



Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas

“ESTUDIO DEL EFECTO DE METFORMINA EN EL ROL PROANGIOGÉNICO DE LAS PLAQUETAS SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES Y CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO”

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención Ciencias Fisiológicas

Por

MÓNICA CASANDRA MÁRQUEZ GUTIÉRREZ

Director de Tesis: Dr. Gareth Owen

Comisión de Tesis: Dra. Margarita Vega

Dr. Alejandro Godoy

Dr. Ricardo Moreno

Abril 2019

Dedico esta tesis primeramente a mi madre Verónica por su infinito amor y dedicación, a mi hermana e hija por su apoyo incondicional, a mis amigos por sus consejos y a Jorge por su cariño y firme propósito de mantener en alto mi confianza, acompañándome en este camino...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile por la excelente formación profesional que recibí. Al departamento de Ciencias Fisiológicas, sus profesores y compañeros por procurar dar mi mejor trabajo a través de críticas constructivas y constante alcance del conocimiento. A María Teresa y Elizabeth de la secretaria de Postgrado por su ayuda en todas las gestiones y trámites durante mi carrera.

Doy gracias al Laboratorio de Trombosis y Hemostasia del Dr. Jaime Pereira, a Patricia, Olga, Nixa, Paola por su contribución técnica en los ensayos de Citometría de Flujo y el manejo de plaquetas humanas. Al Laboratorio del Dr. Alejandro Godoy por el constante suministro de cultivo primario de células de cordón umbilical para la realización de mis experimentos. Al Laboratorio del Dr. Julio Cárdenas de la Facultad de Tecnología Médica de la Universidad de Chile en especial a Galdo Bustos por su apoyo en los ensayos de Western Blotting.

Agradezco mis compañeros de Laboratorio, en especial a la Dra. Rafaela Erices por su apoyo incondicional. Doy las gracias a mis amigos Carla, Camilo, Chio, Fuad y Cristobal por su amistad y sinceros consejos. Finalmente, a mi tutor el Dr. Gareth Owen por su infinita paciencia, ayuda permanente y enorme contribución a mi formación como Doctora.

Gracias a CONICYT Beca N°21151168, FONDECYT 1120292, 1140970, 3150028, CORFO L2 13IDL2-18608 y BMRC 13CTI 21526-P6

INDICE DE MATERIAS

Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice de Materias.....	4
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	9
Lista de Abreviaturas.....	10
Resumen.....	12
Abstract.....	13
1.INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Cáncer de Ovario.....	14
1.2 Etiología del Cáncer de Ovario.....	18
1.3 Cáncer de Ovario y Factores de Riesgo.....	19
1.4 Cáncer de Ovario y su Tratamiento.....	21
1.5 Cáncer de Ovario y Trombocitosis.....	26
1.6 Plaquetas.....	30
1.7 Cáncer de Ovario y Plaquetas.....	32
1.8 Plaquetas y Angiogénesis Tumoral.....	36

1.9 Metformina y su Uso en Clínica.....	41
1.10 Metformina y Cáncer.....	43
1.11 Metformina y su Acción en la Angiogénesis.....	46
1.12 Metformina y Plaquetas.....	49
2. HIPOTESIS.....	51
3. OBJETIVO GENERAL.....	52
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	53
5. MATERIALES.....	54
5.1 Células.....	54
5.2 Reactivos.....	54
6. METODOLOGÍA.....	56
6.1 Cultivos primarios de ascitis.....	56
6.2 Muestras de Cordón Umbilical.....	56
6.3 Líneas de cultivo celular.....	57
6.4 Purificación de Plaquetas.....	57
6.5 Activación y separación de componentes plaquetarios.....	58
6.6 Westernblot.....	58
6.7 Citometría de flujo.....	59
6.8 Ensayo de viabilidad celular.....	60
6.9 Ensayo de formación de estructuras tipo capilar (<i>angiogénesis in vitro</i>).....	60
6.10 Análisis estadístico.....	60

