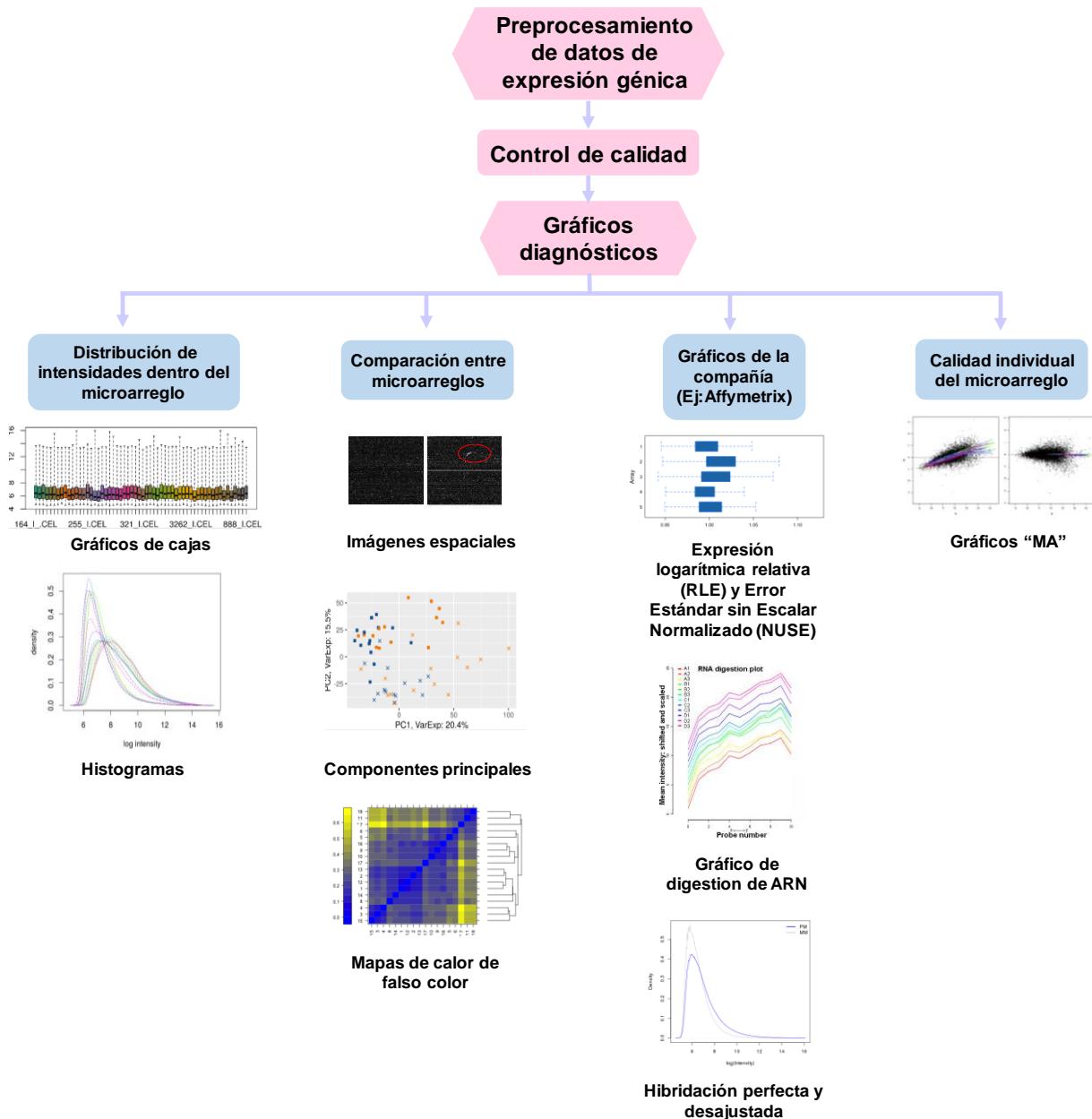


Figura 20. Gráficos diagnósticos para detección de valores atípicos más utilizados en el preprocesamiento de datos de expresión génica.

1.5.2. Análisis estadístico

El propósito de los experimentos de microarreglos es comparar los niveles de expresión génica entre dos fenotipos diferentes. Para ello, una muestra o conjunto de muestras se consideran como referencia o control y la o las otras como experimento. Los ejemplos más frecuentes incluyen comparar sanos versus enfermos, tratados versus no tratados, o el antes y después de un tratamiento. Independientemente del diseño del experimento el principal problema consiste en determinar los genes que se expresan diferencialmente (del inglés “*Differentially Expressed Genes*”,

DEG's). Aunque parece en principio un planteo sencillo, este problema se vuelve más complejo porque los valores de intensidad medidos se ven afectados por numerosas fuentes de fluctuación y ruido [164]. A continuación, se describirán las metodologías estadísticas más populares para determinar posibles genes diferencialmente expresados.

1.5.2.1. Métodos exploratorios

1.5.2.1.1. "Veces de cambio"

El enfoque más intuitivo para encontrar DEG's es considerar su cambio de expresión entre el grupo control y experimental. Normalmente, se define un umbral arbitrario como 2 o 3 veces más expresión que en el control y la diferencia se considera significativa si es mayor que el umbral [165]. Este método de selección suele utilizarse en paralelo con otras técnicas de estimación. Una forma conveniente de seleccionar por veces de cambio ("Fold change"; FC) es calcular la proporción entre los dos niveles de expresión para cada gen. Estas proporciones pueden trazarse de forma gráfica en un histograma. Como se detalló anteriormente, en un experimento de detección que involucra muchos genes se espera que la expresión de la mayoría de ellos no cambie, por lo tanto, la proporción experimento/control se agrupará alrededor de 1, lo que significa que sus logaritmos se agruparán alrededor de 0. El eje horizontal de dicha gráfica representa los valores de proporción logarítmica. La selección de DEG's se puede realizar simplemente estableciendo umbrales en este eje y seleccionando los genes fuera de dichos umbrales. Por ejemplo, para seleccionar genes que tienen un FC de 4 y asumiendo que el logaritmo se ha tomado en base 2, se pueden establecer los umbrales en +/- 2. El proceso de selección por FC es, en principio, el mismo que se utiliza en una situación clásica de prueba de hipótesis, la diferencia radica en que en una situación de prueba de hipótesis los umbrales se eligen con mucha precisión para controlar la probabilidad del error de Tipo I (seleccionar un DEG por error) mientras que, en el método de FC, los umbrales se eligen arbitrariamente, por esta razón la elección de genes posiblemente diferencialmente expresados nunca debe hacerse únicamente por esta metodología, sino que se la considera un método complementario [166].

1.5.2.1.2. Proporción inusual ("Unusual ratio", UR)

Un segundo método de detección de posibles DEG's consiste en seleccionar los genes para los que la relación entre los valores del experimento y del control está a cierta distancia de la relación media entre el experimento/control [167]. Normalmente, esta distancia se toma como $\pm 2\sigma$, donde σ es la desviación estándar de la distribución de la relación. Por lo tanto, los genes seleccionados como regulados diferencialmente serán aquellos que tengan una proporción de experimento/control de al menos 2σ de la proporción media total experimento/control. En la práctica, esto se puede lograr aplicando una transformación z a los valores de la relación logarítmica que esencialmente les resta la media y los divide por la desviación estándar. En un histograma de valores transformados todavía se esperaría que la mayoría de los genes estén centrados alrededor de 0, es decir, tengan una proporción cercana a la proporción media. Las unidades en el eje horizontal representan la desviación estándar, por lo tanto, establecer umbrales en +/-2 corresponderá a seleccionar aquellos genes que tienen una proporción inusual, situados a al menos 2 desviaciones estándar de la proporción media.

1.5.2.2. Pruebas de hipótesis

El análisis de datos de expresión génica se ha convertido en una intensa área de investigación. Si bien las técnicas estadísticas exploratorias, como FC o UR pueden dar un panorama de cuáles son los posibles genes que se están comportando distinto entre los grupos, afirmar simplemente que un gen está diferencialmente expresado por estas razones carece de una base estadística sólida.

Para dar robustez a los resultados se han desarrollado (y están desarrollando) muchas técnicas estadísticas complementarias, las cuales consideran tanto en considerar el FC o el UR, como la variabilidad intrínseca de los datos para crear un valor p (una estimación de la frecuencia con la que se observaría el mismo resultado solo por casualidad). La aplicación de valores p a los datos de expresión génica es complicada dada la gran cantidad de comparaciones múltiples (genes) involucrados. Por ejemplo, normalmente se piensa que un valor p de 0,05 indica significancia, ya que estima una probabilidad del 5% de observar los datos por casualidad. Si se considera un microarreglo de tan solo 10.000 genes (normalmente presentan más de 54.000) con un $p < 0,05$, 500 genes se identificarían como significativos incluso si no hubiera diferencias reales entre los grupos experimentales. Para solucionar este problema, se consideran significativos solo aquellos genes que cumplen con un criterio más estricto. En lugar de usar el valor p se utiliza la tasa de descubrimiento falso (“False Discovery Rate”, FDR). Esta estadística ajusta los valores p en proporción al número de pruebas paralelas involucradas. Desafortunadamente, estos enfoques pueden reducir notablemente el número de genes significativos, incluso cuando se expresan de manera diferencial. Los métodos estadísticos actuales tienen como objetivo lograr un equilibrio entre el descubrimiento de falsos DEG's debido a la variación aleatoria y la perdida de DEG's por criterios estadísticos demasiado estrictos.

A menudo, la selección de una u otra prueba de hipótesis identifica diferentes listas de DEG's debido a que cada prueba opera bajo un conjunto específico de supuestos y pone énfasis en diferentes características de los datos. Muchas pruebas comienzan suponiendo una cierta distribución, otras consideran la distribución conjunta de todas las observaciones de genes para estimar la variabilidad general en las mediciones, mientras que otras analizan cada gen de forma aislada. A medida que aumenta el número de réplicas biológicas en las bases de datos de experimentos de expresión génica, enfoques estadísticos diferentes comienzan a producir resultados cada vez más similares.

En términos generales, los algoritmos estadísticos utilizados para detectar DEG's pueden clasificarse en dos categorías: paramétricos y no paramétricos. El método paramétrico más utilizado es la prueba T de dos muestras y sus variaciones. Otros enfoques paramétricos incluyen el enfoque de análisis de varianza, regresión y métodos empíricos de Bayes, entre otros. También existen algunos métodos semiparamétricos como el método de mezcla jerárquica [168]. A continuación, se detallarán algunos de los métodos más populares dentro de estas categorías.

1.5.2.2.1. Paramétricas

1.5.2.2.1.1. Modelos lineales para datos de expresión génica (Limma)

Limma (*"Linear Models for Microarray Data"*) es un paquete estadístico de Bioconductor basado en el ajuste de los datos a un modelo lineal que utiliza el método paramétrico empírico de Bayes para hacer inferencias. El procedimiento es similar a un ANOVA, pero diseñado para cada gen por separado en lugar de hacer un único modelo general y aplicarlo individualmente. Al igual que la prueba T y ANOVA, limma es un método paramétrico, lo que significa que requiere de ciertos supuestos para ser aplicado, como que los datos presentan un buen ajuste a un modelo lineal y siguen una distribución normal. A pesar que en sus inicios el paquete se usaba exclusivamente para análisis de datos de microarreglos, en la actualidad también se utiliza para analizar datos de RNA-seq. El modelo se aplica bien en un intervalo amplio de número de muestras. Ha mostrado funcionar cuando la cantidad de muestras analizadas es grande, lo que concuerda con el teorema central del límite que demuestra que bajo ciertas condiciones y con cantidades asintóticamente grandes de datos, las sumas o promedios de puntos de datos seguirán aproximadamente una distribución normal, incluso cuando los datos en sí mismos no son normales [169]. Cuando la variabilidad de las muestras es muy alta y el número de muestras es bajo, el método puede no detectar DEG's debido a un mal ajuste de los datos al modelo. Limma es en la actualidad el paquete estadístico más popular para analizar datos de expresión génica ya que los modelos lineales permiten analizar datos resultantes de estudios muy diferentes y complejos sin perder eficacia. Además, mediante la teoría estándar del modelo lineal es posible hacer inferencias de los resultados sobre la totalidad de la población [170].

1.5.2.2. No paramétricas

1.5.2.2.2.1. Análisis de significancia de microarreglos (SAM)

SAM identifica DEG's mediante pruebas T específicas para genes. A cada gen se le asigna una puntuación en base al cambio de su expresión en relación con la desviación estándar de las mediciones repetidas para ese gen. Los genes con puntuaciones superiores a un umbral se consideran potencialmente significativos. El FDR para cada gen se estima mediante permutaciones aleatorias. Este análisis utiliza estadísticas no paramétricas aceptando que es posible que los datos no sigan una distribución normal, lo que es una ventaja sobre otras técnicas como ANOVA y Bonferroni, que asumen igualdad de varianza y/o independencia de genes. La variable de respuesta describe y agrupa los datos según las condiciones experimentales. SAM es especialmente sensible a la variabilidad de los datos, por lo que el preprocesamiento de los mismos puede hacer variar considerablemente el resultado [171].

1.5.2.2.2.2. RankProducts (RP)

El paquete de Bioconductor "RankProd" se desarrolló a partir del método RP, propuesto inicialmente para detectar DEG's en un solo experimento. Es un algoritmo no paramétrico derivado del razonamiento biológico que detecta elementos que se clasifican reiteradamente en un alto o bajo rango en varias listas. El cálculo se realiza a través de permutaciones sucesivas que estiman la

probabilidad de obtener el resultado por azar. RP ofrece varias ventajas sobre el modelado lineal, que incluyen el cálculo y la consideración del FC en la clasificación por rangos, ninguna suposición de distribución y mayor rendimiento con datos ruidosos y/o un número de réplicas reducido. Por otro lado, dado que transforma los valores de expresión reales en rangos, el algoritmo permite el análisis de datos con alta heterogeneidad y la integración de información producida por una amplia variedad de plataformas, como matrices de oligonucleótidos Affymetrix, matrices de ADNC de dos colores y otras matrices personalizadas. Además de la expresión génica, RP se usa para analizar otros tipos de mediciones en experimentos de metabólomica y proteómica [157, 172].

1.5.3. Análisis funcional

La interpretación de los resultados de análisis bioinformáticos es una tarea compleja que se facilita con la realización de análisis funcionales. Estos análisis identifican la expresión diferencial o perturbación de conjuntos de genes relacionados funcionalmente de acuerdo con los conocimientos actuales. Existen diversas bases de datos que describen la funcionalidad de los genes; las más populares son “*Gene Ontology*” (GO) [159], la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) [162] y “*Reactome Pathway*” [160]. Los paquetes de Bioconductor que funcionan con estas bases permiten realizar una diversa colección de gráficas para visualizar los resultados, como redes relacionales y mapas de enriquecimiento. Existen varios métodos estadísticos para análisis funcionales, los más utilizados son el Análisis de Sobre-Representación (ORA), el Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA), el Enriquecimiento de Conjuntos de Genes de Aplicación General (GAGE) y el Análisis de Significación de Categorías Funcionales en Estudios de Expresión Génica (SAFE) [173].

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar drogas en reposicionamiento que actúen sobre puntos clave en la reprogramación metabólica de las células de CCR y CCR resistentes a terapias convencionales y estudiar de qué forma estos fármacos afectan los procesos celulares asociados tanto a la carcinogénesis como al desarrollo de resistencia.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el potencial antitumoral de un grupo de medicamentos en reposicionamiento que afectan el metabolismo celular.
- Seleccionar una droga o combinación de drogas que afecten significativamente la proliferación celular de células de CCR y caracterizar su efecto en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Utilizar un enfoque "*in silico*" para identificar posibles genes y vías metabólicas involucradas en el desarrollo de resistencia a 5-FU en células de CCR.
- Proponer un grupo de medicamentos en reposicionamiento que reviertan el perfil de expresión observado

3. Materiales y Métodos

3.1. Repositionamiento de drogas tradicional

3.1.1. Experimentos *in vitro*

3.1.1.1. Drogas

En base a las investigaciones previas detalladas en la sección **1.3.3** se seleccionaron diez drogas que fueron probadas sobre líneas celulares de CCR. Los detalles del uso original de cada droga y las combinaciones se detallan a continuación (**Tablas II y III**).

Droga	Proveedor	Uso original	Dosis	Solvente
Metformina (Met)	Sigma-Aldrich®	Diabetes	1-50 mM	Agua
Propranolol (Prop)	Sigma-Aldrich®	Hipertensión	1-50 µM	Alcohol etílico 50% en agua estéril
Cloroquina (CQ)	Sigma-Aldrich®	Malaria	0,5- 10 µM	Agua
Dehidroepiandrosterona (DHEA)	Parafarm®	Infertilidad, envejecimiento cutáneo, depresión	1- 200 µM	DMSO
Tetrahidrolipstatina (Orlistat)	Parafarm®	Obesidad	1-20 µM	DMSO
Atorvastatina	Parafarm®	Tratamiento del colesterol alto	1- 200 µM	DMSO
Ácido dicloroacético (DCA)	Parafarm®	Tratamiento de la acidosis láctica	1-200 mM	Agua
Clarithromicina	Parafarm®	Antibiótico	1-200 µM	DMSO
Itraconazol	Parafarm®	Antifúngico	0,1-50 µM	DMSO
Pantoprazol	Parafarm®	Tratamiento del reflujo gastroesofágico	5- 500 µM	Agua

Tabla II. Lista de tratamientos individuales ensayados sobre líneas celulares de CCR.

Combinación	Dosis
Metformina+Propranolol (M+P)	1 Mm+1 µM – 2,5 Mm+2,5 µM
Metformina+ Cloroquina (M+CQ)	1 Mm+1 µM – 2,5 Mm+2,5 µM
Propranolol+ Cloroquina (P+CQ)	1 µM+1 µM – 2,5 µM+2,5 µM

Tabla III. Lista de combinaciones de drogas ensayadas

3.1.1.2. Líneas celulares y condiciones de cultivo

En las **Tabla IV** se detallan las líneas celulares utilizadas en este trabajo. Las líneas cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Life Technologiess, Grand Island, NY, USA) se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. El medio se suplementó con: 10% de suero fetal bovino (SFB; Internegocios), 10 µg/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) y 2 mM de L-glutamina (Gibco). Las líneas cultivadas en “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI; Gibco, Life Technologiess, Grand Island, NY, USA) se incubaron en las mismas condiciones, sin adición de glutamina.

El pasaje de todas las líneas se realizó mediante un lavado con PBS pH 7,4 (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄; 10 mM Na₂HPO₄) y la adición una solución de tripsina 0,05% P/V en PBS.

Línea celular	Origen de la línea celular	Medio de cultivo
HCT116	Humano (carcinoma colorrectal de un hombre adulto)	DMEM
HT29	Humano (adenocarcinoma colorrectal de una mujer adulta)	DMEM
CT26	Murino (carcinoma colorrectal indiferenciado obtenido por inducción química con N-metil-N-nitrosourea en ratón BALB/c)	RPMI
HCT116 ^{5FU}	Humano (obtenida por exposición crónica a dosis crecientes de 5-FU de la línea parental HCT116)	DMEM
CT26 ^{5FU}	Murino (obtenida por exposición crónica a dosis crecientes de 5-FU de la línea parental CT26)	RPMI

Tabla IV. Líneas celulares de CCR utilizadas en este trabajo.

3.1.1.3. Generación de líneas celulares resistentes a 5FU

Se generaron dos líneas resistentes a 5-FU (HCT116^{5FU} y CT26^{5FU}) mediante la exposición intermitente de células HCT116 y CT26 a concentraciones crecientes de la droga. Para esto, un grupo de células fue cultivado hasta alcanzar entre el 80-90% de confluencia y expuesto a una dosis de 5-FU igual a la mitad de su IC₅₀. El tratamiento fue mantenido hasta observar una baja tasa de muerte celular (aproximadamente tres semanas). Los políclones resistentes fueron entonces replaqueados y cultivados hasta alcanzar nuevamente entre un 80-90% de confluencia. En este punto se aplicó una dosis de 5-FU igual a la IC₅₀. Este tratamiento fue mantenido hasta observar una muerte celular mínima en la placa (3-4 semanas). Se repitió el procedimiento hasta observar un porcentaje de muerte menor al 20% al exponer las células a una concentración de 5-FU igual a 2 veces la IC₅₀.

Las líneas generadas fueron cultivadas en las mismas condiciones descriptas para las líneas parentales con la adición de 5µM 5-FU al medio de cultivo periódicamente para mantener la

resistencia. El 5-FU adicionado se preparó a partir de un stock de 5-FU 1000 mM (2,6 µl de solución 5-FU 50 mg/ml en 1 ml de agua estéril).

3.1.1.4. Ensayos de viabilidad celular y cálculo de la IC₅₀

Se realizaron ensayos de viabilidad celular por reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich). Para realizar el ensayo se sembraron 5x10³ células en placas de 96 pocillos que fueron cultivadas por 16 h. Se adicionó cada fármaco en reposicionamiento en diferentes dosis al medio de cultivo de un grupo de pocillos asignados como tratados, otro grupo fue mantenido como control sin tratamiento (al que se agrego vehículo). Los tratamientos individuales y las dosis ensayadas sobre cada línea celular se detallan en la **Tabla II**, y las combinaciones en la **Tabla III**. Al transcurrir 36 h de incubación el medio fue reemplazado por 50 µl de una solución de 0.5 mg/mL de MTT (disuelto en PBS). Seguidamente las células se incubaron durante 40 minutos a 37°C, se les retiró el MTT por aspiración y se las lisó con 50 µl de DMSO. La cantidad de MTT metabolizado se midió por espectrofotometría a una absorbancia de 570 nm (POLARstar® Omega, BGM LABTECH's). Para calcular las IC₅₀ de cada droga en las líneas celulares HCT116 Y HT29 se utilizó el software GraphPadPrism 6 [174].

3.1.1.5. Ensayo de sensibilidad a 5-FU

Se sembraron 5000 células por pocillo de las líneas celulares resistentes a 5-FU en una placa de 96 pocillos. Un grupo fue pretratado con M+P (Met: 2,5mM; Prop: 2,5µM) durante la noche mientras que el otro se mantuvo como control sin pretratamiento. Al día siguiente se retiraron todos los medios, y se trató la mitad del grupo pretratado y la mitad del grupo sin pretratar con 5-FU (2,5µM) por 36 h. Al resto de los pocillos se los mantuvo como control de crecimiento. Para evaluar diferencias en los niveles de proliferación celular se utilizó la técnica de MTT. Las diferencias entre la capacidad proliferativa entre los grupos se evaluaron con un ANOVA.

3.1.1.6. Ensayos de formación de colonias

Un grupo de 500 células fueron sembradas en placas de cultivo de 35 mm e incubadas durante la noche en su medio correspondiente. Transcurrido este tiempo, se adicionó el tratamiento (M+P: Met 2,5mM + Prop 2,5µM) al medio de tres placas asignadas como tratadas, mientras que otras tres fueron mantenidas como control sin tratamiento. Tras la formación de las colonias después de 6-8 días de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (en PBS) durante 10 minutos y se tiñeron con una solución de azul de metílico (0.01g de azul de metílico en 10 ml de agua destilada) durante otros 10 minutos. Se cuantificó el número de colonias por placa y se las fotografió utilizando un microscopio equipado con una cámara digital a un aumento de 5X (Nikon C2+). Para cuantificar el área de las colonias se utilizó el software Image J.

3.1.1.7. Determinación de apoptosis

3.1.1.7.1 Ensayo TUNEL

Para realizar el ensayo TUNEL (“Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling”; marcaje por adición de dUTP a los extremos 3' libres de ADN fragmentado por la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa) se sembraron 5×10^3 células sobre cubreobjetos que se incubaron durante 16 h. Al día siguiente, un grupo fue tratado con M+P (2,5mM+2,5 μ M) “overnight”, un grupo fue asignado como control sin tratamiento y otro como control positivo tratado con 5-FU 5 μ M. El ensayo se realizó utilizando el kit “*In Situ Cell Death Detection*” de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células TUNEL⁺ se cuantificaron utilizando un microscopio de inmunofluorescencia estándar (Nikon C2+). Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos tratados y control.

3.1.1.7.2. Tinción con Anexina V y Ioduro de Propidio

Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células en pocillos de placas de 6 pocillos que fueron incubadas hasta alcanzar el 80% de confluencia. Luego se construyeron cuatro grupos, células tratadas con 2,5 mM de Met, células tratadas con 2,5 μ M de Prop, un grupo tratado con la combinación M+P y un grupo control sin tratamiento. Todos los tratamientos se aplicaron “overnight”. Transcurrida la incubación se recolectó el medio de cultivo y las células adheridas a la placa en un mismo tubo. Las células se lavaron dos veces con PBS y resuspendieron en 100 μ l de Buffer Anexina (Inmunostep; 10 mM Hepes/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂). Luego se tiñeron con 5 μ l de Anexina V-FITC (AP-Biotech) y 5 μ l ioduro de propidio (IP, Immunostep). Las tasas de apoptosis se determinaron por citometría de flujo utilizando un equipo Becton Dickinson FACS Aria II, adquiriéndose 200000 eventos para cada muestra. Los resultados se analizaron con el software FlowJo. Se identificaron diferencias significativas a través por ANOVA.

3.1.1.8. Extracción y cuantificación de proteínas

Se cultivaron células hasta alcanzar el 80% de confluencia en placas de 35 mm. Las placas se lavaron con PBS frío y congelaron a -80°C. Los homogenados celulares se obtuvieron utilizando un scrapper y tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCL 1M pH 8; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5 % DOC; 0,5 % SDS), al cual se le adicionó un inhibidor de proteasas (“Complete” ®, Roche; 1 pastilla/50 ml de RIPA) y fosfatasas (NaF 1 M y NaVO₄ 200 mM, ambos en una dilución 1:1000). Las proteínas fueron recolectadas en el sobrenadante luego de una centrifugación a máxima velocidad por 10 minutos a 4 °C.

La cuantificación de la concentración de proteína en el extracto se determinó mediante el método de Lowry [175] utilizando albumina sérica bovina (BSA) como testigo a través de un lector de microplacas (POLARstar® Omega, BMG LABTECH'S).

3.1.1.9. Western Blot

Alícuotas con cantidades iguales de proteína para cada muestra se desnaturizaron durante 5 minutos a 95 °C en solución amortiguadora de muestra (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; 10% SDS; 50% glicerol; 0,5% azul de bromofenol; 5% β-ME) para separarse electroforéticamente a 110 voltios a temperatura ambiente en un mini-gel de poliacrilamida con una concentración de 4% P/V en presencia de Tris-Base 0,5M pH=6,8 y 10% SDS para la fase de concentración y 8% P/V en presencia de Tris-Base 1,5 M pH=8,8 y 10% SDS para la fase de separación. La corrida se realizó usando el sistema de electroforesis “*mini Bio-Rad PowerPac Basic*” (Bio-Rad Laboratories). El marcador de peso molecular utilizado fue Blue Plus® Protein Marker (14-100 kDa) de Transgenbiotech.

Luego de su separación, las proteínas fueron transferidas durante la noche a 4 °C y 20 mA utilizando el equipo Mini Trans-BlotCell (Bio-Rad) hacia una membrana de PVDF (Amersham HybondTM, GE Healthcare Life Sciences) previamente activada con metanol durante 5 minutos. Seguidamente, la membrana se bloqueó con una solución de leche en polvo desnatada al 5% en T-TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1% V/V Tween20) a temperatura ambiente durante 1 h. Luego del bloqueo la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con T-TBS y se incubó durante la noche en una solución de anticuerpo primario en T-TBS a las concentraciones detalladas en la **Tabla V**.

En todos los casos, como control de carga se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón para α-tubulina (Sigma, dilución 1:1000 en T-TBS). Luego de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 3 veces con T-TBS y se incubó con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa (anti-IgG de ratón [molécula completa] o anti-IgG de conejo [molécula completa], ambos BioRad, dilución 1:5000 en T-TBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con TBS, las bandas de inmunoreacción se revelaron con un kit de quimioluminiscencia estándar (Bio-Lumina, Kalium). La señal se detectó utilizando un lector de quimioluminiscencia (Licor C-Digit Blot Scanner) y se cuantificó por densitometría con el software ImageJ.

Anticuerpo	Número de catálogo	Marca	Dilución	Origen
ERK 1/2 (C-9)	sc-514302	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Conejo
Phospho-Erk ½ (Thr202 / Tyr 204)	#4370	Cell Signaling	1:1000	Ratón
p70 S6 Kinase	#9202	Cell Signaling	1:1000	Conejo
β-catenina (12F7)	sc-59737	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Ratón
E-cadherina (67A4)	sc-21791	Santa Cruz Biotechnology	1:500	Conejo
SNAIL/C15D3	#3879	Cell Signaling	1:1000	Conejo

Tabla V. Anticuerpos primarios utilizados para Wester Blots.

3.1.1.10. Inmunocitoquímica

Se sembraron 5x10³ células sobre cubreobjetos circulares durante 24 h que se fijaron con paraformaldehido 4% en PBS durante 10 minutos. Las células se permeabilizaron en una solución

0,3% de Triton-X100 en PBS por 10 minutos y se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por suero equino 1,5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos en PBS entre cada paso. Para la tinción de las proteínas de interés cada cubreobjetos fue incubado en una cámara húmeda con 40 µL de una dilución de anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente (**Tabla VI**). Luego de 2 lavados de 5 minutos en PBS, cada cubreobjetos se incubó en una solución 1:200 de anticuerpo secundario correspondiente (ratón o conejo) conjugado con Alexa Flúor 488 (Invitrogen) diluido en solución de bloqueo durante 1 h en oscuridad.

Seguidamente, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron en 40 µL de una solución 1:200 de faloidina-rodamina (Invitrogen) en PBS por 20 minutos. Luego de 3 lavados de 5 minutos en PBS, se incubaron en 40 µL de una solución 1:10000 de DAPI (Invitrogen) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los cubreobjetos se enjuagaron con PBS y se montaron con una gota de 4 µL de Mowiol (Calbiochem) en un portaobjetos.

Para la obtención de imágenes los cubreobjetos fueron examinados y fotografiados utilizando un microscopio confocal equipado con epifluorescencia (Nikon C2+).

Anticuerpo	Número de catálogo	Marca	Dilución	Origen
β-catenina (12F7)	sc-59737	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Conejo
E-cadherina (67A4)	sc-21791	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Ratón
Vinculina (H-10)	sc-25336	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Ratón
FAK (D-1)	sc-271126	Santa Cruz Biotechnology	1:50	Ratón
α-Tubulina	T6199	Sigma-Aldrich Corp.	1:200	Ratón

Tabla VI. Anticuerpos primarios utilizados para Inmunocitoquímica.

3.1.1.11. Cuantificación de adhesiones focales

A partir de las imágenes obtenidas de las inmunotinciones de vinculina y FAK descriptas en la sección anterior, se cuantificó el número de adhesiones focales en los grupos tratado y control ($n_c=50$; $n_t=50$); los resultados fueron analizados estadísticamente por una prueba T ($p<0,05$). Para comparar la distribución de las adhesiones focales entre los grupos se utilizó el software ImageJ con el que se midió el ángulo en grados de cada adhesión focal ($n_c=80$; $n_t=156$) con respecto al centro del núcleo de cada célula. Los datos fueron ingresados al software GraphPad Prism v6 donde se construyó un histograma de frecuencias.

Por último, para evaluar diferencias en el tamaño de las adhesiones se procedió según Horzum *et. al* [176], utilizando el software ImageJ las imágenes obtenidas de las inmunotinciones se convierten en imágenes de un solo canal en escalas de grises. Con el comando “threshold” se convierte la imagen en escala de grises en una imagen binaria con dos valores de píxeles: 255 (blanco) y 0 (negro) que pueden ser analizados mediante el comando “analizador de partículas” utilizando los parámetros de circularidad y tamaño establecidos por el usuario.

3.1.1.12. Estudio de la capacidad migratoria celular

En placas de 35 mm se cultivaron células en el medio de cultivo correspondiente suplementado con SFB al 10% hasta obtener una monocapa sub-confluente. Seguidamente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron heridas utilizando un tip amarillo estéril. Para disminuir los estímulos proliferativos, las células se ayunaron agregándole a cada placa medio con suero al 0,1-0,5% más el tratamiento correspondiente. Se tomaron fotos representativas de distintas heridas inmediatamente después de ser realizada (t_0), a las 4, 8, 16 y 24 h de tratamiento utilizando un microscopio invertido (Nikon Ti-E Inverted Live Cell Imaging System). Se analizó la cinética de cierre de herida a partir de la cuantificación del área de la herida en cada placa a los diferentes tiempos utilizando el software ImageJ. Los datos de medición de las distintas áreas fueron sometidos a análisis estadístico mediante ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. El área bajo la curva (AUC) se determinó por el método estándar utilizando el software GraphPad Prism [177].

3.1.2 Evaluación del efecto de M+P *in vivo*

3.1.2.1. Animales

Para llevar a cabo los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones hembras de entre 6 a 8 semanas de edad de las líneas: 1) BALB/c procedentes del Centro de Medicina Comparada de la ciudad de Esperanza, Santa Fe y 2) ratones atípicos desnudos LAEN: NHI(S)-FOXN1 procedentes del bioriego de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata, Buenos Aires. En todos los casos los animales se mantuvieron en el Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos (CIPReB;) de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) donde fueron provistos con comida comercial y agua *ad libitum*, mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y tratados de acuerdo con las directrices del Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL Facultad de Ciencias Médicas) y los lineamientos éticos institucionales del “*Canadian Council on Animal Care*” [178]. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante la primera mitad del ciclo de luz. La eutanasia se realizó por dislocación cervical. En todos los casos el tratamiento M+P fue suministrado en el agua de bebida a una concentración de Met 400 mg/kg/día y Prop 7 mg/kg/día.

3.1.2.2. Modelo de carcinogénesis químicamente inducida

Se implementó un protocolo estándar de carcinogénesis para inducir el desarrollo de tumores en el tracto gastrointestinal de un grupo de ratones BALB/c. El procedimiento consistió en dos etapas: una primera etapa de inducción tumoral a partir de una inyección intraperitoneal de azoximetano (AOM; Santa Cruz Biotechnology) como agente mutagénico y una segunda etapa de desarrollo tumoral utilizando dextrano sulfato de sodio (DSS; Santa Cruz Biotechnology) como agente promotor administrado en el agua de bebida durante 16 semanas (**Figura 21**) [179]. Luego de la inducción, los animales se dividieron aleatoriamente en grupos control y tratado. Tras 6 semanas de tratamiento fueron sacrificados, se les extrajo el tracto intestinal y se cuantificó el número de tumores en ambos grupos. Para resaltar las formaciones tumorales, el intestino se tiñó con una solución de colorante

azul de metileno al 0,5% en agua destilada y se visualizó bajo una lupa. Se evaluaron diferencias entre los grupos a través de una prueba T ($p < 0,05$).

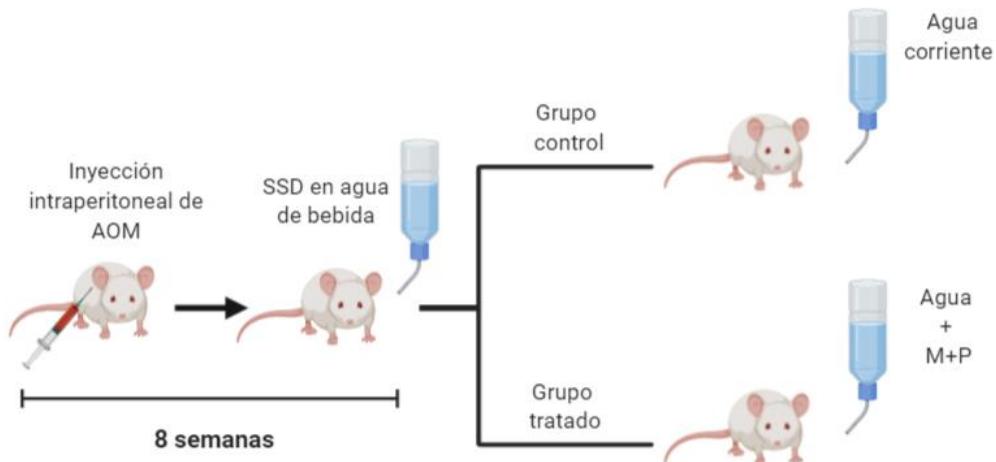


Figura 21. Desarrollo de modelo de CCR químicamente inducido.

3.1.2.3. Modelos alográficos y xenográficos

Para evaluar el efecto de la combinación M+P sobre la velocidad de crecimiento tumoral en diferentes modelos, células en crecimiento exponencial se resuspendieron en 200 μl de PBS y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de un grupo de ratones (**Tabla VII**). Diez días post-inoculación cuando el tumor fue medible, los animales se distribuyeron aleatoriamente en un grupo control y un grupo tratado. Durante un mes de tratamiento, el crecimiento primario del tumor se registró cada 3 a 4 días midiendo su longitud (a) y ancho (b) en mm con un calibre (considerando siempre a>b). El volumen del tumor (V) se calculó utilizando la fórmula $V = 0,4ab^2$. El peso corporal de los ratones se registró durante todo el tratamiento. Luego del sacrificio se extrajeron tumor, bazo, ganglio axilar y pulmones de cada animal. Porciones de tejidos de cada órgano fueron fijados en formaldehído al 4% en PBS y enviados al Laboratorio de Histotecnología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, donde se embebieron en parafina, se tiñeron con hematoxilina/eosina y se montaron en portaobjetos. Estos últimos se observaron en un microscopio equipado con cámara fotográfica donde se identificaron, fotografiaron y cuantificaron procesos de micrometástasis.

Línea celular	Línea de ratón inoculado	Cantidad de células inoculadas
HCT116	Atípicos desnudos	2×10^6
HCT116 ^{5FUR}	Atípicos desnudos	2×10^6
CT26	BALB/c	5×10^5

Tabla VII. Modelos xerográficos implementados

3.1.2.4. Inmunohistoquímica

A partir de tejido tumoral embebido en parafina se realizaron cortes de 6 µm de espesor utilizando un micrótomo. Los cortes fueron fijados en portaobjetos y sometidos a un protocolo de desparafinación con xilol, bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno, bloqueo de sitios inespecíficos con suero de caballo e incubación durante la noche con una dilución de anticuerpo primario en suero bloqueante (**Tabla VIII**). Tras lavar 3 veces con TBS, se realizó una segunda incubación durante 30 minutos con una dilución 1:50 del anticuerpo secundario biotinilado apropiado (Invitrogen) seguido de tres lavados con TBS e incubación con complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories) durante 30 minutos. Las células del tejido se tiñeron con diaminobenzidina (DAB, BD Pharmigen), se realizó una contratinción con hematoxilina y posterior decoloración con una solución de alcohol y ácido (70% de etanol y 1% de ácido clorhídrico). Finalmente, el tejido fue deshidratado y montado con un cubreobjetos. Las muestras se observaron bajo un microscopio óptico (Nikon C2+) con un objetivo de inmersión de 100x.

Anticuerpo	Numero de catálogo	Marca	Dilución	Origen
Anti-Ki67 - IVT Clone K-2	ACK02	Leica Biosystems®	1:400	Conejo
E-cadherina (67A4)	sc-21791	Santa Cruz Biotechnology®	1:50	Ratón

Tabla VII. Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica

Para cuantificar el número de células Ki67⁺, se tomó la misma cantidad de fotos por pieza de tejido en ubicaciones similares (base, extremo lateral izquierdo, extremo lateral derecho, centro y borde superior de avance del tumor; campos=5) y se realizó un conteo del número de células Ki67⁺ en cada campo. Se realizó una prueba T para evaluar las diferencias entre el grupo tratado (n=3) y control (n=3).

3.2. Repositionamiento de drogas “*in silico*”

3.2.1. Preprocesamiento de datos

3.2.1.1. Selección de muestras

Los datos de expresión génica fueron descargados de la base pública GEO [147] en formato “.CEL”. Estos archivos provienen de diferentes estudios de microarreglos realizados a partir de muestras de ARN extraído de tumores de pacientes con CCR. Los criterios de inclusión para la selección de las muestras consistieron en: 1) que no provinieran de estudios de pacientes con poliposis familiar hereditaria, 2) que presentaran información clínica asociada sobre el tipo de quimioterapia suministrada y 3) que detallaran si existió o no recurrencia tumoral luego del tratamiento (definiéndose a la recurrencia como el relapso local o distal del tumor dentro de los 5 años siguientes a la cirugía de remoción).

Se seleccionó un grupo de muestras de dos series de datos: GSE81653 y GSE39582 (**Tabla VIII**). La información clínica de los pacientes permitió dividir las muestras dentro de cada serie en dos grupos: 1) pacientes tratados con 5-FU sin recurrencia tumoral y 2) pacientes tratados con 5-FU con recurrencia tumoral. Cada serie de datos fue analizada individualmente para no incorporar variabilidad al análisis.

Plataforma ID	Serie ID	Año de publicación	Nº total de muestras	Nº de muestras seleccionadas	Relapso	No relapso
GPL570	GSE39582	2013	585	65	23	42
GPL16686	GSE81653	2017	593	83	32	51

Tabla VIII. Características de las series de datos seleccionadas de la base de datos GEO.

3.2.1.2. Control de calidad y análisis exploratorio

El proceso de manipulación y análisis de datos se llevó a cabo utilizando el servidor del HPC (Centro de Cómputos de Alto Rendimiento, CONICET Rosario), donde los datos de expresión fueron ingresados en el entorno R/Bioconductor. Los valores de expresión fueron transformados logarítmicamente para realizar gráficos diagnósticos y explorar la distribución de sus intensidades. El control de calidad se realizó utilizando el paquete “*arrayQualityMetrics*” [152], a partir del cual se generaron gráficos y análisis propios de Affymetrix para explorar la distribución inicial de la intensidades en cada arreglo. También se realizaron análisis de agrupamiento para evaluar si existía asociación en base al fenotipo recurrente y no recurrente entre los pacientes. Se descartó un conjunto de muestras con baja calidad.

3.2.1.3. Normalización, summarización y filtro

Las muestras que superaron el control de calidad fueron normalizadas por el método RMA [163] a través de los paquetes “*oligo*” [151] y “*affy*” [150] dependiendo del modelo de chip. Durante el proceso de normalización también se sumarizaron los valores de expresión de los conjuntos de sondas que representan a un mismo gen a través del cálculo de su expresión media. Los valores de intensidad ajustados al fondo y normalizados se filtraron en base a su intensidad media para descartar genes con expresión cercana a la intensidad de fondo y sin variabilidad entre grupos que puedan incorporar ruido al análisis estadístico.

3.2.1.4. Anotación

La anotación de las sondas se realizó empleando el paquete de anotación suministrado por el fabricante: “*hugene20sttranscriptcluster.db*” [180] para la serie GSE81653 y “*hgu133plus2.db*” [181] para la serie GSE39582 en el entorno R.

3.2.2. Análisis estadístico

3.2.2.1. Determinación de genes diferencialmente expresados

Los DEG'S en el fenotipo recurrente en cada serie de datos se seleccionaron en base a 4 criterios: 1) proporción inusual (UR; usando un umbral de $\pm 2\sigma$ con respecto a la expresión media del mismo gen en el fenotipo no recurrente), 2) “veces de cambio” (FC; a partir del doble de sobreexpresión o subexpresión media con respecto a la expresión media del mismo gen en el fenotipo no recurrente) y 3) el algoritmo no paramétrico SAM y 4) el algoritmo no paramétrico RankProd, en los últimos dos casos el criterio de selección consistió en aquellos genes con un FDR<0,01 y un FC>2.

Una vez obtenida una lista de DEG's para cada serie de datos, éstas se compararon para rescatar aquellos genes que fueron identificados en ambas por alguno de los criterios utilizados. Para ilustrar los resultados se construyeron diagramas de Venn utilizando el paquete “VennDiagram” [182].

3.2.2.2. Análisis de enriquecimiento funcional

Para el análisis de enriquecimiento funcional se utilizaron las bases de datos de anotaciones funcionales: Reactome Pathway y GeneOntology (GO). Ambas bases evalúan la probabilidad de que una categoría esté enriquecida en la lista de genes a través de una prueba de sobrerepresentación de vías (ORA, del inglés “Over Representation Analysis”).