7. RESULTADOS.....	61
7.1 Metformina a concentraciones terapéutica para pacientes diabéticos no reduce la angiogénesis <i>in vitro</i>	61
7.2 Metformina a concentraciones clínica no reduce la angiogénesis promovida por plaquetas.....	65
7.3 Metformina reduce el potencial angiogénico de células de cáncer de ovario promovido por plaquetas.....	70
7.4 Metformina no incrementa la activación plaquetaria.....	75
7.5 Células endoteliales pretratadas con Metformina no reduce la angiogénesis incrementada por plaquetas.....	79
7.6 Metformina no requeriría la activación de AMPK para ejercer su efecto antiangiogénico.....	81
8. DISCUSION.....	86
8.1 Efecto directo de Metformina sobre la angiogénesis promovida por las plaquetas.....	89
8.2 Efecto de Metformina sobre el potencial angiogénico de células de cáncer de ovario incrementado por plaquetas.....	92
8.3 La acción antiangiogénica de Metformina no involucra la activación de AMPK.....	94
9. Limitaciones en los estudios preclínicos utilizando Metformina como un agente anticancer.....	98
10. Cambios metodológicos del presente estudio.....	100

11. CONCLUSIÓN.....	103
12. PROYECCIONES CLÍNICAS.....	104
13. APÉNDICE.....	106
14. REFERENCIAS.....	117

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Acción de las plaquetas sobre el proceso de angiogénesis y el desarrollo del tumor

Figura 2: Metformina a concentraciones terapéuticas para pacientes diabéticos no tiene un efecto significativo sobre la angiogénesis de las células endoteliales

Figura 3: Plaquetas incrementan la angiogénesis de células endoteliales

Figura 4: Metformina 20 μ M reduce significativamente el efecto proangiogénico de las plaquetas sobre células endoteliales HUVEC (cultivo primario)

Figura 5: Plaquetas incrementan el potencial angiogénico de las células de cáncer de ovario

Figura 6: Metformina inhibe el incremento del potencial angiogénico de células de cáncer de ovario promovido por las plaquetas

Figura 7: Metformina previene el incremento del potencial proangiogénico de cultivos primarios provenientes de ascitis de pacientes con cáncer de ovario promovido por las plaquetas

Figura 8: Medio de cultivo DMEMF12 sin suero no incrementa la activación plaquetaria

Figura 9: Metformina (20 μ M) no afecta la activación plaquetaria

Figura 10: Pretratamiento a las células endoteliales con Metformina (20 μ M) durante 2 horas no previene el incremento de la angiogénesis promovida por las plaquetas

Figura 11: El inhibidor de AMPK (Compuesto C), revierte el efecto inhibitorio de Metformina sobre la angiogénesis incrementada por plaquetas

Figura 12: Metformina no cambia los niveles de fosforilación de AMPK en células endoteliales

Ehy926

Figura 13: Metformina no cambia los niveles de fosforilación de AMPK en células endoteliales

HUVEC

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Data Clínica de las muestras de ascitis de pacientes con cáncer de ovario avanzado que fueron utilizadas para la obtención de cultivos primarios

LISTA DE ABREVIACIONES

- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- ADP:** Enzima Poli Adenosina Difosfato
- Akt:** Proteína quinasa B
- AMP:** Adenosina Monofosfato
- AMPK:** AMP-Activated Protein Kinase
- ATP:** Adenosina Trifosfato
- AUGE:** Plan de Acceso Universal de Garantías Explícitas
- BRCA:** Breast Cancer 1 y 2
- CA-125:** Antígeno para Cáncer 125
- CAF:** buffer libre de calcio
- CAMKK β Ca²⁺:** Calmodulin dependent protein kinase β
- CIM:** Células Iniciadoras de Metástasis
- CO:** Cáncer de Ovario
- DMSO:** Dimetil Sulfóxido
- EMT:** Epithelial-Mesenchymal Transition
- eNOS:** Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
- ESGO:** Grupo Ginecológico Oncológico Europeo
- FDA:** Food and Drug Administration
- FIGO:** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
- GOG:** Grupo de Ginecología Oncológica
- HUVEC:** Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IGF1: Insulin-like Growth Factor 1