Para el caso de la base de datos Reactome, la anotación funcional se llevó a cabo utilizando el paquete de R “ReactomePA” (versión 1.32.0) [160] en el entorno R/Bioconductor. Luego del análisis, mediante los comandos “dotplot”, “cnplot” y “emapplot” provistos por el paquete se generaron gráficas para facilitar la visualización de los resultados.

Para el caso de la base de datos GO, se utilizó la herramienta en línea Phanter [183]. Esta herramienta asigna a cada término GO un identificador único que se relaciona con el gen en base a la evidencia. Los términos GO nivel 1 son los más generales, un gen puede clasificarse en varios niveles dependiendo de cuanto se sepa de su función. Un mayor nivel GO significa una función conocida más específica. Se generaron gráficos de barra para ilustrar los resultados.

3.2.2. Búsqueda de compuestos que revierten el perfil de expresión en bases de datos

Para identificar compuestos que reviertan el perfil de expresión asociado a recurrencia luego de la quimioterapia adyuvante con 5-FU se utilizó la herramienta “Query” de la plataforma CLUE [184]. Esta herramienta permite analizar la información del proyecto “L1000 Connectivity Map” (L1000 CMAP) de la Biblioteca de Firmas Celulares Basadas en Redes Integradas (del inglés “Library of Integrated Network-based Cellular Signatures”, LINCS) a cargo del Broad Institute [185]. El proyecto L1000 se encarga de perfilar los cambios en la expresión génica después de la perturbación farmacológica o genética (silenciamiento o sobreexpresión) de líneas celulares a través de técnicas de secuenciación

de alto rendimiento. Actualmente alberga alrededor de 1,3 millones de perfiles de expresión génica generados en más de 9 líneas celulares frente a más de 20000 compuestos, 4500 silenciamientos y 3000 sobreexpresiones. La mayoría de las perturbaciones se midieron pasadas las 96 h luego del estímulo. La herramienta “Query” permite ingresar 150 genes sobreexpresados y 150 genes subexpresados y busca dentro de los compuestos probados cuáles producen una sobreexpresión o subexpresión de todos o de la mayoría de los genes ingresados en las líneas celulares disponibles. Además, organiza con puntuaciones asociadas a probabilidades aquellos compuestos y/o perturbaciones que producen total o parcialmente el perfil de expresión observado (puntuación 0 a 100) o lo revierten (puntuación -100 a 0). De esta forma puede obtenerse una lista de compuestos o perturbaciones probables que, según la base de datos, se asocian al perfil de expresión.

4. Resultados

4.1. Repositionamiento de drogas tradicional

4.1.1. Experimentos *in vitro*

4.1.1.1. Proliferación celular

Con el objetivo de evaluar el potencial antitumoral de distintas drogas en reposicionamiento sobre cáncer colorrectal, se analizó la capacidad de un grupo de drogas con actividad sobre distintas vías del metabolismo celular de afectar el crecimiento de líneas celulares de CCR mediante ensayos estándares de MTT. El efecto de los fármacos se probó sobre dos líneas celulares humanas: HCT116 y HT29. En todos los casos las distintas dosis de los tratamientos se aplicaron durante 36 h.

Se observó que todas las drogas probadas produjeron un decremento en el porcentaje de crecimiento con respecto al crecimiento normal de manera dependiente de la dosis ($p<0,05$) (Figura 22). Los resultados de las IC_{50} para cada droga se muestran en la Tabla IX.

4.1.1.2. Combinaciones de drogas

Un efecto en la disminución del crecimiento celular de las combinaciones por pares de metformina, propranolol y cloroquina ya había sido observada en distintos moldeos de cáncer de mama triple negativos. En base a estos antecedentes, se decidió probar estas combinaciones sobre las líneas humanas de CCR en las dosis detalladas en la sección 3.1.1.1. De entre todas las combinaciones, M+P fue capaz de disminuir los niveles de proliferación celular de forma significativa en ambas líneas celulares y en mayor proporción que los tratamientos individuales, incluso a bajas dosis de ambas drogas (Figura 23).

4.1.1.3. Efecto de M+P sobre la línea murina CT26

Para corroborar el efecto observado en las líneas humanas se utilizó la línea murina CT26. Sobre esta línea se probó el efecto tanto de las drogas individuales como de la combinación de M+P con el fin de evaluar si la relación observada en las líneas humanas se mantenía. Los niveles de proliferación se midieron a través de un ensayo de MTT estándar, las dosis usadas y el tiempo de tratamiento fue el mismo que para las líneas humanas. Los resultados indicaron que nuevamente, metformina y propanolol afectan el crecimiento celular de forma dependiente de dosis. La combinación de M+P fue capaz de reducir el crecimiento celular en mayor proporción que los tratamientos individuales también en esta línea celular (Figura 24).

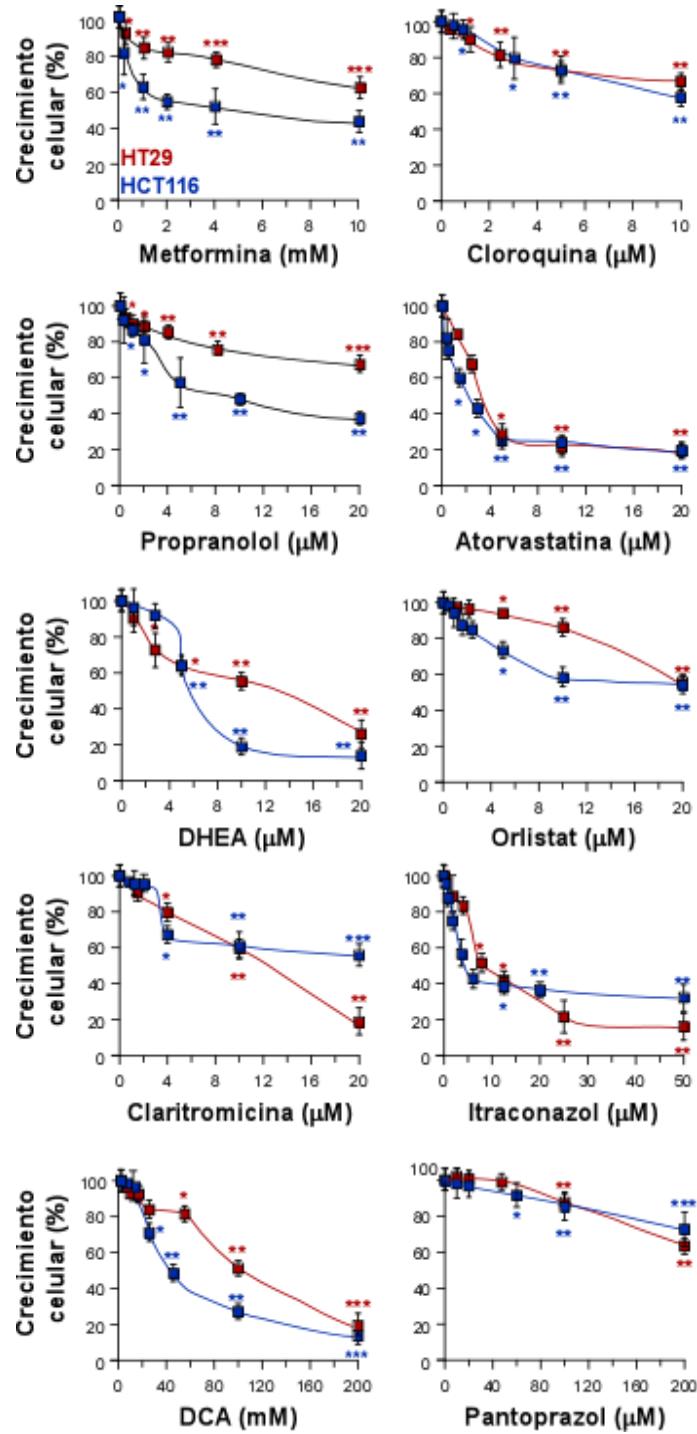


Figura 22. Ensayos de proliferación. Efecto de tratamientos con fármacos en reposicionamiento sobre la proliferación de las líneas celulares de CCR humano HCT116 (azul) y HT29 (rojo).

Tabla IX. IC₅₀ de las drogas testeadas sobre las líneas celulares HCT116 y HT29

Droga	Línea celular	IC50	SD
Cloroquina	HCT116	2,72 µM	±0,64
	HT29	3,9 µM	±0,50
DHEA	HCT116	4,01 µM	±0,18
	HT29	5,74 µM	±0,34
Orlistat	HCT116	9,92 µM	±0,62
	HT29	20,01µM	±0,22
Metformina	HCT116	2,61 mM	±0,24
	HT29	3,11 mM	±0,22
5-FU	HCT116	2,49 µM	±0,16
	HT29	2,54 µM	±0,47
Propranolol	HCT116	25,5 µM	±0,28
	HT29	39,04 µM	±0,52
DCA	HCT116	10,98 mM	±0,3
	HT29	50,67 mM	±0,6
Atorvastatina	HCT116	1,92 µM	±0,28
	HT29	1,93 µM	±0,10
Claritromicina	HCT116	9,37 µM	±0,20
	HT29	29,37 µM	±0,28
Itraconazol	HCT116	1,1 µM	±0,10
	HT29	1,35 µM	±0,14
Pantoprazol	HCT116	105,8 µM	±0,50
	HT29	178 µM	±0,82

4.1.1.5. Apoptosis

Las células cancerígenas se caracterizan por su capacidad de evadir los puntos de control que conducen a la apoptosis celular, lo que les permite sobrevivir y proliferar descontroladamente. Con el fin de estudiar el efecto del tratamiento M+P sobre los niveles de apoptosis celular se utilizaron dos enfoques: por un lado, se realizó un ensayo enzimático TUNEL sobre un grupo de células HCT116 control y tratadas con la combinación durante 16 h. Para este experimento, un tercer grupo de células tratadas con 5FU 5µM fue utilizado como control positivo. Luego de la reacción se contó el número de células TUNEL+ por campo en cada tratamiento.

Por otro lado, las células cultivadas en medio con y sin tratamiento fueron teñidas con Anexina V y Ioduro de Propidio para evaluar el efecto del mismo por citometría de flujo.

Se observó que el número de células TUNEL+ del grupo tratado con la combinación fue significativamente mayor al del grupo control ($p<0,05$) (Figura 25 A). El resultado fue confirmado por

citometría de flujo ($p<0,05$) (Figura 25 B). Este incremento en los niveles de apoptosis sugiere un efecto de la combinación sobre la capacidad de supervivencia de las células cancerosas que las incapacita de evadir procesos que conducen a la apoptosis celular.

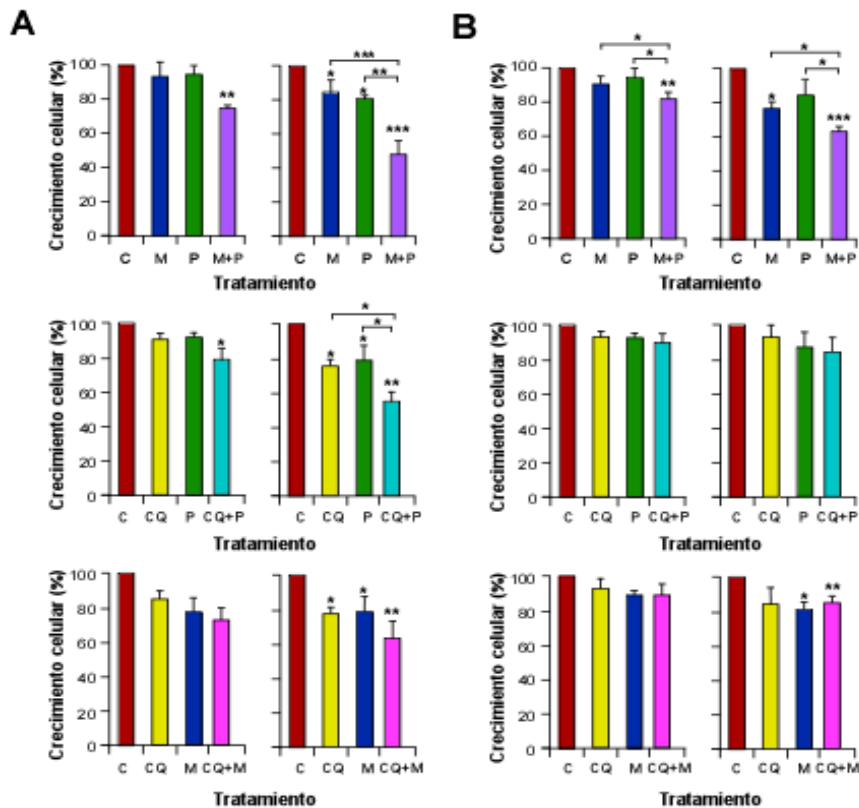


Figura 23. Combinaciones de drogas. Ensayos de proliferación sobre dos líneas celulares de CCR humano (A) HCT11 6 y (B) HT29. Dentro de cada línea celular, el par superior representa la combinación metformina más propranolol (M+P), el central propranolol más cloroquina (P+CQ) y el inferior metformina más cloroquina (M+CQ). Dentro de cada combinación, el panel izquierdo representa la dosis: M 1mM + P 1µM; CQ 1µM + P 1µM; M 1mM + CQ 1µM. Y el panel derecho: M 2,5mM + P 2,5µM; CQ 2,5µM + P 2,5µM; M 2,5mM + CQ 2,5µM.

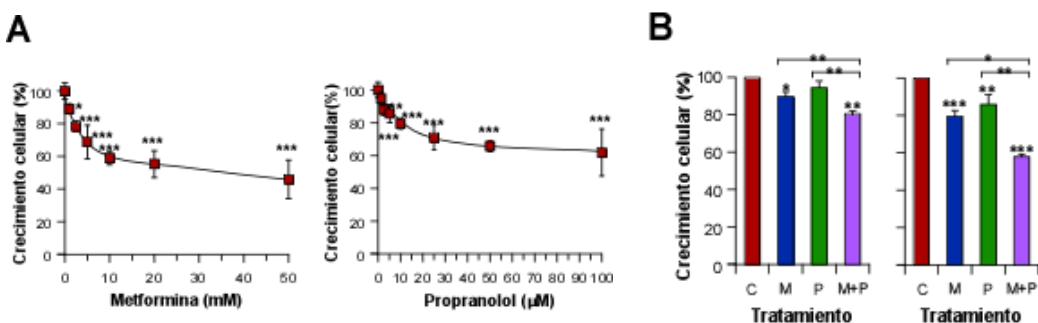


Figura 24. Efecto de M+P sobre la línea celular de CCR murino CT26. (A) Efecto de los tratamientos individuales de metformina y propranolol sobre la capacidad proliferativa de la línea celular CT26. (B) Efecto de la combinación de M+P sobre la capacidad proliferativa de la línea celular CT26. Izquierda: M 1mM y P 1µM. Derecha: M 2,5mM y P 2,5µM.

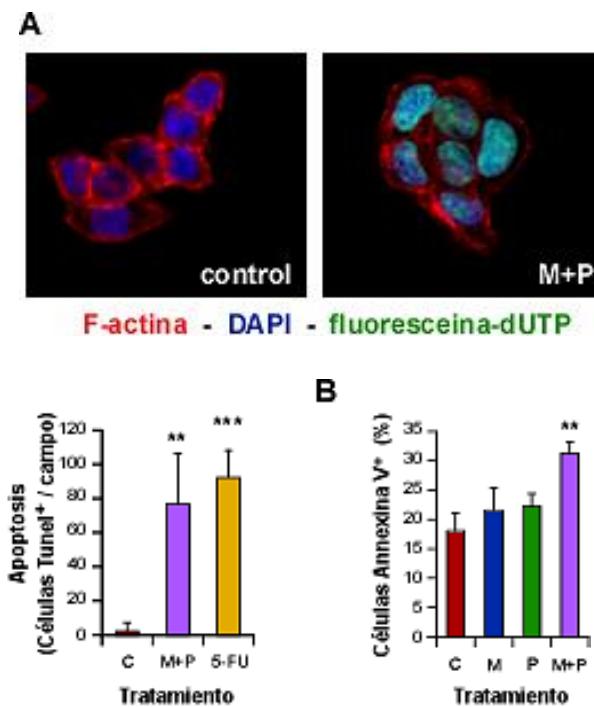


Figura 25. Apoptosis celular. Efecto del tratamiento M+P sobre los niveles de apoptosis de células HCT116 mediante (A) ensayo TUNEL, (B) citometría de flujo por tinción con Anexina V y Ioduro de Propidio.

4.1.1.6. Capacidad clonogénica

Para evaluar el efecto de la combinación sobre la capacidad clonogénica celular, se realizó un ensayo de formación de colonias. A diferencia de los ensayos de proliferación, que miden la actividad metabólica de las células, los ensayos de clonogenicidad miden la capacidad de la célula de dividirse y formar una colonia a partir de una única célula. Una célula metabólicamente activa no siempre tiene una alta actividad mitótica. Asimismo, muchas células disminuyen su tasa metabólica cuando son expuestas a un fármaco, en este periodo suelen ocurrir los procesos de reprogramación metabólica que conllevan al desarrollo de resistencia a los tratamientos. Luego de este periodo la célula recupera su metabolismo y es capaz de dividirse nuevamente. El ensayo de clonogenicidad se llevó a cabo sobre las tres líneas celulares en estudio: HCT116, HT29 y CT26. Se sembraron 500 células en placas de 35 mm y se cultivaron durante ocho días en presencia de medio de cultivo con y sin tratamiento. Al finalizar el experimento las colonias se fijaron y tiñeron con azul de metileno, luego se cuantificaron y se midió su diámetro. En todos los casos se observó una disminución tanto en el número de colonias por placa como también en el tamaño de las mismas luego de ocho días de tratamiento ($p<0,05$) (Figura 26). Los resultados indican que la combinación M+P no solo afecta a las células a nivel metabólico sino también, por un lado, al crecimiento celular reflejado en la disminución del tamaño de las colonias, y por el otro a la capacidad de formar clones a partir de una única célula. Este ultima observación sugiere que la combinación podría afectar procesos

metastásicos, donde una única célula o un grupo reducido de ellas colonizan nuevos tejidos en base a su capacidad de formar clones

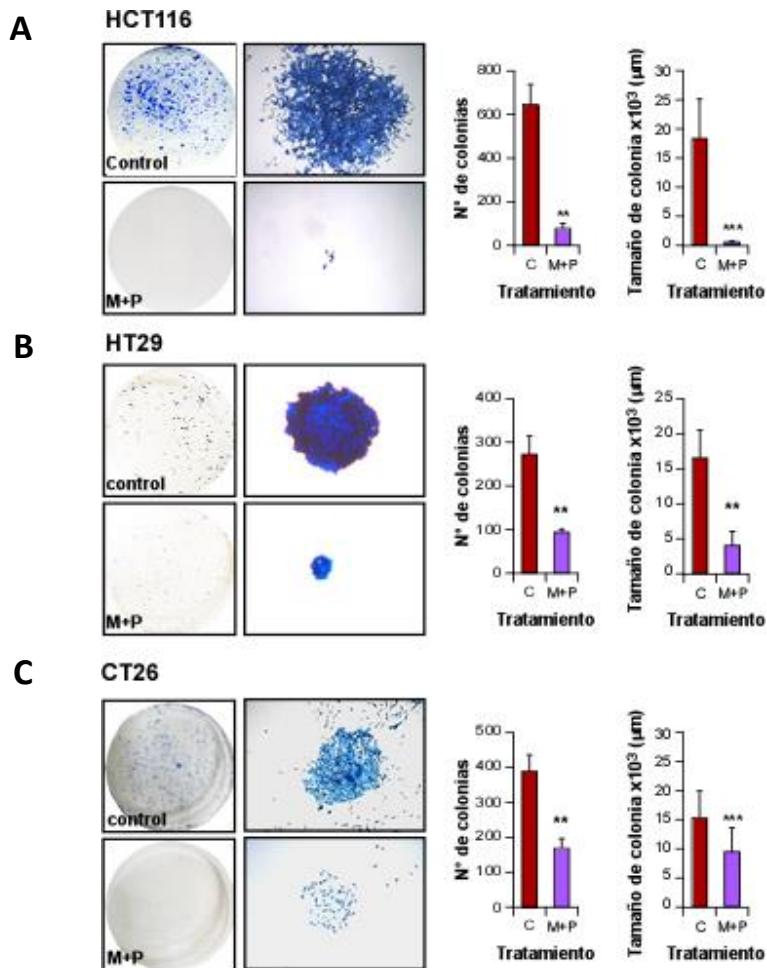


Figura 26. Ensayo de formación de colonias. Se tomaron fotos de colonias de las líneas celulares HT116 (A), HT29 (B) y CT26(C) de un grupo de células control y un grupo de células tratadas con la combinación de M+P durante 8 días. Se cuantificó el número de colonias (gráfico de barras izquierdo) y se midió su diámetro (gráfico de barras derecho) utilizando el software ImageJ.

4.1.1.7. Vías de señalización celular

Las vías de señalización celular se definen como un conjunto de proteínas que trabajan juntas para activar, regular y finalizar ciertas respuestas celulares que le permiten a la célula expresar un fenotipo. En cáncer, la actividad de muchas proteínas involucradas en vías de señalización se encuentra desregulada. Esta desregulación se debe tanto a mutaciones como a diferencias en los niveles de expresión de alguna proteína de la vía. La activación de la vía de señalización de quinasas

activadas por mitógenos (ERK) ocurre en la mayoría de los tipos de cáncer, por lo que las mutaciones de activación de esta vía son el factor oncogénico más abundante.

El impacto del tratamiento sobre procesos de señalización celular asociados a estímulos proliferativos se evaluó mediante el estudio de la cinética de los niveles de fosforilación de ERK y de la expresión de la proteína ribosomal p70-S6 por la técnica de Western Blot.

Para esto, un grupo de células HCT116 fueron cultivadas hasta alcanzar el 70% de confluencia, se retiró el medio y las células se ayunaron en DMEM sin suero durante 4 h para inactivar las vías de señalización asociadas a la proliferación celular. Luego se renovó el medio sin suero a 4 placas asignadas como control y se agregó medio sin suero más tratamiento M+P a las placas asignadas como tratadas y se incubó por 1 h. Seguidamente, se indujo la proliferación mediante adición de medio completo y se tomaron muestras a los tiempos 0, 2, 5 y 10 minutos.

Se observó que en células pretratadas con la combinación M+P los niveles de fosforilación de ERK disminuyeron transcurridos 10 minutos luego de la activación con suero, mientras que en el grupo sin pretratamiento se mantuvieron constantes. También se observó una expresión reducida de la proteína p70-S6 en el grupo pretratado con respecto a su expresión en el grupo control (**Figura 27**). La reducción de la activación y expresión de estas proteínas en células pretratadas confirma los efectos de la combinación sobre la capacidad proliferativa celular, ya que ERK y p70 actúan como moléculas pleiotrópicas en los tumores, donde activan vías pro-supervivencia que conducen a la proliferación y migración celular, así como la modulación de la apoptosis, la diferenciación y la senescencia.

4.1.1.8. Capacidad migratoria

La migración celular se produce en muchos procesos fisiológicos normales, sin embargo, en situaciones patológicas se encuentra desregulada como en el caso de la metástasis y la inflamación. Para indagar en el efecto de los tratamientos individuales y su combinación sobre la capacidad migratoria celular se realizó un ensayo de herida estándar en el que se cultivó un grupo de células hasta formar una monocapa subconfluente sobre la cual se realizaron heridas utilizando un tip amarillo. Se realizó un seguimiento del cierre de la herida cada 4 h durante 24 h en placas tratadas y no tratadas.

La cinética de cierre de herida reveló que el tratamiento disminuye la velocidad de cicatrización de la misma en las tres líneas celulares bajo estudio (**Figura 28 A-C**; $p<0,05$). Asimismo, la cuantificación del área de herida a las 24 h de tratamiento demostró que la combinación retarda el cierre de la herida en mayor medida que los tratamientos individuales ($p<0,05$) (**Figura 28 D**). Esta observación pone de manifiesto que la combinación de M+P posee un efecto más fuerte que los tratamientos individuales reduciendo notablemente la motilidad celular y podría estar interfiriendo con importantes procesos relacionados a la reorganización del citoesqueleto que es esencial para lograr el movimiento.

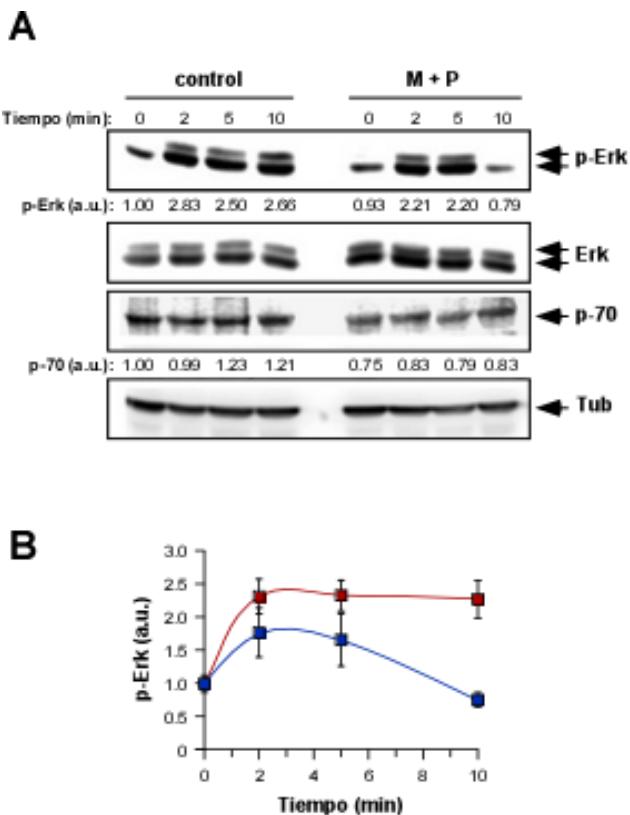


Figura 27. Cinética de fosforilación de ERK. Blots representativos (A) y cinética del efecto de la combinación M+P (M: 2.5mM; P: 2.5μM) sobre la fosforilación de Erk (B). Los niveles de Erk fosforilado (p-Erk) se midieron en unidades arbitrarias (u.a.) con respecto a la expresión de Erk total (Erk). La expresión de de P-70 se midió en u.a con respecto a la expresión de tubulina. En todos los casos se utilizó tubulina como control

4.1.1.9. Adhesiones focales

Además de la capacidad migratoria, otro evento celular altamente asociado con la capacidad metastásica es la propiedad de las células de reordenar su citoesqueleto y soltarse de los puntos de adhesión que las mantienen unidas a la matriz extracelular. Las adhesiones focales son estructuras dinámicas que forman enlaces mecánicos entre los filamentos de actina intracelular del citoesqueleto y el sustrato extracelular. El ensamblaje dinámico y el desmontaje de estas estructuras juegan un papel central en la migración celular. La estimulación de la formación de adhesiones aumenta la unión de las células a los sustratos, dando lugar a células con morfología fibroblástica y menos migratoria.

Para estudiar las adhesiones focales se realizaron inmunotinciones de importantes proteínas relacionadas con la adhesión al sustrato y la organización del citoesqueleto celular. La cuantificación del número de adhesiones focales y su distribución detectadas por las tinciones de FAK y Vinculina demostraron que en células tratadas el número de adhesiones fue mayor (**Figura 29**).

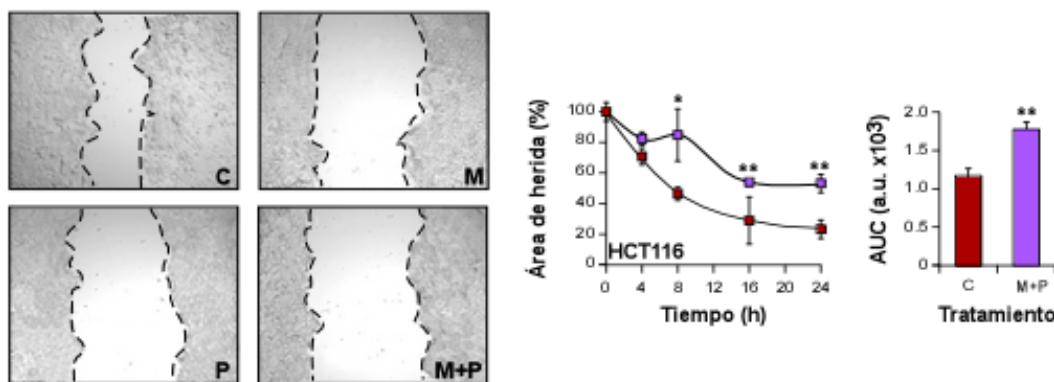
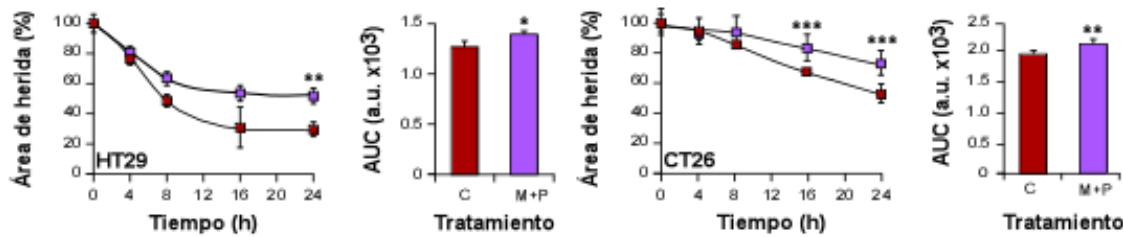
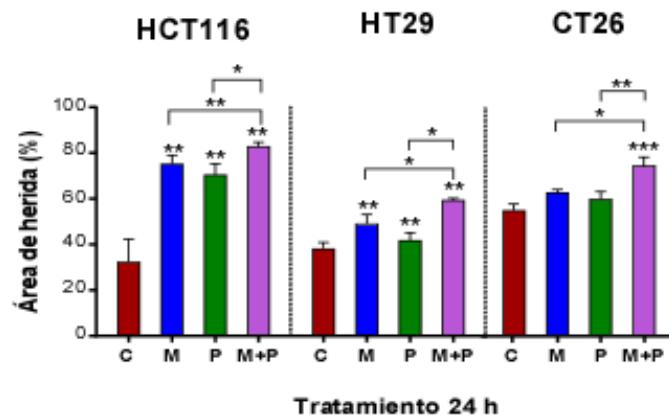
A**B****D**

Figura 28. Ensayo de herida. (A) Izquierda: Herida sobre una monocapa subconfluente de células HCT116 luego de 24 h de tratamiento (C: control; M: metformina; P: propranolol). Derecha: cinética de cierre de herida durante 24 h de células HCT116 control y tratadas con M+P, y área bajo la curva (AUC) en unidades arbitrarias (u.a.). (ByC) Cinética de cierre de herida durante 24 h y área bajo la curva para un grupo de células HT29 y CT26 control y tratadas con M+P. (D) Cuantificación del área de herida de células HCT116, HT29 y CT26 a las 24 horas de tratamiento con fármacos individuales y su combinación.

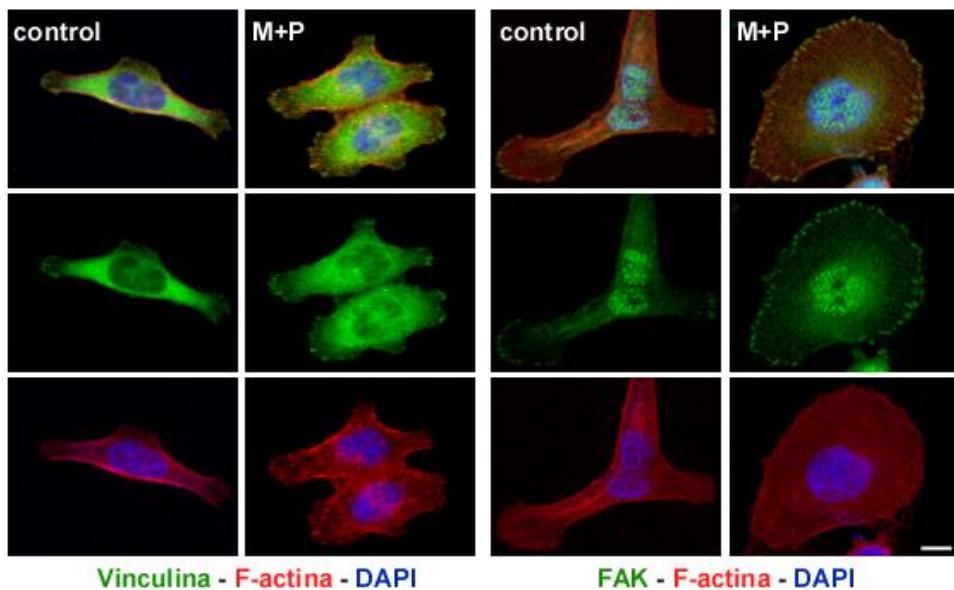
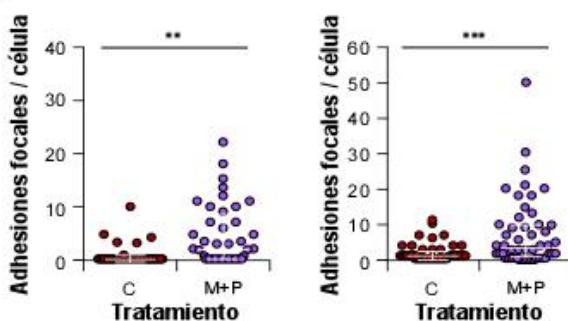
A**B**

Figura 29. Recuento de adhesiones focales. (A) Inmunotinción de placas de adhesión focal en células control y tratadas con M+P (M: 2,5mM; P: 2,5μM). Vinculina (izquierda) y FAK (derecha) se detectaron en verde. (B) Cuantificación de adhesiones focales por célula detectadas por vinculina (izquierda) y FAK (derecha). Barra de magnificación: 20μm

Utilizando el software ImageJ se midió el diámetro de un grupo de adhesiones focales de células control y tratadas, también se cuantificó su distancia angular con respecto al centro del núcleo celular para estudiar su distribución. El tamaño de las adhesiones resultó ser mayor en el grupo tratado ($p<0,05$). Con respecto a su distribución se observó que el tratamiento indujo la distribución de las adhesiones focales de forma radial alrededor del núcleo, mientras que en el grupo control se encontraron principalmente asociadas a estructuras de motilidad celular en los extremos celulares (**Figura 30**). Esta distribución y tamaño diferencial sugiere una fijación más fuerte al sustrato en células tratadas lo que podría asociarse a la menor capacidad de migración observada en el ensayo de cierre de herida.

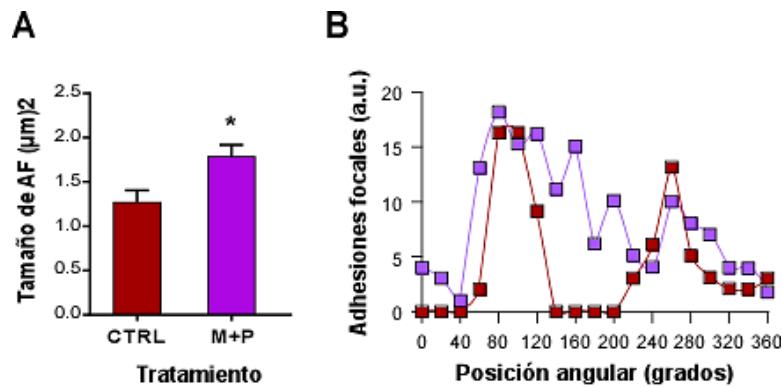


Figura 30. Tamaño y distribución de adhesiones focales. (A) Diferencia de tamaño de adhesiones focales (AF) entre células HCT116 control y tratadas con M+P. (B) Distribución de adhesiones focales en un grupo de células HCT116 control y tratadas.

Por otro lado, la tinción de microtúbulos y microfilamentos de tubulina y actina respectivamente, reveló una disposición desordenada del esqueleto de actina en células tratadas, mientras que estructuras asociadas a migración y movimiento celular como ruffles y lamelipodios se observaron con más frecuencia en células control (**Figura 31**).

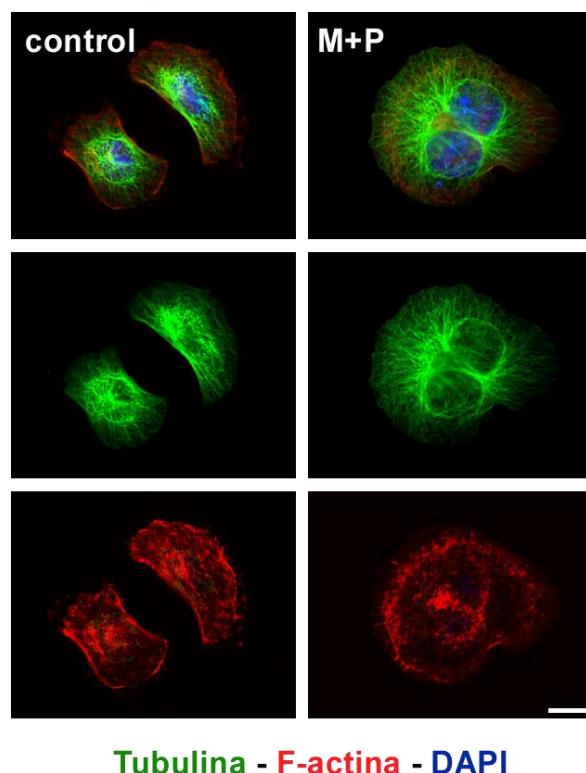


Figura 31. Inmunotinción de fibras de tubulina (verde). En todos los casos, la F-actina se visualiza en rojo mediante la tinción con faloidina-rodamina y los núcleos en azul por tinción con DAPI. Barra de magnificación: 20 μm .

4.1.1.10. Transición epitelio-mesénquima

Además de la adquisición de un fenotipo migratorio, la transición epitelio mesénquima es un proceso mediante el cual las células adquieren propiedades mesenquimales que están asociadas con un fenotipo más invasivo o metastásico. Para explorar el impacto del tratamiento M+P sobre estos procesos se estudió la expresión de β -catenina, E-cadherina y el regulador transcripcional SNAIL. Como se detalló en la sección 1.1.5 estas tres proteínas se encuentran profundamente involucradas en procesos de adhesión intercelular y miden de forma indirecta la capacidad de la célula de desprenderse de un tumor primario para invadir nuevos tejidos. Para estudiar los niveles de expresión de estas proteínas se cultivaron células HCT116 control y tratadas durante 24 h con M+P, luego se realizó una extracción de proteínas y la expresión de las proteínas de interés se detectó mediante Western Blot.

Los resultados indicaron niveles de expresión aumentados de β -catenina y E-cadherina transcurridas las 24 h de tratamiento; contrariamente la expresión del regulador transcripcional SNAIL se vio disminuida (**Figura 32**).

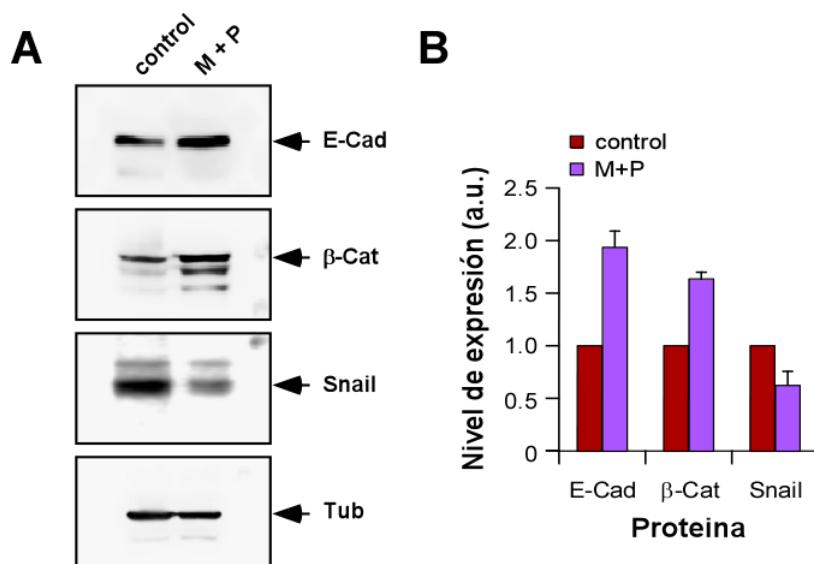


Figura 32. Expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima. (A) Expresión de E-cadherina (E-Cad), β -catenina (β -Cat), y Snail en un grupo de células HCT116 control y tratadas con M+P durante 24 h. (B) Niveles de expresión de E-cadherina, β -catenina, y Snail medidos en unidades arbitrarias (a.u.).

Para corroborar los resultados observados en los estudios de expresión por Wester Blot, se cultivaron células HCT116 sobre cubreobjetos y se mantuvieron en presencia y ausencia de tratamiento M+P por 24 h. Las células se fijaron con formaldehido y se detectaron las proteínas β -catenina y E-cadherina por inmunocitoquímica. La intensidad de fluorescencia permitió observar que no solo la expresión de estas proteínas fue mayor en el grupo tratado, sino que también su distribución fue diferente, encontrándose fuertemente localizadas en las uniones adherentes intercelulares en el grupo tratado, mientras que en el control su distribución fue difusa (**Figura 33**).

Esta distribución diferencial sugiere que las células tratadas no solo están adheridas con mayor fuerza al sustrato, sino también entre sí, lo que concuerda con la dificultad para migrar observada en el ensayo de herida.

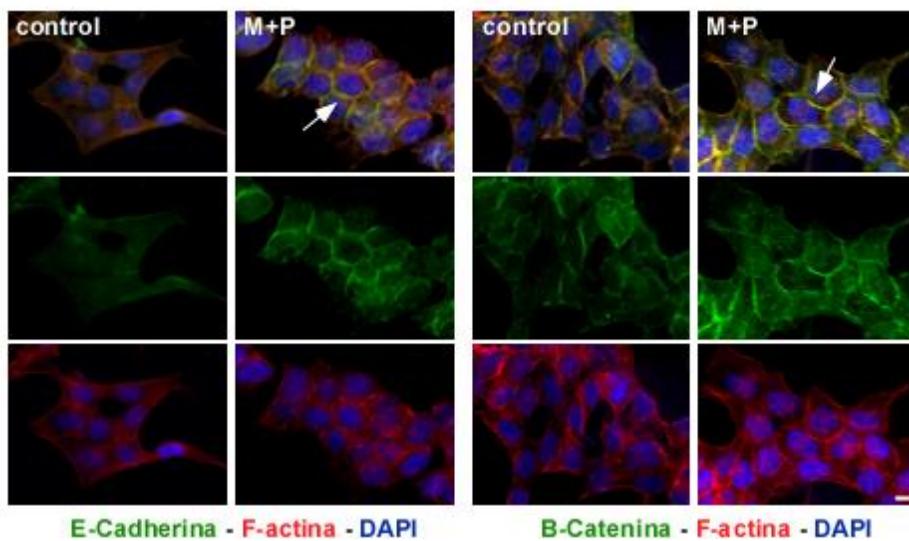


Figura 33. Inmunoletinación de proteínas marcadoras de transición epitelio-mesénquima. Se observa la distribución de E-cadherina (izquierda, verde) y β -catenina (derecha, verde) sobre un grupo de células HCT116 control y tratado con M+P por 24 h. En ambos casos se tiñó el núcleo con DAPI (azul) y el esqueleto de actina con faloidina-rodamina (rojo). Barra de magnificación: 10 μ m.

4.1.1.11. Modelos resistentes a 5-FU

Para estudiar el efecto del tratamiento M+P sobre modelos celulares resistentes a 5-FU, células HCT116 y CT26 fueron expuestas de manera crónica a dosis crecientes de 5-FU hasta alcanzar una proliferación estable a altas dosis de la droga. Se comparó el efecto de las drogas individuales Met y Porp y de su combinación M+P sobre la proliferación celular y la capacidad clonogénica de las líneas HCT116^{FUR} Y CT26^{FUR}. Para evaluar cambios en los niveles de proliferación se realizó un ensayo MTT estándar. La capacidad de formar colonias se evaluó a través del crecimiento en placa de células resistentes aisladas en presencia y ausencia de la combinación M+P. Tras ocho días de tratamiento las colonias se fijaron y tiñeron para cuantificar su número y tamaño en ambos grupos.

Los resultados indicaron que, en ambas líneas celulares resistentes, la combinación produjo una disminución mayor en los niveles de crecimiento celular que los tratamientos individuales ($p<0,05$). Así mismo, también disminuyó el número y tamaño de las colonias formadas ($p<0,05$) (Figura 34). Una observación interesante fue que el decremento tanto en la proliferación celular como en la capacidad clonogénica en las líneas resistentes fue mayor que el de las líneas parentales, indicando que el tratamiento podría estar afectando vías involucradas en el desarrollo de resistencia a 5-FU.

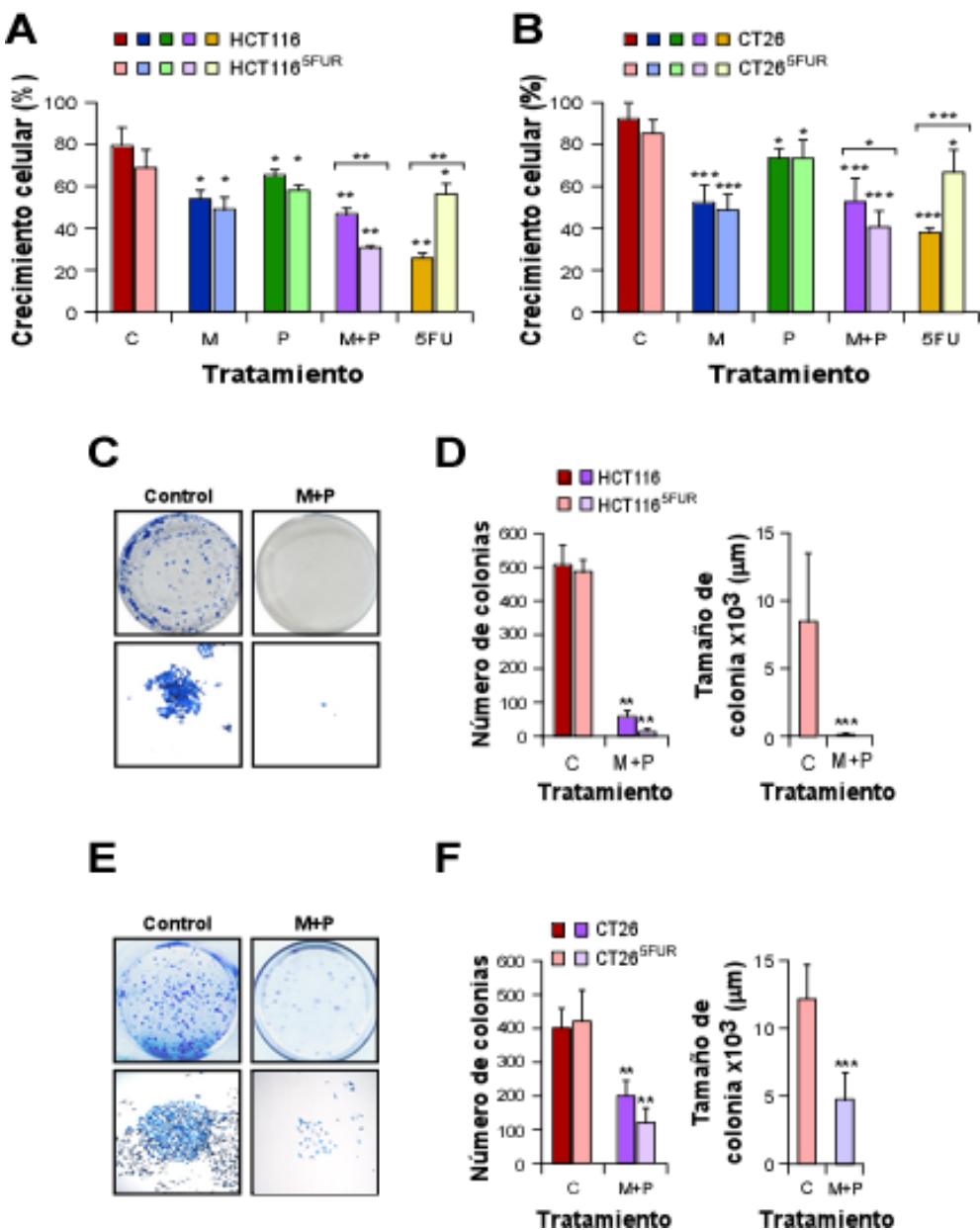


Figura 34. Efecto del tratamiento M+P sobre la capacidad proliferativa y clonogénica de líneas celulares resistentes a 5-FU. Efecto de los tratamientos individuales y de la combinación M+P sobre el crecimiento celular de las líneas HCT116 y HCT116^{5FU} (A) y las líneas CT26 y CT26^{5FU} (B). Ensayo de clonogenicidad sobre la línea celular HCT116^{5FU} (C) y CT26^{5FU} (E). (D y F) Izquierda: cuantificación del número de colonias en el grupo tratado y control para las líneas celulares HCT116 y HCT116^{5FU} (D) y CT26 y CT26^{5FU} (F). Derecha: cuantificación del tamaño de colonia de células controles y tratadas de la línea celular HCT116^{5FU} (D) y CT26^{5FU} (F).

4.1.1.12. Ensayo de sensibilización a 5-FU

En varias investigaciones se ha descripto que metformina presenta capacidad de sensibilizar células de distintos tipos de cáncer a terapias convencionales como 5-fluorouracilo y oxaliplatino. En base a los efectos del tratamiento M+P observados sobre la proliferación y capacidad clonogénica de células de CCR resistentes a 5-FU, se decidió probar el posible efecto sensibilizante de la combinación M+P a 5-FU. Para ello un grupo de células fue pretratado con M+P durante 16 h. Transcurrido el pretratamiento se trataron con 5-FU 2,5 μ M durante otras 16 h tanto las células pretratadas como aquellas sin pretratamiento. Como controles se utilizó un grupo de células sin pretratamiento M+P y sin tratamiento con 5-FU y un grupo de células pretratadas con M+P, pero sin tratamiento posterior con 5-FU.

Los resultados indicaron que la proliferación celular frente al tratamiento con 5-FU de las células pretratadas con M+P fue significativamente menor ($p<0,05$). Este resultado confirmó el efecto observado en la sección anterior, y sugiere que la combinación M+P podría revertir parcialmente la resistencia desarrollada durante la generación de la línea HCT116^{5FUR} y CT26^{5FUR} (Figura 35).

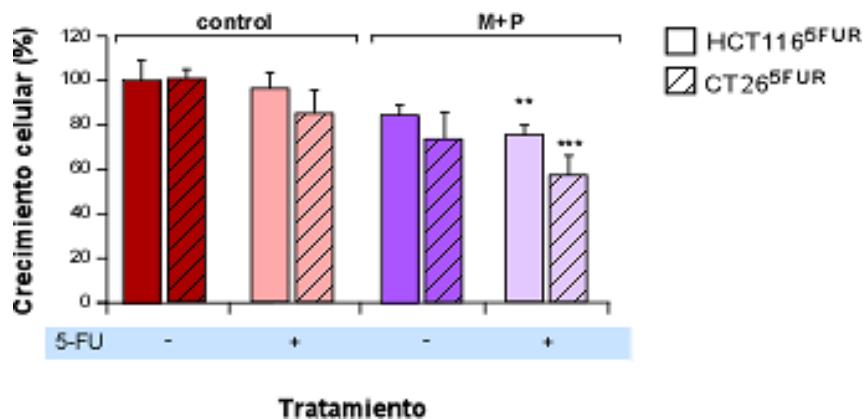


Figura 35. Ensayo de sensibilización a 5-FU. Las barras lisas corresponden a la línea HCT116^{5FUR}, las barras rayadas a la línea CT26^{5FUR}.

4.1.2. Evaluación del efecto de M+P *in vivo*

Para validar los efectos observados *in vitro* se implementaron dos modelos *in vivo*: el primero consistió en inducir químicamente tumores intestinales en un grupo de ratones, el segundo en el desarrollo de modelos xenográficos y alográficos utilizando distintas líneas celulares.

Para todos los experimentos *in vivo*, se utilizaron dosis de Met y Prop descritas previamente para tratar la diabetes o la hipertensión respectivamente en modelos de ratón de estas enfermedades y sin toxicidad asociada [186, 187].

4.1.2.1. Modelo carcinogénico

Para generar un modelo murino de desarrollo de tumores intestinales se utilizó un grupo de ratones hembras BALB/c sobre los cuales se implementó un protocolo de carcinogénesis químicamente inducida. Transcurrido el tiempo de inducción los ratones se separaron en dos grupos, a un grupo se le suministró agua de bebida corriente y al otro se le agregó el tratamiento M+P disuelto en el agua de bebida. Tras seis semanas de tratamiento los animales fueron sacrificados, y se extrajo el tracto intestinal. Los intestinos se tiñeron con azul de metileno para identificar las formaciones tumorales y cuantificarlas. Complementariamente, para explorar diferencias histológicas y en los niveles de proliferación celular se tomaron muestras de tumores de ambos grupos a los que se les realizó una tinción de H&E e inmunohistoquímica para evaluar el marcador de proliferación Ki-67.

La cuantificación de tumores reveló que el número de tumores en el grupo tratado con M+P fue significativamente menor que en el grupo control ($p<0,05$) (Figura 36).

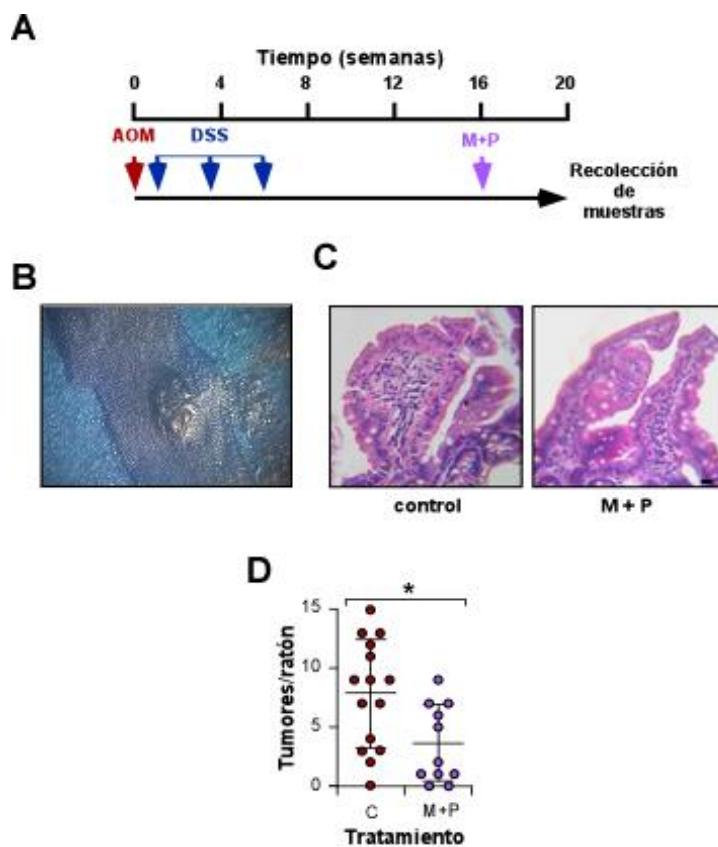


Figura 36. Recuento de tumores en intestino. (A) Diagrama de protocolo de carcinogénesis químicamente inducida en ratones BALB/c, se utilizó azoximetano como agente mutagénico y sodio dextran sulfato como agente promotor. El tratamiento se aplicó en el agua de bebida durante 6 semanas (B) Fotografía de colon teñido con azul de metileno donde se observa una formación tumoral macroscópica. (C) Fotografía de tejido de intestino delgado teñido con H&E de un grupo control y tratado, se observan vellosidades con deformación. La fotografía fue tomada a un aumento de 40X. (D) Cuantificación del número de tumores intestinales en el grupo control y tratado con M+P. Barra de magnificación: 20μm.

Por otro lado, aunque la tinción de H&E de los tejidos tumorales no reveló diferencias histológicas claras entre los grupos, el tejido tumoral extraído del grupo tratado exhibió menores índices de proliferación por Ki-67 que los respectivos controles ($p<0,05$) (Figura 37). Los resultados observados *in vivo* confirman las observaciones sobre líneas celulares, evidenciando un efecto de la combinación sobre el desarrollo tumoral relacionado con una menor capacidad proliferativa.

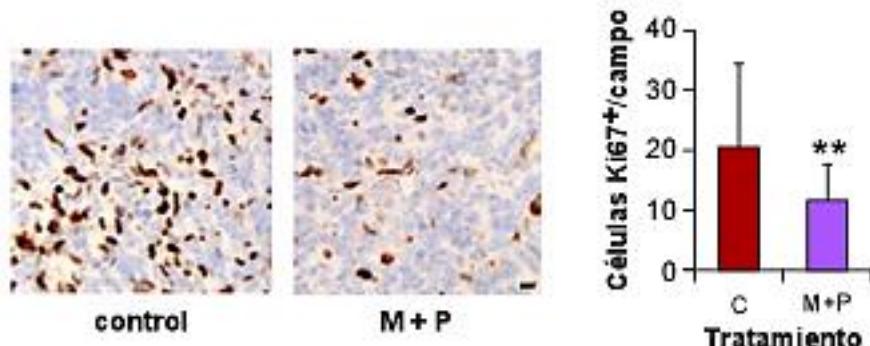


Figura 37. Inmunotinción de Ki67 en tejido tumoral. Izquierda: fotografía de tejido tumoral con tinción de Ki67 de un tumor control y tratado. Derecha: recuento de células Ki67⁺ en tejido tumoral control y tratado. Barra de magnificación: 20μm.

4.1.2.2. Modelo xenográfico HCT116

Para evaluar el efecto de la combinación M+P sobre el crecimiento tumoral, se utilizó un modelo xenográfico de ratones atípicos en el que se inyectó subcutáneamente a cada ratón un grupo de células HCT116. Los animales se dividieron aleatoriamente en un grupo control y un grupo tratado; a este último se le suministró el tratamiento M+P en el agua de bebida. El crecimiento primario del tumor se registró cada 3 a 4 días. También el peso corporal de los ratones se registró al inicio y final del experimento. Luego del sacrificio se extrajeron tumor, bazo, ganglio axilar y pulmones de cada animal, los cuales fueron fijados y teñidos con H&E. Sobre el tejido tumoral se realizó una tinción Ki-67 para evaluar diferencias en los niveles de proliferación celular y una inmunotinción de E-cadherina que permitió estudiar el efecto del tratamiento sobre las uniones intercelulares como una medida indirecta de la capacidad metastásica de las células.

Los resultados indicaron que la velocidad de crecimiento del tumor en el grupo tratado fue significativamente menor respecto al grupo control a partir de los 22 días de tratamiento ($p<0,05$). Además, no se registraron diferencias significativas en el peso de los ratones tratados y controles durante el inicio y final del mismo (Figura 38). La evaluación periódica de características indirectas tales como comportamiento general, calidad de pelaje, movimiento, en conjunto con el peso corporal, sugieren la ausencia de toxicidad asociada al tratamiento.

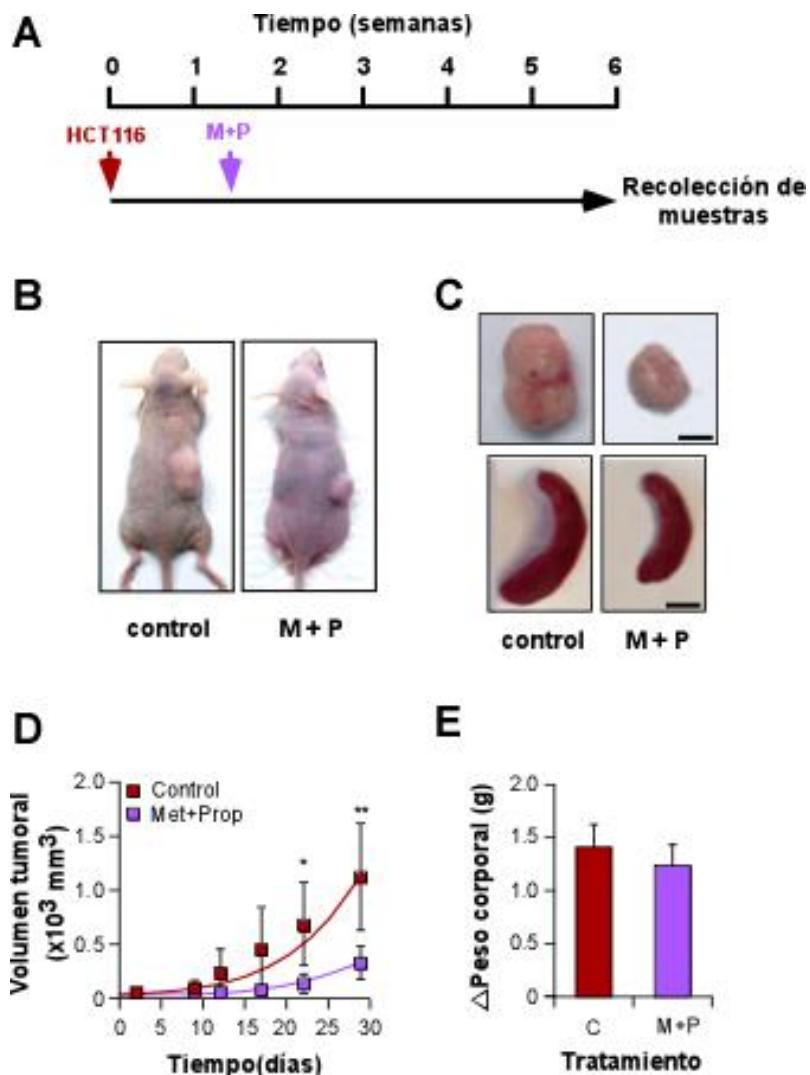


Figura 38. Modelo xenográfico de células HCT116. (A) Esquema de desarrollo de un modelo xenográfico, en el tiempo 0 un grupo de células HCT116 fue inyectada en el flanco derecho de ratones atípicos, el tratamiento se inició a los diez días luego de la inyección. (B) Fotografía representativa de ratones inyectados subcutáneamente con células HCT116 tras 30 días de tratamiento. (C) Superior: tumores representativos extirpados de ratones de cada grupo experimental al finalizar el tratamiento. Inferior: bazo esplenomegálico de un ratón control y bazo con dimensiones conservadas de un ratón bajo tratamiento. (D) Cinética de crecimiento tumoral de células HCT116 ($p<0,05$ día 23) (E) Variación del peso corporal de los ratones dentro de los grupos al inicio y finalización del tratamiento. Barra de magnificación: 5 mm.

La inmunotinción del marcador de proliferación Ki67 en tejido tumoral reveló un menor recuento de células Ki-67^+ en los tumores provenientes del grupo tratado, indicando niveles proliferativos disminuidos ($p<0,05$). Por otro lado, la inmunotinción de E-cadherina indicó un mayor nivel de expresión para esta proteína asociada al tratamiento. Estos resultados coinciden con los observados en los modelos *in vitro*, donde se observó una menor proliferación de células tratadas en ensayos de

MTT, así como distinta distribución y expresión de la proteína E-cadherina por Western Blot en células bajo tratamiento con M+P. La mayor intensidad de color en las uniones intercelulares del tejido tumoral del grupo tratado se relaciona a células con fenotipo epitelial asociadas con una menor capacidad migratoria (**Figura 39**).

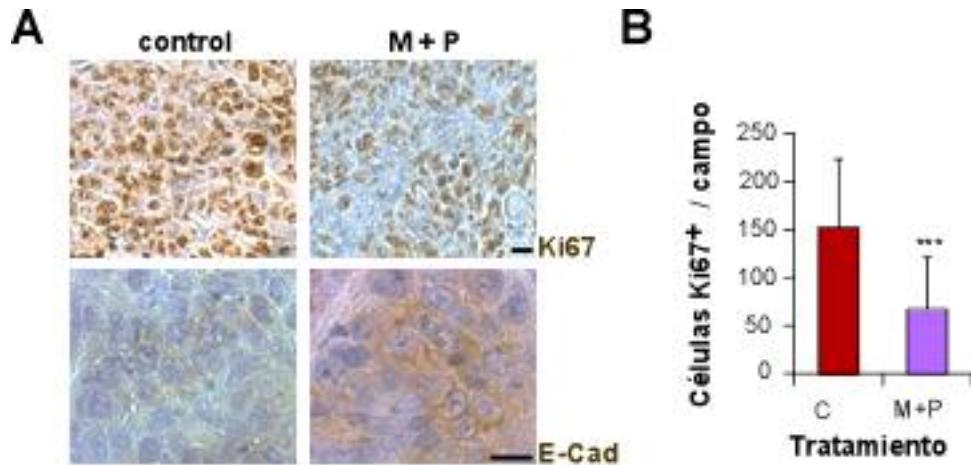


Figura 39. Inmunotincion de Ki67 y E-caderina en tejido tumoral. (A) Arriba: inmunitinción del marcador de proliferación Ki67. Abajo: Inmunohistoquímica de E-cadherina (E-cad) en tejido tumoral control y tratado. (B) Cuantificación de células Ki67⁺ en tejido tumoral normal y tratado. Barra de magnificación: 50μm.

En las tinciones de H&E de tejido tumoral no se observaron diferencias histológicas claras entre los grupos. Sin embargo, al observar microscópicamente los órganos extraídos se identificaron dos especímenes con micrometástasis pulmonares en el grupo control mientras que no se observaron micrometástasis en el grupo tratado. Esta observación concuerda con los resultados de la tinción de E-cadherina donde las células se encontrarían más interconectadas en los tumores provenientes de animales tratados, lo que disminuiría su probabilidad de desprenderse del tumor primario y colonizar otros órganos (**Figura 40**). Por otro lado, la observación de los bazos extirpados reveló un mayor tamaño de bazo en animales del grupo control que podría estar asociado a una respuesta inmunológica debido a la detección de células tumorales circulantes (**Figura 38 C, inferior**).

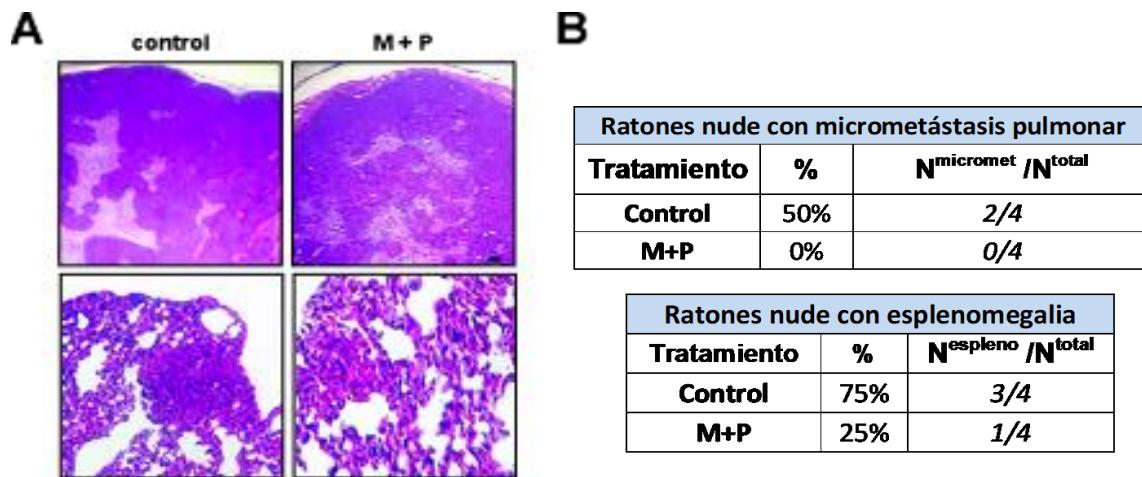


Figura 40. Micrometástasis y esplenomegalia en modelo xenográfico HCT116. (A) Superior: Fotografías representativas de tumores control y tratado. Inferior: micrometástasis pulmonares identificadas en el grupo control. (B) Arriba: Tabla de micrometástasis pulmonares identificadas en ratones pertenecientes al grupo control y tratado. Abajo: Numero de ratones con esplenomegalia. %: porcentaje de ratones con micrometástasis o esplenomegalia. N^{micromet}: número de ratones con micrometástasis. N^{espleno}: número de ratones con esplenomegalia. N^{total}: número total de ratones dentro del grupo experimental. Barra de magnificación: 40μm.

4.1.2.3. Modelo alográfico CT26

Para evaluar el efecto de la combinación de M+P en un modelo murino inmunocompetente, se injectaron subcutáneamente células CT26 en el flanco derecho de ratones BALB/c. Durante el tiempo de tratamiento, se registraron los diámetros mayor y menor del tumor cada 3 a 4 días. El peso al inicio y final del experimento también fue registrado. Al finalizar el tratamiento, se tomaron muestras de órganos que fueron teñidos con hematoxilina eosina. Los resultados indicaron una vez más diferencias significativas en la progresión tumoral a partir de los 20 días de tratamiento ($p<0,05$). Nuevamente no se registraron variaciones en el peso de los ratones ni se observaron cambios que pudieran sugerir toxicidad asociada al tratamiento (**Figura 41**).

En las tinciones de H&E se observó que los animales bajo tratamiento presentaron un número significativamente menor de micrometástasis pulmonares, sin embargo, el tratamiento no previno las micrometástasis a hígado ni tampoco las redujo significativamente. La observación de los bazo extirpados reveló un mayor número de especímenes con esplenomegalia en el grupo control (**Figura 42**).

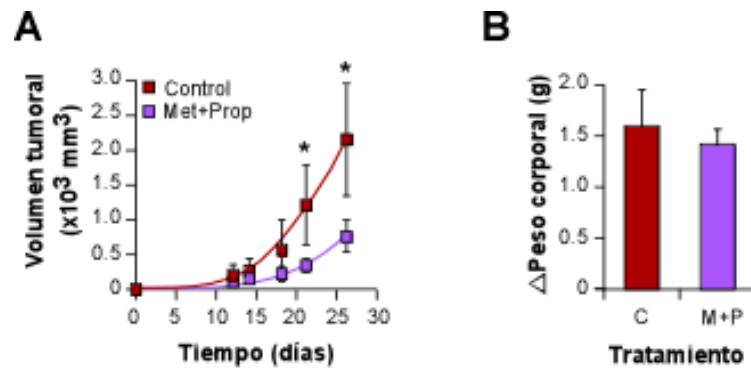


Figura 41. Modelo alógráfico CT26. (A) Cinética de crecimiento tumoral de células CT26 en un modelo alógráfico de ratones BALB/c ($P<0,05$ día 22). (B) Variación del peso corporal de los ratones dentro de los grupos al iniciar y finalizar el tratamiento.

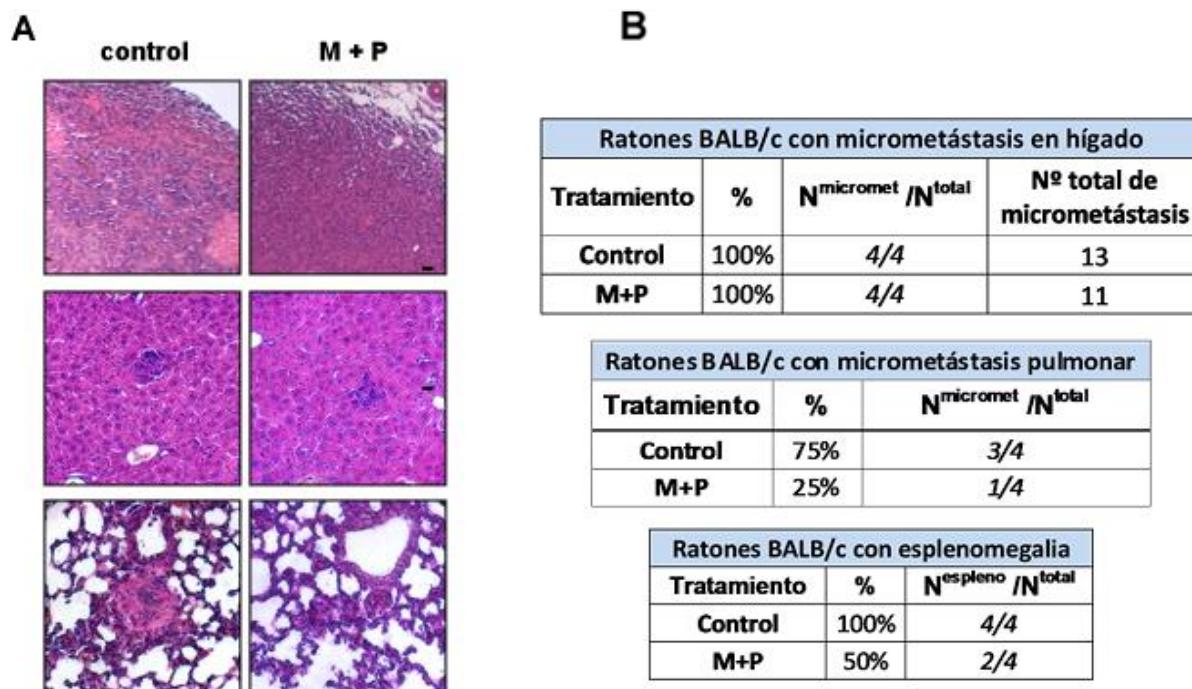


Figura 42. Micrometástasis y esplenomegalia en modelo alógráfico CT26. (A) Superior: fotografías de tejido tumoral correspondientes a los grupos control y tratado. Central: micrometástasis en hígado observadas en ambos grupos experimentales. Inferior: micrometástasis pulmonares. (B) Superior: número de ratones con micrometástasis en hígado. Centro: número de ratones con micrometástasis pulmonares. %: Porcentaje de ratones con metástasis, N^{micromet} . nº ratones con micrometástasis pulmonares, N^{total} . nº ratones en el grupo experimental. Inferior: número de ratones con esplenomegalia identificados en cada grupo. %: Porcentaje de ratones con esplenomegalia, N^{espleno} . nº ratones con esplenomegalia, N^{total} : nº ratones en el grupo experimental. Barra de magnificación: 40 μ m

4.1.2.4. Modelo xenográfico HCT116^{5FU}R

Se estudió el efecto de la combinación M+P sobre el crecimiento tumoral de células HCT116^{5FU}R en un modelo *in vivo*. Las células fueron inyectadas subcutáneamente en el flanco derecho de ratones atípicos hembras del mismo modo que se describió anteriormente. El tratamiento M+P se suministró en el agua de bebida. Se registró el volumen tumoral y el peso corporal durante todo el experimento. Al finalizar, se tomaron muestras de tumor, bazo, hígado, y pulmones que fueron teñidos con H&E para evaluar presencia de micrometástasis. Los resultados demostraron que la combinación M+P fue capaz de disminuir la progresión tumoral de células 5-FU resistente *in vivo* ($p>0,05$), confirmando el efecto observado *in vitro* sobre las líneas celulares. Así mismo, no se observaron cambios en el peso de los ratones al inicio y final del tratamiento (Figura 43).

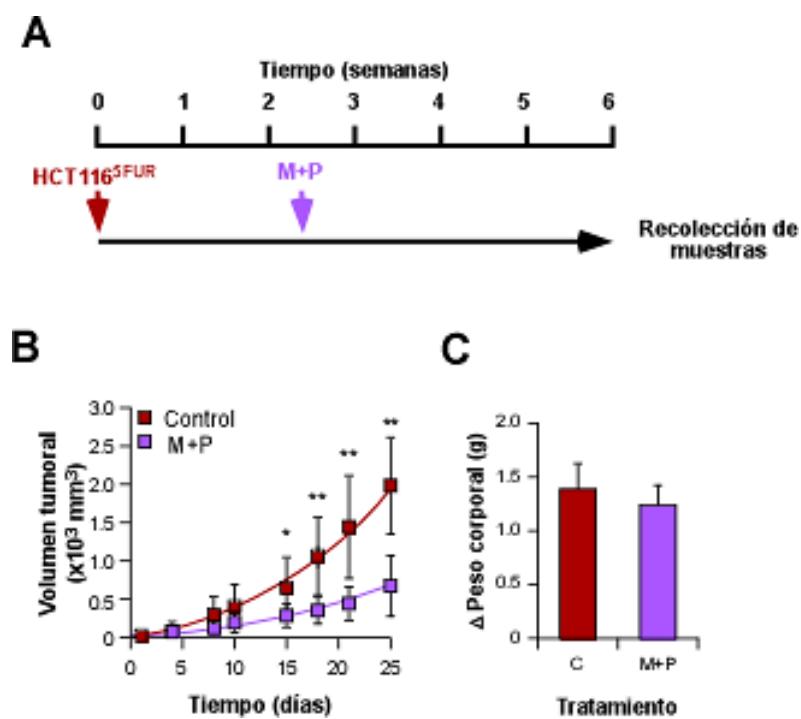


Figura 43. Modelo xenográfico HCT116^{5FU}R (A) Esquema de desarrollo de modelo xenográfico con células HCT116^{5FU}R, las células se inyectaron subcutáneamente en un modelo murino de ratones atípicos. (B) Cinética de crecimiento tumoral de células HCT116^{5FU}R ($P<0,05$ día 15). (C) Variación del peso corporal de los ratones dentro de los grupos al iniciar y finalizar el tratamiento.

Aunque no se observaron diferencias histológicas claras entre los tumores provenientes de animales control y tratados en las tinciones de H&E, el tratamiento redujo el número de individuos con micrometástasis pulmonares y con esplenomegalia (Figura 44).

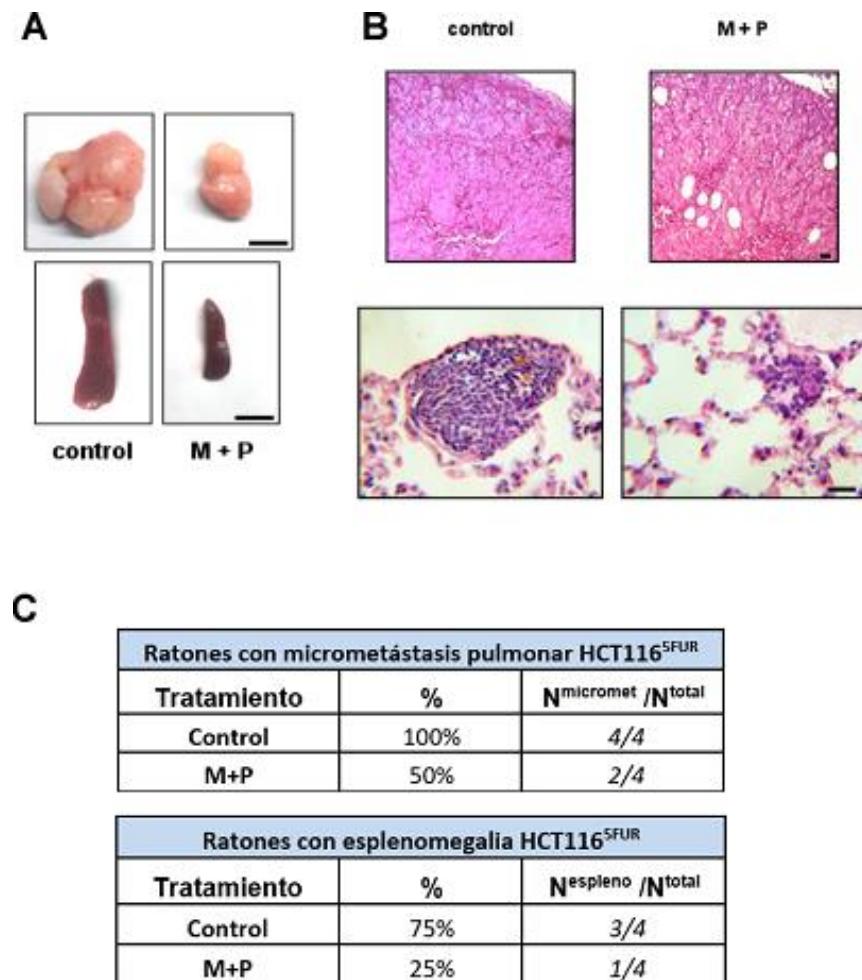


Figura 44. Micrometástasis y esplenomegalia en modelo xenográfico HCT116^{SFUR}. (A) Arriba: tumores extirpados de un ratón de grupo control y tratado. Abajo: se observa bazo con esplenomegalia extraído de un espécimen del grupo control y un bazo normal de un espécimen bajo tratamiento. (B) Superior: Fotos representativas de tejido tumoral control y tratado. Inferior: fotografía de micrometástasis pulmonares identificadas en ambos grupos. (C) Superior: Recuento de individuos con micrometástasis pulmonares. Inferior: recuento de individuos con esplenomegalia en cada grupo. %: Porcentaje de ratones con micrometástasis o esplenomegalia. N^{micromet} : nº ratones con micrometástasis pulmonares. N^{espleno} : nº ratones con esplenomegalia. N^{total} : nº ratones en el grupo experimental. Barra de magnificación: 60µm.

4.2. Repositionamiento de drogas “*in silico*”

4.2.1. Preprocesamiento

4.2.1.1. Análisis de calidad de datos de expresión génica

Con el objetivo de identificar genes diferencialmente expresados entre pacientes con y sin recurrencia tumoral luego del tratamiento adyuvante con 5-FU se descargaron de la base de datos GEO archivos en formato “.CEL” que contienen datos de expresión génica.

El primer conjunto de datos fue extraído de la serie GSE39582 que contenía un total de 585 muestras, 82 de ellas cumplieron los requerimientos para el análisis: no provenir de estudios de pacientes con poliposis familiar hereditaria y presentar información clínica asociada que detallara el tipo de quimioterapia suministrada y si existió o no recurrencia tumoral luego del tratamiento.

El segundo conjunto de datos se extrajo de la serie GSE81653, que contenía 593 muestras de las cuales 192 cumplieron con los requerimientos.

Dado que cada serie de datos procede de un experimento llevado a cabo en distintos laboratorios, fueron analizadas de manera independiente con el fin de no incorporar variabilidad al análisis. Todos los procedimientos fueron realizados utilizando distintos paquetes del entorno R/Bioconductor. Debido a que en cada experimento se utilizó un modelo de microarray distinto (“Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array” para la serie GSE39582 y “Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array” para la serie GSE81653) se emplearon los paquetes “Affy” y “Oligo” respectivamente, que el fabricante recomienda para introducir los datos al entorno R.

Para explorar la calidad de los microarrays de cada serie de datos se utilizó el paquete “arrayQualityMetrics” que permite realizar una serie de gráficos diagnósticos y elabora de forma automática una tabla que detalla qué muestras podrían considerarse como “outliers” (**Tabla X y XI, Anexo**). El paquete también genera gráficos de distancias de falso color entre las muestras que indicaron que los datos crudos no presentaban un agrupamiento claro en base al fenotipo antes del análisis (**Figura 45**), esto es común en los experimentos de microarray debido a la alta heterogeneidad de los datos de expresión.

En base al resultado del análisis de calidad, los mapas de distancias entre las muestras y la capacidad de procesamiento del servidor disponible para el análisis se seleccionaron 65 muestras de las 82 inicialmente identificadas para la serie GSE39582 (42 recurrentes y 23 no recurrentes) y 83 muestras de las 192 inicialmente identificadas para la serie GSE81653 (32 recurrentes y 51 no recurrentes).

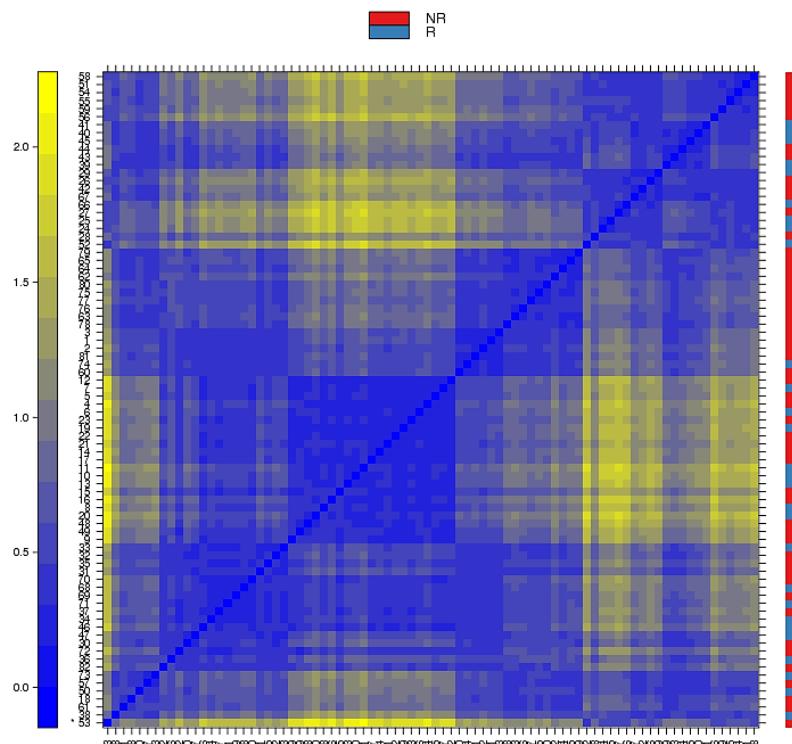
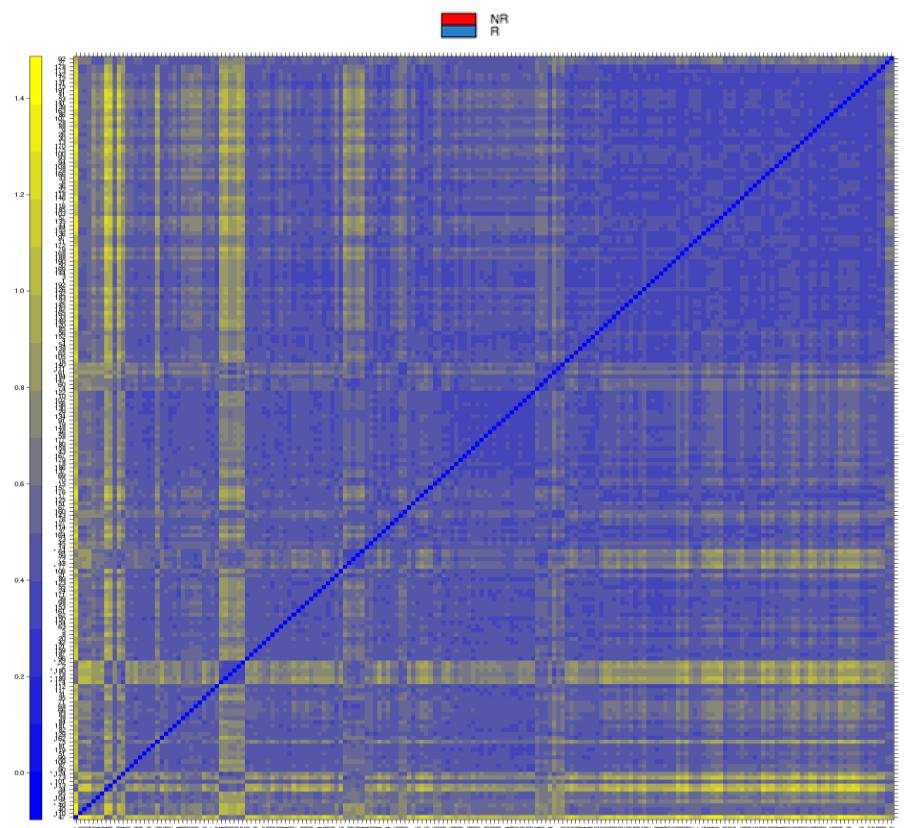
A**B**

Figura 45. Mapa de calor de color falso que representa las distancias entre matrices de expresión de la serie de datos GSE39582 (A) y GSE81653 (B). La escala de color se genera con el fin de cubrir el rango de distancias encontradas en el conjunto de datos. Los patrones en este gráfico pueden indicar la agrupación de las matrices, ya sea debido a factores experimentales biológicos o no intencionales (efectos por lotes). La distancia d_{ab} entre dos matrices a y b se calcula como la diferencia absoluta media entre los datos de las matrices (utilizando los datos de todas las sondas sin filtrado). Se utiliza la fórmula, $d_{ab} = \text{media } |M_{ai} - M_{bi}|$, donde M_{ai} es el valor de la sonda i-ésima en la matriz a-ésima. La detección de valores atípicos se realizó buscando matrices para las cuales la suma de las distancias a todas las demás matrices, $S_a = \sum_b d_{ab}$ era excepcionalmente grande. NR= no recurrente. R=recurrente.