IL-6: Interleuquina 6

IMC: Índice de Masa Corporal

LKB1: liver kinase B1

MC: Medio Condicionado

MFS: Medium Free Serum

MINSAL: Ministerio de Salud

MTS: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium)

MVP: Mean Platelet Volume

mTOR: mammalian Target of Rapamycin)

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa Beta

NK: Natural Killer

NO: Nitric Oxide

OCT1: Organic Cationic transporter 1

PARP: Enzima Poliadenosina Difosfato (ADP) Ribosa Polimerasa

PBS: Buffer fosfato salino (phosphate bufferered saline)

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PGE: Prostaciclina E

PF4: Platelet Factor 4

PKC: Proteina quinasa C

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

SFB: Suero Fetal Bovino

SFM: Medio de cultivo libre de suero (serum free médium)

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

TNF- α : Tumoral Necrosis Factor Alpha

TPO: Trombopoietina

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VTE: Venous Thromboembolism

RESUMEN

El cáncer de ovario (CO) es el cáncer ginecológico más letal y la 7^a causa de muerte por cáncer en mujeres. Aproximadamente el 40% de las pacientes con CO presenta un elevado conteo plaquetario (Trombocitosis), fenómeno que se ha correlacionado independientemente con un mal pronóstico en estas pacientes. Es sabido que factores proangiogénicos liberados desde plaquetas activadas promueven la angiogénesis tumoral, contribuyendo al crecimiento del tumor y posterior metástasis. El tratamiento actual para el CO incluye cirugía citorreductiva seguido de quimioterapia, sin embargo, muchas pacientes recurren en la enfermedad a los pocos meses. Terapia antiangiogénica, un tratamiento alternativo, ha mostrado reducido beneficio clínico y elevados efectos adversos. Metformina, primera línea de tratamiento para la Diabetes tipo II, ha mostrado una disminución en el riesgo de desarrollar CO en pacientes diabéticas, sin embargo, el mecanismo se desconoce. Estudios *in vitro* han sugerido que Metformina a concentraciones supra farmacológicas puede tener un efecto antiangiogénico. Sin embargo, no existen reportes que evalúen el efecto del fármaco sobre el rol proangiogénico de las plaquetas, usando concentraciones presentes en plasma de pacientes diabéticas,. El objetivo del presente estudio fue dilucidar el efecto de Metformina a concentraciones terapéuticas sobre la reducción de la angiogénesis promovida por plaquetas, tanto directamente sobre células endoteliales, como sobre el potencial angiogénico de células de CO. Cultivo primario proveniente de pacientes con CO, líneas celulares de CO y cultivo primario de células endoteliales provenientes de vena umbilical humana (HUVEC) fueron utilizadas en este estudio. Metformina 20 μ M (concentración observada en plasma de pacientes diabéticos) reduce significativamente la angiogénesis (medida utilizando el ensayo *in vitro* de formación de estructuras tipo capilar) promovida por la adición directa de plaquetas o Medio Condicionado proveniente de células de cáncer previamente incubadas con plaquetas. El efecto de Metformina no involucró disminución en la viabilidad celular o reducción en la activación plaquetaria. Curiosamente, Metformina se requirió estar presente durante todo el tiempo de la incubación de plaquetas con células endoteliales para ejercer su efecto antiangiogénico, debido a que un pretratamiento a las células endoteliales o plaquetas con Metformina no afectaron la angiogénesis promovida por plaquetas. La adición de Compuesto C (un conocido inhibidor de AMPK, aunque con otras acciones reportadas) no afecta la acción proangiogénica de las plaquetas sobre células endoteliales, indicando que la acción de AMPK no es requerida para la activación plaquetaria o promoción de la angiogénesis. A pesar de que, la presencia de Compuesto C revirtió la acción de Metformina, no observamos activación de AMPK en células endoteliales y, por ende, futuros experimentos permitirán identificar las vías de transducción internas usadas por Metformina para eliminar la respuesta a plaquetas. Nosotros proponemos que concentraciones de Metformina ya aprobadas para el tratamiento de la diabetes se deben investigar en un ensayo clínico prospectivo en pacientes con cáncer de ovario que no presenten diabetes.