4.2.1.2. Normalización

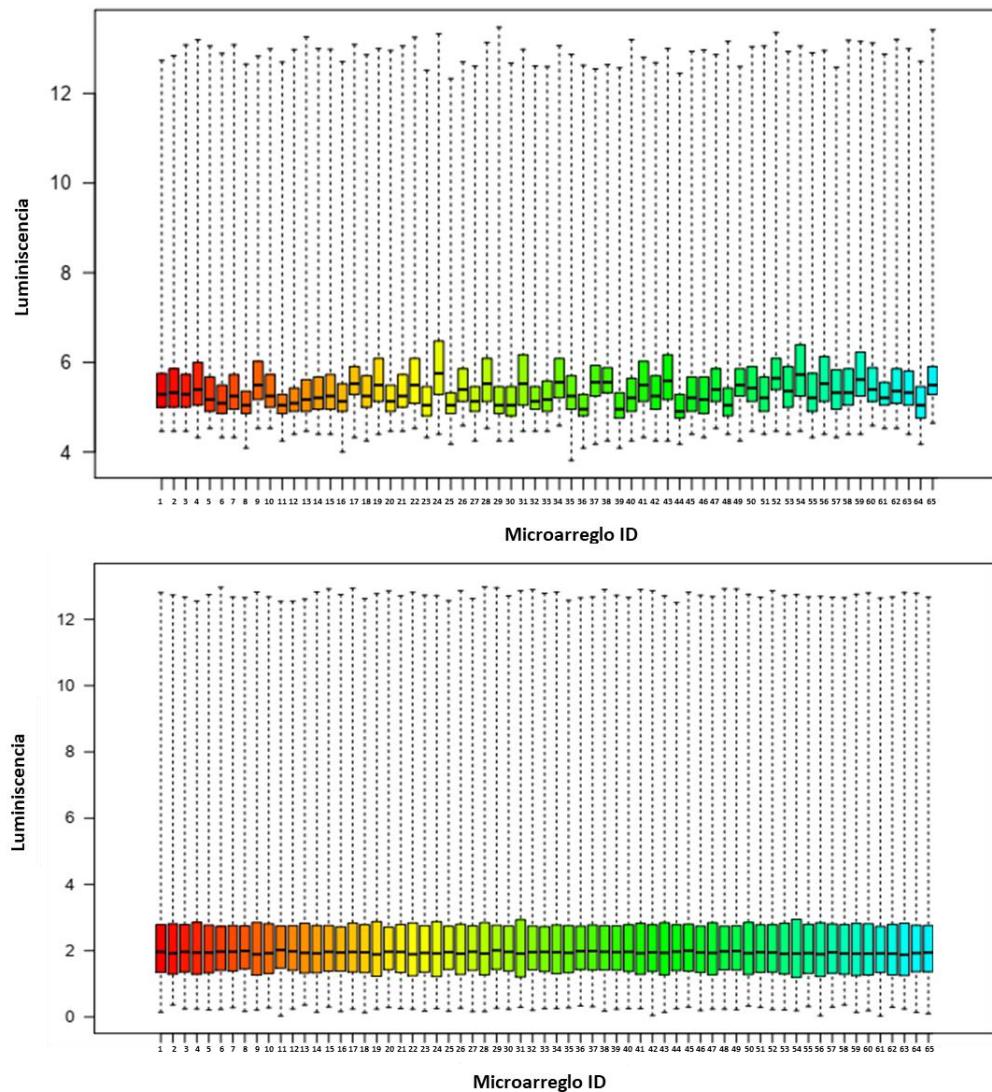
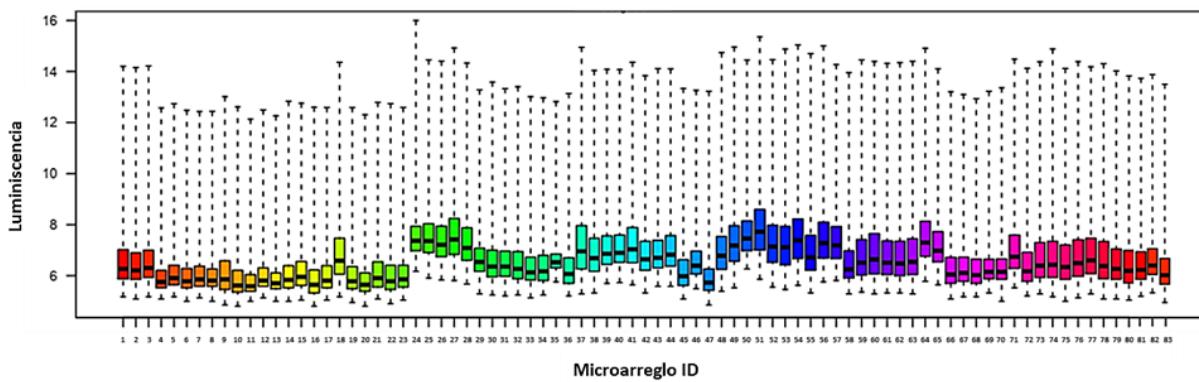
La normalización permite identificar y eliminar errores sistemáticos que no se deban a diferencias reales entre el ARNm de los distintos grupos de tejidos. El objetivo del proceso fue igualar la distribución de los datos para hacerlos comparables. En este análisis se utilizó el método de normalización por cuantiles recomendado por el fabricante para cada modelo de chip, en ambos casos consistió en la aplicación del método Promedio Robusto de Matriz Múltiple o RMA (del inglés “*Robust Multi-array Average*”), en el caso del chip GSE39582 se aplicó una variante de RMA llamada gc-RMA que utiliza un conjunto de sondas especiales para ajustar las afinidades de hibridación entre la sonda y la secuencia objetivo que permite obtener valores de expresión más precisos.

Se generaron gráficos de caja para visualizar el resultado del proceso de normalización, en los que se aprecia la distribución de las intensidades dentro de cada muestra antes y después de la normalización (**Figura 46**). La disposición de los valores luego de la normalización indicó que las muestras seleccionadas adoptaron distribuciones similares en ambas series sin necesidad de eliminar del análisis muestras adicionales.

4.2.1.3. Filtro en base a la intensidad

Como parte del proceso de normalización se realizó la anotación y summarización de las sondas que representaban un mismo gen a través del cálculo de la media de su expresión. Comúnmente, los datos de microarreglos pueden exponer genes con una intensidad de expresión similar al rango de intensidad de fondo. Estos genes además no cambian mucho entre las matrices. Por tanto, combinan una varianza baja con una intensidad baja. Así, podrían acabar detectándose como diferencialmente expresados, aunque apenas superen el límite de “detección” y no sean muy informativos en general. Para estudiar la presencia de genes con baja intensidad entre los grupos se calcularon las medianas por filas, es decir por genes, a partir de los datos de expresión (que representan las medianas de la transcripción). A partir de estos datos se creó un histograma de las medianas de las intensidades (**Figura 47**). La detección de este tipo de genes se efectúa a través de la visualización de un enriquecimiento de las medianas bajas en el lado izquierdo de la distribución de intensidades. En este análisis los histogramas indicaron la presencia de una gran cantidad de genes con intensidad cercana a cero. Para descartar estos genes se estableció un umbral de expresión mínimo de 1,5. La elección del umbral de expresión intenta descartar la mínima cantidad de genes posibles del análisis y

a la vez reducir al máximo el ruido de los genes con baja expresión y varianza entre los grupos experimentales en el análisis estadístico.

A**B**

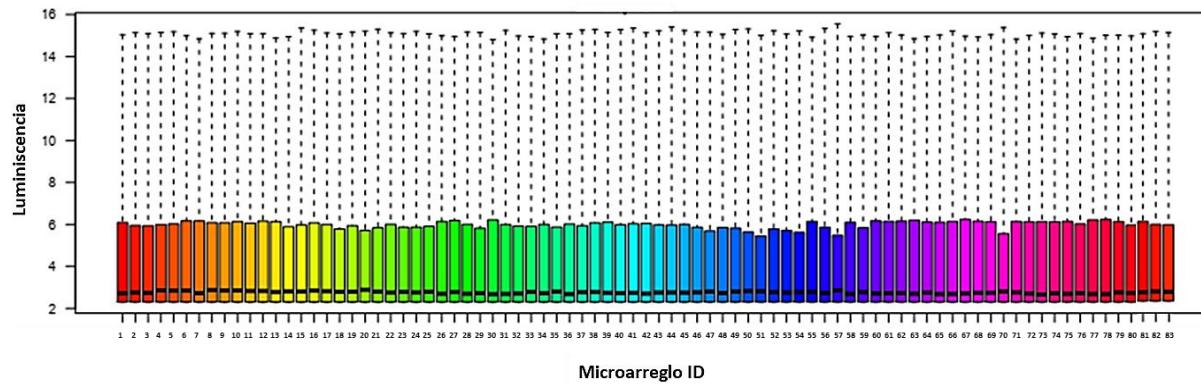
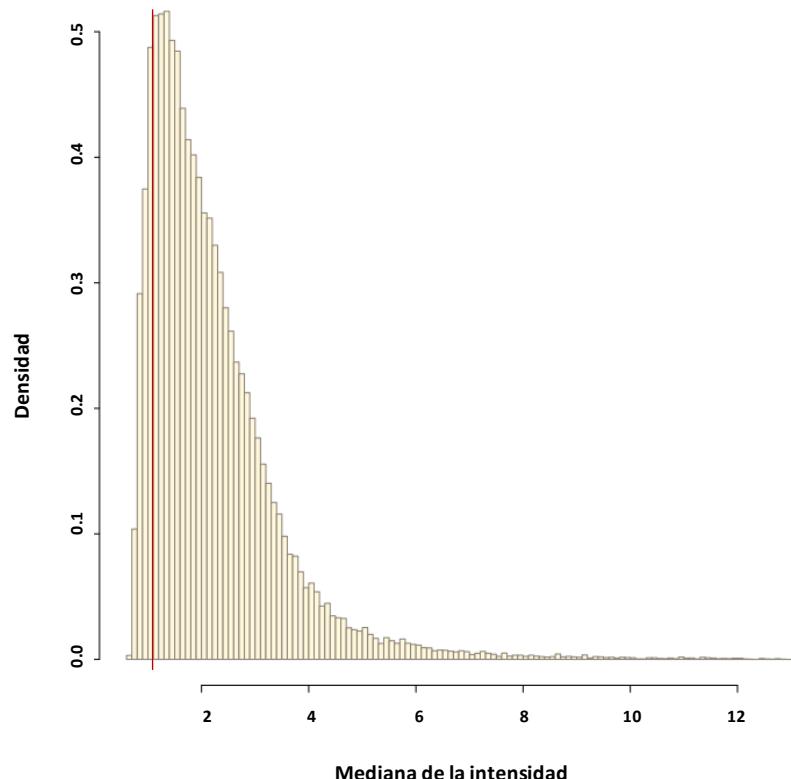


Figura 46. Normalización de la serie GSE39582 (A) y GSE81653 (B). En ambos casos el grafico superior corresponde a la distribución de las intensidades dentro de cada microarreglo antes de la normalización, el grafico inferior corresponde a los mismos valores luego de aplicar el método RMA. Los diagramas de cajas representan resúmenes de las distribuciones de intensidad de señal de las matrices. Cada cuadro corresponde a una matriz. Normalmente, se espera que las cajas tengan posiciones y anchos similares. Si la distribución de una matriz luego de la normalización es muy diferente a las demás, esto puede indicar un problema experimental. Los valores representados corresponden a la media y la desviacion estandar de los \log_2 de los valores de las intensidades.

A

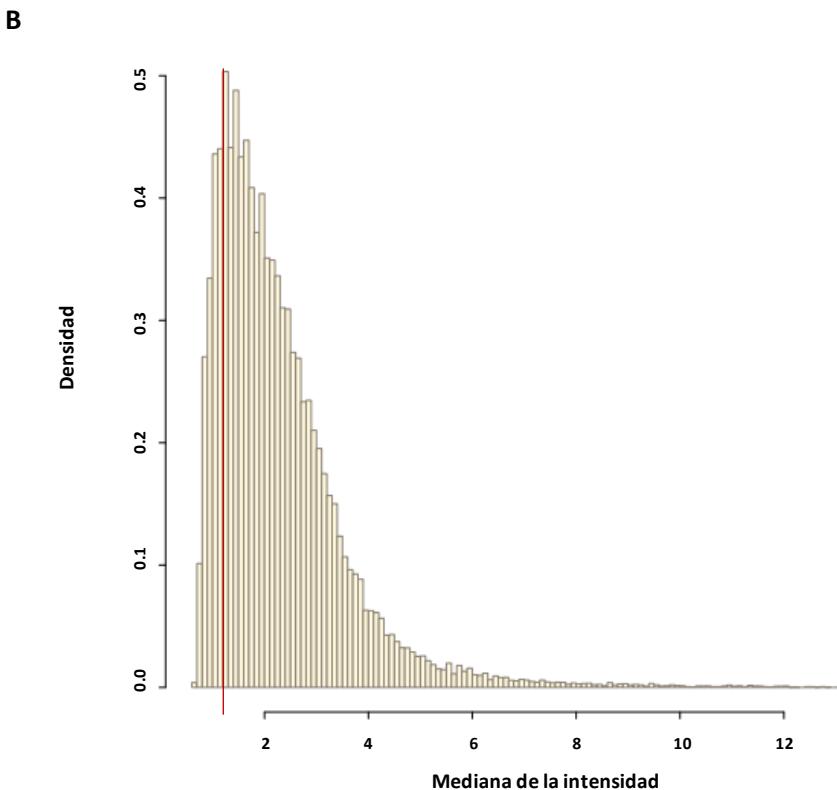


Figura 47. Histograma de las medianas de las intensidades de expresión para la serie GSE39582 (A) y GSE81653 (B). La línea roja indica el umbral de expresión mínima, las sondas ubicadas a la izquierda de la línea fueron descartadas del análisis.

4.2.2. Análisis estadístico

Para obtener una lista de genes diferencialmente expresados se utilizaron métodos estadísticos con diferente robustez. Dos métodos exploratorios: veces de cambio (FC) y proporción inusual (UR), y dos pruebas de hipótesis no paramétricas: RankProd (RP) y el análisis de significancia de microarreglos (SAM). Las pruebas se aplicaron de forma independiente a cada conjunto de datos.

Para seleccionar genes por veces de cambio se consideraron aquellos genes que se expresaron al menos 1,5 veces más (o menos) en el fenotipo recurrente con respecto al no recurrente. El análisis identificó un total de 447 genes sobreexpresados y 677 genes subexpresados para las muestras seleccionadas de la serie de datos GSE39582 y 318 genes sobreexpresados y 193 genes subexpresados para las muestras seleccionadas de la serie de datos GSE81653. Para visualizar los resultados se generaron gráficos Scatter (**Figura 48**).

La detección por proporción inusual detecta aquellos genes cuya proporción de valores control-experimento se encuentra a una distancia seleccionada arbitrariamente de la proporción media de valores control-experimento, habitualmente esta distancia se fija en ± 2 la desviación estándar. Para

usar este método se deben transformar los valores de FC en valores logarítmicos: log2 (media del experimento/media del

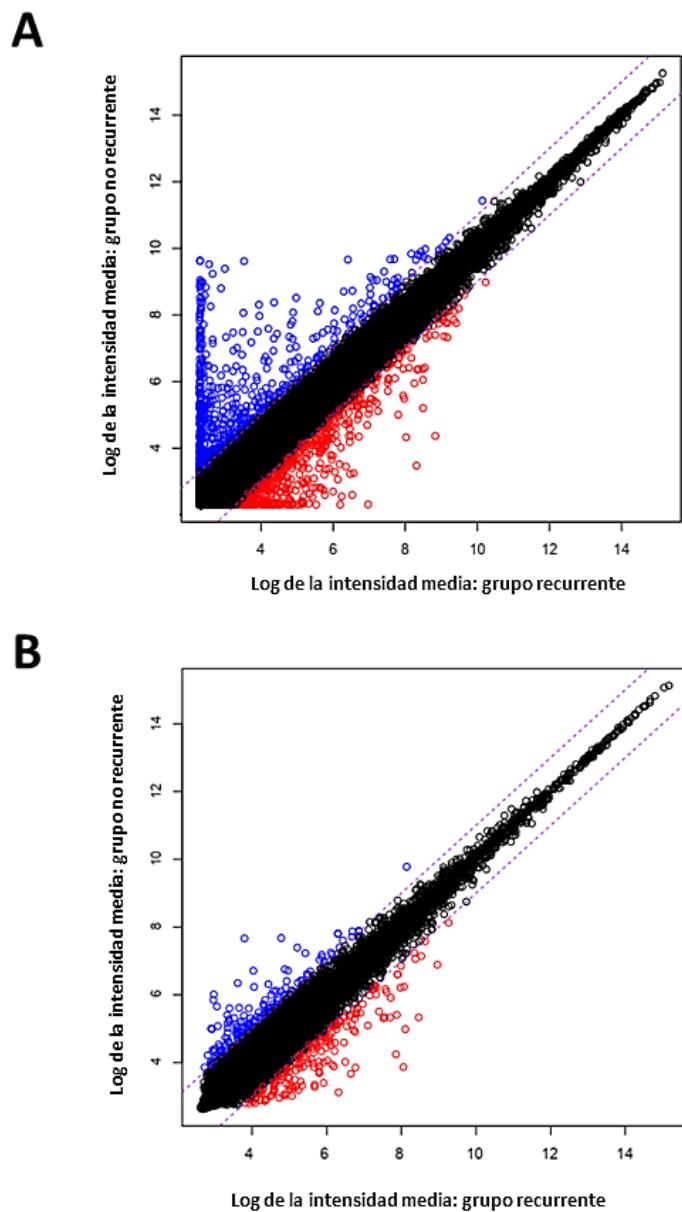


Figura 48. Scatter plot de valores logarítmicos del FC para las series GSE39582 (A) y GSE81653 (B). Un scatter plot es un gráfico de dispersión que muestra los genes sobreexpresados (puntos rojos) y subexpresados (puntos azules) en los pacientes con recurrencia tumoral con respecto a los sin recurrencia tumoral. El grafico filtra los genes con valores de cambio inferior y superior a 1,5 (líneas puntuadas).

control), en lugar de los valores de FC sin procesar. Esto se debe a que la distribución del FC sin procesar suele estar sesgada hacia la derecha. Una transformación logarítmica normalmente corrige la distribución. En la **Figura 49** puede verse el resultado de la trasformación logarítmica de los valores

de FC donde se visualiza la corrección de la distribución. Mediante este método se identificaron 6622 genes con un UR amentado y 3482 con un UR disminuido en las muestras seleccionadas de la serie de datos GSE81653; y 3414 genes con una UR aumentado y 3130 genes con un UR disminuido en muestras seleccionadas de la serie de datos GSE39582.

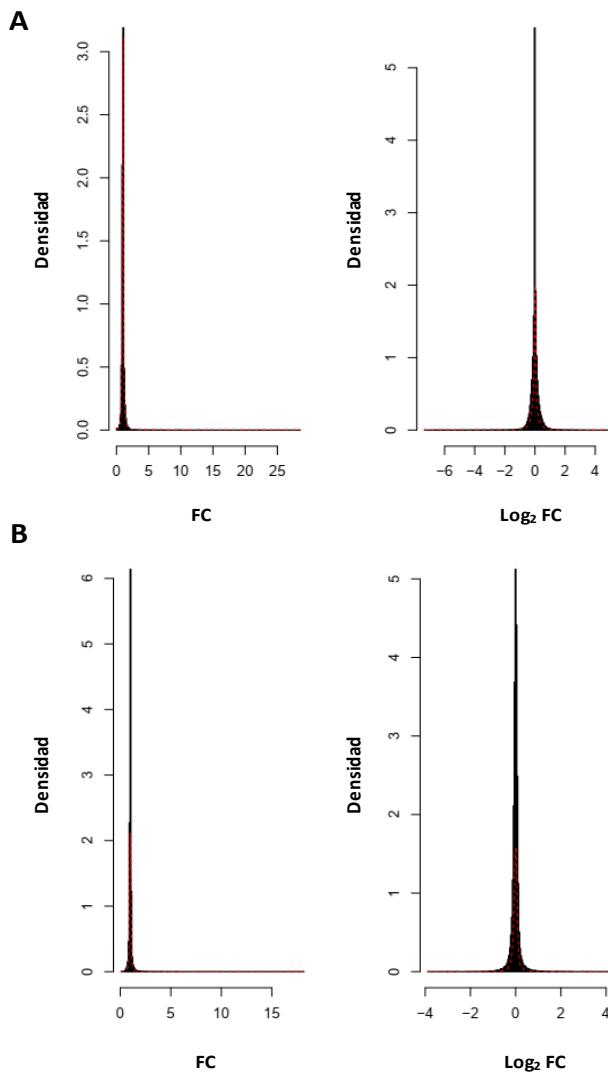


Figura 49. Transformación logarítmica de la distribución del FC en las series las series GSE39582 (A) y GSE81653 (B). Panel izquierdo: datos antes de la transformación. Panel derecho: datos después de la transformación. La simetría de la distribución luego de la transformación logarítmica es un indicador de buena calidad de datos.

Los últimos dos métodos para seleccionar candidatos DEG's fueron las pruebas estadísticas RP y SAM, en ambos casos los log₂ de los valores de expresión resultantes del preprocesamiento fueron analizados por el paquete del método correspondiente. Los conjuntos de genes que presentaron |log₂FC| > 1 y Tasa de Falsos Positivos (FDR) < 0,01 se consideraron sobreexpresados o subexpresados dependiendo del signo del log₂-FC.

El paquete RP identificó 1649 posibles genes sobreexpresados y 409 posibles genes subexpresados en la serie GSE39582. Mientras que en la serie GSE81653 se identificaron 4266 posibles genes sobreexpresados y 1287 posibles genes subexpresados (**Figura 50**).

El método SAM identificó 276 genes sobreexpresados en el fenotipo recurrente, pero no detectó ningún gen subexpresado en la serie GSE39582 (delta= 1.8). Por otro lado, en la serie GSE81653 identificó un total de 470 genes sobreexpresados y 745 subexpresados (delta=0) (**Figura 51**).

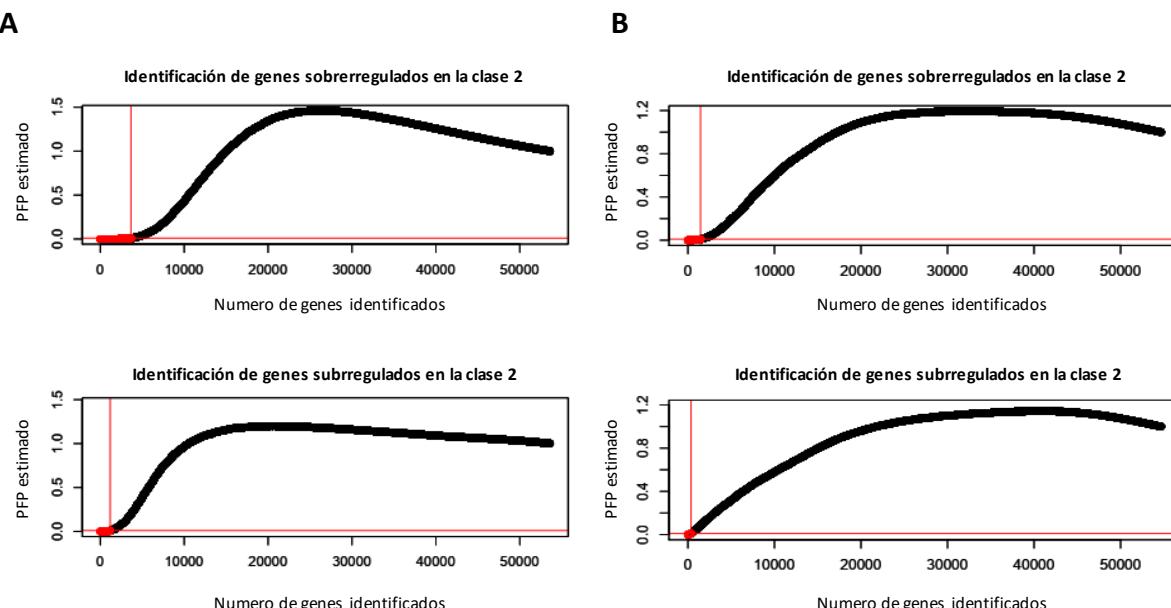


Figura 50. Gráfico de porcentaje de predicción falsa versus número de genes identificados para las series GSE39582 (A) y GSE81653 (B) según el método RP. En rojo se indica el número de genes con porcentaje de predicción falsa (pfp) inferior a 0,01 que fueron identificados como sobreexpresados (panel izquierdo) o subexpresados (panel derecho) en la condición recurrente.

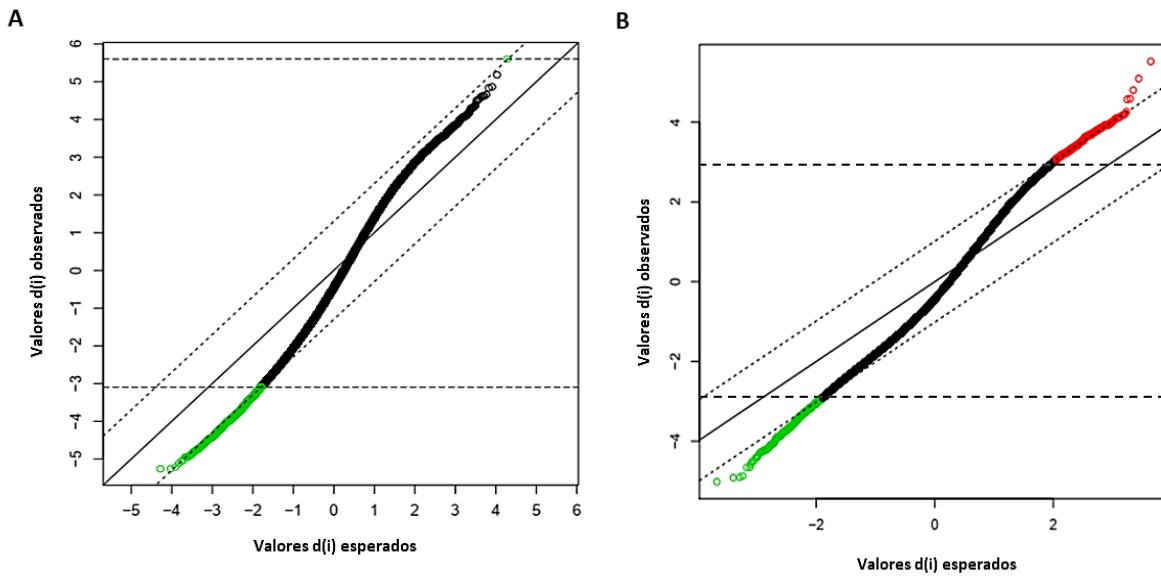


Figura 51. Gráfico SAM de umbral de significación con respecto al valor Δ para las series GSE39582 (A) y GSE81653 (B). Los genes coloreados tienen una diferencia mayor que el Δ elegido ($\Delta=1,8$ para A y $\Delta=0$ para B; $fc=1,5$) entre el valor d_i observado y el valor d_i esperado. El verde y el rojo indican regulación alta y baja, respectivamente.

Para sintetizar los resultados se generó un diagrama de ven utilizando el paquete gráfico “VennDiagram” (Figura 52).

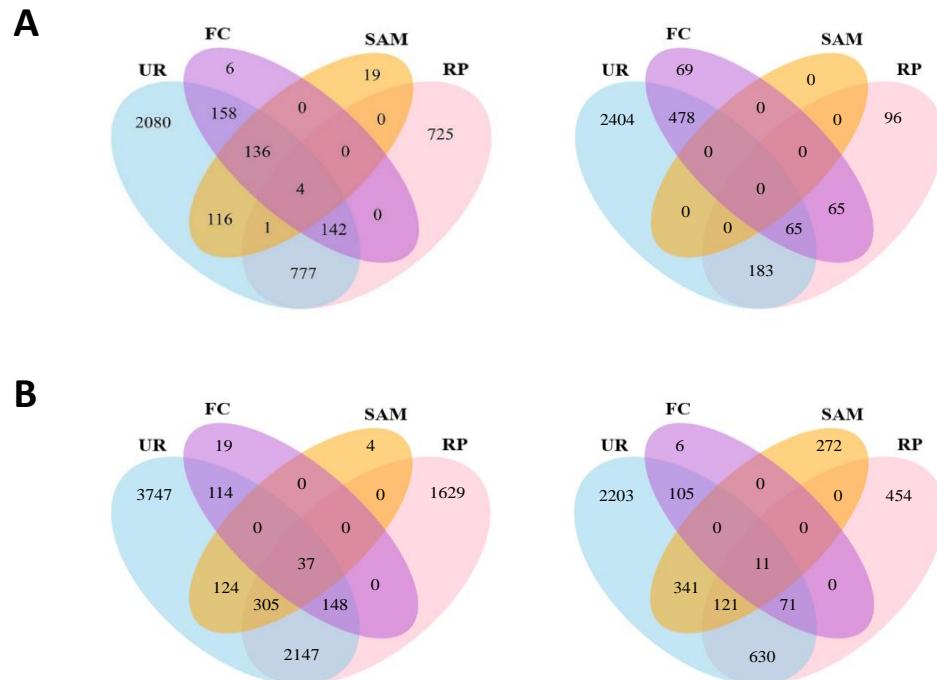


Figura 52. Diagramas de Venn de genes comunes identificados mediante los cuatro métodos estadísticos utilizados para las series GSE39582 (A) y GSE81653 (B). Los números dentro de cada intersección indican la cantidad de genes que fueron detectados como sobreexpresados (izquierda) o subexpresados(derecha) por dos o más métodos. UR: proporción inusual; FC: veces de cambio; SAM: análisis de significancia de microarreglos; RP: RankProd

Finalmente se compararon las listas de DEG's obtenidas para cada serie de datos y se extrajeron aquellos comunes en ambos estudios detectados mediante uno o más métodos. Se recataron 484 genes detectados como sobreexpresados y 79 genes detectados como subexpresados (**Tabla XII y XIII**, sección **Anexo**).

4.2.2. Análisis funcional

Se evaluaron las principales rutas que podrían estar implicadas en el desarrollo de resistencia a 5-FU utilizando el paquete “ReactomePA” y herramienta Phanter de la base de datos GenOntology (GO). Los genes identificados se asociaron a términos que representan categorías funcionales.

Los resultados de la base de datos Reactome indicaron que las tres principales vías sobreerreguladas se asociaron a la ruta de señalización mediada por Rho GTPasas, sus efectores y activadores. Mientras que entre las vías subrreguladas se encontraron receptores de citoquinas, receptores de unión a ligandos peptídicos y otras vías asociadas a la respuesta inmune (**Figura 53**). Para representar los resultados se utilizaron comandos del paquete “ReactomePA” con los que se generaron dos tipos de gráficas. Por un lado, se visualizaron los genes con mayor probabilidad de asociación a las vías Rho GTPasas a través de un gráfico “cnplot” y por el otro se observaron las relaciones entre los términos más frecuentes en la lista de genes a través de un mapa de enriquecimiento (**Figura 54 y 55**).

Por otro lado, la base de datos GO clasificó a la mayoría de los genes sobreexpresados detectados dentro de las categorías “procesos biológicos” (BP), “funciones moleculares” (MF) y “rutas”. Los términos nivel 1 de la categoría BP relacionados a los genes sobreexpresados incluyeron procesos celulares, regulación biológica y procesos metabólicos. En la categoría rutas, sobresalieron vías relacionadas a la respuesta inmune, como la vía de señalización de citoquinas y quimioquinas y otras como la vía de receptores de gonadotropina y la vía Wnt/β-catenina. La función molecular de la mayoría de los genes sobreexpresados se asoció a uniones (**Figura 56**).

Los genes subexpresados fueron clasificados dentro de las categorías BP y MF. Dentro de los BP los términos más frecuentes fueron procesos celulares, regulación biológica, metabolismo celular y respuesta a estímulos. Las funciones moleculares al igual que en caso de los genes sobreexpresados se relacionaron al término “unión” (**Figura 57**).

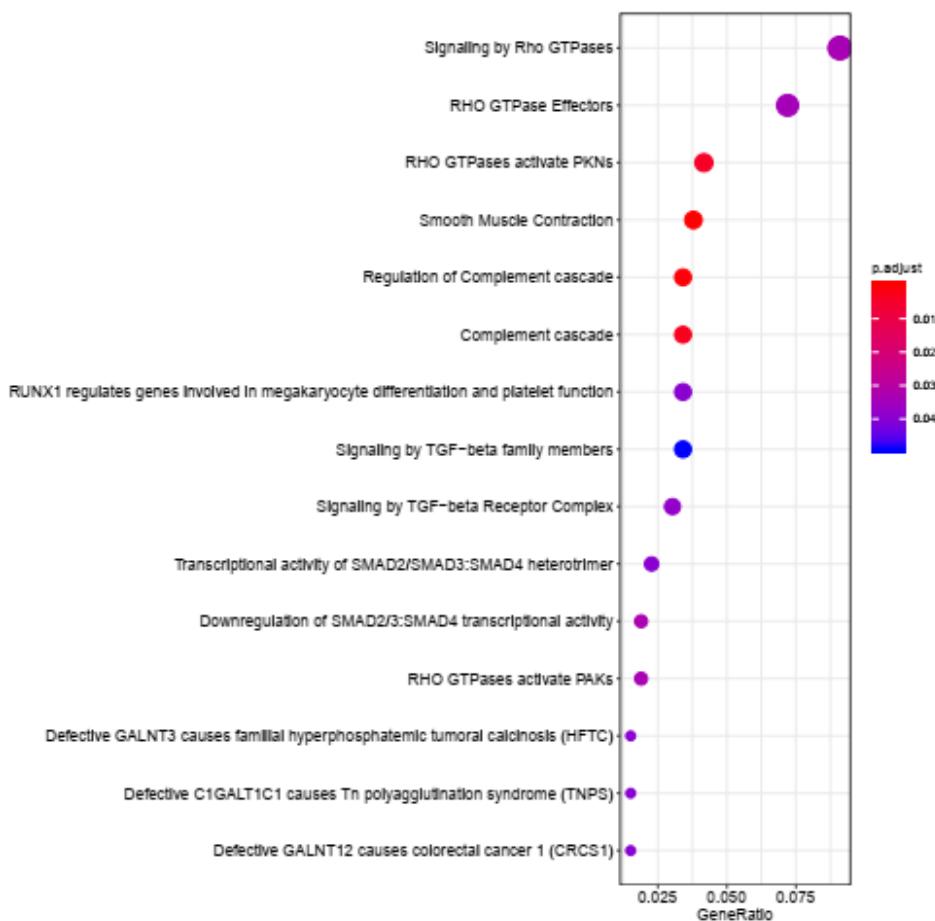
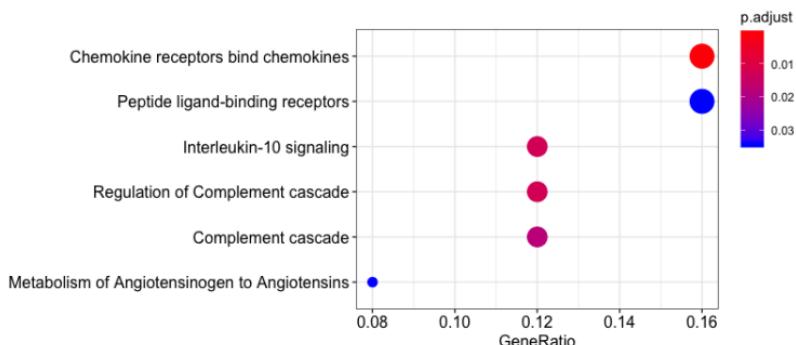
A**B**

Figura 53. Clasificación funcional de genes sobreexpresados (A) y subexpresados (B) según la base de datos Reactome. El tamaño de los puntos se asocia con la cantidad de genes asociados a un término. El color de los puntos indica el valor p ajustado resultante del análisis de sobrerrepresentación (ORA). Rojo: valores p ajustados más significativos se relacionan con una mayor probabilidad de que ese término se relacione con los genes de la lista. Azul: valores p ajustados menos significativos indican una menor probabilidad de relación. En el gráfico se muestran solo los términos significativos ($p<0,05$).

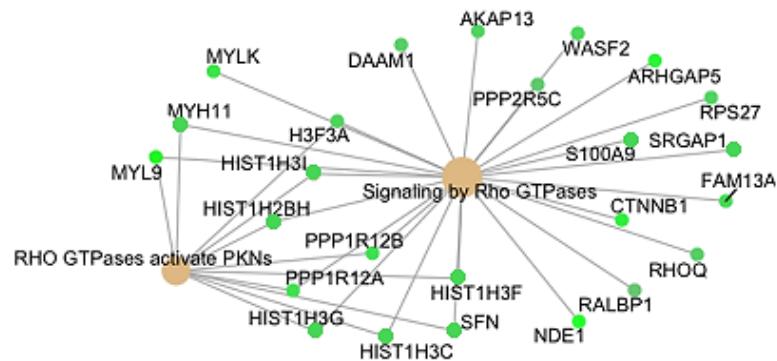


Figura 54. Cnplot de la vía Rho GTPasas. El gráfico muestra los genes de la lista con mayor probabilidad de asociación al término enriquecido.

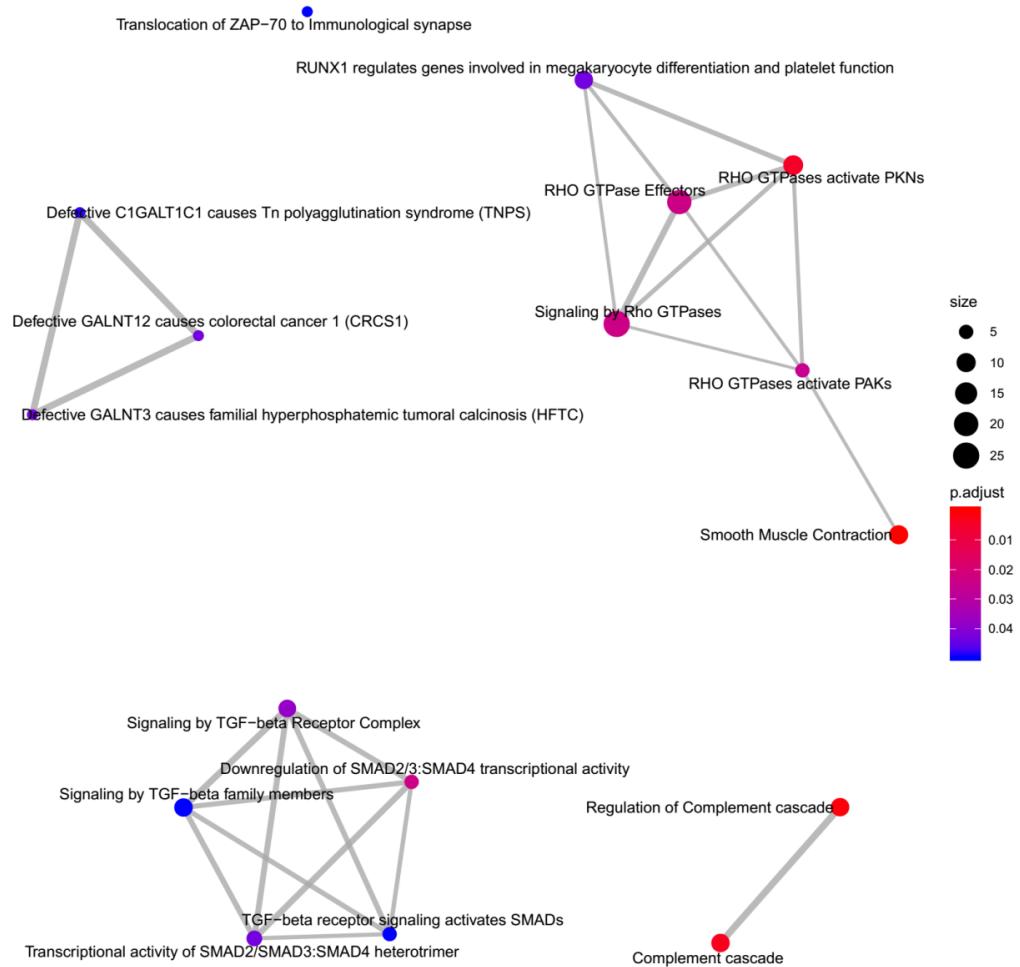


Figura 55. Mapa de enriquecimiento funcional. Se muestran las relaciones entre las vías enriquecidas en el análisis, tanto sub como sobreexpresadas.

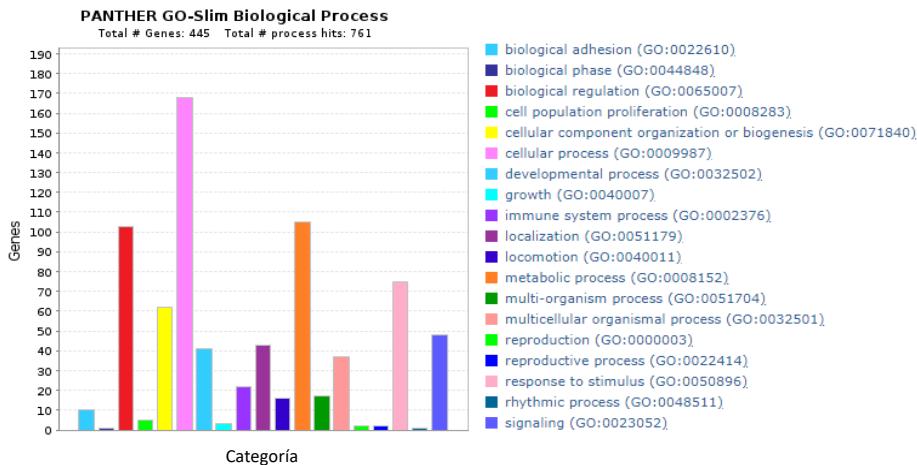
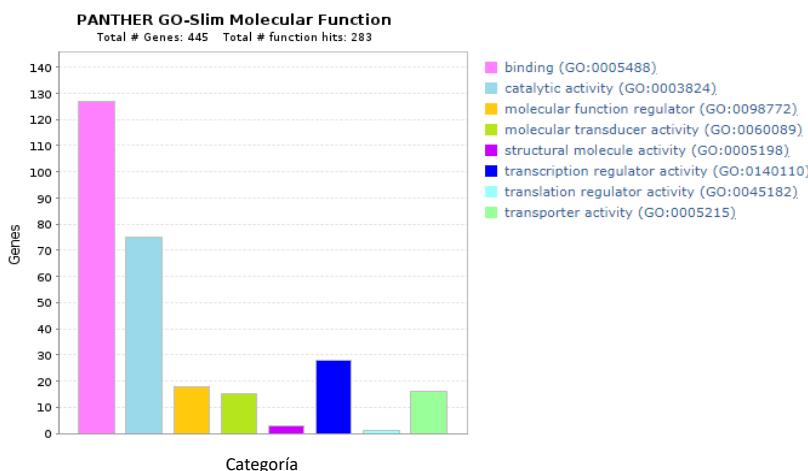
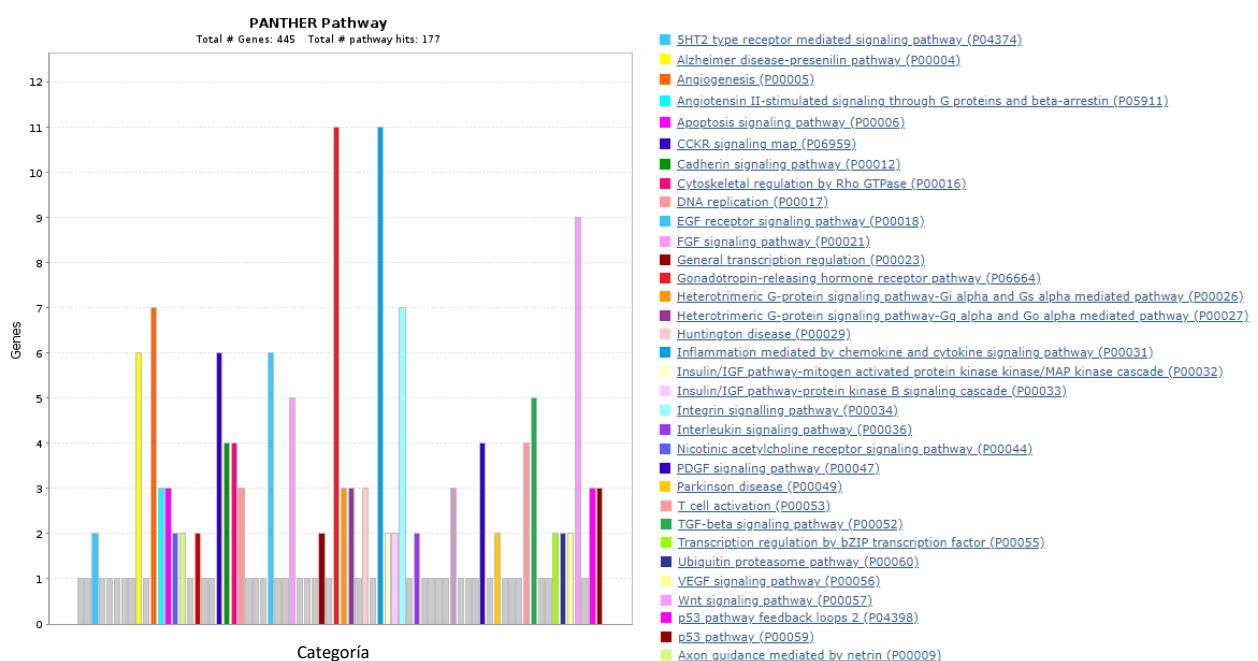
A**B****C**

Figura 56. Clasificación funcional de genes sobreexpresados según la base de datos GO. (A) Clasificación dentro de la categoría “*Biological Process*”. (B) Clasificación dentro de la categoría “*Molecular Function*”. (C) Clasificación dentro de la categoría “*Pathways*”. “Category”: Categorías funcionales. “Genes”: número de genes asociados al término.