ABSTRACT

Ovarian Cancer (OC) is the most lethal gynecologist cancer and the seventh cause of death by cancer among women. Approximately 40% of patients with OC possess an increase in platelets count (thrombocytosis), a phenomenon independently correlated with poor prognosis. By releasing proangiogenic factors upon their activation, platelets have been reported to promote tumor angiogenesis and thus contribute to tumor growth and metastasis. The treatment of an OC patient classically includes cytoreductive surgery followed by chemotherapy, however, many patients relapse after only a few months with little options for further treatment. Antiangiogenic therapy is now an option however it demonstrates only mild clinical benefit and many adverse effects. Metformin, a drug commonly used in the treatment of type II diabetes, has been associated with a decrease in the risk of develop ovarian cancer, however, the mechanism by which this drug cause these antitumoral effects. is currently unknown. Studies *in vitro* have suggested that Metformin at concentrations higher than those observed in diabetic patients may have an antiangiogenic role. However, there are no reports that have evaluated the effect of metformin present in diabetic patients on proangiogenic role of platelets. Therefore, we investigated the use of metformin at clinical concentrations on reduction of platelet-induced angiogenesis, both directly upon endothelial cells and upon proangiogenic potential of ovarian cancer cells. Primary cancer cultures from ovarian cancer patients, ovarian cancer cell lines and primary cultures of endothelial cells from the human umbilical vein (HUVEC) were utilized in this study. Metformin (at 20uM, the concentration observed in plasma of diabetic patients) significantly reduced angiogenesis (measured using an in vitro tube forming assay) promoted by both the addition of platelets directly or conditioned media from ovarian cancer cells previously co-incubated with platelets. This effect of metformin did not involve a decrease in cell viability, nor a reduction in the platelet activation. Interestingly, Metformin was required be present all times during the incubation to exert its antiangiogenic effect, as pretreatment or either endothelial cells or platelets with Metformin did effect platelet induced angiogenesis. The presence of compound C (a known AMPK inhibitor) reverted the action of metformin, suggesting that AMPK activation in endothelial cells may be critical for the reduction angiogenesis promoted by metformin in the presence of platelets. Interestingly, we did not observe an increase in AMPK in endothelial cells upon treatment with metformin, nor was there an alteration in platelet-promoted angiogenesis by this inhibitor. Our study suggests that Metformin reduces the proangiogenic effect of platelets via an action upon the endothelial cell. We propose that concentrations of Metformin already approved from use in the control of diabetes should be investigated in a prospective clinical trial in ovarian cancer patients.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es la 7ª causa de muerte por cáncer en mujeres y es el responsable de más fallecimientos por cáncer que cualquier otra malignidad ginecológica a nivel mundial (Kurman R. J. y Shih Iem., 2010). Estudios epidemiológicos indican que más de 230.000 mujeres son diagnosticadas con esta enfermedad y de ellas cerca de 150.000 mueren cada año (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). En Chile, según la Guía Clínica AUGEMINSAL 2013 (Ministerio de Salud), esta patología constituye la 9 causa de muerte en la mujer. Entonces, de todos los cánceres ginecológicos que alcanzan el 11,5% del total d canceres del sexo femenino, el cáncer de ovario se ubica en el segundo lugar con un 3,9% del total de los tumores ginecológicos, siendo un serio problema de salud en nuestro país.

El cáncer de ovario se origina en los ovarios, que son dos glándulas reproductoras y la fuente principal de las hormonas femeninas; el estrógeno y la progesterona (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). Los ovarios están compuestos por tres tipos principales de células, cada tipo de célula puede originar un tipo de tumor diferente (Mukesh V., 2009). Uno de los tipos de tumor proviene de células epiteliales. Estas células cubren la superficie externa del ovario y forman cerca del 90% de los tumores ováricos (Prat J., 2012). El otro tipo de tumores provienen de células germinales y constituyen cerca del 2 - 10%

de los tumores (Mukesh V., 2009; Gordon C. J. y cols, 2014). Por último, existen los tumores estromales que se presentan en un 1% de los tumores ováricos y se originan de las células del tejido estructural que sostienen el ovario y producen las hormonas femeninas estrógeno y progesterona (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). Estos tipos de cáncer aumentan la secreción de hormonas masculinas como testosterona. (Gordon C. J. y cols, 2014). Entre los tumores estromales malignos se encuentran los tumores de células de la granulosa. Estos tumores se consideran cánceres de bajo grado y a menudo se diagnostican en etapas tempranas teniendo buen pronóstico para la paciente (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>).