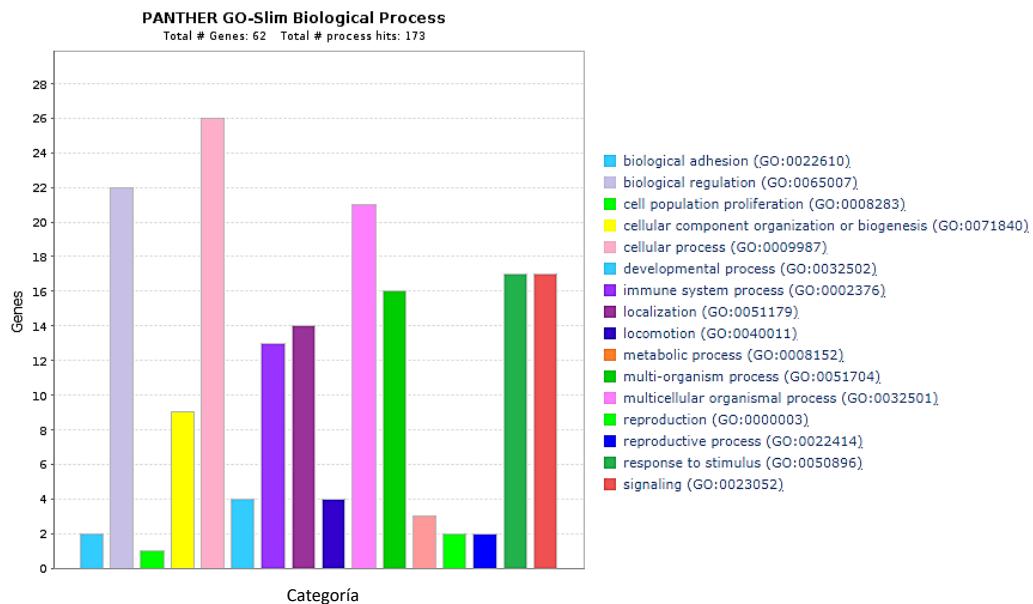
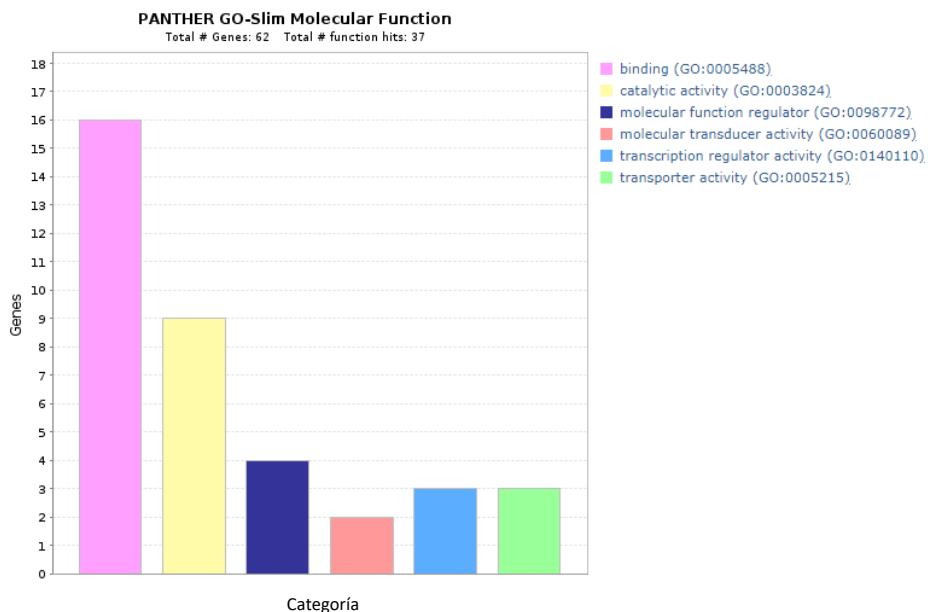
A**B**

Figura 57. Clasificación funcional de genes subexpresados según la base de datos GO. (A) Clasificación dentro de la categoría “*Molecular Functions*”. (B) Clasificación dentro de la categoría “*Biological Process*”. Para ambos casos se muestran los términos GO nivel 1.

4.2.3. Búsqueda de compuestos que revierten el perfil de expresión

Con el fin de identificar compuestos que reviertan el perfil de expresión observado se utilizó la herramienta “Query” de la plataforma CLUE. Para realizar el análisis solo pueden ser introducidos 150 genes sobreexpresados y 150 genes subexpresados. Dado que el número de genes subexpresados detectado fue menor a 150 se consideraron todos ellos. Para el caso de los más de 400 genes sobreexpresados se conservaron aquellos genes detectados como DEG's por dos o más métodos simultáneamente en ambos estudios y aquellos asociados a las vías sobrerepresentadas en el análisis funcional. Los genes seleccionados para el análisis se detallan en la **Tabla XIV (Anexo)**.

La plataforma detectó perfiles de expresión similares al introducido en 9 líneas celulares: A375, A549, AH1E, HCC515, HEPG2, HT29, MCF7, PC3 y VCAP. Como la línea HT29 es una línea de CCR se consideraron los compuestos que puedan tener un efecto sobre ésta.

Entre los compuestos detectados en la base de datos, fármacos ya utilizados para el tratamiento de cáncer resistente a otras quimioterapias, como el irinotecán y el topotecan mostraron una alta puntuación LINCS como posibles reversores del perfil de expresión. También aparecieron en posiciones altas otros compuestos que no son utilizados en cáncer como por ejemplo RO-04-5595 (un antagonista de los receptores de glutamato), Y-134 (un agonista de los receptores de estrógeno) y bisindolilmaleimida (un inhibidor de PKC) (**Figura 58**).

Por último, la base de datos permite extraer los principales tipos de perturbaciones asociadas a la generación o reversión del perfil de expresión ingresado, ya sea el uso de un determinado tipo de fármaco o la pérdida o ganancia de función de determinadas vías. En la **Figura 59** se detallan las clases de perturbaciones asociadas a la reversión del perfil con altas puntuaciones LINCS. Entre estas se destacan la perdida de función de las proteínas activadores de las Rho GTPasas, la perdida de función de las vías Wnt y NFkB y la inhibición de PKC.



Figura 58. Fármacos con una alta puntuación de reversión (entre -90 y -99) del perfil de expresión asociado a resistencia a 5-FU en la línea celular HT29 de acuerdo a la base de datos LINCS. En la esquina izquierda se muestran las 9 líneas celulares en las que se identificaron perfiles similares. La columna “name” detalla el nombre de los fármacos que emparejaron con el perfil de expresión reverso al ingresado. La escala de color indica el nivel con el que el fármaco es capaz de inducir o revertir el perfil en la línea celular, el azul indica mayor capacidad de reversión, el rojo mayor capacidad de inducción, el gradiente de color representa niveles intermedios.

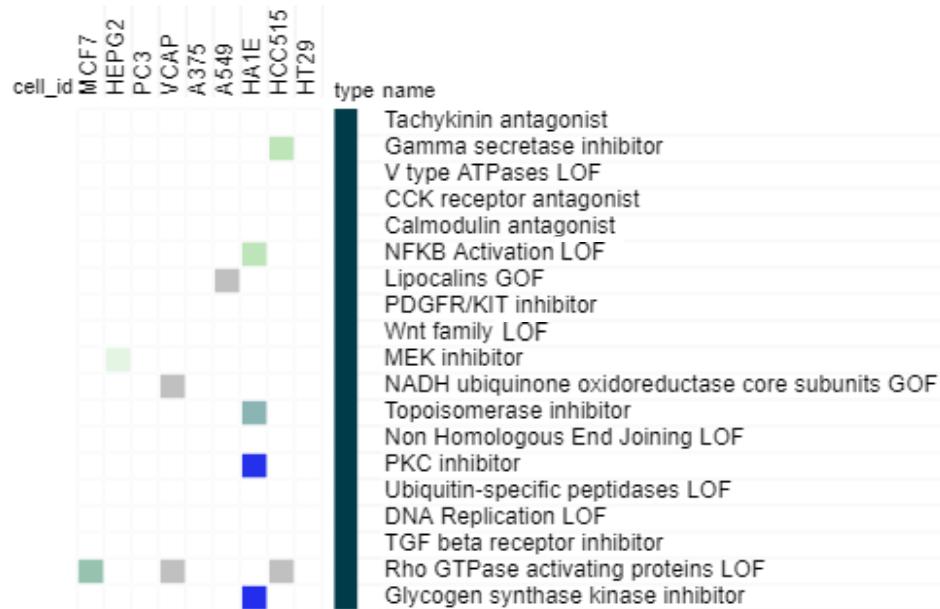


Figura 59. Clases de perturbaciones (Cmap class) con mayor puntuación de reversión (90-40%) del perfil de expresión asociado a resistencia a 5-FU en la línea celular HT29 de acuerdo a la base de datos LINCS. La escala de color indica el nivel con el que la perturbación es capaz de inducir o revertir el perfil en la línea celular, el azul indica mayor capacidad de reversión, el rojo mayor capacidad de inducción, el gradiente de color representa niveles intermedios. GOF: “*gain of function*”; LOF: “*loss of function*”

5.Discusión

Aunque que se han producido grandes avances en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer, éste continúa siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. Durante los últimos treinta años los cánceres de pulmón, mama, colon y próstata se han mantenido dentro del grupo de neoplasias con mayores niveles de mortalidad en el mundo [34]. Además, en la última década, se ha observado un decaimiento en la edad en que se diagnostican ciertos tipos de cánceres, entre ellos el CCR [188]. Se cree que este decaimiento se relaciona con el estrés, el sedentarismo y la alimentación relacionados a los hábitos de vida modernos. Se estima que en el año 2030 habrá más de 2,2 millones de casos de CCR y 1,1 millones de muertes por cáncer en todo el mundo [35].

Las quimioterapias tradicionales para el tratamiento de CCR involucran el uso de drogas citotóxicas. Los regímenes de quimioterapia habituales que se utilizan en la clínica incluyen FOLFOX (5-FU/leucovorina/oxaliplatino), FOLFIRI (5-FU/leucovorina/irinotecán), CAPOX (capecitabina/oxaliplatino) y FOLFOXIRI (5-FU/leucovorina/oxaliplatino/irinotecán) [56]. Los mecanismos precisos que contribuyen al efecto citotóxico son distintos para los diferentes agentes quimioterapéuticos. Generalmente, actúan alterando la replicación, transcripción y reparación del ADN, promoviendo así la muerte celular [56]. Sin embargo, estas terapias afectan la maquinaria replicativa de todas las células del cuerpo de manera inespecífica, lo que produce una serie de efectos secundarios indeseables para el paciente como náuseas, vómitos, pérdida de peso, caída del cabello y riesgo de complicaciones infecciosas debido a la inmunosupresión. En los últimos años se están desarrollando nuevas terapias, principalmente desde el campo de la inmunología; si bien han dado buenos resultados, muchas de ellas no son aplicables al tratamiento de pacientes con ciertos trasfondos genéticos.

El desarrollo de terapias alternativas, menos invasivas y más seguras se ha convertido entonces en un tópico esencial en la lucha contra el cáncer. No obstante, desarrollar nuevos fármacos para tratar enfermedades es un proceso largo y altamente costoso. Muchos países, especialmente los países de bajo y mediano desarrollo, no son capaces de costear estos procesos [65]. En consecuencia, están surgiendo nuevas estrategias, como el reposicionamiento de drogas que se basa en la idea de encontrar nuevos usos a fármacos conocidos y que ya son usados para tratar otras enfermedades por lo que se conocen sus niveles de toxicidad, las dosis óptimas y su farmacocinética [62]. Para proponer la reutilización de un fármaco en una nueva patología, a menudo se sigue el siguiente algoritmo: (1) identificación de posibles fármacos candidatos, (2) investigación mecanicista en modelos preclínicos y (3) evaluación de seguridad y eficacia en ensayos clínicos. El primer paso es la parte más crítica y generalmente se logra mediante diferentes enfoques sistemáticos. Los enfoques experimentales implican una primera etapa de análisis observacionales y epidemiológicos donde se proponen una serie de hipótesis en base a la observación, por ejemplo, una menor incidencia de una enfermedad en un grupo de pacientes bajo determinado tratamiento. Enfoques más modernos incluyen el uso de herramientas computacionales en los se realizan análisis de datos a gran escala, incluida la asociación genética, la reversión de perfiles de expresión y el análisis clínico retrospectivo [189].

En al año 1920, Warburg reportó que las células tumorales tenían una particularidad muy interesante. Contrariamente a los que se esperaba, su principal mecanismo para obtener energía no era la fosforilación oxidativa sino la fermentación. En base a estas observaciones Warbug propuso

que las células tumorales sufren una “reprogramación metabólica”. Décadas más tarde, cuando se lograron caracterizar las funciones de los oncogenes y genes supresores de tumores, se encontró que, si bien no de manera directa, la mayoría de ellos desencadenaban procesos que acababan con la modificación del metabolismo celular, permitiendo a las células tumorales evadir respuestas inmunes, sobrevivir a ambientes altamente hipóticos y desarrollar resistencia a muchos tratamientos crónicos. El metabolismo celular se convirtió entonces en un potencial objetivo para abordar el desarrollo de nuevos tratamientos. Actualmente se están probando en ensayos *in vitro* e *in vivo* un gran número de compuestos que inhiben ciertas rutas metabólicas como la glutaminólisis o la ruta de las pentosas fosfato [190]. En este trabajo nos enfocamos en estudiar el efecto de drogas que actúan sobre rutas metabólicas en distintos modelos de CCR; para ello seleccionamos un conjunto de posibles drogas candidatas a reposicionar utilizando enfoques tanto observacionales como computacionales.

Como primer paso, probamos el efecto antiproliferativo sobre dos líneas de CCR humano de un grupo de diez drogas en reposicionamiento seleccionadas en base a sus efectos previamente reportados sobre algún punto del metabolismo celular. Todas las drogas probadas mostraron afectar la capacidad proliferativa de las células en forma dependiente de la dosis (**Figura 22**), indicando la potencialidad del uso de drogas en reposicionamiento para inhibir el crecimiento de células tumorales. Varios tipos de compuestos no utilizados en terapias oncológicas en sus inicios, han sido reposicionados y constituyen hoy en día quimioterapias empleadas en la clínica para tratar distintos tipos de cáncer. Entre ellas se encuentran la talidomida, originalmente propuesta para tratar las náuseas matutinas en embarazadas, que actualmente se utiliza para el tratamiento del mieloma múltiple; el afilibercept, utilizado para el tratamiento de la degeneración macular en personas mayores, que se reposicionó para su uso en CCR; y el nintendanib, indicado para tratar la fibrosis pulmonar idiopática, y hoy en día se usa también para el tratamiento de cáncer de pulmón [191]. Actualmente, varios proyectos, como el proyecto ReDO (“*The Repurposing Drugs in Oncology*”) [192, 193] y el proyecto repoDB [194] testean y recolectan información de más de 250 posibles drogas no utilizadas en cáncer con potencial para ser reposicionadas.

En base a estudios recientes de otros autores que habían demostrado el efecto de las combinaciones de M+P, CQ+P y CQ+M sobre modelos de cáncer de mama triple negativo (TNBC, del inglés “*triple negative breast cancer*”)[195, 196], un cáncer con opciones terapéuticas muy reducidas y resistente a la mayoría de los tratamientos, decidimos seleccionar estas drogas y combinarlas para explorar sus efectos sobre las líneas celulares bajo estudio. Nuestros resultados indicaron que, entre las combinaciones probadas, la de M+P fue la más efectiva en reducir la proliferación en ambas líneas, aun en mayor medida que los tratamientos individuales. La combinación de las drogas incluso permitió disminuir las dosis de ambas a 1mM de Met y 1 μ M de Prop sin perder sus efectos antiproliferativos. Estas dosis fueron menores a las reportadas en estudios previos sobre otros modelos de cáncer (especialmente las de propranolol) [196-198], y pueden considerarse clínicamente relevantes ya que son comparables a las encontradas en el plasma de pacientes bajo tratamiento con Met o Prop [198, 199], lo que nos permite especular con una traslación futura a estudios de fase I. El empleo de dosis bajas en las quimioterapias es un factor decisivo, dado que se asocian con una

menor probabilidad de inducción de toxicidad en los pacientes. Incluso, dosis superiores a las utilizadas en este trabajo no han demostrado producir efectos sobre células normales [198, 200].

Adicionalmente, el efecto del tratamiento M+P sobre la proliferación celular se correlacionó con niveles reducidos de fosforilación de Erk y de expresión de la proteína quinasa ribosómica p70, observados después de estímulos séricos (**Figura 27**). También se observaron menores niveles de fosforilación de Erk en presencia de M+P después de la inducción proliferativa de células 4T1 [201], lo que sugiere que el mecanismo subyacente que estaría afectando al crecimiento de las células tumorales se mantiene independientemente del tipo celular y está relacionado con una menor capacidad de activación de vías de señalización asociadas a la proliferación.

Los efectos de la metformina individualmente sobre la capacidad proliferativa de células de CCR están muy bien caracterizados y los mecanismos por los cuales afecta la proliferación han sido reportados en varias investigaciones. Específicamente sobre las líneas celulares utilizadas en este trabajo, HCT116 y HT29, se reportó que metformina reduce la proliferación al inducir la detención del ciclo celular en la fase G0/G1, disminuir la expresión de c-Myc, regular negativamente IGF1R y reducir la expresión de CD44 y LGR5 [202, 203]. Los mecanismos por los cuales el propranolol afecta la proliferación de células de CCR están menos caracterizados. Estudios recientes de Ping Liao y colaboradores demostraron que se relacionan a una disminución de la fosforilación de AKT/ERK/MEK registrada tanto en modelos *in vitro* como en modelos de tumores de ratón de células CT26; también los autores observaron una inhibición de la fosforilación de ERK en muestras de tejidos tumorales de pacientes con CCR bajo tratamiento con propranolol [204].

Nuestros estudios acerca del efecto del tratamiento sobre los niveles de apoptosis celular indicaron que la combinación fue capaz de inducir apoptosis en mayor medida que los tratamientos individuales (**Figura 25**). En los estudios realizados por citometría de flujo observamos que los tratamientos por separado a las dosis ensayadas no produjeron un aumento significativo en los niveles de apoptosis con respecto al control, sin embargo, si observamos diferencias significativas cuando los fármacos se combinaron, indicando que a esas dosis es la combinación y no los tratamientos por separado la que incapacitaría a las células de evadir los procesos que conllevan a la apoptosis celular. Este efecto de la combinación también había sido observado sobre células 4T1 [196]. Algunos autores sugieren que Met individualmente es capaz de detener transitoriamente el crecimiento celular sin inducir apoptosis, autofagia o senescencia, por lo plantean que la identificación de compuestos que combinados con la biguanidina logren inducir la muerte celular sería un objetivo importante para reposicionar la droga [202]. Bajo estas observaciones, es posible que, en nuestros experimentos, como en los estudios de Mogavero y colaboradores, la metformina sea capaz de detener el ciclo celular sin inducir apoptosis, y que sea el propranolol el que esté afectando alguna vía esencial por la cual las células son capaces de inducir muerte celular tras esta detención de ciclo inducida por metformina. Se requieren posteriores estudios para confirmar esta hipótesis.

La capacidad clonogénica de las células tumorales de CCR también se vio afectada por el tratamiento en los tres modelos *in vitro*, en los que se redujo tanto el número como el tamaño de las

colonias (**Figura 26**). Este efecto también había sido reportado para metformina individualmente en las investigaciones de Mogavero y colaboradores, en los que la droga fue capaz de reducir la capacidad clonogénica temporalmente, ya que cuando se la retiraba del medio de cultivo, la mayoría de las células retomaban su desarrollo normal posiblemente por una reactivación de la ruta mTOR y la sobreexpresión de la proteína IGF1R. Los efectos del propranolol individualmente sobre la capacidad clonogénica de líneas de CCR no habían sido previamente caracterizados, no obstante el compuesto mostró reducir la clonogenicidad de líneas celulares de osteosarcoma y cuello uterino [205, 206]. Este efecto se relacionó en osteosarcoma con una reducción de la expresión del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y en cuello uterino con la supresión de la vía cGMP/PKG. En los estudios del efecto de la combinación sobre TNBC los autores también observaron una reducción de la capacidad clonogénica tanto en el número de colonias como el tamaño de las mismas, en este modelo además se comparó el efecto de los dos tratamientos individuales observándose un mayor efecto de la combinación. La reducción de la capacidad clonogénica es un punto importante ya que se relaciona directamente con el proceso metastásico, donde durante la etapa de colonización solo una o unas pocas células que logran llegar al órgano diana deben ser capaces de clonarse a sí mismas para lograr colonizarlo.

Otra etapa importante del proceso metastásico es la capacidad de las células de migrar. Una etapa fundamental en el proceso de migración consiste en la remodelación del citoesqueleto celular que permite a la célula desprenderse del tumor primario. Durante este proceso la célula debe “soltarse” del tumor mediante la modificación de estructuras de adhesión celular que la unen a otras células y tejidos. En nuestros experimentos observamos que el tratamiento con M+P redujo la capacidad migratoria de las células en estudio observada a través de la cinética de cierre de herida en los tres modelos celulares ensayados *in vitro*. Además, la comparación del área de herida a las 24 horas de tratamiento demostró que la combinación fue más efectiva que Met y Prop individualmente. Estos efectos coincidieron con los reportados en TNBC, en los que M+P afectó la capacidad migratoria de células 4T1 [196].

Para estudiar más profundamente los mecanismos que podrían estar involucrados en la disminución de la capacidad migratoria evaluamos la expresión y distribución de importantes moléculas de adhesión. FAK y vinculina son dos proteínas esenciales para la formación de adhesiones focales (AF). La primera juega un doble papel como componente estructural de las AF y molécula señalizadora, y la segunda es una proteína estructural que conecta a las AF con el citoesqueleto de actina para inducir y dirigir el movimiento. Mediante la inmunotinción de estas proteínas observamos que células bajo tratamiento con M+P presentaron un mayor número de AF (**Figura 29**). Además, estas adhesiones demostraron ser de mayor tamaño y estar distribuidas radialmente en comparación con las de células control. En investigaciones sobre el efecto de metformina sobre la migración celular, Amable y colaboradores registraron un menor número de adhesiones focales en células tratadas, pero coincidieron en que el tamaño de estas estructuras fue mayor, incluso registraron adhesiones de mayor tamaño que las observadas en nuestros experimentos. Los autores propusieron que el tratamiento con metformina produce una redistribución de otras importantes proteínas de adhesión que acaba por producir una reestructuración en las AF que reduce su número, pero

aumenta su tamaño [207]. Bajo esta hipótesis es posible que el mayor número de AF observadas en nuestro trabajo esté relacionado a un proceso de fusión de AF más pequeñas para formar otras de mayor tamaño, sin embargo, para corroborar esta idea son necesarias más investigaciones que caractericen el efecto de la metformina sobre estas estructuras. Por otro lado, se han reportado efectos del propranolol sobre la capacidad migratoria de células de CCR que estarían relacionados a la inhibición de los efectos de la norepinefrina, pero se conoce poco sobre el efecto del compuesto sobre proteínas de adhesión celular [208]. Algunos autores han destacado la acción del propranolol sobre los niveles de anoikis, una forma de muerte celular programada debido a la interrupción de las interacciones célula-MEC, en la que se pierde la actividad señalizadora de FAK y, por lo tanto, se induce apoptosis celular. En cáncer de ovario se reportó un efecto protector por parte de las catecolaminas que posibilita a las células evadir procesos de anoikis, estos efectos estarían mediados por altos niveles de fosforilación de FAK a través de la activación de Src dependiente de ADRB2. En este modelo, aunque el propranolol no redujo la expresión de FAK con respecto a células de cáncer de ovario sin tratamiento, su acción bloqueante de los ADRB2 produjo una disminución en los niveles de fosforilación de la proteína que resultó en un aumento de los niveles de anoikis [209]. Algo similar sucedió en cáncer de próstata donde altos niveles de norepinefrina se correlacionaron a una mayor activación de la vía β 2AR-cAMP-PKA que fosforila a FAK; en estos estudios nuevamente aunque propranolol no redujo la expresión de FAK si logró reducir sus niveles de fosforilación [210]. Es importante destacar que en nuestro trabajo observamos la expresión de FAK total, un aporte interesante a este estudio sería determinar cómo el tratamiento afecta sus niveles de fosforilación para estimar su nivel de actividad frente a esta combinación de drogas.

Por otro lado, en nuestros resultados observamos también que las AF se distribuyeron radialmente en comparación con las células control en las que se encontraron principalmente asociadas a estructuras de motilidad celular como ruffles y lamidiopodios (**Figura 30**). Esta distribución diferencial podría estar indicando una menor capacidad de la célula de desprenderse del sustrato. Las AF son estructuras dinámicas que forman enlaces mecánicos entre los haces de actina intracelular citoesqueléticos y el sustrato extracelular. En condiciones normales, son bastante estables, pero en las células móviles deben ensamblarse y desmontarse constantemente. El montaje y desmontaje dinámico de las AF juega un papel central en la migración celular. La estimulación de la formación de AF aumenta la unión de las células a los sustratos, dando lugar a células con morfología diseminada. Por el contrario, la migración direccional de la célula requiere la formación continua y el recambio de AF en el borde delantero del cuerpo celular y la liberación de estas uniones en la parte posterior [211].

Adicionalmente, la tinción del citoesqueleto de actina reveló una organización diferente en células tratadas, en las que se observó una menor cantidad de estructuras asociadas a motilidad como filopodios o ruffles (**Figura 31**). Estos resultados sugieren que M+P interfiere con la reorganización del citoesqueleto celular dificultando el movimiento de las células. Estudios mecanicistas en cáncer de cuello uterino determinaron que los efectos antimigración de metformina se relacionan a la inhibición de la formación de filopodios y lamelipodios mediante la supresión de FAK, Akt y las proteínas Rac1 y RhoA [212]. Estas últimas dos proteínas son miembros de la familia Rho de pequeñas guanosina

trifosfatasas (GTPasas). Se ha informado que esta familia de proteínas desempeña un papel crucial en la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de filopodios. Además, se encontró que los niveles de expresión de Rac1 y RhoA están aumentados en varios tipos de cánceres, incluido el CCR [213, 214]. Aunque los efectos del propranolol sobre la organización del citoesqueleto de actina en células de CCR están menos estudiados, algunos autores han reportado un efecto en otros tipos tumorales. Recientemente, Garguilo y colaboradores reportaron que el tratamiento con propranolol de líneas celulares de cáncer de mama aumenta el número de adhesiones celulares. Además, produce un incremento del área celular, cambios en el citoesqueleto de actina, una reducción del número filopodios y lamelipodios y un aumento en la expresión de F-actina en células de mama no tumorales. Estos cambios se asociaron a un mecanismo mediado por las proteínas PAK4/LIMK/COFILIN, y la vía que involucra a la β 1-arrestina como mediador de la endocitosis dependiente de clatrina [215]. En otra investigación Stiles y colaboradores encontraron que el propranolol afecta la proliferación, migración y produce una reorganización del citoesqueleto de actina en células endoteliales de hemangiomas infantiles y normales. En este modelo el propranolol redujo drásticamente el estado de activación de varios reguladores conocidos de la dinámica del citoesqueleto de actina, incluida la quinasa de adhesión focal (FAK), cofilina, e兹rina/radixina/moesina (ERM) y la miosina fosfatasa (MYPT1) [216]. La similitud de los efectos del propranolol sobre la migración de células tanto tumorales como no tumorales de distintos tejidos, sugiere que el mecanismo por el cual la droga afecta la migración podría ser independiente del tipo celular.

Además de FAK y vinculina, en nuestro trabajo estudiamos la expresión y distribución de otras dos importantes proteínas marcadoras de transición epitelio-mesénquima (TEM), E-cadherina y β -catenina. Esas proteínas son componentes estructurales esenciales de las uniones adhesivas célula-célula. Nuestros estudios por Western Blot revelaron una expresión aumentada de estas proteínas en células tratadas con M+P (**Figura 32**). Asimismo, observamos una disminución de los niveles de SNAIL, un regulador transcripcional que disminuye la expresión de E-cadherina. Por otro lado, las inmunotinciones de E-cadherina y β -catenina nos permitieron visualizar una distribución diferencial entre los grupos tratados y control (**Figura 33**): en el primer grupo ambas proteínas se mostraron fuertemente confinadas a la membrana celular, mientras que en el segundo se las encontró más dispersas en el espacio citoplasmático. Aunque estudios previos de otros autores confirmaron un aumento en la expresión de E-cadherina como resultado del tratamiento con metformina tanto en modelos *in vitro* [217] como en tejido tumoral de pacientes [218], los cambios en la expresión de β -catenina son menos claros. Algunos estudios reportan una disminución de la expresión de la proteína [217], mientras otros no detectaron cambios significativos en su expresión pero si una redistribución de su localización, encontrándose, coincidentemente a nuestros resultados, asociadas a la membrana plasmática [207, 219]. La relocalización de la proteína hacia esta dirección puede estar relacionada a interacciones célula-célula más fuertes, lo que puede asociarse con una menor capacidad metastásica. Por otro lado, en estudios llevados a cabo por Zhang y colaboradores, se observó un aumento en la expresión de E-cadherina en células HT29 luego de su tratamiento con propranolol. Este efecto también se relacionó con su capacidad bloqueante de los receptores de epinefrina que activarían la ruta β -AR/HIF-1 α /Snail que promueve el aumento de la expresión de SNAIL [220]. Los efectos del propranolol sobre la expresión de β -catenina también pueden relacionarse con su

capacidad de inhibición de la ruta cGMP/PKG, ya que estudios previos han informado que la activación de cGMP-PKG juega un rol importante en el control de los niveles celulares de la proteína [221].

De forma similar a FAK, β -catenina cumple una doble función como proteína estructural y activadora de vías de señalización, activando en este caso la vía canónica Wnt/ β -catenina. La actividad de esta vía depende de la concentración citoplasmática de β -catenina, en condiciones normales esta concentración se mantiene baja gracias a un proceso de degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma. El incremento de β -catenina citoplasmática permite su entrada al núcleo en donde activa la transcripción de un grupo de genes cuyos productos proteicos participan en procesos de división celular, desarrollo embrionario y morfogénesis. Tanto el rol de FAK como de β -catenina no depende únicamente de su expresión sino también de sus niveles de activación. Como se mencionó anteriormente para el caso de FAK, un aporte interesante a este trabajo sería el estudio de los niveles de activación de β -catenina para establecer una relación con sus niveles de expresión y determinar si el efecto observado debido al tratamiento se debe a cambios en uno o ambos. Es posible que los aumentos de expresión observados por Western Blot tanto para FAK como para β -catenina estén relacionados a niveles de activación disminuidos, favoreciendo su rol como proteínas estructurales, fortaleciendo la unión de las células tumorales al sustrato y a otras células y limitando su capacidad metastásica.

Los resultados observados *in vitro* fueron corroborados en distintos modelos murinos, en los que M+P demostró, por un lado, reducir la formación y la capacidad proliferativa de tumores intestinales en un modelo de carcinogénesis químicamente inducida (**Figura 36**), y por el otro, disminuir la capacidad de crecimiento tumoral en un modelo xenográfico y alográfico de células HCT116 y CT26 respectivamente (**Figuras 38 y 41**). La disminución de la capacidad de las células de CRC para formar colonias y el aumento de la apoptosis en presencia de M+P podrían ser parcialmente responsables de la reducción de la carga tumoral desarrollada por los ratones después de la carcinogénesis inducida químicamente. Además, la inmunotinción del marcador de proliferación Ki67 en los tejidos tumorales demostraron que los tumores provenientes de ratones bajo tratamiento en todos los casos poseían menores niveles proliferativos, lo que se relaciona de forma directa con una cinética de crecimiento tumoral significativamente más lenta, en concordancia con nuestros datos *in vitro* que demuestran un efecto de la combinación sobre la proliferación.

Otra observación importante registrada en los modelos *in vivo* fue la disminución del número de animales con micrometástasis pulmonares en el grupo tratado (**Figuras 40 y 42**), que se vincula estrechamente con la disminución de la capacidad migratoria y el aumento en la expresión de proteínas de unión al sustrato y uniones intercelulares registradas en los modelos *in vitro*. De hecho, en nuestros experimentos detectamos una expresión aumentada de E-cadherina en tumores provenientes de animales bajo tratamiento. También registramos un menor número de animales con esplenomegalia en el grupo tratado. En general, la disminución de la capacidad migratoria y clonogénica observadas en las líneas celulares se vieron reflejadas en nuestros modelos *in vivo*, en los que el menor recuento de micrometástasis y animales con esplenomegalia en el grupo bajo tratamiento sugiere que las células migran menos desde tumor primario y, además las células

circulantes tendrían menor capacidad de colonización metastásica. Los efectos *in vivo* de la combinación M+P ya habían sido observado en modelos alográficos de líneas celulares de TNBC, en los que además de reducir la cinética de crecimiento tumoral y el número de micrometástasis pulmonares, disminuyó la proliferación, aumento los niveles de apoptosis de tejidos tumorales tratados, mejorando la supervivencia global de los animales [196].

Por otro lado, a diferencia de la línea celular HCT116, las células CT26 se caracterizan por metastatizar tanto a pulmón como a hígado. Durante la identificación histológica de micrometástasis encontramos que el tratamiento, si bien redujo el número de individuos con micrometástasis a pulmón, no fue capaz de disminuir la formación de micrometástasis en hígado. Este hecho sugiere que el tratamiento puede estar afectando determinadas proteínas que controlan programas transcripcionales específicos que le permiten a las células colonizar determinados órganos. En cáncer de mama metastásico, Citterio y colaboradores reportaron que los programas que controlan el tropismo selectivo hacia pulmón se encuentran regulados por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina Vav2 y Vav3 [222].

Actualmente, el 5-FU es ampliamente utilizado como agente quimioterapéutico para el tratamiento del CCR, sin embargo, su eficacia clínica se ve obstaculizada por el desarrollo de resistencia [223]. Para estudiar el efecto de M+P sobre células de CCR resistente a 5-FU generamos en nuestro laboratorio dos líneas celulares resistentes por exposición crónica a dosis crecientes de 5-FU, a las que denominamos HCTT116^{5FU}R y CT26^{5FU}R. El tratamiento M+P demostró reducir tanto la proliferación como la capacidad clonogénica de ambas líneas (**Figura 34**). Nuevamente para el caso de proliferación, observamos que la combinación fue más efectiva que los tratamientos individuales. Curiosamente el tratamiento produjo una inhibición del crecimiento celular más abrupta en comparación con las líneas parentales sensibles a 5-FU. Esta observación nos sugirió que M+P podría estar interfiriendo con algún mecanismo relacionado al desarrollo de resistencia. Para corroborar este efecto realizamos un ensayo de resensibilización donde un grupo de células resistentes pre-tratadas y sin pre-tratar con M+P fueron expuestas a 5-FU con el fin de evaluar si la combinación era capaz de restaurar los efectos citotóxicos de la droga. Los resultados indicaron que el pre-tratamiento con M+P resensibilizó parcialmente a las células al 5-FU (**Figura 35**). Adicionalmente, corroboramos el efecto de M+P sobre células resistentes *in vitro*, en un modelo xenográfico de células HCTT116^{5FU}R, en el que el tratamiento redujo la cinética de crecimiento tumoral y el número de animales con micrometástasis pulmonares y esplenomegalia (**Figura 43**).

Numerosos mecanismos a través de los cuales las células de CCR desarrollan resistencia a 5-FU están siendo descriptos en variadas investigaciones. Los mecanismos de resistencia son complejos, algunos de ellos están mejor estudiados y han podido ser descriptos, como por ejemplo mecanismos dependientes de energía que involucran complejos proteicos que bombean el fármaco hacia el exterior de la célula, mecanismos de secuestro en vesículas citoplasmáticas, variaciones en el transporte entre núcleo y citoplasma, mecanismos de evasión de apoptosis o mecanismos mediados por enzimas, como el aumento de la capacidad de reparación del ADN. Otros están recién comenzando a caracterizarse, como los relacionados a los microARNs y ARNs no codificantes. La enzima fundamental en el metabolismo del 5-FU es la timidilato sintasa, que pertenece a una de las

tres vías más importantes del anabolismo del fármaco. Al igual que otras enzimas involucradas en el metabolismo de la droga, la alteración más conocida que promueve la resistencia al 5-FU es la sobreexpresión de la timidilato sintasa. Pero, además, se ha reportado que la exposición al 5-FU altera otras funciones celulares esenciales como la apoptosis, la autofagia, la respiración, el metabolismo de la glucosa y el ciclo celular. Por otro lado, otros autores han demostrado que en CCR el desarrollo de resistencia al fármaco se relaciona con cambios epigenéticos y desregulaciones de microARNs [223].

Estudios recientes sobre el efecto de metformina en CCR resistente a 5-FU indicaron que la droga puede resensibilizar a las células tumorales tanto a la quimioterapia como a la radioterapia a partir de la reducción de la actividad de las vías TGF-β/Smad y STAT3 [224]. Los efectos de metformina sobre la vía JAK2/STAT3 ya habían sido reportados en TNBC [225], pero no fue hasta hace poco que se descubrió su participación en eventos de resistencia a 5-FU. Otros autores aseguran que el efecto quimiosensibilizante de metformina se aleja de su conocida acción sobre las vías AMPK y NF-κB hacia otros efectos menos conocidos como los asociados a la inhibición de la maquinaria replicativa de las células a través de la regulación de la expresión del complejo MCM y la proteína nuclear PCNA [226]. Paralelamente otros autores reportan que la acción quimiosensibilizadora de metformina se relaciona a sus efectos sobre la respuesta immune, que incluyen, por un lado, la inhibición de la caspasa-3 en los linfocitos infiltrantes de tumores CD8+ (TILs) que los protege de la apoptosis; por el otro, la inhibición del complejo mitocondrial I que reduce el consumo de oxígeno revirtiendo la hipoxia intratumoral (que interfiere con la infiltración de células inmunosupresoras como MDSC, TAMs y Tregs y suprime el desarrollo de TEM); y por último, la activación de AMPK que fosforila PD-L1 e induce su glicosilación conduciendo a su degradación asociada al retículo endoplásmico [227, 228].

La acción del propranolol como quimiosensibilizante de células de CCR a 5-FU no ha sido aún bien caracterizada. Una investigación llevada a cabo por el grupo de Heriu Yao, informó que el desarrollo de resistencia a 5-FU en la línea celular HT29 se encontró asociado con altos niveles de expresión de receptores adrenérgicos alfa tipo 2. En esta investigación, se probó la acción resensibilizante a 5-FU de propranolol y no se encontró un efecto reversor significativo de la droga aplicada en forma individual [229]. Sin embargo otros autores afirman que los efectos de propranolol como resensibilizante en CCR podrían estar asociados a su acción sobre la expresión de la HK2 y los transportadores de glucosa 1 (GLUT1), ya que algunas investigaciones han demostrado que el metabolismo de la glucosa está significativamente sobreregulado en células tumorales resistentes a quimioterapias en comparación con las no resistentes [230]. Además, el propranolol demostró capacidad de resensibilizar a células de cáncer de tiroides a otras drogas citotóxicas a través de este mecanismo [231].

Se requieren de estudios mecanicistas más profundos sobre la capacidad resensibilizante a 5-FU de la combinación de M+P para determinar de qué forma afecta el desarrollo de resistencia y cuáles son las rutas y proteínas involucradas.

Con el fin de identificar otros posibles fármacos a reposicionar para el tratamiento de CCR resistente a 5-FU, utilizamos un abordaje basado en técnicas de reposicionamiento computacional.

Explorando bases de datos públicas rescatamos datos de expresión génica de pacientes con y sin recurrencia tumoral luego del tratamiento con 5-FU. Mediante un análisis de expresión diferencial identificamos un grupo de genes sobre y sub expresados en el grupo recurrente con respecto al no recurrente. Con estos genes construimos un perfil de expresión asociado a recurrencia que ingresamos a la base de datos del proyecto LINCS L1000 Connectivity Map, con el fin de identificar los compuestos testeados en esta base de datos con mayor probabilidad de revertir el perfil de expresión observado. Utilizamos las herramientas de esta base de datos para rastrear las principales perturbaciones que revertirían el perfil de expresión. También realizamos un análisis funcional para identificar las principales rutas asociadas a la resistencia.

El análisis funcional de los genes sobreexpresados según la base de datos “Reactome” indicó que las rutas biológicas más Enriquecidas en la lista de genes ingresada se relacionaron con la vía de las Rho GTPasas (**Figura 53 A**). Las Rho GTPasas pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, que funcionan como interruptores moleculares controlando importantes vías de señalización celular. Sufren cambios conformacionales en respuesta a la unión de GDP o GTP. Sólo en el estado activo unido a GTP son capaces de activar a sus proteínas efectoras. El paso de un estado a otro necesita ser catalizado por otras proteínas, por un lado, los GEFs (del inglés, “*Guanine nucleotide exchange factors*”) que favorecen el intercambio de GDP por GTP, activando a las GTPasas, mientras que por el otro los GAPs (“*GTPase activating proteins*”) estimulan su actividad hidrolasa intrínseca, provocando su inactivación. Algunas GTPasas como Rho y Rab son reguladas adicionalmente por un tercer tipo de proteínas, los GDIs (“*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*”), que enmascaran los grupos isoprenilo y retienen a las proteínas inactivas en el citosol [232]. Hasta la actualidad las Rho GTPasas se dividen en 7 subfamilias (Cdc42, Rac, Rho, RhoDF, RhoH, RhoUV y Rnd), de las cuales sólo Rac, Rho y Cdc42 se encuentran mejor caracterizadas. Estas proteínas son conocidas por su papel esencial en los procesos de migración y adhesión celular ya que entre sus roles más estudiados se encuentran el control de la remodelación del esqueleto de actina. En cáncer particularmente están involucradas en un amplio rango de funciones, ya que actúan como proteínas señalizadoras que activan efectores que participan de diversos procesos celulares que se extienden desde el control transcripcional, el tráfico de vesículas, la progresión del ciclo celular, la morfogénesis y la polaridad celular hasta el metabolismo [233-235]. En los últimos dos años muchos estudios transcriptómicos han comenzado a relacionarlas con procesos tanto de quimio como radio resistencia [236]. Esta vía había sido identificada como Enriquecida en análisis de expresión génica de tejidos de tumores colorrectales quimioradioresistentes por otros autores [237]. Aunque se conoce poco sobre los mecanismos mediante los cuales la desregulación de las Rho GTPasas induce dicha resistencia, algunas investigaciones reportaron que involucran la regulación de la apoptosis, la reparación del ADN, la inducción de TEM y la interferencia en la absorción de fármacos [236]. Algunos autores han reportado que en CCR la sobreexpresión de algunas Rho GTPasas como RhoA y Rac1b se relacionan con fenotipos resistentes a quimioterapias [238, 239]. En otros tipos de cáncer del sistema digestivo, como cáncer gástrico, se informó que la sobreexpresión de RhoGDI2 otorgó resistencia específicamente a 5-FU [240]. Pero no sólo las Rho GTPasas en sí mismas se han relacionado con el desarrollo de resistencia, sino que también algunas de sus proteínas reguladoras, por ejemplo, Tan y

colaboradores reportaron que la sobreexpresión de Vav3, un importante GEF de Rac1, confirió resistencia a células de cáncer gástrico a través de la desregulación de la ruta JNK [241].

A diferencia de las proteínas de la familia Ras, que se encuentran mutadas en la mayoría de los canceres (alrededor del 30%), las proteínas Rho generalmente no se encuentran mutadas, lo que las convierte en un objetivo farmacológico más atractivo, ya que las proteínas no mutadas son más fácilmente drogables. Más bien se piensa que los efectos mediados por las Rho GTPasas en cáncer se producen, por un lado, por variaciones en su expresión y por el otro, por defectos en la actividad de las moléculas que controlan su activación y desactivación (GEFs, GAPs y GDIs) [242]. Hofbauer y colaboradores por ejemplo, informaron que la sobreactivación de Rac1 por parte de Tiam1 induce quimioresistencia a cisplatino en células de leucemia linfocítica crónica [243]. Una observación importante es que, si bien en nuestro análisis de expresión génica diferencial, a excepción de RhoQ y RHOBTB3, no se encontraron directamente sobreexpresados miembros fundamentales de la familia Rho GTPasas, si lo hicieron proteínas activadoras como los GAPs ARHGAP5 y FAM13A y el GEF AKAP13. Pero, sobre todo, encontramos variación en la expresión de proteínas que participan en las vías más conocidas controladas por sus efectores, como MYH, MYLK, MYL9, MKTN, PPP1R12A y NRP1, entre otras. Estos resultados sugieren que es posible que la desregulación de la vía se deba a la sobreactivación de las proteínas Rho causada por alguna variación en la actividad de sus activadores. Sin embargo, dado que la sobreactivación no siempre significa sobreexpresión, este tipo de eventos no son detectables en los análisis de expresión diferencial. Una propuesta interesante para explorar el papel de las Rho GTPasas en el desarrollo de resistencia a 5-FU en CCR, sería el estudio del silenciamiento o activación constitutiva de algunos de sus GEFs y GAPs.

La clasificación funcional de los genes sobreexpresados según la base de datos Gene Ontology identificó tres vías Enriquecidas en la lista de genes: la vía de inflamación mediada por citoquinas y quimioquinas, la vía de receptores de gonadotropina y la vía Wnt/β-catenina (**Figura 56**). La primera es una vía muy conocida en cáncer y se relaciona con procesos inflamatorios crónicos. En relación a las vías Enriquecidas por la base de datos “Reactome”, se sabe que una sobreexpresión y/o sobreactivación de las Rho GTPasas resulta en una sobreexpresión y/o sobreactivación de las rutas JNK, AKT y NF-kB. Esta última vía es la principal para la producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, en efecto, este proceso demostró estar relacionado al desarrollo de resistencia a 5-FU en CCR [238]. Por otro lado, aunque la mayoría de los mecanismos de resistencia al 5-FU reportados ocurren en las células tumorales, otros han demostrado estar regulados por el microambiente tumoral (MAT), que juega un papel crucial en la biodisponibilidad de moléculas quimioterapéuticas y en el comportamiento biológico general de los tumores. El MAT está compuesto por fibroblastos asociados a células tumorales, células endoteliales y células inmunitarias como macrófagos asociados a tumores y células madres tumorales. En este contexto, las moléculas solubles extracelulares (factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas) y las vesículas (exosomas) desempeñan funciones importantes tanto al inicio de la carcinogénesis, como en el desarrollo de resistencia [244]. Se ha reportado que las citoquinas y quimioquinas secretadas por fibroblastos y macrófagos asociados a tumores también activan las vías de señalización JAK/STAT y PI3K/AKT para

proteger a las células tumorales de los agentes quimioterapéuticos que se utilizan actualmente en el tratamiento del CCR [245].

La vía de receptores de gonadotropina es una vía mucho menos caracterizada; sin embargo, algunos autores encontraron que los receptores de hormonas peptídicas como la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, también llamada hormona liberadora de hormona luteinizante) y la somatostatina se expresan más en las células tumorales que en células normales. Por esta razón varios estudios proponen utilizarlos como dianas mediante la unión de fármacos citotóxicos a sus ligandos peptídicos [246, 247]. Investigaciones previas han reportado la sobreexpresión de estos receptores en líneas celulares de CCR; además se ha asociado su sobreexpresión en tejidos tumorales de pacientes con un peor pronóstico [248]. Varios autores reportaron que el aprovechamiento de la sobreexpresión de estos receptores es una estrategia farmacológica prometedora, ya que la unión de GnRH a su receptores produce efectos antiproliferativos mediados por la inhibición de la ruta del factor de crecimiento epidermal y la activación de la ruta JNK/AP-1 [249]. Algunas investigaciones también han probado la administración de GnRH y análogos como tratamiento para CCR, los resultados preliminares de estos estudios sugieren una propiedad antiangiogénica de la hormona (74).

La ruta Wnt/β-catenina también se encuentra muy estudiada en cáncer, es una de las principales vías frecuentemente desreguladas en varios tipos de tumores, incluido CCR. Esta ruta incluye las vías canónica y no canónica (independiente de β-catenina). En ausencia de ligandos de Wnt, β-catenina se sitúa en la membrana celular y se comunica con E-cadherina para mediar la adhesión intercelular. Mientras tanto, la β-catenina citoplasmática libre suele desestabilizarse y destruirse mediante un complejo proteico. Cuando Wnt activa la señalización de Wnt/βcatenina, suprime la acción del complejo de destrucción de β-catenina permitiendo su acumulación citoplasmática y su posterior translocación al núcleo donde se une a varios factores de transcripción y promueve la expresión de proteínas involucradas en la diferenciación, proliferación, apoptosis, invasión y angiogénesis celular [250]. Por otro lado, la señalización no canónica de Wnt se distingue por mecanismos de transducción de señales independientes de β-catenina. Existen varias vías reguladas por Wnt como Wnt/PCP y Wnt/Ca⁺⁺. Dentro de la señalización Wnt/PCP, los ligandos Wnt se unen al receptor ROR-Frizzled y activan Dvl que se une a las Rho GTPasas mediante la desinhibición de la proteína DAAM1 (activador de morfogénesis 1 asociado a Dvl) en el citoplasma. La activación de las pequeñas GTPasas Rac1 y Rho estimula a su efector ROCK (Rho quinasa) y a la vía JNK, lo que conduce a reordenamientos del citoesqueleto y respuestas transcripcionales [251]. La activación aberrante de estas vías se asocia con altos niveles de proliferación celular, comportamientos invasivos y desarrollo de quimio y radio resistencia, lo que sugiere su valor potencial como diana terapéutica. Otras investigaciones de análisis de datos de expresión génica de CCR resistentes a 5-FU ya han informado la participación de la vía canónica en el desarrollo de resistencia [252]. Además, la reducción de la expresión de algunos miembros de la vía así como la reducción de su actividad mediada por fármacos han demostrados revertir la resistencia a 5-FU en CCR en varios estudios [253-256]. Algunas investigaciones también han reportado que la vía puede flanquear desde la vía canónica hacia la no canónica para mediar la resistencia [257]. Interesantemente en los resultados de nuestro análisis de expresión diferencial

encontramos una sobreexpresión tanto de β -catenina como de DAAM1, sugiriendo que los mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia a 5-FU podrían involucrar tanto la vía canónica como no canónica, de hecho la sobreexpresión de proteínas activadas por las Rho GTPasas identificadas por la base de datos Reactome podría tener una vinculación con la activación de la vía no canónica, sin embargo se requieren más investigaciones para corroborar esta hipótesis.

Con respecto a las vías detectadas como subreguladas por la base de datos Reactome, se encontraron principalmente la vía de receptores de quimioquinas, la vía de receptores de unión a ligandos peptídicos y la vía de la interleuquina-10 (**Figura 53 B**). Esta clasificación coincidió con la de la base de datos GO, que clasificó la mayoría de los genes subregulados en las categorías GO nivel 1 “Procesos Biológicos” (BP) y “Funciones Moleculares” (MF) (**Figura 57**). Dentro de BP, los genes se asociaron con los términos GO nivel 3 0002757, 0002768, 0019221 y 0002768, todos ellos relacionados a rutas activadas por receptores de superficie y respuesta inmune mediada por citoquinas. Este resultado sugiere que la resistencia a 5-FU en los pacientes se relaciona tanto con una disminución de macromoléculas de superficie que se combinan con hormonas, neurotransmisores, fármacos o mensajeros intracelulares para iniciar un cambio en la función celular, como de señales moleculares iniciadas por la unión de un ligando extracelular a un receptor en la superficie de la célula diana capaz de activar, perpetuar o inhibir una respuesta inmune, como por ejemplo, las señales moleculares iniciadas por el entrecruzamiento de un receptor de antígeno en una célula B o T.

Entre las quimioquinas subexpresadas en nuestros análisis se encontraron CXCL5, CXCL8 y CXCL11. La familia de quimioquinas CXC y sus receptores son expresados no sólo por las células tumorales, sino también por leucocitos, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales. Esta familia modula el comportamiento del tumor regulando la angiogénesis, activando respuestas inmunitarias específicas y estimulando directamente la proliferación tumoral de forma autocrina o paracrina. Algunas investigaciones las han asociado con metástasis y resistencia a tratamientos. Se han reportado variaciones de su expresión tanto en células tumorales como en fibroblastos o leucocitos infiltrantes. Además, los genes CXC son altamente polimórficos y ciertas variantes genéticas se relacionan con la respuesta al tratamiento. Dependiendo del órgano en donde se ha iniciado la carcinogénesis, el estadio del tumor y otros factores del MAT, estas proteínas pueden actuar como factores promotores o inhibidores tumorales. Los patrones de expresión y los valores pronósticos de la familia CXC aún se encuentran bajo investigación [258]. Los efectos de la expresión de CXCL5 en CCR son muy variados, mientras algunas investigaciones asocian una expresión incrementada en tejidos tumorales con respecto al tejido normal y relacionan su alta expresión con un peor pronóstico [259], otras han reportado que la reducción de su expresión resulta en una cinética de crecimiento tumoral incrementada y un mayor número de metástasis *in vivo* [260]. Estudios recientes sugieren que una expresión alta de CXCL5 no se relaciona con una supervivencia global menor en pacientes [261]. Contrariamente a nuestros resultados, la sobreexpresión de CXCL8 se ha asociado a quimioresistencia a 5-FU en una línea celular de CCR resistente [262]. Varias investigaciones la reportan como sobreexpresada y sus efectos han sido ampliamente caracterizados [263, 264]. No obstante, los datos de expresión génica de bases de datos de pacientes como “The Cancer Genome

Atlas Program" (TCGA) y "Protein Atlas", asocian una expresión baja de la proteína a una menor sobrevida global, de hecho, a medida que aumenta el número de pacientes, la diferencia entre las curvas de sobrevida se hace más significativa, indicado que el comportamiento de esta proteína en modelos celulares y en pacientes posiblemente diverge. Por otro lado, la expresión de CXCL11 está poco estudiada en CCR. Algunos autores reportaron que pacientes en estados avanzados con una alta expresión de CXCL11 se asociaron a un mejor pronóstico [258]. Sin embargo, otros autores la han encontraron sobreexpresada en tejidos tumorales colorrectales en comparación al tejido normal [265].

La segunda ruta identificada como subrregulada por la base de datos "Reactome" consistió en la vía de la interleuquina-10 (IL-10), una citoquina inmunorreguladora multifuncional con roles inmunsupresores y antiangiogénicos, que es producida por células inmunitarias, incluidos macrófagos, linfocitos T y células "*natural killers*". Se ha informado que IL-10 tiene propiedades tanto promotoras como inhibidoras de tumores dependiendo del contexto y del tipo de tumor. En algunos tumores IL-10 promueve la proliferación y metástasis mediante inmunosupresión favorecida por la síntesis del factor de necrosis tumoral, IL-1, IL-12 y quimioquinas, y la subrregulación de las moléculas coestimuladoras de superficie CD80 y CD86. En otros tipos tumorales IL-10 promueve la expresión y síntesis de IL-6, que provoca la proliferación celular a través de la regulación positiva de Bcl-2. Los efectos antitumorales de la IL-10 en otros tumores se encontraron asociados a la subrregulación de VEGF, IL-1b, TNF- α , IL-6 y MMP-9 y la inhibición de la translocación del factor nuclear KB (NF-KB). Dependiendo del tipo de tumor, los agonistas y antagonistas de IL-10 pueden tener efectos terapéuticos a través de diferentes mecanismos [266]. En CCR el impacto de cambios en la expresión de la proteína ha sido estudiado especialmente en modelos *in vivo*. Sturlan y colaboradores reportaron que ratones C57BL/6 deficientes en IL-10 desarrollaron colitis y CCR similar al cáncer asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal en seres humanos [267]. En otro estudio, el tratamiento de tumores colorrectales murinos con bacterias lácticas genéticamente modificadas para producir IL-10 (GM-LAB) demostraron un efecto antitumoral de la proteína [268]. No obstante, el rol de esta interleuquina en cáncer, al igual que la mayoría de este tipo de proteínas es variable [269].

También se encontraron subrreguladas varias inmunoglobulinas como IGHA1, IGHM, IGKC, IGHD, IGLC, IGHV1-69 y IGHV4-31. Aunque aún no existen estudios que relacionen una disminución en la expresión de estas proteínas a nivel transcripcional con resistencia a 5-FU en CCR, investigaciones recientes en TNBC, han propuesto mediante un análisis de redes de co-expresión génica, que la alta expresión de seis genes de inmunoglobulinas (IGHA1, IGHD, IGHG1, IGHG3, IGLC2, y IGLJ3) pueden actuar como biomarcadores de mejor pronóstico. De hecho, la subexpresión de estas inmunoglobulinas se asoció con una mayor probabilidad de recurrencia tumoral en este tipo de cáncer [270].

Por otro lado, también observamos una subexpresión de proteínas GAGE. Las células cancerosas, expresan抗ígenos específicos que pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico para inducir una respuesta inmunitaria. Estos抗ígenos son denominados抗ígenos de cáncer (CTA), ya que se expresan en una amplia variedad de neoplasias, pero no en tejidos normales, excepto en las células germinales de los testículos, en el trofoblasto del ovario y ocasionalmente en la placenta, en los que

no inducen autoinmunidad, ya que las células germinales son inmuno-privilegiadas y carecen de expresión de MHC de clase I y II. Los CTA son considerados objetivos potenciales para la inmunoterapia, así como biomarcadores para la detección temprana de tumores malignos [271]. Los antígenos GAGE son una familia de CTA, la expresión de ARNm de este grupo es más frecuente en melanomas y carcinoma colorrectal, pero también se puede encontrar en otros tumores [272, 273]. La regulación de la expresión de estos antígenos en células tumorales es compleja, en CCR recientemente se ha informado que estaría regulada por la expresión de microARNs [274]. Aunque el papel de estos antígenos en la quimioresistencia de pacientes de CCR está poco estudiada, Kasuga y colaboradores reportaron que el silenciamiento de los genes que los codifican en líneas celulares de meduloblastoma las sensibilizó a determinados agentes quimioterápicos como cisplatino y etopósido [275].

El reposicionamiento de drogas *in silico* es una técnica moderna que permite identificar compuestos con potencial para ser reposicionados en alguna patología. Aunque la identificación es probabilística, algunas drogas han comenzado a ser reposicionadas utilizando estos enfoques, muchos de ellas se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos. En los últimos años el reposicionamiento *in silico* ha tenido una importante utilidad en cáncer, especialmente en la identificación de compuestos que puedan sensibilizar a los canceres resistentes a las quimioterapias convencionales [276]. En nuestros estudios computacionales utilizamos bases de datos para identificar tanto compuestos como perturbaciones con una alta probabilidad de revertir el perfil de expresión relacionado a resistencia que obtuvimos en el análisis de expresión diferencial. Entre los compuestos con una mayor puntuación de reversión LINCS se identificaron el irinotecán y el topotecan (**Figura 58**). Estos compuestos son fuertes inhibidores de la topoisomerasa I y ya son utilizados en clínica para el tratamiento de cáncer, de hecho, el irinotecán se utiliza como terapia de segunda línea para el tratamiento de CCR metastásico cuando este no responde a la quimioterapia con 5-FU [277, 278]. La administración de irinotecán ha demostrado potenciar la citotoxicidad del 5-FU mediante la reducción de la expresión de la timidilato sintasa. Pero además el irinotecán presenta mecanismos propios independientes a través de la unión al complejo ADN/topoisomerasa-1 en el que provoca roturas de la cadena de ADN y muerte de las células tumorales. El topotecán y el irinotecán actúan mediante mecanismos de acción similares como inhibidores de la topoisomerasa-1, pero tienen distinta farmacodinamia [279]. El topotecan, aunque no es utilizado en CCR, si se utiliza en otros tipos de cáncer quimioresistentes, como cáncer de pulmón y de ovario [280]. Que estos fármacos hayan aparecido en posiciones altas en la lista puede considerarse un control positivo del perfil de expresión obtenido.

Los demás compuestos identificados pertenecieron a categorías muy variadas, esto era de esperarse ya que los análisis funcionales revelaron varias rutas enriquecidas, sugiriendo que el desarrollo de resistencia involucra la modificación de un conjunto de mecanismos que se articulan e interactúan de manera simultánea. Interesantemente, se encontraron compuestos implicados en la estimulación o inhibición de mensajes hormonales. Principalmente inhibidores de receptores adrenérgicos (categoría a la que pertenece el propranolol), entre ellos la fentolamina, un bloqueante de receptores adrenérgicos alfa que ha demostrado tener efectos en otros tipos de cáncer en

investigaciones recientes [281]. También se identificaron varios compuestos agonistas y antagonistas de los receptores de dopamina y serotonina, moduladores selectivos del receptor de estrógeno (esta categoría incluye al tamoxifeno y raloxifeno, muy utilizados en cáncer de mama). Se sabe que la regulación de mensajes hormonales es crucial para en el control de la activación de importantes vías celulares, además, las hormonas dopaminérgicas pueden regular la respuesta inmunológica.

En la lista también aparecieron compuestos relacionados con el control de la inflamación, principalmente inhibidores de COX. En el análisis funcional se había observado un desbalance de la respuesta inflamatoria asociado a la resistencia. Entre estos compuestos, el Tolemin ha demostrado efectos antiproliferativos y antiapoptóticos sobre otros tipos de cáncer [282, 283].

Por otro lado, se identificaron inhibidores de receptores de glutamato, como RO-04-5595, SIB-1893 y aniracetam. La sobreexpresión de estos receptores ya se había encontrado fuertemente asociada a CCR resistente a 5-FU [284]. Aparecieron también algunos inhibidores de la fosfolipasa 1, relacionada con la activación aberrante de la rutas Wnt/β-catenina y PI3K/Akt, que incluso fue detectada en nuestros análisis de expresión diferencial [285]. Además, se encontraron compuestos inhibidores de importantes vías, como sirolimus (rapamicina), que interesantemente, al igual que la metformina, es un conocido inhibidor de la vía mTOR y ha demostrado sensibilizar a pacientes con CCR metastásico a agentes citotóxicos como 5-FU o Irinotecán [286].

Dada la alta variabilidad en cuanto al tipo de compuestos propuestos para revertir el perfil de expresión, se creó una tabla de perturbaciones. Esta tabla sintetiza las principales perturbaciones que revertirían el perfil observado en las que estarían involucrados los compuestos identificados (**Figura 59**). Entre ellas destacan la inhibición de MEK, dentro de esta categoría se habían identificado compuestos como U0126 y el inhibidor MEK1-2 (trametinib). Este último ha demostrado capacidad de sensibilizar células a 5-FU en otros estudios a través de la inducción de la expresión de p15 y p27 y la reducción de los niveles de ciclina D1 en células HT29 [287]. Además, MEK participa en la vía Ras-Raf-MEK-ERK, relacionada con la actividad de la proteína Rac1, una proteína central en la ruta de las Rho GTPasas, que se detectó como positivamente enriquecida en nuestro análisis. La activación de MEK, además, se relaciona con otras vías que son parte de la cascada de señalización de las Rho GTPasas, como la vía integrina-FAK [288]. Este punto es interesante en cuanto al efecto sensibilizante que observamos de M+P sobre células resistentes a 5-FU, ya que vimos que la combinación afecta de alguna forma al menos la expresión de FAK, sería interesante estudiar si el efecto del tratamiento combinado sobre la resistencia tiene alguna relación con la modificación de la expresión de esta proteína y de qué forma afecta la activación de rutas relacionadas. Otra perturbación importante identificada para la reversión de la resistencia fue la perdida de función de la vía Wnt, esto concuerda con los resultados de nuestro análisis de expresión diferencial, en los que además de encontrar sobreexpresados importantes genes de la ruta canónica, encontramos algunos genes claves de la vía no canónica.

Por otro lado, en la lista de perturbaciones también se detectó la pérdida de función de los activadores de las Rho GTPasas como una perturbación con una alta puntuación de reversión, lo que avala la hipótesis de que si bien, muchas proteínas importantes de la familia de las Rho GTPasas no se

encontraron diferencialmente expresadas en nuestros resultados, la sobreexpresión de objetivos de sus efectores corriente abajo podría relacionarse con una sobreactivación de la vía. En este contexto, a pesar de que no aparecieron en la lista, el uso de compuestos inhibidores de la actividad Rho GTPasa como FRAX597 (inhibidor de PAK), Y-27632 2HCl (inhibidor de ROCK), 1A-116 (inhibidor de Rac), NSC23766 (inhibidor de Rac), o Rhosin (inhibidor de RhoA) podrían ser útiles para evaluar el rol de la activación de la vía en el desarrollo de resistencia a 5-FU.

Tradicionalmente, los quimioterapéuticos utilizados en clínica para el tratamiento del cáncer se centran en afectar el ciclo celular y la maquinaria replicativa de la célula; aunque estos tratamientos dan buenos resultados, su uso conlleva efectos secundarios indeseables. Además, el desarrollo de resistencia es un fenómeno frecuente. Cada vez más investigaciones científicas evidencian que tanto el metabolismo celular como el componente inmunológico constituyen dos objetivos potenciales tanto para el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas como para sensibilizar a las células a los tratamientos ya existentes. En nuestro trabajo varios compuestos conocidos que, se sabe, actúan principalmente sobre vías metabólicas demostraron poseer efectos antiproliferativos. Entre ellos la combinación de M+P nos resultó particularmente interesante, dado que permitió disminuir la dosis de ambas drogas sin obstaculizar su capacidad antiproliferativa. Las inmunotinciones y el estudio de la expresión de proteínas de adhesión celular de las células bajo tratamiento con M+P nos permitió especular que el efecto de la combinación sobre células de CCR involucran la regulación de rutas implicadas en la organización del citoesqueleto celular mediante mecanismos que aún deben ser estudiados. Por otro lado, la utilización de enfoques computacionales aprovechando la gran cantidad de información génica de acceso público generada en la última década, demostró facilitar la identificación de posibles candidatos a reposicionar. Nuestros análisis funcionales sugieren que la generación de resistencia a 5-FU involucraría tres ejes fundamentales: por un lado, la evasión de la respuesta inmune reflejada en una baja de la expresión de genes que codifican importantes moléculas señalizadores del sistema inmunológico, por el otro la activación de la vía canónica y no canónica Wnt y por último la sobreactivación de la ruta de las Rho GTPasas. Encontrar las asociaciones a través de las cuales estos ejes interactúan para inducir la resistencia es una labor compleja, sin embargo, las herramientas computacionales también están comenzando a facilitar esta tarea a través de, por ejemplo, los análisis de redes de coexpresión génica. No obstante, el establecimiento definitivo y la interpretación de estas relaciones aun es una labor exclusivamente humana. En este trabajo demostramos que el reposicionamiento de drogas es una herramienta con un alto potencial para el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas, ahorrando tiempo y recursos económicos en comparación con la generación de fármacos *de novo*.

6. Anexo

ID de la muestra	Nombre de la muestra	1*	2*	3*	4*	5*	6*	Fenotipo
1	GSM1681363_MFL_409s_U133_2.CEL							NR
2	GSM1681367_MFL_597s_U133_2.CEL							NR
3	GSM1681369_MFL_636s_U133_2.CEL							NR
4	GSM972017_280705-12.CEL				x			NR
5	GSM972018_080705-01.CEL							NR
6	GSM972019_080705-02.CEL							R
7	GSM972020_080705-07.CEL							R
8	GSM972021_080705-09.CEL							R
9	GSM972022_200705-12.CEL							NR
10	GSM972023_280605-01.CEL							R
11	GSM972024_280605-03.CEL			x				R
12	GSM972025_280605-06.CEL			x				NR
13	GSM972026_280605-07.CEL			x				R
14	GSM972027_280705-01_bis_scan_2_taches.CEL							NR
15	GSM972028_280705-02.CEL							NR
16	GSM972029_280705-06.CEL							NR
17	GSM972030_280705-08.CEL							NR
18	GSM972079_SOG_732_U133_2.CEL		x					NR
19	GSM972096_050805-03.CEL							R
20	GSM972097_050805-04.CEL							R
21	GSM972098_050805-06.CEL							NR
22	GSM972099_050805-07.CEL							NR
23	GSM972100_050805-08.CEL							NR
24	GSM972101_051206-03.CEL							R
25	GSM972102_051206-04.CEL							R
26	GSM972103_051206-07.CEL							NR
27	GSM972104_051206-14.CEL							NR
28	GSM972105_051206-16.CEL	x	x					NR
29	GSM972106_051206-17.CEL							R
30	GSM972107_051206-20.CEL							NR
31	GSM972108_051206-23.CEL							NR
32	GSM972109_051206-24.CEL							NR
33	GSM972110_070123-01.CEL							R
34	GSM972111_070123-03.CEL							R
35	GSM972112_070123-11.CEL							NR
36	GSM972113_070123-15.CEL		x	x				R
37	GSM972114_070123-16.CEL							NR
38	GSM972115_080318-04.CEL			x				R
39	GSM972116_110706-16.CEL							R
40	GSM972117_110706-19.CEL							R
41	GSM972118_110706-20.CEL							R

ID de la muestra	Nombre de la muestra	1*	2*	3*	4*	5*	6*	Fenotipo
42	GSM972119_110706-21.CEL							NR
43	GSM972120_110706-22.CEL							NR
44	GSM972121_110706-23.CEL							NR
45	GSM972122_110706-24.CEL							R
46	GSM972164_VB_109T_U133_2.CEL							R
47	GSM972166_VB_114T_U133_2.CEL							R
48	GSM972190_VB_234T_U133_2.CEL							NR
49	GSM972191_VB_235T_U133_2.CEL			x				NR
50	GSM972224_AD_09_U133_2.CEL							R
51	GSM972234_AD_1311_U133_2.CEL							NR
52	GSM972254_AD_1473_U133_2.CEL							R
53	GSM972259_AD_1516_U133_2.CEL	x		x				NR
54	GSM972263_AD_32b_U133_2.CEL							NR
55	GSM972265_AD_39_U133_2.CEL							NR
56	GSM972276_AD_52_U133_2.CEL							NR
57	GSM972279_AD_57_U133_2.CEL							NR
58	GSM972289_AD_797_U133_2.CEL							NR
59	GSM972295_AD_885_U133_2.CEL							NR
60	GSM972306_MFL_200b_U133_2.CEL							NR
61	GSM972311_MFL_225b_U133_2.CEL							NR
62	GSM972323_MFL_378b_U133_2.CEL			x				NR
63	GSM972334_MFL_541b_U133_2.CEL							NR
64	GSM972336_MFL_565b_U133_2.CEL							NR
65	GSM972339_MFL_596b_U133_2.CEL			x				NR
66	GSM972361_051206-06.CEL							R
67	GSM972362_051206-08.CEL							NR
68	GSM972372_070123-04.CEL							R
69	GSM972376_070123-09.CEL							NR
70	GSM972377_070123-10.CEL							NR
71	GSM972380_070123-14.CEL							R
72	GSM972424_VB_237T_U133_2.CEL		x					NR
73	GSM972444_AD_30_U133_2.CEL							R
74	GSM972457_MFL_1689b_U133_2.CEL							R
75	GSM972466_MFL_396b_U133_2.CEL							NR
76	GSM972470_MFL_408b_U133_2.CEL							NR
77	GSM972472_MFL_440b_U133_2.CEL							NR
78	GSM972476_MFL_540b_U133_2.CEL		x					NR
79	GSM972481_MFL_635b_U133_2.CEL			x				NR
80	GSM972484_MFL_688b_U133_2.CEL			x				NR
81	GSM972503_MFL_038_U133_2.CEL							NR
82	GSM972522_VB_340T_U133_2.CEL							NR

Tabla X. Tabla de salida del paquete “ArrayQualityMetrics” del análisis de calidad de la serie de datos GSE39582. Las columnas llamadas 1*,2*,... indican las llamadas de los diferentes métodos de detección de valores atípicos:

1* detección de valores atípicos por distancias entre matrices

2* detección de valores atípicos por Boxplots

3* detección de valores atípicos por expresión de registro relativa (RLE)

4* detección de valores atípicos por error estándar sin escala normalizado (NUSE)

5* detección de valores atípicos por parcelas MA

6* detección de valores atípicos por distribución espacial de intensidades

Las muestras detectadas como atípicas por al menos un criterio se marcaron con una cruz.

R= recurrente; NR=no recurrente.

Las filas marcadas en gris indican las muestras descartadas del análisis.

ID de la muestra	Nombre de la muestra	1*	2*	3*	Fenotipo
1	GSM2165276_5FU-Recurrence1.cel				R
2	GSM2165277_5FU-Recurrence2.cel	x	x		R
3	GSM2165278_5FU-Recurrence3.cel				R
4	GSM2165279_5FU-Recurrence4.cel				R
5	GSM2165280_5FU-Recurrence5.cel		x		R
6	GSM2165281_5FU-Recurrence6.cel				R
7	GSM2165282_5FU-Recurrence7.cel				R
8	GSM2165283_5FU-Recurrence8.cel				R
9	GSM2165284_5FU-Recurrence9.cel				R
10	GSM2165285_5FU-Recurrence10.cel				R
11	GSM2165286_5FU-Recurrence11.cel				R
12	GSM2165287_5FU-Recurrence12.cel				R
13	GSM2165288_5FU-Recurrence13.cel				R
14	GSM2165289_5FU-Recurrence14.cel		x		R
15	GSM2165290_5FU-Recurrence15.cel		x		R
16	GSM2165291_5FU-Recurrence16.cel				R
17	GSM2165292_5FU-Recurrence17.cel				R
18	GSM2165293_5FU-Recurrence18.cel	x	x		R
19	GSM2165294_5FU-Recurrence19.cel				R
20	GSM2165295_5FU-Recurrence20.cel		x		R
21	GSM2165296_5FU-Recurrence21.cel		x		R
22	GSM2165297_5FU-Recurrence22.cel				R
23	GSM2165298_5FU-Recurrence23.cel				R
24	GSM2165299_5FU-Recurrence24.cel		x		R
25	GSM2165300_5FU-Recurrence25.cel	x	x		R
26	GSM2165301_5FU-Recurrence26.cel				R
27	GSM2165302_5FU-Recurrence27.cel		x		R
28	GSM2165303_5FU-Recurrence28.cel				R
29	GSM2165304_5FU-Recurrence29.cel				R
30	GSM2165305_5FU-Recurrence30.cel				R
31	GSM2165306_5FU-Recurrence31.cel		x		R
32	GSM2165307_5FU-Recurrence32.cel				R
33	GSM2165308_5FU-Recurrence33.cel				R
34	GSM2165309_5FU-Recurrence34.cel	x	x		R

ID de la muestra	Nombre de la muestra	1*	2*	3*	Fenotipo
35	GSM2165310_5FU-Recurrence35.cel		x		R
36	GSM2165311_5FU-Recurrence36.cel				R
37	GSM2165312_5FU-Recurrence37.cel				R
38	GSM2165313_5FU-Recurrence38.cel		x		R
39	GSM2165314_5FU-Recurrence39.cel				R
40	GSM2165315_5FU-Recurrence40.cel				R
41	GSM2165316_5FU-Recurrence41.cel				R
42	GSM2165317_5FU-Recurrence42.cel				R
43	GSM2165318_5FU-Recurrence43.cel				R
44	GSM2165319_5FU-Recurrence44.cel				R
45	GSM2165320_5FU-Recurrence45.cel		x		R
46	GSM2165321_5FU-Recurrence46.cel				R
47	GSM2165322_5FU-Recurrence47.cel	x	x		R
48	GSM2165323_5FU-Recurrence48.cel		x		R
49	GSM2165324_5FU-Recurrence49.cel	x			R
50	GSM2165325_5FU-Recurrence50.cel				R
51	GSM2165326_5FU-Recurrence51.cel		x		R
52	GSM2165327_5FU-Recurrence52.cel	x	x		R
53	GSM2165328_5FU-Recurrence53.cel				R
54	GSM2165329_5FU-Recurrence54.cel				R
55	GSM2165330_5FU-Recurrence55.cel				R
56	GSM2165331_5FU-Recurrence56.cel				R
57	GSM2165332_5FU-Recurrence57.cel				R
58	GSM2165333_5FU-Recurrence58.cel				R
59	GSM2165334_5FU-Recurrence59.cel		x		R
60	GSM2165335_5FU-Recurrence60.cel		x		R
61	GSM2165336_5FU-Recurrence61.cel	x	x		R
62	GSM2165337_5FU-Recurrence62.cel				R
63	GSM2165338_5FU-Recurrence63.cel				R
64	GSM2165339_5FU-Recurrence64.cel		x		R
65	GSM2165340_5FU-Recurrence65.cel				R
66	GSM2165341_5FU-Recurrence66.cel		x		R
67	GSM2165342_5FU-Recurrence67.cel				R
68	GSM2165343_5FU-Recurrence68.cel		x		R
69	GSM2165344_5FU-Recurrence69.cel				R
70	GSM2165345_5FU-Recurrence70.cel		x		R
71	GSM2165346_5FU-Recurrence71.cel		x		R
72	GSM2165347_5FU-Recurrence72.cel		x		R
73	GSM2165348_5FU-Recurrence73.cel	x	x	x	R
74	GSM2165349_5FU-NonRecurrence1.cel			x	R
75	GSM2165350_5FU-NonRecurrence2.cel	x		x	NR
76	GSM2165351_5FU-NonRecurrence3.cel				NR
77	GSM2165352_5FU-NonRecurrence4.cel	x		x	NR
78	GSM2165353_5FU-NonRecurrence5.cel				NR
79	GSM2165354_5FU-NonRecurrence6.cel				NR
80	GSM2165355_5FU-NonRecurrence7.cel				NR
81	GSM2165356_5FU-NonRecurrence8.cel		x		NR
82	GSM2165357_5FU-NonRecurrence9.cel		x		NR
83	GSM2165358_5FU-NonRecurrence10.cel		x		NR

ID de la muestra	Nombre de la muestra	1*	2*	3*	Fenotipo
84	GSM2165359_5FU-NonRecurrence11.cel		x		NR
85	GSM2165360_5FU-NonRecurrence12.cel				NR
86	GSM2165361_5FU-NonRecurrence13.cel				NR
87	GSM2165362_5FU-NonRecurrence14.cel				NR
88	GSM2165363_5FU-NonRecurrence15.cel				NR
89	GSM2165364_5FU-NonRecurrence16.cel				NR
90	GSM2165365_5FU-NonRecurrence17.cel		x		NR
91	GSM2165366_5FU-NonRecurrence18.cel				NR
92	GSM2165367_5FU-NonRecurrence19.cel		x		NR
93	GSM2165368_5FU-NonRecurrence20.cel				NR
94	GSM2165369_5FU-NonRecurrence21.cel				NR
95	GSM2165370_5FU-NonRecurrence22.cel		x		NR
96	GSM2165371_5FU-NonRecurrence23.cel		x		NR
97	GSM2165372_5FU-NonRecurrence24.cel				NR
98	GSM2165373_5FU-NonRecurrence25.cel				NR
99	GSM2165374_5FU-NonRecurrence26.cel				NR
100	GSM2165375_5FU-NonRecurrence27.cel				NR
101	GSM2165376_5FU-NonRecurrence28.cel				NR
102	GSM2165377_5FU-NonRecurrence29.cel				NR
103	GSM2165378_5FU-NonRecurrence30.cel				NR
104	GSM2165379_5FU-NonRecurrence31.cel		x		NR
105	GSM2165380_5FU-NonRecurrence32.cel				NR
106	GSM2165381_5FU-NonRecurrence33.cel				NR
107	GSM2165382_5FU-NonRecurrence34.cel				NR
108	GSM2165383_5FU-NonRecurrence35.cel				NR
109	GSM2165384_5FU-NonRecurrence36.cel		x		NR
110	GSM2165385_5FU-NonRecurrence37.cel				NR
111	GSM2165386_5FU-NonRecurrence38.cel				NR
112	GSM2165387_5FU-NonRecurrence39.cel				NR
113	GSM2165388_5FU-NonRecurrence40.cel	x	x		NR
114	GSM2165389_5FU-NonRecurrence41.cel				NR
115	GSM2165390_5FU-NonRecurrence42.cel				NR
116	GSM2165391_5FU-NonRecurrence43.cel				NR
117	GSM2165392_5FU-NonRecurrence44.cel				NR
118	GSM2165393_5FU-NonRecurrence45.cel				NR
119	GSM2165394_5FU-NonRecurrence46.cel				NR
120	GSM2165395_5FU-NonRecurrence47.cel				NR
121	GSM2165396_5FU-NonRecurrence48.cel				NR
122	GSM2165397_5FU-NonRecurrence49.cel				NR
123	GSM2165398_5FU-NonRecurrence50.cel				NR
124	GSM2165399_5FU-NonRecurrence51.cel	x	x		NR
125	GSM2165400_5FU-NonRecurrence52.cel				NR
126	GSM2165401_5FU-NonRecurrence53.cel				NR
127	GSM2165402_5FU-NonRecurrence54.cel		x		NR
128	GSM2165403_5FU-NonRecurrence55.cel				NR
129	GSM2165404_5FU-NonRecurrence56.cel		x		NR
130	GSM2165405_5FU-NonRecurrence57.cel				NR
131	GSM2165406_5FU-NonRecurrence58.cel				NR
132	GSM2165407_5FU-NonRecurrence59.cel				NR

ID de la muestra	Nombre de la muestra	1*	2*	3*	Fenotipo
133	GSM2165408_5FU-NonRecurrence60.cel				NR
134	GSM2165409_5FU-NonRecurrence61.cel		x		NR
135	GSM2165410_5FU-NonRecurrence62.cel				NR
136	GSM2165411_5FU-NonRecurrence63.cel				NR
137	GSM2165412_5FU-NonRecurrence64.cel				NR
138	GSM2165413_5FU-NonRecurrence65.cel				NR
139	GSM2165414_5FU-NonRecurrence66.cel				NR
140	GSM2165415_5FU-NonRecurrence67.cel		x		NR
141	GSM2165416_5FU-NonRecurrence68.cel				NR
142	GSM2165417_5FU-NonRecurrence69.cel				NR
143	GSM2165418_5FU-NonRecurrence70.cel				NR
144	GSM2165419_5FU-NonRecurrence71.cel				NR
145	GSM2165420_5FU-NonRecurrence72.cel				NR
146	GSM2165421_5FU-NonRecurrence73.cel				NR
147	GSM2165422_5FU-NonRecurrence74.cel		x		NR
148	GSM2165423_5FU-NonRecurrence75.cel				NR
149	GSM2165424_5FU-NonRecurrence76.cel				NR
150	GSM2165425_5FU-NonRecurrence77.cel	x			NR
151	GSM2165426_5FU-NonRecurrence78.cel	x			NR
152	GSM2165427_5FU-NonRecurrence79.cel				NR
153	GSM2165428_5FU-NonRecurrence80.cel				NR
154	GSM2165429_5FU-NonRecurrence81.cel		x		NR
155	GSM2165430_5FU-NonRecurrence82.cel				NR
156	GSM2165431_5FU-NonRecurrence83.cel		x		NR
157	GSM2165432_5FU-NonRecurrence84.cel				NR
158	GSM2165433_5FU-NonRecurrence85.cel				NR
159	GSM2165434_5FU-NonRecurrence86.cel				NR
160	GSM2165435_5FU-NonRecurrence87.cel				NR
161	GSM2165436_5FU-NonRecurrence88.cel		x		NR
162	GSM2165437_5FU-NonRecurrence89.cel				NR
163	GSM2165438_5FU-NonRecurrence90.cel				NR
164	GSM2165439_5FU-NonRecurrence91.cel				NR
165	GSM2165440_5FU-NonRecurrence92.cel				NR
166	GSM2165441_5FU-NonRecurrence93.cel				NR
167	GSM2165442_5FU-NonRecurrence94.cel				NR
168	GSM2165443_5FU-NonRecurrence95.cel				NR
169	GSM2165444_5FU-NonRecurrence96.cel				NR
170	GSM2165445_5FU-NonRecurrence97.cel				NR
171	GSM2165446_5FU-NonRecurrence98.cel		x		NR
172	GSM2165447_5FU-NonRecurrence99.cel				NR
173	GSM2165448_5FU-NonRecurrence100.cel				NR
174	GSM2165449_5FU-NonRecurrence101.cel	x	x		NR
175	GSM2165450_5FU-NonRecurrence102.cel				NR
176	GSM2165451_5FU-NonRecurrence103.cel				NR
177	GSM2165452_5FU-NonRecurrence104.cel		x		NR
178	GSM2165453_5FU-NonRecurrence105.cel				NR
179	GSM2165454_5FU-NonRecurrence106.cel				NR
180	GSM2165455_5FU-NonRecurrence107.cel	x	x		NR
181	GSM2165456_5FU-NonRecurrence108.cel				NR

ID de la muestra	Nombre de la muestra	1*	2*	3*	Fenotipo
182	GSM2165457_5FU-NonRecurrence109.cel				NR
183	GSM2165458_5FU-NonRecurrence110.cel				NR
184	GSM2165459_5FU-NonRecurrence111.cel				NR
185	GSM2165460_5FU-NonRecurrence112.cel				NR
186	GSM2165461_5FU-NonRecurrence113.cel				NR
187	GSM2165462_5FU-NonRecurrence114.cel				NR
188	GSM2165463_5FU-NonRecurrence115.cel				NR
189	GSM2165464_5FU-NonRecurrence116.cel	x	x		NR
190	GSM2165465_5FU-NonRecurrence117.cel				NR
191	GSM2165466_5FU-NonRecurrence118.cel				NR
192	GSM2165467_5FU-NonRecurrence119.cel				NR

Tabla XI. Tabla de salida del paquete “ArrayQualityMetrics” del análisis de calidad de la serie de datos GSE81653. Las columnas llamadas 1*, 2*,... indican las llamadas de los diferentes métodos de detección de valores atípicos:

1* detección de valores atípicos por distancias entre matrices

2* detección de valores atípicos por Boxplots

3* detección de valores atípicos por expresión de registro relativa (RLE)

4* detección de valores atípicos por error estándar sin escala normalizado (NUSE)

5* detección de valores atípicos por parcelas MA

6* detección de valores atípicos por distribución espacial de intensidades

Las muestras detectadas como atípicas por al menos un criterio se marcaron con una cruz.

R= recurrente; NR=no recurrente.

Las filas marcadas en gris indican las muestras descartadas del análisis.