El cáncer de ovario epitelial es la patología más extensamente estudiada, debido a que presenta el mayor porcentaje de incidencia entre los tipos de cánceres de ovario. Este tipo de cáncer puede clasificarse en 4 categorías; seroso, que es el más común, mucinoso, endometriode y de célula clara (Mukesh V., 2009). La clasificación de los tipos de tumores permite la administración de un mejor tratamiento asociado a su comportamiento clínico y biológico. Sin embargo, los factores de riesgo aplican similarmente para todos los tipos de cáncer (Mukesh V., 2009).

Luego que una mujer es diagnosticada con la enfermedad, el oncólogo evalúa si el cáncer se ha diseminado y de ser así a que otros órganos, esto a través de la obtención de varias muestras de tejido (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). Este proceso se llama estadificación (o determinación de la etapa) y permite identificar la etapa (o estadio) de un cáncer, describiendo su grado de diseminación en el organismo, determinando la gravedad y el

tratamiento más adecuado para esta malignidad. Según la Federación internacional de ginecología y obstetricia (FIGO) la estratificación para el cáncer de ovario establece que las etapas del cáncer van desde la I a la IV (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html> ; Gordon C. J. y cols, 2014)

Por ejemplo, si una paciente es diagnosticada en etapa I, puede ser clasificada en 3 subetapas, Ia, Ib, Ic; dependiendo si presenta la enfermedad localizada en uno o en los dos ovarios o si además existe ruptura de la capsula y presencia de ascitis peritoneal, respectivamente. Si en cambio, la paciente es diagnosticada en etapa IIa, indica que la enfermedad se extendió a la trompa de Falopio, afectando al útero, IIb si la enfermedad se extiende a otros tejidos pélvicos como vejiga, colon sigmoideo y recto y es IIc si además de afectar tejido en la cavidad pélvica, existe presencia de ascitis en esta región (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). En el caso de ser diagnosticada en etapa III la enfermedad afecta nodos linfáticos, incluyendo hígado. Se considera IIIa cuando se compromete la región peritoneal, IIIb cuando el tumor tiene un tamaño de hasta 2 cm de diámetro y IIIc cuando la enfermedad afecta nodos linfáticos y el tumor es mayor a 2 cm de diámetro. Finalmente, la paciente se diagnostica en etapa IVa cuando presenta metástasis distante en los pulmones con efusión pleural y IVb si el cáncer se diseminó al interior del bazo o el hígado, ganglios linfáticos y otros órganos o tejidos fuera de la cavidad peritoneal, tal como pulmones y huesos (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>; Gordon C. J. y cols, 2014). Adicionalmente existe otro tipo de clasificación de los tumores que indican el potencial maligno que estos pueden tener. Esta clasificación se centra en establecer el grado de diferenciación que

presenta el tejido respecto al tejido normal y este va desde 1 a 3, en el cual 1 corresponde a tejido altamente diferenciado y 3 pobremente diferenciado y mucho más agresivo (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>).

A nivel celular en el cáncer de ovario se observan procesos críticos que llevan a cabo las células para permitir la progresión del tumor y que se comparten con otro tipo de malignidades. Por ejemplo, durante la tumorigénesis inicial, las células de cáncer de ovario se someten a una transición epitelio-mesénquima (EMT; sigla en inglés), proceso que involucra un cambio en la expresión de integrinas, caderinas y una sobrerregulación de vías proteolíticas. EMT es un proceso que conduce a la pérdida de la polaridad celular, permitiendo que las células ahora denominadas células iniciadoras de metástasis (CIM), se disocian y pueden migrar diseminándose a otros lugares para colonizar y formar tumores secundarios (Lengyel E., 2010; Swier N. y Versteeg H. H., 2017). En el fluido peritoneal existe presencia de CIM que se vuelven resistentes a la muerte celular programada y se acumulan preferencialmente en el peritoneo abdominal u omento. Las CIM revierten su fenotipo de célula mesenquimal al tipo epitelial, volviendo a formar masas tumorales. Los pasos iniciales de metástasis son regulados por una interacción controlada de receptores de adhesión y proteasas, luego ocurre un rápido crecimiento de nódulos tumorales sobre el mesotelio, esto dirigida por oncogenes, lo que produce la formación de ascitis, obstrucción de los intestinos y finalmente caquexia (Lengyel E., 2010).