Símbolo	Nombre
SEP6	septin 6
SEP7	septin 7
ABI3BP	ABI family member 3 binding protein
ABLIM1	actin binding LIM protein 1
ACE2	angiotensin I converting enzyme 2
ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12
ADAMDEC1	ADAM like decysin 1
ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 1
ADAMTS9-AS2	ADAMTS9 antisense RNA 2
ADGRG7	adhesion G protein-coupled receptor G7
ADH1B	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide
ADH1C	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide
ADTRP	androgen dependent TFPI regulating protein
AFF4	AF4/FMR2 family member 4
AGAP4	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 4
AGR3	anterior gradient 3, protein disulphide isomerase family member

Símbolo	Nombre
AHSA2	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)
AKAP13	A-kinase anchoring protein 13
AKR1B10	aldo-keto reductase family 1 member B10
ALDOB	aldolase, fructose-bisphosphate B
ANKRD10	ankyrin repeat domain 10
ANKRD12	ankyrin repeat domain 12
ANKRD20A9P	ankyrin repeat domain 20 family member A9, pseudogene
ANKRD28	ankyrin repeat domain 28
ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36B
ANKRD36BP2	ankyrin repeat domain 36B pseudogene 2
ANXA1	annexin A1
APOBEC1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 1
ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5
ARID2	AT-rich interaction domain 2
ASPN	Asporin
ATF3	activating transcription factor 3
ATP2B4	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 4
ATP6V0E1	ATPase H ⁺ transporting V0 subunit e1
ATRX	ATRX, chromatin remodeler
ATXN1	ataxin 1
BAMBI	BMP and activin membrane bound inhibitor
BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B
BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1
BCL2L15	BCL2 like 15
BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40
BMP2K	BMP2 inducible kinase
BMS1P6	BMS1, ribosome biogenesis factor pseudogene 6
BOD1L1	biorientation of chromosomes in cell division 1 like 1
BRD2	bromodomain containing 2
BTBD7	BTB domain containing 7
BTNL8	butyrophilin like 8
C10orf99	chromosome 10 open reading frame 99
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48
C19orf43	chromosome 19 open reading frame 43
C3	complement C3
C4A	complement C4A (Rodgers blood group)
C4B	complement C4B (Chido blood group)
C4B_2	complement component 4B (Chido blood group), copy 2

Símbolo	Nombre
C7	complement C7
C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4
C8orf88	chromosome 8 open reading frame 88
CA2	carbonic anhydrase 2
CA4	carbonic anhydrase 4
CALD1	caldesmon 1
CAMK2N1	calcium/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor 1
CARMN	cardiac mesoderm enhancer-associated non-coding RNA
CASC4	cancer susceptibility candidate 4
CASP4	caspase 4
CBR4	carbonyl reductase 4
CCAR1	cell division cycle and apoptosis regulator 1
CCDC146	coiled-coil domain containing 146
CCDC50	coiled-coil domain containing 50
CCL11	C-C motif chemokine ligand 11
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CCL28	C-C motif chemokine ligand 28
CCNL1	cyclin L1
CD177	CD177 molecule
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
CD47	CD47 molecule
CD55	CD55 molecule (Cromer blood group)
CD58	CD58 molecule
CD59	CD59 molecule
CD99P1	CD99 molecule pseudogene 1
CDC42BPA	CDC42 binding protein kinase alpha
CEACAM7	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 7
CEP104	centrosomal protein 104
CEP95	centrosomal protein 95
CFH	complement factor H
CFL2	cofilin 2
CHD2	chromodomain helicase DNA binding protein 2
CHP2	calcineurin like EF-hand protein 2
CHRDL1	chordin like 1
CLCA1	chloride channel accessory 1
CLCA4	chloride channel accessory 4
CLDN8	claudin 8
CLINT1	clathrin interactor 1

Símbolo	Nombre
CLK4	CDC like kinase 4
CNN1	calponin 1
CNPY2	canopy FGF signaling regulator 2
CNTF	ciliary neurotrophic factor
COL14A1	collagen type XIV alpha 1 chain
COX7A1	cytochrome c oxidase subunit 7A1
CRISPLD2	cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2
CRYBB2	crystallin beta B2
CSPP1	centrosome and spindle pole associated protein 1
CTNNB1	catenin beta 1
CTSO	cathepsin O
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
CXCL14	C-X-C motif chemokine ligand 14
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9
CYAT1	immunoglobulin lambda light chain-like
CYCS	cytochrome c, somatic
CYP2C18	cytochrome P450 family 2 subfamily C member 18
CYP3A5	cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5
DAAM1	dishevelled associated activator of morphogenesis 1
DCAF16	DDB1 and CUL4 associated factor 16
DCN	decorin
DDX17	DEAD-box helicase 17
DDX24	DEAD-box helicase 24
DDX6	DEAD-box helicase 6
DEFA5	defensin alpha 5
DEFA6	defensin alpha 6
DENND1B	DENN domain containing 1B
DES	desmin
DMBT1	deleted in malignant brain tumors 1
DPP4	dipeptidyl peptidase 4
DSG3	desmoglein 3
DST	dystonin
DUSP1	dual specificity phosphatase 1
DUXAP10	double homeobox A pseudogene 10
EBLN3P	endogenous Bornavirus-like nucleoprotein 3, pseudogene
EDIL3	EGF like repeats and discoidin domains 3
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
EFEMP1	EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1

Símbolo	Nombre
EFNB2	ephrin B2
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGR1	early growth response 1
EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
EMP1	epithelial membrane protein 1
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
EPHA7	EPH receptor A7
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1
ETS2	ETS proto-oncogene 2, transcription factor
ETV6	ETS variant 6
EXOC6	exocyst complex component 6
FABP1	fatty acid binding protein 1
FABP3	fatty acid binding protein 3
FAM114A1	family with sequence similarity 114 member A1
FAM129A	family with sequence similarity 129 member A
FAM13A	family with sequence similarity 13 member A
FAM185A	family with sequence similarity 185 member A
FAM208B	family with sequence similarity 208 member B
FAM3B	family with sequence similarity 3 member B
FAM3C	family with sequence similarity 3 member C
FAM3D	family with sequence similarity 3 member D
FAR2P2	fatty acyl-CoA reductase 2 pseudogene 2
FBXO32	F-box protein 32
FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein
FDCSP	follicular dendritic cell secreted protein
FERMT2	fermitin family member 2
FGF7	fibroblast growth factor 7
FLJ22763	uncharacterized LOC401081
FNBP1	formin binding protein 1
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
FOSB	FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
FOXF1	forkhead box F1
FOXF2	forkhead box F2
FOXP2	forkhead box P2
FRYL	FRY like transcription coactivator
FRZB	frizzled-related protein
FTX	FTX transcript, XIST regulator (non-protein coding)
FXR1	FMR1 autosomal homolog 1

Símbolo	Nombre
GABRE	gamma-aminobutyric acid type A receptor epsilon subunit
GALNT1	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1
GBA3	glucosylceramidase beta 3 (gene/pseudogene)
GDAP2	ganglioside induced differentiation associated protein 2
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
GGNBP2	gametogenetin binding protein 2
GLG1	golgi glycoprotein 1
GLIPR1	GLI pathogenesis related 1
GLIS3	GLIS family zinc finger 3
GNG11	G protein subunit gamma 11
GOLGA4	golgin A4
GRK3	G protein-coupled receptor kinase 3
GUCA2A	guanylate cyclase activator 2A
H3F3A	H3 histone family member 3A
HBA1	hemoglobin subunit alpha 1
HCG18	HLA complex group 18 (non-protein coding)
HECTD1	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 1
HIST1H2BH	histone cluster 1 H2B family member h
HIST1H3C	histone cluster 1 H3 family member c
HIST1H3F	histone cluster 1 H3 family member f
HIST1H3G	histone cluster 1 H3 family member g
HIST1H3I	histone cluster 1 H3 family member i
HIVEP2	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2
HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
HOOK3	hook microtubule tethering protein 3
HOXB5	homeobox B5
HOXB6	homeobox B6
HOXB9	homeobox B9
HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
HSD17B2	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 2
IFFO2	intermediate filament family orphan 2
IFngr1	interferon gamma receptor 1
IGF1	insulin like growth factor 1
IGH	immunoglobulin heavy locus
IGHA1	immunoglobulin heavy constant alpha 1

Símbolo	Nombre
IGHA2	immunoglobulin heavy constant alpha 2 (A2m marker)
IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
IGHM	immunoglobulin heavy constant mu
IGHV4-31	immunoglobulin heavy variable 4-31
IGK	immunoglobulin kappa locus
IGKC	immunoglobulin kappa constant
IGLC1	immunoglobulin lambda constant 1
IGLJ3	immunoglobulin lambda joining 3
IGLV1-44	immunoglobulin lambda variable 1-44
IL18	interleukin 18
IL6ST	interleukin 6 signal transducer
INAFM2	InaF motif containing 2
INVS	inversin
ITGA1	integrin subunit alpha 1
ITLN1	intelectin 1
ITPKB	inositol-trisphosphate 3-kinase B
JCHAIN	joining chain of multimeric IgA and IgM
JMJD1C	jumonji domain containing 1C
JUP	junction plakoglobin
KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2
KATNBL1	katanin regulatory subunit B1 like 1
KCNMA1	potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1
KCNQ1OT1	KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1 (non-protein coding)
KIAA1033	KIAA1033
KIF1B	kinesin family member 1B
KMT2A	lysine methyltransferase 2A
KNOP1	lysine rich nucleolar protein 1
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
KRT20	keratin 20
KRT23	keratin 23
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor alpha
LIMA1	LIM domain and actin binding 1
LIMS3-LOC440895	LIMS3-LOC440895 readthrough
LINC00483	long intergenic non-protein coding RNA 483
LINC00869	long intergenic non-protein coding RNA 869
LINC01133	long intergenic non-protein coding RNA 1133
LIPH	lipase H
LMOD1	leiomodin 1

Símbolo	Nombre
LOC100288570	glycosylphosphatidylinositol anchor attachment protein 1 homolog (yeast) pseudogene
LOC100507334	two pore channel 3 pseudogene
LOC100507412	uncharacterized LOC100507412
LOC440895	two pore channel 3 pseudogene
LOC645513	septin 7 pseudogene
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
LRCH3	leucine rich repeats and calponin homology domain containing 3
LRRC19	leucine rich repeat containing 19
LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1
LYPD8	LY6/PLAUR domain containing 8
LYZ	lysozyme
MAB21L2	mab-21 like 2
MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1
MAF	MAF bZIP transcription factor
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)
MAMDC2	MAM domain containing 2
MAML2	mastermind like transcriptional coactivator 2
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
MBNL1	muscleblind like splicing regulator 1
MBNL2	muscleblind like splicing regulator 2
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus
MEG3	maternally expressed 3 (non-protein coding)
MEP1A	meprin A subunit alpha
MGA	MGA, MAX dimerization protein
MGEA5	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)
MGP	matrix Gla protein
MIR3916	microRNA 3916
MIR612	microRNA 612
MS4A8	membrane spanning 4-domains A8
MT1F	metallothionein 1F
MT1G	metallothionein 1G
MT1H	metallothionein 1H
MUC1	mucin 1, cell surface associated
MUC12	mucin 12, cell surface associated
MUC17	mucin 17, cell surface associated
MUC2	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming
MUC4	mucin 4, cell surface associated
MYH11	myosin heavy chain 11

Símbolo	Nombre
MYL9	myosin light chain 9
MYLK	myosin light chain kinase
MYO6	myosin VI
MYOCD	myocardin
MYOF	myoferlin
NAIP	NLR family apoptosis inhibitory protein
NASP	nuclear autoantigenic sperm protein
NBPF1	neuroblastoma breakpoint family member 1
NBPF10	neuroblastoma breakpoint family member 10
NBPF14	neuroblastoma breakpoint family member 14
NBPF26	neuroblastoma breakpoint family member 26
NBPF9	neuroblastoma breakpoint family member 9
NDE1	nudE neurodevelopment protein 1
NDUFB8	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B8
NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1
NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (non-protein coding)
NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase
NEGR1	neuronal growth regulator 1
NEXN	nexilin F-actin binding protein
NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5
NFATC2IP	nuclear factor of activated T-cells 2 interacting protein
NID2	nidogen 2
NKTR	natural killer cell triggering receptor
NOTCH2NL	notch 2 N-terminal like
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
NR5A2	nuclear receptor subfamily 5 group A member 2
NRP1	neuropilin 1
NUMB	NUMB, endocytic adaptor protein
NXPE4	neurexophilin and PC-esterase domain family member 4
OGN	osteoglycin
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
OLFM4	olfactomedin 4
OTUD1	OTU deubiquitinase 1
OXR1	oxidation resistance 1
PALLD	palladin, cytoskeletal associated protein
PAPD4	polyA) RNA polymerase D4, non-canonical
PARP8	poly(ADP-ribose) polymerase family member 8
PARVA	parvin alpha

Símbolo	Nombre
PCSK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein
PDE5A	phosphodiesterase 5A
PDE9A	phosphodiesterase 9A
PDLM3	PDZ and LIM domain 3
PDLM5	PDZ and LIM domain 5
PELI1	pellino E3 ubiquitin protein ligase 1
PGGHG	protein-glucosylgalactosylhydroxylysine glucosidase
PGM5	phosphoglucomutase 5
PGM5-AS1	PGM5 antisense RNA 1
PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2
PI3	peptidase inhibitor 3
PIGR	polymeric immunoglobulin receptor
PIK3C2A	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha
PLA2G10	phospholipase A2 group X
PLA2G2A	phospholipase A2 group IIA
PLAC8	placenta specific 8
PLCE1	phospholipase C epsilon 1
PLN	phospholamban
PNISR	PNN interacting serine and arginine rich protein
PNN	pinin, desmosome associated protein
PNOG	prepronociceptin
POSTN	periostin
PPA2	pyrophosphatase (inorganic) 2
PPP1R12A	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A
PPP1R12B	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B
PPP2R5C	protein phosphatase 2 regulatory subunit B'gamma
PRAC1	prostate cancer susceptibility candidate 1
PRPF38B	pre-mRNA processing factor 38B
PRUNE2	prune homolog 2
PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
RAB18	RAB18, member RAS oncogene family
RALBP1	ralA binding protein 1
RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor 2
RASEF	RAS and EF-hand domain containing
RASSF6	Ras association domain family member 6
RBM25	RNA binding motif protein 25
RBM5	RNA binding motif protein 5

Símbolo	Nombre
RBMS1	RNA binding motif single stranded interacting protein 1
REG1A	regenerating family member 1 alpha
REG1B	regenerating family member 1 beta
REG3A	regenerating family member 3 alpha
RERE	arginine-glutamic acid dipeptide repeats
RGS1	regulator of G-protein signaling 1
RGS2	regulator of G-protein signaling 2
RHBDL2	rhomboid like 2
RHOBTB3	Rho related BTB domain containing 3
RHOQ	ras homolog family member Q
RIF1	replication timing regulatory factor 1
RNPC3	RNA binding region (RNP1, RRM) containing 3
RPL31	ribosomal protein L31
RPS27	ribosomal protein S27
RREB1	ras responsive element binding protein 1
RSF1	remodeling and spacing factor 1
S100A9	S100 calcium binding protein A9
SBF2	SET binding factor 2
SCAF11	SR-related CTD associated factor 11
SCAF4	SR-related CTD associated factor 4
SEC31A	SEC31 homolog A, COPII coat complex component
SECISBP2L	SECIS binding protein 2 like
SEMA6A	semaphorin 6A
SERPINB6	serpin family B member 6
SERPINE1	serpin family E member 1
SERPING1	serpin family G member 1
SFN	stratifin
SFRP2	secreted frizzled related protein 2
SH3KBP1	SH3 domain containing kinase binding protein 1
SI	sucrase-isomaltase
SLAIN2	SLAIN motif family member 2
SLC26A2	solute carrier family 26 member 2
SLC26A3	solute carrier family 26 member 3
SLC28A2	solute carrier family 28 member 2
SLC38A11	solute carrier family 38 member 11
SLC4A4	solute carrier family 4 member 4
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor
SLX4IP	SLX4 interacting protein

Símbolo	Nombre
SMAD4	SMAD family member 4
SMC3	structural maintenance of chromosomes 3
SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1
SMIM14	small integral membrane protein 14
SMIM24	small integral membrane protein 24
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
SON	SON DNA binding protein
SPAG9	sperm associated antigen 9
SPARCL1	SPARC like 1
SPEN	spen family transcriptional repressor
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1
SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1
SRPK2	SRSF protein kinase 2
SRPX2	sushi repeat containing protein, X-linked 2
SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2
SRSF4	serine and arginine rich splicing factor 4
SULT1B1	sulfotransferase family 1B member 1
SYNM	synemin
SYNPO2	synaptopodin 2
TACC1	transforming acidic coiled-coil containing protein 1
TAF15	TATA-box binding protein associated factor 15
TAF1D	TATA-box binding protein associated factor, RNA polymerase I subunit D
TAF9B	TATA-box binding protein associated factor 9b
TAGLN	transgelin
TARP	TCR gamma alternate reading frame protein
TBL1XR1	transducin beta like 1 X-linked receptor 1
TBX10	T-box 10
TCEAL9	transcription elongation factor A like 9
TCF7L2	transcription factor 7 like 2
TDG	thymine DNA glycosylase
TEX10	testis expressed 10
TGFBR1	transforming growth factor beta receptor 1
THRAP3	thyroid hormone receptor associated protein 3
TM2D1	TM2 domain containing 1
TM4SF20	transmembrane 4 L six family member 20
TM4SF4	transmembrane 4 L six family member 4
TMC5	transmembrane channel like 5
TMF1	TATA element modulatory factor 1

Símbolo	Nombre
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
TNC	tenascin C
TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase
TNS1	tensin 1
TOB1	transducer of ERBB2, 1
TOP1	topoisomerase (DNA) I
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha
TOX4	TOX high mobility group box family member 4
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
TPM2	tropomyosin 2 (beta)
TRAJ17	T cell receptor alpha joining 17
TRAK2	trafficking kinesin protein 2
TRGC2	T cell receptor gamma constant 2
TSHZ3	teashirt zinc finger homeobox 3
TSIX	TSIX transcript, XIST antisense RNA
TSPAN1	tetraspanin 1
TTC14	tetratricopeptide repeat domain 14
UACA	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats
UBE2D3	ubiquitin conjugating enzyme E2 D3
UBXN10-AS1	UBXN10 antisense RNA 1
UBXN7	UBX domain protein 7
UGT2A3	UDP glucuronosyltransferase family 2 member A3
UGT2B17	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B17
USP16	ubiquitin specific peptidase 16
USP25	ubiquitin specific peptidase 25
USP48	ubiquitin specific peptidase 48
USP53	ubiquitin specific peptidase 53
USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked
VMP1	vacuole membrane protein 1
VPS13B	vacuolar protein sorting 13 homolog B
VSIG2	V-set and immunoglobulin domain containing 2
WASF2	WAS protein family member 2
WDR11	WD repeat domain 11
WLS	wntless Wnt ligand secretion mediator
WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1
WSB1	WD repeat and SOCS box containing 1
XIST	X inactive specific transcript (non-protein coding)
YME1L1	YME1 like 1 ATPase

Símbolo	Nombre
ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20
ZCCHC6	zinc finger CCHC-type containing 6
ZCCHC7	zinc finger CCHC-type containing 7
ZFP91	ZFP91 zinc finger protein
ZG16	zymogen granule protein 16
ZMYM2	zinc finger MYM-type containing 2
ZMYND8	zinc finger MYND-type containing 8
ZNF117	zinc finger protein 117
ZNF37BP	zinc finger protein 37B, pseudogene
ZNF532	zinc finger protein 532
ZNF595	zinc finger protein 595

Tabla XII. Genes comunes detectados como sobreexpresados en pacientes con recurrencia tumoral luego del tratamiento con 5-FU en ambos estudios.

Símbolo	Nombre
ANKRD30B	Ankyrin repeat domain 30B
C5orf46	Chromosome 5 open reading frame 46
CES1	Carboxylesterase 1
CFHR4	Complement factor H related 4
CFHR5	Complement factor H related 5
CPB2	Carboxypeptidase B2
CRACR2A	Calcium release activated channel regulator 2A
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11
CXCL5	C-X-C motif chemokine ligand 5
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8
DUXAP10	Double homeobox A pseudogene 10
ELFN1-AS1	ELFN1 antisense RNA 1
ERP27	Endoplasmic reticulum protein 27
F13B	Coagulation factor XIII B chain
FADS1	Fatty acid desaturase 1
FAM9A	Family with sequence similarity 9 member A
G1m marker	Immunoglobulin heavy constant gamma 1
G3m marker	Immunoglobulin heavy constant gamma 3
GAGE1	G antigen 1
GAGE12B	G antigen 12B
GAGE12C	G antigen 12C
GAGE12D	G antigen 12D
GAGE12E	G antigen 12E

Símbolo	Nombre
GAGE12F	G antigen 12F
GAGE12G	G antigen 12G
GAGE12H	G antigen 12H
GAGE12I	G antigen 12I
GAGE12J	G antigen 12J
GAGE13	G antigen 13
GAGE2A	G antigen 2A
GAGE2B	G antigen 2B
GAGE2C	G antigen 2C
GAGE2D	G antigen 2D
GAGE2E	G antigen 2E
GAGE4	G antigen 4
GAGE5	G antigen 5
GAGE6	G antigen 6
GAGE7	G antigen 7
GAGE8	G antigen 8
GLUD2	glutamate dehydrogenase 2
HLA-DQB1	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
HSD3B2	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2
IGHA1	Immunoglobulin heavy constant alpha 1
IGHD	Immunoglobulin heavy constant delta
IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu
IGHV1-69	Immunoglobulin heavy variable 1-69
IGHV4-31	Immunoglobulin heavy variable 4-31
IGK	Immunoglobulin kappa locus
IGKC	Immunoglobulin kappa constant
IGLC1	Immunoglobulin lambda constant 1
IL1A	Interleukin 1 alpha
IL1B	Interleukin 1 beta
KCNJ12	potassium voltage-gated channel subfamily J member 12
KCNJ18	potassium voltage-gated channel subfamily J member 18
LGR5	Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LINC01088	Long intergenic non-protein coding RNA 1088
LINC01123	Long intergenic non-protein coding RNA 1123
LRRC37A3	Leucine rich repeat containing 37 member A3
MIR1908	microRNA 1908
MIR196B	microRNA 196b
MRLN	myoregulin

Símbolo	Nombre
MSTO1	misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator
MSTO2P	misato family member 2, pseudogene
POU5F1B	POU class 5 homeobox 1B
POU5F1P4	POU class 5 homeobox 1 pseudogene 4
PPBP	pro-platelet basic protein
PSMB2	proteasome subunit beta 2
PTPRD	protein tyrosine phosphatase, receptor type D
RGS16	regulator of G-protein signaling 16
RXRA	retinoid X receptor alpha
S100A7	S100 calcium binding protein A7
SNORA29	small nucleolar RNA, H/ACA box 29
SP8	Sp8 transcription factor
TCFL5	transcription factor like 5
UBD	ubiquitin D
WDCP	WD repeat and coiled coil containing
XIST	X inactive specific transcript (non-protein coding)
YME1L1	YME1 like 1 ATPase
ZDHHC11	zinc finger DHHC-type containing 11

Tabla XIII. Genes comunes detectados como subexpresados en pacientes con recurrencia tumoral luego del tratamiento con 5-FU.

Sobreexpresados	ABI3BP, ADAMDEC1, ADAMTS1, AFF4, AKAP13, ANKRD28, ANXA1, APOBEC1, ASPN, ATF3, ATRX, ATXN1, BAMBI, C7, CALD1, CAMK2N1, CCL2, CDC42BPA, CHRDL1, CLCA1, CLDN8, CLINT1, CNN1, COL14A1, COX7A1, CTSO, CXCL14, CYCS, DAAM1, DDX17, DDX6, DEFA6, DES, DUSP1, EFNB2, EGFR, EGR1, ENPP2, FAM129A, FAM208B, FBXO32, FERMT2, FOS, FOSB, FOXF2, GABRE, GEM, GOLGA4, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HOXB6, IFNGR1, IGF1, IL18, IL6ST, ITLN1, JUP, KATNBL1, KCNMA1, KRAS, LMOD1, LTBP1, MAB21L2, MBNL1, MBNL2, MEG3, MGA, MUC4, MYH11, MYL9, MYLK, MYO6, MYOCD, NEAT1, NEXN, NKTR, NR4A3, NXPE4, OLFM4, PARP8, PCSK5, PDLIM3, PELI1, PGM5, PLA2G10, PLA2G2A, PLN, PNISR, PPA2, PPP1R12B, PPP2R5C, RBM25, RIF1, RPS27, SCAF11, SCAF4, SECISBP2L, SEMA6A, SERPINE1, SFN, SLC28A2, SMCHD1, SPARCL1, SPEN, SRRM2, SULT1B1, SYNM, TBL1XR1, TGFBR1, THRAP3, TNC, TNIK, TNS1, TOP1, TPM2, UBE2D3, UGT2A3, UGT2B17, USP9X, VPS13B, WASHC4, WLS, XIST, YME1L1, ZBTB20, ZG16, ZNF532, ARHGAP5, FAM13A, NFAT5, NFATC2IP, NRP1, P68431, PIK3C2A, PNN, POSTN, PPP1R12A, RBM5, RHOQ, TAGLN, RHOBTB3
Subexpresados	CES1, CFHR4, CFHR5, CPB2, CXCL11, CXCL5, CXCL8, F13B, FADS1, GAGE1, GLUD2, HLA-DQB1, HSD3B2, IL1A, IL1B, KCNJ12, LGR5, LRRC37A3, POU5F1B, POU5F1P4, PPBP, PSMB2, PTPRD, RGS16, RXRA, S100A7, TCFL5, WDCP, ZDHHC11

Tabla XIV. Genes seleccionados para análisis de reversión en Query LINCS.

7. Bibliografía

1. Singh MP, Rai S, Pandey A, Singh NK, Srivastava S: **Molecular subtypes of colorectal cancer: an emerging therapeutic opportunity for personalized medicine.** *Genes & Diseases* 2019.
2. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *cell* 2011, **144**(5):646-674.
3. Loeb LA: **A mutator phenotype in cancer.** *Cancer research* 2001, **61**(8):3230-3239.
4. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creaire C, Dawson E: **COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer.** *Nucleic acids research* 2019, **47**(D1):D941-D947.
5. Seyfried TN: **Cancer as a mitochondrial metabolic disease.** *Frontiers in cell and developmental biology* 2015, **3**:43.
6. Wishart DS: **Is cancer a genetic disease or a metabolic disease?** *EBioMedicine* 2015, **2**(6):478-479.
7. Boroughs LK, DeBerardinis RJ: **Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth.** *Nature cell biology* 2015, **17**(4):351-359.
8. Nagarajan A, Malvi P, Wajapeyee N: **Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism.** *Trends in cancer* 2016, **2**(7):365-377.
9. Cho ES, Cha YH, Kim HS, Kim NH, Yook JI: **The pentose phosphate pathway as a potential target for cancer therapy.** *Biomolecules & therapeutics* 2018, **26**(1):29.
10. Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O, Adewale O, Olayide I, Emuwochere R: **Biology of glucose metabolism in cancer cells.** *Journal of Oncological Sciences* 2017, **3**(2):45-51.
11. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV: **Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism.** *Nature Reviews Cancer* 2011, **11**(5):325-337.
12. DeBerardinis RJ, Thompson CB: **Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us?** *cell* 2012, **148**(6):1132-1144.
13. Valastyan S, Weinberg RA: **Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.** *cell* 2011, **147**(2):275-292.
14. Fidler IJ: **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** *Nature reviews cancer* 2003, **3**(6):453-458.
15. Olson MF, Sahai E: **The actin cytoskeleton in cancer cell motility.** *Clinical & experimental metastasis* 2009, **26**(4):273.
16. Yang J, Weinberg R: **Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.** *Developmental cell* 2008, **14**(6):818-829.
17. Jeanes A, Gottardi C, Yap A: **Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?** *Oncogene* 2008, **27**(55):6920-6929.
18. Padmanaban V, Krol I, Suhail Y, Szczerba BM, Aceto N, Bader JS, Ewald AJ: **E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer.** *Nature* 2019, **573**(7774):439-444.

19. Chen H-N, Yuan K, Xie N, Wang K, Huang Z, Chen Y, Dou Q, Wu M, Nice EC, Zhou Z-G: **Pdlim1 stabilizes the e-cadherin/β-catenin complex to prevent epithelial–mesenchymal transition and metastatic potential of colorectal cancer cells.** *Cancer research* 2016, **76**(5):1122-1134.
20. Devlin JR, Verschuren EW: **More than a tumor suppressor: E-cadherin loss drives lung cancer metastasis.** In.: American Thoracic Society; 2018.
21. Krishnamurthy N, Kurzrock R: **Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors.** *Cancer treatment reviews* 2018, **62**:50-60.
22. Schneider JA, Logan SK: **Revisiting the role of Wnt/β-catenin signaling in prostate cancer.** *Molecular and cellular endocrinology* 2018, **462**:3-8.
23. Yang D, Zhang X, Zhang W, Rengarajan T: **Vicenin-2 inhibits Wnt/β-catenin signaling and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cell line.** *Drug design, development and therapy* 2018, **12**:1303.
24. Xue G, Romano E, Massi D, Mandalà M: **Wnt/β-catenin signaling in melanoma: Preclinical rationale and novel therapeutic insights.** *Cancer treatment reviews* 2016, **49**:1-12.
25. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, De Herreros AG: **The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.** *Nature cell biology* 2000, **2**(2):84-89.
26. Wu Y, Zhou BP: **Snail: more than EMT.** *Cell adhesion & migration* 2010, **4**(2):199-203.
27. Petit V, Thiery JP: **Focal adhesions: structure and dynamics.** *Biology of the Cell* 2000, **92**(7):477-494.
28. Slack JK, Lacoste J, Parsons JT: **Focal Adhesion Kinase and its Associated Proteins.** *Signaling Through Cell Adhesion Molecules* 2019:49.
29. Zhou J, Yi Q, Tang L: **The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2019, **38**(1):250.
30. Carisey A, Tsang R, Greiner AM, Nijenhuis N, Heath N, Nazgiewicz A, Kemkemer R, Derby B, Spatz J, Ballestrem C: **Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner.** *Current Biology* 2013, **23**(4):271-281.
31. Kioka N, Sakata S, Kawauchi T, Amachi T, Akiyama SK, Okazaki K, Yaen C, Yamada KM, Aota S-i: **Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization.** *The Journal of cell biology* 1999, **144**(1):59-69.
32. Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Mizutani K, Kameyama K, Tsumoto H, Miura Y, Deguchi T, Ito M: **Integrin β4 and vinculin contained in exosomes are potential markers for progression of prostate cancer associated with taxane-resistance.** *International journal of oncology* 2015, **47**(1):384-390.
33. Rahib L, Smith BD, Aisenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM: **Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States.** *Cancer research* 2014, **74**(11):2913-2921.
34. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2018, **68**(6):394-424.

35. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: **Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality.** *Gut* 2017, **66**(4):683-691.
36. Bardhan K, Liu K: **Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis.** *Cancers* 2013, **5**(2):676-713.
37. Bupathi M, Wu C: **Biomarkers for immune therapy in colorectal cancer: mismatch-repair deficiency and others.** *Journal of gastrointestinal oncology* 2016, **7**(5):713.
38. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F: **Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial.** *J clin oncol* 2009, **27**(19):3109-3116.
39. Moghadamyeghaneh Z, Alizadeh RF, Phelan M, Carmichael JC, Mills S, Pigazzi A, Zell JA, Stamos MJ: **Trends in colorectal cancer admissions and stage at presentation: impact of screening.** *Surgical endoscopy* 2016, **30**(8):3604-3610.
40. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ: **Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer.** *International journal of molecular sciences* 2017, **18**(1):197.
41. Armaghany T, Wilson J, Chu Q, Mills G: **Genetic alterations in colorectal cancer.** *Gastrointest Cancer Res.* 2012; **5** (1): 19–27. In.: Epub 2012/05/11. PMID: 22574233.
42. Yang S, Sun Z, Zhou Q, Wang W, Wang G, Song J, Li Z, Zhang Z, Chang Y, Xia K: **MicroRNAs, long noncoding RNAs, and circular RNAs: potential tumor biomarkers and targets for colorectal cancer.** *Cancer Management and Research* 2018, **10**:2249.
43. Bertucci F, Salas S, Esteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort Jm: **Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters.** *Oncogene* 2004, **23**(7):1377-1391.
44. American Cancer Society Cancer Statistics Center <http://cancerstatisticscenter.cancer.org>: April, 2020.
45. Coates A, Abraham S, Kaye SB, Sowerbutts T, Frewin C, Fox R, Tattersall M: **On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy.** *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 1983, **19**(2):203-208.
46. Rutman RJ, Cantarow A, Paschkis KE: **Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma.** *Cancer research* 1954, **14**(2):119-123.
47. Grem JL: **5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development.** *Investigational new drugs* 2000, **18**(4):299-313.
48. Moertel CG: **Chemotherapy for colorectal cancer.** *New England Journal of Medicine* 1994, **330**(16):1136-1142.
49. Yaffee P, Osipov A, Tan C, Tuli R, Hendifar A: **Review of systemic therapies for locally advanced and metastatic rectal cancer.** *Journal of gastrointestinal oncology* 2015, **6**(2):185.
50. Douillard J, Cunningham D, Roth A, Navarro M, James R, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M: **Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil**

- alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet* 2000, **355**(9209):1041-1047.
51. Marques RP, Duarte GS, Sterrantino C, Pais HL, Quintela A, Martins AP, Costa J: **Triplet (FOLFOXIRI) versus doublet (FOLFOX or FOLFIRI) backbone chemotherapy as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis.** *Critical reviews in oncology/hematology* 2017, **118**:54-62.
52. Kanwar SS, Poolla A, Majumdar A: **Regulation of colon cancer recurrence and development of therapeutic strategies.** *World journal of gastrointestinal pathophysiology* 2012, **3**(1):1.
53. Ferrara N: **The role of the vegf signaling pathway in tumor angiogenesis.** *Tumor Angiogenesis: A Key Target for Cancer Therapy* 2019:211-226.
54. Ciardiello D, Vitiello PP, Cardone C, Martini G, Troiani T, Martinelli E, Ciardiello F: **Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy.** *Cancer treatment reviews* 2019, **76**:22-32.
55. Zhang J, Yang PL, Gray NS: **Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors.** *Nature reviews cancer* 2009, **9**(1):28-39.
56. Hammond WA, Swaika A, Mody K: **Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review.** *Therapeutic advances in medical oncology* 2016, **8**(1):57-84.
57. Van der Jeught K, Xu H-C, Li Y-J, Lu X-B, Ji G: **Drug resistance and new therapies in colorectal cancer.** *World journal of gastroenterology* 2018, **24**(34):3834.
58. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG: **KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection.** *Clin oncol* 2009, **27**(7):1130-1136.
59. Ashburn TT, Thor KB: **Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs.** *Nature reviews Drug discovery* 2004, **3**(8):673-683.
60. Hopkins AL: **Predicting promiscuity.** *Nature* 2009, **462**(7270):167-168.
61. Chong CR, Sullivan DJ: **New uses for old drugs.** *Nature* 2007, **448**(7154):645-646.
62. Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP: **Repurposing drugs in your medicine cabinet: untapped opportunities for cancer therapy?** *Future oncology* 2015, **11**(2):181-184.
63. Abboud C, Berman E, Cohen A, al. e: **The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts.** *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2013, **121**(22):4439-4442.
64. André N, Banavali S, Snihur Y, Pasquier E: **Has the time come for metronomics in low-income and middle-income countries?** *The Lancet Oncology* 2013, **14**(6):e239-e248.
65. Siddiqui M, Rajkumar SV: **The high cost of cancer drugs and what we can do about it.** In: *Mayo Clinic Proceedings*: 2012; Elsevier; 2012: 935-943.
66. Wong H-H, Jessup A, Sertkaya A, Birkenbach A, Berlind A, Eyraud J: **Examination Of Clinical Trial Costs And Barriers For Drug Development Final.** 2014.

67. Kim I-W, Jang H, Kim JH, Kim MG, Kim S, Oh JM: **Computational drug repositioning for gastric cancer using reversal gene expression profiles.** *Scientific reports* 2019, **9**(1):1-10.
68. Edelstein J: **Cáncer: el costo y la efectividad de los medicamentos, en la mira.** In: *La Voz*. 29-10- 2018: 16.
69. Reddy AS, Zhang S: **Polypharmacology: drug discovery for the future.** *Expert review of clinical pharmacology* 2013, **6**(1):41-47.
70. Boolell M, Allen M, Ballard S, Gepi-Attee S, Muirhead G, Naylor A, Osterloh I, Gingell C: **Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction.** *International journal of impotence research* 1996, **8**(2):47-52.
71. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J: **Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, **91**(9):4082-4085.
72. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M: **Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma.** *New England Journal of Medicine* 1999, **341**(21):1565-1571.
73. Ning Y-M, Gulley JL, Arlen PM, Woo S, Steinberg SM, Wright JJ, Parnes HL, Trepel JB, Lee M-J, Kim YS: **Phase II trial of bevacizumab, thalidomide, docetaxel, and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer.** *Journal of clinical oncology* 2010, **28**(12):2070.
74. Díaz-Carballo D, Acikelli AH, Klein J, Jastrow H, Dammann P, Wyganowski T, Guemues C, Gustmann S, Bardenheuer W, Malak S: **Therapeutic potential of antiviral drugs targeting chemorefractory colorectal adenocarcinoma cells overexpressing endogenous retroviral elements.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2015, **34**(1):81.
75. Mayorek N, Naftali-Shani N, Grunewald M: **Diclofenac inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer by modulation of VEGF levels and arginase activity.** *PloS one* 2010, **5**(9).
76. Ertem FU, Zhang W, Chang K, Mohaiza Dashwood W, Rajendran P, Sun D, Abudayyeh A, Vilar E, Abdelrahim M, Dashwood RH: **Oncogenic targets Mmp7, S100a9, Nppb and Aldh1a3 from transcriptome profiling of FAP and Pirc adenomas are downregulated in response to tumor suppression by Clotam.** *International journal of cancer* 2017, **140**(2):460-468.
77. DeFronzo RA, Goodman AM: **Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *New England Journal of Medicine* 1995, **333**(9):541-549.
78. Lord JM, Flight IH, Norman RJ: **Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis.** *Bmj* 2003, **327**(7421):951.
79. Lee M-S, Hsu C-C, Wahlgqvist ML, Tsai H-N, Chang Y-H, Huang Y-C: **Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals.** *BMC cancer* 2011, **11**(1):20.
80. Currie CJ, Poole CD, Jenkins-Jones S, Gale EA, Johnson JA, Morgan CL: **Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: impact of metformin on survival.** *Diabetes care* 2012, **35**(2):299-304.

81. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD: **Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients.** *Bmj* 2005, **330**(7503):1304-1305.
82. Andrzejewski S, Siegel PM, St-Pierre J: **Metabolic profiles associated with metformin efficacy in cancer.** *Frontiers in endocrinology* 2018, **9**:372.
83. Pernicova I, Korbonits M: **Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer.** *Nature Reviews Endocrinology* 2014, **10**(3):143.
84. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Viollet B, Thompson CB: **Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth.** *Cancer research* 2007, **67**(14):6745-6752.
85. Brown SL, Kolozsvary AJ, Isrow D, Al Feghali KA, Lapanowski K, Jenrow KA, Kim JH: **A novel mechanism of high dose radiation sensitization by metformin.** *Frontiers in oncology* 2019, **9**:247.
86. Choi YW, Lim IK: **Sensitization of metformin-cytotoxicity by dichloroacetate via reprogramming glucose metabolism in cancer cells.** *Cancer letters* 2014, **346**(2):300-308.
87. Qu C, Zhang W, Zheng G, Zhang Z, Yin J, He Z: **Metformin reverses multidrug resistance and epithelial–mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells.** *Molecular and cellular biochemistry* 2014, **386**(1-2):63-71.
88. Black J, Crowther A, Shanks R: **Dornhorst AC: a new adrenergic betareceptor antagonist.** *Lancet* 1964, **1**:1080-1081.
89. Webb AJ, Fischer U, Mehta Z, Rothwell PM: **Effects of antihypertensive-drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis.** *The Lancet* 2010, **375**(9718):906-915.
90. Steenen SA, van Wijk AJ, Van Der Heijden GJ, van Westrhenen R, Lange J, Jongh A: **Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis.** *Journal of Psychopharmacology* 2016, **30**(2):128-139.
91. Pan P, Gauthier B, Vidula S, Lydie M, Ilse R, Sukhatme VP: **Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—Propranolol as an anti-cancer agent.** *ecancermedicalscience* 2016, **10**.
92. Bagazgoitia L, Torrelo A, Gutierrez JCL, Hernández-Martín Á, Luna P, Gutierrez M, Bano A, Tamariz A, Larralde M, Alvarez R: **Propranolol for infantile hemangiomas.** *Pediatric dermatology* 2011, **28**(2):108-114.
93. Chang P-Y, Huang W-Y, Lin C-L, Huang T-C, Wu Y-Y, Chen J-H, Kao C-H: **Propranolol reduces cancer risk: a population-based cohort study.** *Medicine* 2015, **94**(27).
94. Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Schuller HM: **Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol.** *Anti-cancer drugs* 2009, **20**(6):477.
95. De Giorgi V, Grazzini M, Benemei S, Marchionni N, Botteri E, Pennacchioli E, Geppetti P, Gandini S: **Propranolol for off-label treatment of patients with melanoma: results from a cohort study.** *JAMA oncology* 2018, **4**(2):e172908-e172908.

96. Liao X, Che X, Zhao W, Zhang D, Bi T, Wang G: **The β-adrenoceptor antagonist, propranolol, induces human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting nuclear factor κB signaling.** *Oncology reports* 2010, **24**(6):1669-1676.
97. Farah BL, Sinha RA, Wu Y, Singh BK, Zhou J, Bay B-H, Yen PM: **β-Adrenergic agonist and antagonist regulation of autophagy in HepG2 cells, primary mouse hepatocytes, and mouse liver.** *PloS one* 2014, **9**(6):e98155.
98. Brohée L, Demine S, Willems J, Arnould T, Colige AC, Deroanne CF: **Lipin-1 regulates cancer cell phenotype and is a potential target to potentiate rapamycin treatment.** *Oncotarget* 2015, **6**(13):11264.
99. Kang F, Ma W, Ma X, Shao Y, Yang W, Chen X, Li L, Wang J: **Propranolol inhibits glucose metabolism and 18F-FDG uptake of breast cancer through posttranscriptional downregulation of hexokinase-2.** *Journal of Nuclear Medicine* 2014, **55**(3):439-445.
100. Qin J-f, Jin F-j, Li N, Guan H-t, Lan L, Ni H, Wang Y: **Adrenergic receptor β2 activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment.** *BMB reports* 2015, **48**(5):295.
101. Tao C-Y, Shang J, Chen T, Yu D, Jiang Y-M, Liu D, Cheng G-Y, Xiao J, Zhao Z-Z: **Impact of antimalarial (AM) on serum lipids in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: A systematic review and meta-analysis.** *Medicine* 2019, **98**(14).
102. Datta S, Choudhury D, Das A, Mukherjee DD, Dasgupta M, Bandopadhyay S, Chakrabarti G: **Autophagy inhibition with chloroquine reverts paclitaxel resistance and attenuates metastatic potential in human nonsmall lung adenocarcinoma A549 cells via ROS mediated modulation of β-catenin pathway.** *Apoptosis* 2019, **24**(5-6):414-433.
103. Cudjoe Jr EK, Kyte SL, Saleh T, Landry JW, Gewirtz DA: **Autophagy Inhibition and Chemosensitization in Cancer Therapy.** In: *Targeting Cell Survival Pathways to Enhance Response to Chemotherapy*. Elsevier; 2019: 259-273.
104. Kim EL, Wüstenberg R, Rübsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bücker E-M, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W: **Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells.** *Neuro-oncology* 2010, **12**(4):389-400.
105. Espinoza JA, Zisi A, Kanellis DC, Carreras-Puigvert J, Henriksson M, Hühn D, Watanabe K, Helleday T, Lindström MS, Bartek J: **The antimalarial drug amodiaquine stabilizes p53 through ribosome biogenesis stress, independently of its autophagy-inhibitory activity.** *Cell Death & Differentiation* 2020, **27**(2):773-789.
106. Friday E, Oliver III R, Turturro F, Welbourne T: **Role of glutamate dehydrogenase in cancer growth and homeostasis.** *Dehydrogenases* 2012.
107. Jarzyna R, Kiersztan A, Lisowa O, Bryła J: **The inhibition of gluconeogenesis by chloroquine contributes to its hypoglycaemic action.** *European journal of pharmacology* 2001, **428**(3):381-388.
108. Ma Q, Gao Y, Xu P, Li K, Xu X, Gao J, Qi Y, Xu J, Yang Y, Song W: **Atorvastatin Inhibits Breast Cancer Cells by Downregulating PTEN/AKT Pathway via Promoting Ras Homolog Family Member B (RhoB).** *BioMed research international* 2019, **2019**.

109. Bao H, Zheng N, Li Z, Zhi Y: **Synergistic Effect of Tangeretin and Atorvastatin for Colon Cancer Combination Therapy: Targeted Delivery of These Dual Drugs Using RGD Peptide Decorated Nanocarriers.** *Drug design, development and therapy* 2020, **14**:3057.
110. Ali A, Levantini E, Fhu CW, Teo JT, Clohessy JG, Goggi JL, Wu C-s, Chen L, Chin TM, Tenen DG: **CAV1-GLUT3 signaling is important for cellular energy and can be targeted by Atorvastatin in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Theranostics* 2019, **9**(21):6157.
111. Stacpoole PW, Greene YJ: **Dichloroacetate.** *Diabetes care* 1992, **15**(6):785-791.
112. Abdelmalak M, Lew A, Ramezani R, Shroads AL, Coats BS, Langae T, Shankar MN, Neiberger RE, Subramony S, Stacpoole PW: **Long-term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis.** *Molecular genetics and metabolism* 2013, **109**(2):139-143.
113. Zhou L, Liu L, Chai W, Zhao T, Jin X, Guo X, Han L, Yuan C: **Dichloroacetic acid upregulates apoptosis of ovarian cancer cells by regulating mitochondrial function.** *Oncotargets and therapy* 2019, **12**:1729.
114. Schoonjans C, Joudiou N, Brusa D, Corbet C, Feron O, Gallez B: **Acidosis-induced metabolic reprogramming in tumor cells enhances the anti-proliferative activity of the PDK inhibitor dichloroacetate.** *Cancer letters* 2020, **470**:18-28.
115. Michelakis E, Webster L, Mackey J: **Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer.** *British journal of cancer* 2008, **99**(7):989-994.
116. Czumaj A, Zabielska J, Pakiet A, Mika A, Rostkowska O, Makarewicz W, Kobiela J, Sledzinski T, Stelmanska E: **In vivo effectiveness of orlistat in the suppression of human colorectal cancer cell proliferation.** *Anticancer research* 2019, **39**(7):3815-3822.
117. Chuang H-Y, Lee Y-P, Lin W-C, Lin Y-H, Hwang J-J: **fatty Acid inhibition Sensitizes Androgen-Dependent and-independent prostate cancer to Radiotherapy via fASn/nf- κ B pathway.** *Scientific reports* 2019, **9**(1):1-11.
118. de Almeida LY, Mariano FS, Bastos DC, Cavassani KA, Raphelson J, Mariano VS, Agostini M, Moreira FS, Coletta RD, Mattos-Graner RO: **The antimetastatic activity of orlistat is accompanied by an antitumoral immune response in mouse melanoma.** *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2020, **85**(2):321-330.
119. Zaytseva YY, Harris JW, Mitov MI, Kim JT, Butterfield DA, Lee EY, Weiss HL, Gao T, Evers BM: **Increased expression of fatty acid synthase provides a survival advantage to colorectal cancer cells via upregulation of cellular respiration.** *Oncotarget* 2015, **6**(22):18891.
120. Mueck W, Kubitz D, Becka M: **Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects.** *British journal of clinical pharmacology* 2013, **76**(3):455-466.
121. Schafranek L, Leclercq TM, White DL, Hughes TP: **Clarithromycin enhances dasatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia cells, by inhibition of late stage autophagy.** *Leukemia & lymphoma* 2013, **54**(1):198-201.
122. Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Ishii H, Hibi T: **Antibiotics directly induce apoptosis in B cell lymphoma cells derived from BALB/c mice.** *Anticancer research* 2004, **24**(6):3723-3730.

123. Yatsunami J, Turuta N, Wakamatsu K, Hara N, Hayashi S-i: **Clarithromycin is a potent inhibitor of tumor-induced angiogenesis.** *Research in experimental medicine* 1997, **197**(4):189-197.
124. Mikasa K, Sawaki M, Kita E, Hamada K, Teramoto S, Sakamoto M, Maeda K, Konishi M, Narita N: **Significant survival benefit to patients with advanced non-small-cell lung cancer from treatment with clarithromycin.** *Cancer chemotherapy* 1997, **43**(4):288-296.
125. Niesvizky R, Jayabalan DS, Furst JR, Cho HJ, Pearse RN, Zafar F, Lent RW, Tepler J, Schuster MW, Leonard JP: **Clarithromycin, lenalidomide and dexamethasone combination therapy as primary treatment of multiple myeloma.** *Journal of clinical oncology* 2006, **24**(18_suppl):7545-7545.
126. Sachs G, Shin JM, Howden C: **The clinical pharmacology of proton pump inhibitors.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2006, **23**:2-8.
127. Zhang B, Yang Y, Shi X, Liao W, Chen M, Cheng AS-L, Yan H, Fang C, Zhang S, Xu G: **Proton pump inhibitor pantoprazole abrogates adriamycin-resistant gastric cancer cell invasiveness via suppression of Akt/GSK- β /β-catenin signaling and epithelial–mesenchymal transition.** *Cancer letters* 2015, **356**(2):704-712.
128. Aoki K, Saito T, Satoh S, Mukasa K, Kaneshiro M, Kawasaki S, Okamura A, Sekihara H: **Dehydroepiandrosterone suppresses the elevated hepatic glucose-6-phosphatase and fructose-1, 6-bisphosphatase activities in C57BL/Ksj-db/db mice: comparison with troglitazone.** *Diabetes* 1999, **48**(8):1579-1585.
129. Mukasa K, Kaneshiro M, Aoki K, Okamura J, Saito T, Satoh S, Sekihara H: **Dehydroepiandrosterone (DHEA) ameliorates the insulin sensitivity in older rats.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1998, **67**(4):355-358.
130. Moynihan JA, Callahan TA, Kelley SP, Campbell LM: **Adrenal Hormone Modulation of Type 1 and Type 2 Cytokine Production by Spleen Cells: Dexamethasone and Dehydroepiandrosterone Suppress Interleukin-2, Interleukin-4, and Interferon-γ Production in Vitro.** *Cellular immunology* 1998, **184**(1):58-64.
131. Herrington DM: **Dehydroepiandrosterone and coronary atherosclerosis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995, **774**:271-280.
132. Osawa E, Nakajima A, Yoshida S, Omura M, Nagase H, Ueno N, Wada K, Matsuhashi N, Ochiai M, Nakagama H: **Chemoprevention of precursors to colon cancer by dehydroepiandrosterone (DHEA).** *Life sciences* 2002, **70**(22):2623-2630.
133. Nyce JW, Magee PN, Hard GC, Schwartz AG: **Inhibition of 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in Balb/c mice by dehydroepiandrosterone.** *Carcinogenesis* 1984, **5**(1):57-62.
134. Pereira MA, Khouri MD: **Prevention by chemopreventive agents of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon.** *Cancer letters* 1991, **61**(1):27-33.
135. Elisabetta P, Llaria M, Sara B, Sara R, Tumedei MM, Elisabetta P, Caterina D, Alessio S, Federico P, Lorenzo G: **Phase II Study of Dehydroepiandrosterone in Androgen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer.** 2019.

136. Schwartz AG, Whitcomb JM, Nyce JW, Lewbart ML, Pashko LL: **Dehydroepiandrosterone and structural analogs: a new class of cancer chemopreventive agents.** *Adv Cancer Res* 1988, **51**(391-424):79.
137. Wahid M, Jawed A, Mandal RK, Dar SA, Khan S, Akhter N, Haque S: **Vismodegib, itraconazole and sonidegib as hedgehog pathway inhibitors and their relative competencies in the treatment of basal cell carcinomas.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016, **98**:235-241.
138. Antonarakis ES, Heath EI, Smith DC, Rathkopf D, Blackford AL, Danila DC, King S, Frost A, Ajiboye AS, Zhao M: **Repurposing itraconazole as a treatment for advanced prostate cancer: a noncomparative randomized phase II trial in men with metastatic castration-resistant prostate cancer.** *The oncologist* 2013, **18**(2):163.
139. Hu Q, Hou Y-C, Huang J, Fang J-Y, Xiong H: **Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2017, **36**(1):50.
140. Liang G, Liu M, Wang Q, Shen Y, Mei H, Li D, Liu W: **Itraconazole exerts its anti-melanoma effect by suppressing Hedgehog, Wnt, and PI3K/mTOR signaling pathways.** *Oncotarget* 2017, **8**(17):28510.
141. Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP: **Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—itraconazole as an anti-cancer agent.** *ecancermedicalscience* 2015, **9**.
142. Cheng F: **In silico oncology drug repositioning and polypharmacology.** In: *Cancer Bioinformatics*. Springer; 2019: 243-261.
143. Lagarde N, Rey J, Gyulkhandanyan A, Tufféry P, Miteva MA, Villoutreix BO: **Online structure-based screening of purchasable approved drugs and natural compounds: Retrospective examples of drug repositioning on cancer targets.** *Oncotarget* 2018, **9**(64):32346.
144. Alaimo S, Giugno R, Pulvirenti A: **Recommendation techniques for drug–target interaction prediction and drug repositioning.** In: *Data Mining Techniques for the Life Sciences*. Springer; 2016: 441-462.
145. Wilhelm BT, Landry J-R: **RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing.** *Methods* 2009, **48**(3):249-257.
146. Brazma A: **Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—successes, failures, challenges.** *The Scientific World Journal* 2009, **9**.
147. Clough E, Barrett T: **The gene expression omnibus database.** In: *Statistical genomics*. Springer; 2016: 93-110.
148. Athar A, Füllgrabe A, George N, Iqbal H, Huerta L, Ali A, Snow C, Fonseca NA, Petryszak R, Papatheodorou I: **ArrayExpress update—from bulk to single-cell expression data.** *Nucleic acids research* 2019, **47**(D1):D711-D715.
149. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J: **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.** *Genome biology* 2004, **5**(10):R80.
150. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA: **affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level.** *Bioinformatics* 2004, **20**(3):307-315.

151. Carvalho B: **An Introduction to the Oligo Package**. In.; 2007.
152. Kauffmann A, Gentleman R, Huber W: **arrayQualityMetrics—a bioconductor package for quality assessment of microarray data**. *Bioinformatics* 2009, **25**(3):415-416.
153. Wilson CL, Miller CJ: **Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis**. *Bioinformatics* 2005, **21**(18):3683-3685.
154. Parman C, Halling C: **affyQCReport: a package to generate QC reports for affymetrix array data**. In: *Bioconductor Package Help Documentation*. 2008.
155. Wu Z, Liu W, Jin X, Ji H, Wang H, Glusman G, Robinson M, Liu L, Ruan J, Gao S: **NormExpression: an R package to normalize gene expression data using evaluated methods**. *Frontiers in genetics* 2019, **10**:400.
156. Smyth GK: **Limma: linear models for microarray data**. In: *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Springer; 2005: 397-420.
157. Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P: **Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments**. *FEBS letters* 2004, **573**(1-3):83-92.
158. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays**. In.: Google Patents; 2008.
159. Carlson M, Falcon S, Pages H, Li N: **GO. db: A set of annotation maps describing the entire Gene Ontology**. *R package version* 2017, **3**(0):10.18129.
160. Yu G, He Q-Y: **ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization**. *Molecular BioSystems* 2016, **12**(2):477-479.
161. Fresno C, Fernandez EA, Fresno MC, Chart A: **Package ‘RDAVIDWebService’**. 2014.
162. Zhao S, Guo Y, Shyr Y: **KEGGprofile: An annotation and visualization package for multi-types and multi-groups expression data in KEGG pathway**. *R package version* 2012, **1**(1).
163. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: **Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data**. *Biostatistics* 2003, **4**(2):249-264.
164. Draghici S, Kuklin A, Hoff B, Shams S: **Experimental design, analysis of variance and slide quality assessment in gene expression arrays**. *Current Opinion in Drug Discovery Development* 2001, **4**(3):332-337.
165. Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, Roberts M-A: **The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data**. *BMC bioinformatics* 2002, **3**(1):17.
166. Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G, Duan Z-H: **Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations**. In: *BMC bioinformatics: 2012*; Springer; 2012: S11.
167. Draghici S: **Statistical intelligence: effective analysis of high-density microarray data**. *Drug discovery today* 2002, **7**(11):S55-S63.

168. Speed T: **Statistical analysis of gene expression microarray data**: CRC Press; 2003.
169. Billingsley P: **Probability and measure**: John Wiley & Sons; 2008.
170. Faraway JJ: **Linear models with R**: CRC press; 2014.
171. Chu G, Li J, Narasimhan B, Tibshirani R, Tusher V: **Significance analysis of microarrays users guide and technical document**. 2001.
172. Breitling R, Herzyk P: **Rank-based methods as a non-parametric alternative of the T-statistic for the analysis of biological microarray data**. *Journal of bioinformatics and computational biology* 2005, **3**(05):1171-1189.
173. Maciejewski H: **Gene set analysis methods: statistical models and methodological differences**. *Briefings in bioinformatics* 2014, **15**(4):504-518.
174. Motulsky H: **GraphPad curve fitting guide**. In.; 2016.
175. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. *Journal of biological chemistry* 1951, **193**:265-275.
176. Horzum U, Ozdil B, Pesen-Okvur D: **Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions**. *MethodsX* 2014, **1**:56-59.
177. Swift ML: **GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing**. *Journal of chemical information and computer sciences* 1997, **37**(2):411-412.
178. Rowsell HC: **The Canadian Council on Animal Care--its guidelines and policy directives: the veterinarian's responsibility**. *Canadian journal of veterinary research* 1991, **55**(3):205.
179. Neufert C, Becker C, Neurath MF: **An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression**. *Nature protocols* 2007, **2**(8):1998.
180. JW M: **hugene20sttranscriptcluster. db: Affymetrix hugene20 annotation data (chip hugene20sttranscriptcluster)**. *R package version* 2013, **8**(1).
181. Carlson M, Falcon S, Pages H, Li N: **hgu133plus2. db: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array annotation data (chip hgu133plus2)**. *R package version* 2016, **3**(3).
182. Chen H, Boutros PC: **VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R**. *BMC bioinformatics* 2011, **12**(1):35.
183. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania AJGr: **PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function**. 2003, **13**(9):2129-2141.
184. Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, Peck DD, Natoli TE, Lu X, Gould J, Davis JF, Tubelli AA, Asiedu JK: **A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles**. *Cell* 2017, **171**(6):1437-1452. e1417.
185. Koleti A, Terryn R, Stathias V, Chung C, Cooper DJ, Turner JP, Vidović D, Forlin M, Kelley TT, D'Urso A: **Data Portal for the Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS) program: integrated access to diverse large-scale cellular perturbation response data**. *Nucleic acids research* 2018, **46**(D1):D558-D566.

186. Li J, Zheng J, Wang S, Lau HK, Fathi A, Wang Q: **Cardiovascular benefits of native GLP-1 and its metabolites: an indicator for GLP-1-therapy strategies.** *Frontiers in Physiology* 2017, **8**:15.
187. Fabbiano S, Menacho-Márquez M, Sevilla MA, Albarrán-Juárez J, Zheng Y, Offermanns S, Montero MJ, Bustelo XR: **Genetic dissection of the vav2-rac1 signaling axis in vascular smooth muscle cells.** *Molecular and cellular biochemistry cellular biology* 2014, **34**(24):4404-4419.
188. Loomans-Kropp HA, Umar A: **Increasing Incidence of Colorectal Cancer in Young Adults.** *Journal of Cancer Epidemiology* 2019, **2019**.
189. Pushpakom S, Iorio F, Evers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilliams T, Latimer J, McNamee C: **Drug repurposing: progress, challenges and recommendations.** *Nature reviews Drug discovery* 2019, **18**(1):41-58.
190. Yoshida GJ: **Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research Clinical Cancer Research* 2015, **34**(1):1-10.
191. Anselmino L, Malizia F, Menacho-Márquez M: **Modern Strategies in Cancer Study: Drug Repositioning in Colorectal Cancer Treatment.** 2019.
192. Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP, Vikas P: **The repurposing drugs in oncology (ReDO) project.** *Cancer Medical Science* 2014, **8**.
193. Pantziarka P, Verbaanderd C, Sukhatme V, Capistrano IR, Crispino S, Gyawali B, Rooman I, Van Nuffel AM, Meheus L, Sukhatme VP: **ReDO_DB: the repurposing drugs in oncology database.** *Cancer Medical Science* 2018, **12**.
194. Brown AS, Patel CJ: **A standard database for drug repositioning.** *Scientific data* 2017, **4**(1):1-7.
195. Aires). MB: 2016, **VOL. 76 Supl. I.**
196. Rico M, Baglioni M, Bondarenko M, Laluce NC, Rozados V, Nicolas A, Carré M, Scharovsky OG, Márquez MM: **Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models.** *Oncotarget* 2017, **8**(2):2874.
197. Liao P, Song K, Zhu Z, Liu Z, Zhang W, Li W, Hu J, Hu Q, Chen C, Chen B: **Propranolol suppresses the growth of colorectal cancer through simultaneously activating autologous CD8+ T cells and inhibiting tumor AKT/MAPK pathway.** *Clinical Pharmacology Therapeutics* 2020.
198. Pantziarka P, Bouche G, Sukhatme V, Meheus L, Rooman I, Sukhatme VP: **Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—Propranolol as an anti-cancer agent.** *Cancer Medical Science* 2016, **10**.
199. Dowling RJ, Lam S, Bassi C, Mouaaz S, Aman A, Kiyota T, Al-Awar R, Goodwin PJ, Stambolic V: **Metformin pharmacokinetics in mouse tumors: implications for human therapy.** *Cell Metabolism* 2016, **23**(4):567-568.
200. Erices R, Bravo ML, Gonzalez P, Oliva B, Racionero D, Garrido M, Ibañez C, Kato S, Brañes J, Pizarro J: **Metformin, at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells.** *Reproductive sciences* 2013, **20**(12):1433-1446.

201. Baglioni MV, Anselmino LE, Laluce NC, Malizia F, Chapo GF, Mainetti LE, Rozados VR, Scharovsky OG, Rico MJ, Márquez MAM: **Drug repositioning for triple negative breast and colorectal cancers treatment: Exploring the use of metformin and propranolol.** In.: AACR; 2020.
202. Mogavero A, Maiorana MV, Zanutto S, Varinelli L, Bozzi F, Belfiore A, Volpi CC, Gloghini A, Pierotti MA, Gariboldi M: **Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production.** *Scientific reports* 2017, **7**(1):1-12.
203. Kamarudin MNA, Sarker MMR, Zhou J-R, Parhar I: **Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2019, **38**(1):491.
204. Liao P, Song K, Zhu Z, Liu Z, Zhang W, Li W, Hu J, Hu Q, Chen C, Chen B: **Propranolol suppresses the growth of colorectal cancer through simultaneously activating autologous CD8+ T cells and inhibiting tumor AKT/MAPK pathway.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2020.
205. Duckett MM, Phung SK, Nguyen L, Khammanivong A, Dickerson E, Dusenberry K, Lawrence J: **The adrenergic receptor antagonists propranolol and carvedilol decrease bone sarcoma cell viability and sustained carvedilol reduces clonogenic survival and increases radiosensitivity in canine osteosarcoma cells.** *Veterinary Comparative Oncology* 2020, **18**(1):128-140.
206. Gong L, Lei Y, Tan X, Dong Y, Luo Z, Zhang D, Han S: **Propranolol selectively inhibits cervical cancer cell growth by suppressing the cGMP/PKG pathway.** *Biomedicine Pharmacotherapy* 2019, **111**:1243-1248.
207. Amable G, Martínez-León E, Picco ME, Nemirovsky SI, Rozengurt E, Rey O: **Metformin inhibition of colorectal cancer cell migration is associated with rebuilt adherens junctions and FAK downregulation.** *Journal of Cellular Physiology* 2020.
208. Masur K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F: **Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by β-blockers.** *Cancer Research* 2001, **61**(7):2866-2869.
209. Sood AK, Armaiz-Pena GN, Halder J, Nick AM, Stone RL, Hu W, Carroll AR, Spannuth WA, Deavers MT, Allen JK: **Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis.** *The Journal of clinical investigation* 2010, **120**(5):1515-1523.
210. Cheng Y, Gao X-H, Li X-J, Cao Q-H, Zhao D-D, Zhou J-R, Wu H-X, Wang Y, You L-J, Yang H-B: **Depression promotes prostate cancer invasion and metastasis via a sympathetic-cAMP-FAK signaling pathway.** *Oncogene* 2018, **37**(22):2953-2966.
211. Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M: **Turnover of focal adhesions and cancer cell migration.** *International journal of cell biology* 2012, **2012**.
212. Hakimee H, Hutamekalin P, Tanasawet S, Chonpathompikulert P, Tipmanee V, Sukketsiri W: **Metformin Inhibit Cervical Cancer Migration by Suppressing the FAK/Akt Signaling Pathway.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 2019, **20**(12):3539.

213. Kotelevets L, Chastre E: **Rac1 Signaling: From Intestinal Homeostasis to Colorectal Cancer Metastasis.** *Cancers* 2020, **12**(3):665.
214. Dopeso H, Rodrigues P, Bilic J, Bazzocco S, Cartón-García F, Macaya I, De Marcondes PG, Anguita E, Masanas M, Jiménez-Flores LM: **Mechanisms of inactivation of the tumour suppressor gene RHOA in colorectal cancer.** *British journal of cancer* 2018, **118**(1):106-116.
215. Gargiulo L, Rivero EM, di Siervi N, Buzzi ED, Buffone MG, Davio CA, Lüthy IA, Bruzzone A: **Agonist Effects of Propranolol on Non-Tumor Human Breast Cells.** *Cells* 2020, **9**(4):1036.
216. Stiles J, Amaya C, Pham R, Rowntree RK, Lacaze M, Mulne A, Bischoff J, Kokta V, Boucheron LE, Mitchell DC: **Propranolol treatment of infantile hemangioma endothelial cells: A molecular analysis.** *Experimental and molecular pathology therapeutic medicine* 2012, **4**(4):594-604.
217. Zhang C, Wang Y: **Metformin attenuates cells stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells by inhibiting the Wnt3a/β-catenin pathway.** *Molecular Medicine Reports* 2019, **19**(2):1203-1209.
218. Wang Y, Wu Z, Hu L: **Epithelial-mesenchymal transition phenotype, metformin, and survival for colorectal cancer patients with diabetes mellitus II.** *Gastroenterology Research Practice* 2017, **2017**.
219. Cheng X, Xu X, Chen D, Zhao F, Wang W: **Therapeutic potential of targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in colorectal cancer.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019, **110**:473-481.
220. Zhang J, Deng Y-t, Liu J, Wang Y-q, Yi T-w, Huang B-y, He S-s, Zheng B, Jiang Y: **Norepinephrine induced epithelial–mesenchymal transition in HT-29 and A549 cells in vitro.** *Journal of cancer research* 2016, **142**(2):423-435.
221. Li N, Xi Y, Tinsley HN, Gurpinar E, Gary BD, Zhu B, Li Y, Chen X, Keeton AB, Abadi AH: **Sulindac selectively inhibits colon tumor cell growth by activating the cGMP/PKG pathway to suppress Wnt/β-catenin signaling.** *Molecular cancer therapeutics* 2013, **12**(9):1848-1859.
222. Citterio C, Menacho-Marquez M, Garcia-Escudero R, Larive RM, Barreiro O, Sanchez-Madrid F, Paramio JM, Bustelo XR: **The Rho exchange factors Vav2 and Vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells.** *Science signaling* 2012, **5**(244):ra71-ra71.
223. Blondy S, David V, Verdier M, Mathonnet M, Perraud A, Christou N: **5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes.** *Cancer Science* 2020, **111**(9):3142.
224. Park JH, Kim Yh, Park EH, Lee SJ, Kim H, Kim A, Lee SB, Shim S, Jang H, Myung JK: **Effects of metformin and phenformin on apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in chemoresistant rectal cancer.** *Cancer science* 2019, **110**(9):2834.
225. Deng X-S, Wang S, Deng A, Liu B, Edgerton SM, Lind SE, Wahdan-Alaswad R, Thor AD: **Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers.** *Cell cycle* 2012, **11**(2):367-376.

226. Kim S-H, Kim S-C, Ku J-L: **Metformin increases chemo-sensitivity via gene downregulation encoding DNA replication proteins in 5-Fu resistant colorectal cancer cells.** *Oncotarget* 2017, **8**(34):56546.
227. Mazurek M, Litak J, Kamieniak P, Kulesza B, Jonak K, Baj J, Grochowski C: **Metformin as Potential Therapy for High-Grade Glioma.** *Cancers* 2020, **12**(1):210.
228. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udon H: **Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015, **112**(6):1809-1814.
229. Yao H, Duan Z, Wang M, Awonuga AO, Rappolee D, Xie Y: **Adrenaline induces chemoresistance in HT-29 colon adenocarcinoma cells.** *Cancer genetics and cytogenetics* 2009, **190**(2):81-87.
230. Fang S, Fang X: **Advances in glucose metabolism research in colorectal cancer.** *Biomedical reports* 2016, **5**(3):289-295.
231. Wei W-J, Shen C-T, Song H-J, Qiu Z-L, Luo Q-Y: **Propranolol sensitizes thyroid cancer cells to cytotoxic effect of vemurafenib.** *Oncology reports* 2016, **36**(3):1576-1584.
232. Hodge RG, Ridley AJ: **Regulating Rho GTPases and their regulators.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2016, **17**(8):496.
233. Bustelo XR: **RHO GTPases in cancer: known facts, open questions, and therapeutic challenges.** *Biochemical Society transactions* 2018, **46**(3):741-760.
234. Haga RB, Ridley AJ: **Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology.** *Small GTPases* 2016, **7**(4):207-221.
235. Møller LLV, Klip A, Sylow L: **Rho GTPases—Emerging Regulators of Glucose Homeostasis and Metabolic Health.** *Cells* 2019, **8**(5):434.
236. Zheng C-W, Zeng R-J, Xu L-Y, Li E-M: **Rho GTPases: Promising candidates for overcoming chemotherapeutic resistance.** *Cancer Letters* 2020, **475**:65-78.
237. Wang X, Ghareeb WM, Lu X, Huang Y, Huang S, Chi P: **Coexpression network analysis linked H2AFJ to chemoradiation resistance in colorectal cancer.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2019, **120**(6):10351-10362.
238. Goka ET, Lippman ME: **Rac1b: An emerging therapeutic target for chemoresistance in colorectal cancer.** In: *Drug Resistance in Colorectal Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies.* Elsevier; 2020: 153-171.
239. Ruihua H, Mengyi Z, Chong Z, Meng Q, Xin M, Qiulin T, Feng B, Ming L: **RhoA regulates resistance to irinotecan by regulating membrane transporter and apoptosis signaling in colorectal cancer.** *Oncotarget* 2016, **7**(52):87136.
240. Zheng Z, He X-Y, Li J-F, Yu B-Q, Chen X-H, Ji J, Zhang J-N, Gu Q-L, Zhu Z-G, Liu B-Y: **RhoGDI2 confers resistance to 5-fluorouracil in human gastric cancer cells.** *Oncology Letters* 2013, **5**(1):255-260.
241. Tan B, Li Y, Zhao Q, Fan L, Liu Y, Wang D, Zhao X: **Inhibition of Vav3 could reverse the drug resistance of gastric cancer cells by downregulating JNK signaling pathway.** *Cancer gene therapy* 2014, **21**(12):526-531.

242. Sahai E, Marshall CJ: **RHO-GTPases and cancer.** *Nature Reviews Cancer* 2002, **2**(2):133-142.
243. Hofbauer SW, Krenn PW, Ganghammer S, Asslaber D, Pichler U, Oberascher K, Henschler R, Wallner M, Kerschbaum H, Greil R: **Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells.** *The Journal of the American Society of Hematology* 2014, **123**(14):2181-2188.
244. Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F: **The tumor microenvironment: a pitch for multiple players.** *Frontiers in oncology* 2013, **3**:90.
245. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C: **The emerging multiple roles of nuclear Akt.** *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research* 2012, **1823**(12):2168-2178.
246. Mező G, Manea M: **Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones.** *Expert opinion on drug delivery* 2010, **7**(1):79-96.
247. Lajkó E, Hegedüs R, Mező G, Kőhidai L: **Apoptotic Effects of Drug Targeting Conjugates Containing Different GnRH Analogs on Colon Carcinoma Cells.** *International journal of molecular sciences* 2019, **20**(18):4421.
248. Carlsson E, Ranki A, Sipilä L, Karenko L, Abdel-Rahman W, Ovaska K, Siggberg L, Aapola U, Ässämäki R, Häyry V: **Potential role of a navigator gene NAV3 in colorectal cancer.** *British journal of cancer* 2012, **106**(3):517-524.
249. Gründker C, Emons G: **The role of gonadotropin-releasing hormone in cancer cell proliferation and metastasis.** *Frontiers in endocrinology* 2017, **8**:187.
250. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M: **Wnt signaling in cancer.** *Oncogene* 2017, **36**(11):1461-1473.
251. Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N: **Wnt signaling pathways meet Rho GTPases.** *Genes developmental cell* 2009, **23**(3):265-277.
252. He L, Zhu H, Zhou S, Wu T, Wu H, Yang H, Mao H, SekharKathera C, Janardhan A, Edick AM: **Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells.** *Experimental molecular Medicine Reports* 2018, **50**(8):1-12.
253. Li Q, Yang T, Li D, Ding F, Bai G, Wang W, Sun H: **Knockdown of aquaporin-5 sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil via inhibition of the Wnt-β-catenin signaling pathway.** *Biochemistry Cell Biology* 2018, **96**(5):572-579.
254. Cho Y-H, Ro EJ, Yoon J-S, Mizutani T, Kang D-W, Park J-C, Kim TI, Clevers H, Choi K-Y: **5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/β-catenin pathway activation.** *Nature Communications* 2020, **11**(1):1-13.
255. Kobayashi M, Funayama R, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K: **Wnt-β-catenin signaling regulates ABCC 3 (MRP 3) transporter expression in colorectal cancer.** *Cancer science* 2016, **107**(12):1776-1784.
256. Huang G-L, Song W, Zhou P, Fu Q-R, Lin C-L, Chen Q-X, Shen D-Y: **Oncogenic retinoic acid receptor γ knockdown reverses multi-drug resistance of human colorectal cancer via Wnt/β-catenin pathway.** *Cell Cycle* 2017, **16**(7):685-692.

257. Bordonaro M, Tewari S, Cicco CE, Atamna W, Lazarova DL: **A switch from canonical to noncanonical Wnt signaling mediates drug resistance in colon cancer cells.** *PLoS One* 2011, **6**(11):e27308.
258. Yu L, Yang X, Xu C, Sun J, Fang Z, Pan H, Han W: **Comprehensive analysis of the expression and prognostic value of CXC chemokines in colorectal cancer.** *International Immunopharmacology* 2020, **89**:107077.
259. Zhao J, Ou B, Han D, Wang P, Zong Y, Zhu C, Liu D, Zheng M, Sun J, Feng H: **Tumor-derived CXCL5 promotes human colorectal cancer metastasis through activation of the ERK/Elk-1/Snail and AKT/GSK3 β /β-catenin pathways.** *Molecular cancer* 2017, **16**(1):1-15.
260. Speetjens FM, Kuppen PJ, Sandel MH, Menon AG, Burg D, van de Velde CJ, Tollenaar RA, de Bont HJ, Nagelkerke JF: **Disrupted expression of CXCL5 in colorectal cancer is associated with rapid tumor formation in rats and poor prognosis in patients.** *Clinical Cancer Research* 2008, **14**(8):2276-2284.
261. Hu B, Fan H, Lv X, Chen S, Shao Z: **Prognostic significance of CXCL5 expression in cancer patients: a meta-analysis.** *Cancer cell international* 2018, **18**(1):68.
262. Dabkeviciene D, Jonusiene V, Zitkute V, Zalyte E, Grigaitis P, Kirveliene V, Sasnauskienė A: **The role of interleukin-8 (CXCL8) and CXCR2 in acquired chemoresistance of human colorectal carcinoma cells HCT116.** *Medical oncology* 2015, **32**(12):258.
263. Xiao Y-C, Yang Z-B, Cheng X-S, Fang X-B, Shen T, Xia C-F, Liu P, Qian H-H, Sun B, Yin Z-F: **CXCL8, overexpressed in colorectal cancer, enhances the resistance of colorectal cancer cells to anoikis.** *Cancer letters* 2015, **361**(1):22-32.
264. Li J, Liu Q, Huang X, Cai Y, Song L, Xie Q, Liu F, Chen X, Xu P, Zeng F: **Transcriptional profiling reveals the regulatory role of CXCL8 in promoting colorectal cancer.** *Frontiers in Genetics* 2020, **10**:1360.
265. Sun G, Li Y, Peng Y, Lu D, Zhang F, Cui X, Zhang Q, Li Z: **Identification of differentially expressed genes and biological characteristics of colorectal cancer by integrated bioinformatics analysis.** *Journal of Cellular Physiology* 2019, **234**(9):15215-15224.
266. Sheikhpour E, Noorbakhsh P, Foroughi E, Farahnak S, Nasiri R, Neamatzadeh H: **A survey on the role of interleukin-10 in breast cancer: A narrative.** *Reports of biochemistry & molecular biology* 2018, **7**(1):30.
267. Sturlan S, Oberhuber G, Beinhauer BG, Tichy B, Kappel S, Wang J, Rogy MA: **Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer development.** *Carcinogenesis* 2001, **22**(4):665-671.
268. del Carmen S, de LeBlanc AdM, Levit R, Azevedo V, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, LeBlanc JG: **Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model.** *International immunopharmacology* 2017, **42**:122-129.
269. Li J, Huang L, Zhao H, Yan Y, Lu J: **The Role of Interleukins in Colorectal Cancer.** *International Journal of Biological Sciences* 2020, **16**(13):2323.
270. Hsu H-M, Chu C-M, Chang Y-J, Yu J-C, Chen C-T, Jian C-E, Lee C-Y, Chiang Y-T, Chang C-W, Chang Y-T: **Six novel immunoglobulin genes as biomarkers for better prognosis in triple-**

- negative breast cancer by gene co-expression network analysis.** *Scientific reports* 2019, **9**(1):1-12.
271. Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, Nicolay HJM, Sigalotti L, Maio M: **The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential.** *Molecular oncology* 2011, **5**(2):164-182.
272. Gerhardt A, Usener D, Keese M, Sturm J, Schadendorf D, Eichmüller S: **Tissue expression and sero-reactivity of tumor-specific antigens in colorectal cancer.** *Cancer letters* 2004, **208**(2):197-206.
273. Eichmüller S, Usener D, Jochim A, Schadendorf D: **mRNA expression of tumor-associated antigens in melanoma tissues and cell lines.** *Experimental dermatology* 2002, **11**(4):292-301.
274. Kutilin D: **Regulation of Gene Expression of Cancer/Testis Antigens in Colorectal Cancer Patients.** *Molecular Biology* 2020, **54**(4):520-534.
275. Kasuga C, Nakahara Y, Ueda S, Hawkins C, Taylor MD, Smith CA, Rutka JT: **Expression of MAGE and GAGE genes in medulloblastoma and modulation of resistance to chemotherapy.** *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 2008, **1**(4):305-313.
276. Dinić J, Efferth T, García-Sosa AT, Grahovac J, Padrón JM, Pajeva I, Rizzolio F, Saponara S, Spengler G, Tsakovska I: **Repurposing old drugs to fight multidrug resistant cancers.** *Drug Resistance Updates* 2020:100713.
277. Van Cutsem E, Cunningham D, Huinink WTB, Punt C, Alexopoulos C, Dirix L, Symann M, Blijham G, Cholet P, Fillet G: **Clinical activity and benefit of irinotecan (CPT-11) in patients with colorectal cancer truly resistant to 5-fluorouracil (5-FU).** *European journal of cancer* 1999, **35**(1):54-59.
278. Vanhoefer U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Rustum YM: **Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview.** *Journal of clinical oncology* 2001, **19**(5):1501-1518.
279. Jonsson E, Dhar S, Jonsson B, Nygren P, Graf W, Larsson R: **Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines.** *European journal of cancer* 2000, **36**(16):2120-2127.
280. Quoix E: **Topotecan in the treatment of relapsed small cell lung cancer.** *OncoTargets and therapy* 2008, **1**:79.
281. Decker AM, Decker JT, Jung Y, Cackowski FC, Daignault-Newton S, Morgan TM, Shea LD, Taichman RS: **Adrenergic Blockade Promotes Maintenance of Dormancy in Prostate Cancer Through Upregulation of GAS6.** *Translational Oncology* 2020, **13**(7):100781.
282. Noroozi S, Ahmadi R, Iranshahi M: **The Apoptotic Effects of Tolmetin on Human Gastric Cancer Cells.** *Journal of Payavard Salamat* 2020, **14**(2):144-151.
283. Noroozi S: **Tolmetin Inhibits Cervical Cancer Cells Proliferation.** *International Conference on BioMedical Sciences (ICBMS19) Turkey* 2019.
284. Yoo BC, Jeon E, Hong S-H, Shin Y-K, Chang HJ, Park J-G: **Metabotropic glutamate receptor 4-mediated 5-fluorouracil resistance in a human colon cancer cell line.** *Clinical Cancer Research* 2004, **10**(12):4176-4184.

285. Kang DW, Lee BH, Suh Y-A, Choi Y-S, Jang SJ, Kim YM, Choi K-Y: **Phospholipase D1 inhibition linked to upregulation of ICAT blocks colorectal cancer growth hyperactivated by Wnt/β-catenin and PI3K/Akt Signaling.** *Clinical Cancer Research* 2017, **23**(23):7340-7350.
286. Ghiringhelli F, Guiu B, Chauffert B, Ladoire S: **Sirolimus, bevacizumab, 5-Fluorouracil and irinotecan for advanced colorectal cancer: a pilot study.** *World Journal of Gastroenterology* 2009, **15**(34):4278.
287. Watanabe M, Sowa Y, Yogosawa M, Sakai T: **Novel MEK inhibitor trametinib and other retinoblastoma gene (RB)-reactivating agents enhance efficacy of 5-fluorouracil on human colon cancer cells.** *Cancer science* 2013, **104**(6):687-693.
288. Chang F, Lemmon CA, Park D, Romer LH: **FAK potentiates Rac1 activation and localization to matrix adhesion sites: a role for βPIX.** *Molecular biology of the cell* 2007, **18**(1):253-264.

Agradecimientos

Me cuesta creer en las causalidades, quizá mi formación me hizo creer que todo en la vida es por culpa del “azar”. Pero en esta etapa aprendí, que a veces la vida “sin querer queriendo” te lleva por ciertos caminos. Y por esas casualidades (o no), conocí gente que no solo me hizo crecer intelectualmente, sino también como persona.

Sin duda, la primera lección importante que me llevo de esta etapa es a cerca del liderazgo. Siempre fui una persona con un poco de temor a la autoridad. Durante mucho tiempo asumí erróneamente la idea de que autoridad y superioridad eran lo mismo. Aprendí a callar y a no cuestionar demasiado. Cada vez que una idea rondaba por mi cabeza, una vocecita boicotera me decía por atrás “y mira si lo que decís es una boludez”, “y mira si lo que preguntas ya lo tendrías que saber”, “y mira si, y mira, y mira...”. Lastimosamente, me topé con varias personas que le daban pie a esa vocecita. Y así, con el correr del tiempo me acostumbre a pensar hacia adentro.

Sin embargo, en estos últimos años conocí líderes con perfiles completamente diferentes a los que conocía, como Mauricio Menacho o Gustavo Chapo. Personas que dan el ejemplo, que trasmiten confianza, seguridad y generan un compromiso basado en la admiración y el respeto mutuo. Personas que no buscan culpables, sino soluciones. Que te enseñan a aprender de tus propios errores y te sacan el miedo de intentar. Los años que estuve bajo la dirección de Mauricio, me sorprendió la facilidad con la que, de pronto, esa voz en mi cabeza comenzó a callarse, ya no había preguntas tontas, ni ideas malas, todo se trataba de aprender. A pesar de estar en situaciones difíciles, en las que no todo salía como se esperaba, vi en él a una persona que se concentró en nunca perder el aguante, el empuje, las ganas, el optimismo. Y entonces entendí que ser líder requiere de un estricto autocontrol emocional, una capacidad desarrollada para separar el ambiente laboral de la vida personal, paciencia por demás y mucha determinación para ayudar al otro a sacar lo mejor de sí mismo. Sin duda, ser líder no es una tarea sencilla. Por eso mi querido Mauri, quiero agradecerte estos años en los que te he visto cada día dejar lo mejor de vos mismo, con altas, con bajas, con días mejores y peores, pero siempre determinado a hacer que las cosas vayan hacia adelante. Quiero que sepas que te admiro profundamente. No pierdas nunca esa humildad con la que enfrentas la vida y que sin darte cuenta ayuda a muchos a creer más en sí mismos, a perder el miedo de intentarlo.

La segunda lección es a cerca del trabajo en equipo. “Dos mentes piensan mejor que una”, sin duda. Por lo general, uno lee la frase en algún libro o la escucha en una película, pero no entiende lo que significa hasta que, fehacientemente, le toca pensar en equipo. Soy alguien a quien puede llamarse “antisocial”, siempre fui el que estaba en el fondo del aula, el que no hablaba mucho. La realidad es que las relaciones sociales no son (ni fueron nunca) mi fuerte. Ya se habrán dado cuenta, chicxs, porque nunca iba a ninguna reunión extralaboral, habrán pensado “que mala onda este”. Pero a pesar de que siempre me mantuve en el rincón oscuro, en alguna esquina o en cualquier lugar en el que no haya mucha luz para pasar desapercibido, aprendí mucho de cada una de las personas con la que compartí el ambiente laboral: cada cual es un mundo, todos vemos la misma cosa desde un

ángulo diferente, pero ninguno de estos enfoques puede considerarse correcto o incorrecto. El truco del trabajo en equipo es la tolerancia. Aceptar que la idea del otro no vale más ni menos que la mía, buscar la forma en que esas ideas pueden complementarse para crear algo mejor. El trabajo en equipo requiere tanto de aprender a escuchar, como de buscar las palabras correctas para expresar una idea de la mejor manera, sin herir, sin desestimar, sin desmerecer.

No puedo dejar de hacer mención de las personas que tuve más cerca: Vicky, Flor y Nahu. Agradecer a Vicky por sus ayudas en mi proyecto, por sus valiosos aportes y colaboraciones, por la paciencia en enseñarme técnicas que me fueron de mucha utilidad. Mil gracias Vicky por la buena onda y el aguante en todo. Flor y Nahu, estos últimos dos años la vida nos acercó mucho. Y chicxs, a pesar de que me resistí, es imposible no quererlos. Realmente hacen que los días sean mejores, crean un ambiente de trabajo llevadero, dinámico y muy enriquecedor. Florcita, te agradezco porque de vos aprendí muchas cosas, siempre estás ahí cuando alguien te necesita. Quizá ya te lo he dicho, pero veo en vos esa capacidad especial de liderazgo que ayuda a crecer. Admiro la paciencia y la fuerza con la que llevas adelante tus proyectos y tu capacidad de transmitir lo que sabes a los demás. Y a vos Nahu, desde el primer momento demostraste ser una persona muy positiva, la realidad es que le sacas el fondo gris a cualquier día malo (¿los vectorizas?). Para vos esto recién empieza, y es un mundo nuevo, pero te veo ponerle siempre la mejor onda, siempre dispuesto a aprender, a compartir los que aprendiste y a ampliar ese conocimiento aportando ideas nuevas.

Ahora voy a salir del ámbito laboral para agradecerle a mi compañero de lucha, Joey. Gracias por tenerme paciencia, acompañarme y bancarme estos años que no fueron nada fáciles. Por entrenarte en descifrar mis caras para entender que me pasa, aguantar mis largas charlas nerds, y escucharlas, aunque te hayas aburrido de lo lindo. Gracias por estar ahí siempre, por ser la persona que nunca me falta, por hacerme reír y desconectarme del mundo un rato, para después volver con más fuerza.

Y como siempre, gracias a mis padres y hermano. Personas de las que me siento afortunado de estar acompañado. Gracias por todo el esfuerzo que ponen siempre para ayudarme a alcanzar mis objetivos. Gracias por la fuerza, el amor incondicional y la confianza que depositan en mi cada día y que es el motor que me mueve a palearla.

Gracias a todos los que me dieron la oportunidad de hacer un doctorado, a los que se encargaron de que sea posible llevar a adelante este proyecto, a los que colaboraron para que culminara esta etapa. **Mil gracias a todos.**



AGENCIA
NACIONAL DE PROMOCIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



HPC Cluster



2020