1.2 Etiología del cáncer de ovario

El origen y patogenicidad del cáncer de ovario epitelial son pobremente comprendidos. Recientes estudios han dado indicios de las posibles etiologías de esta enfermedad, dependiendo de la procedencia del tejido, ya sea desde el epitelio mesodermal o de los tubos müllerianos (Kurman R. J. y Shh Iem., 2010). Existen al menos dos teorías que describen la etiología de esta enfermedad. La primera indica que el cáncer de ovario se origina a partir de la superficie epitelial ovárica (mesotelio) el cual se invagina dentro del estroma resultando en la inclusión de quistes que eventualmente pueden someterse a transformación maligna (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). Este cáncer puede propagarse desde el ovario a la pelvis, abdomen y sitios distantes, pero no por una vía hematógica sino por la cavidad peritoneal, conduciendo a la acumulación de líquido ascítico en la región (Lengyel E., 2010).

La segunda teoría propone un origen mülleriano y no mesotelial. El tejido mülleriano incluye el cérvix, endometrio y trompas de Falopio. Este tejido comienza a generar quistes en esta región, los que posteriormente migran hacia el ovario (metástasis hacia el ovario), donde puede ocurrir la transformación maligna del tejido ovárico (Kurman R. J. y Shh Iem., 2010). La heterogeneidad celular que presenta el cáncer de ovario sugiere que hay diferentes vías de señalización que se pueden activar, volviéndose más complejo establecer un único tratamiento que sea efectivo y con reducidos efectos secundarios para las pacientes (Swier N. y Versteeg H. H., 2017).

1.3 Cáncer de ovario y factores de riesgo

El cáncer de ovario presenta múltiples factores de riesgos, dentro de los que destaca el historial genético de la mujer en esta enfermedad. Se estima que cerca del 7% de las mujeres con cáncer de ovario tienen algún familiar que ha presentado cáncer de ovario. Respecto a ello, se ha observado que la mayoría de los cánceres hereditarios pueden ser atribuidos a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA 2 (Breast cancer 1-2) (Mukesh V., 2009). Otro factor de riesgo es la edad, debido a que se ha observado que la mayoría de las pacientes que desarrollan esta malignidad se encuentran en etapa menopáusica. Son mujeres que se encuentran en un rango de edad entre los 58 a 63 años, principalmente.

Las hormonas son cruciales en el desarrollo del tumor y se han considerado otro factor de riesgo, debido a que actúan como factores de crecimiento. Por ejemplo, las pacientes que presentan mayor secreción de hormona luteinizante y folículo estimulante, potenciando el estímulo del epitelio ovárico, conduciendo a un incremento en la proliferación celular y subsecuentemente transformación maligna de estas células (Mukesh V., 2009). El uso de terapia de reemplazo hormonal durante el estado menopáusico ha sido considerado otro factor de riesgo, debido a que se ha observado que incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Este riesgo pareciese ser mayor en mujeres que son tratadas con progesterona y estrógeno respecto de las que mujeres que solo son tratadas con estrógeno (sin progesterona) (Fuente:

<https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). La obesidad y la diabetes mellitus tipo II también han sido incluidas dentro de los factores de riesgo para el cáncer de ovario (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>; Gao S. y cols., 2015). Respecto a estos factores se ha observado que el tener un elevado índice de masa corporal (IMC) incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de ovario, así lo indicó un estudio que comparó mujeres con una dieta reducida en contenido graso durante 4 años, respecto de una dieta con contenido graso normal. Aunque esta relación de alimentación y riesgo de cáncer no está establecida, si existen estudios que indican que un elevado IMC incrementa el riesgo de cáncer de ovario (Mukesh V. 2009; Gao S. y cols., 2015). Sin embargo, otros estudios indican que el uso del IMC no es lo más correcto, debido a que el método no logra pesquisar individuos enfermos y clasificarlos como obesos. Entonces se comenzó a usar circunferencia de cintura, que se asocia mejor con la adiposidad abdominal y resistencia a la insulina. Estos resultados sugieren que no sólo la obesidad, sino también la disfunción metabólica aún en personas con un IMC normal se asocia con un incremento en el riesgo de cáncer (Guía Clínica Ovario Epitelial MINSAL 2013; Gao S. y cols., 2015). Por otra parte, el exceso de glucosa y la alterada liberación de insulina en las pacientes diabéticas ha sido relacionada con el desarrollo de cáncer de ovario (Gallagher E. J., LeRoith D., 2015). Existen también factores que disminuyen el riesgo de desarrollar cáncer de ovario como es el número de embarazos, la lactancia y el tratamiento con anticonceptivos orales, debido a que todos factores reducen el número de ovulaciones. De acuerdo con la hipótesis de la “ovulación continua”, se sabe que cada vez que ocurre una ovulación hay daño en el tejido ovárico (Fathalla M. F. 2013). El proceso de regeneración del tejido requiere que las células se

dividan y diferencien en células epiteliales del ovario. Esto aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones espontaneas que puedan promover la carcinogénesis (Gordon C. J. y cols, 2014). Estos factores que disminuyen el desarrollo de cáncer de ovario, reducen el número de ovulaciones en la mujer disminuyendo la probabilidad de que ocurra transformación maligna de las células epiteliales del ovario (Kurman R. J. y Shih Iem., 2010). Es importante enfatizar en los factores de riesgo establecidos, debido a que es posible obtener información de la etiología de esta malignidad y el oncólogo puede tratar a la paciente con el tratamiento más adecuado para ella, reduciendo los efectos adversos.

1.4 Cáncer de ovario y su tratamiento

El cáncer de ovario es una enfermedad que se presenta principalmente en etapa menopáusica con un promedio de edad de 58 años en las mujeres, varios años previo a la edad promedio de detección de la enfermedad, que es 63 años. Su alta letalidad se debe a que es un cáncer silencioso. Las pacientes en un comienzo presentan 3 a 4 meses dolor abdominal, sin embargo, no acuden al médico, debido a que confunden los síntomas de esta enfermedad con síntomas de su estado menopáusico o condición de colon irritable. Entonces para cuando se diagnostica con la malignidad, las pacientes se encuentra en etapa avanzada del cáncer, reduciendo las posibilidades de sobrevida de las pacientes (Cuello M. 2013; Erices R. y cols. 2013). De acuerdo

con datos clínicos, mujeres que son diagnosticadas en etapa I y II de la enfermedad, tienen una tasa de sobrevivida a 5 años del 91%, mientras que mujeres que son diagnosticadas en etapa III y IV, su sobrevivida a 5 años no alcanza el 40% (Cuello M. 2013; Guía Clínica Ovario Epitelial MINSAL 2013). Para pesquisar un posible cáncer de ovario, puede obtenerse una muestra de sangre de la paciente para medir los niveles plasmáticos y abdominales del antígeno para cáncer 125 (CA-125) y un ultrasonido transvaginal, ambos exámenes son claves para establecer la enfermedad en caso de sospecha. Estos análisis muchas veces pueden mostrar la extensión del tumor en la región pélvica, permitiendo determinar un mejor tratamiento para estas pacientes (Gordon C. J. y cols., 2014). Uno de los principales problemas para dilucidar un efectivo tratamiento para las pacientes con cáncer de ovario es que esta enfermedad es heterogénea, compuesta de diferentes tipos de células cancerosas que presentan rasgos y comportamientos clínico-patológicos diversos. Debido a esto, la terapia convencional solo afecta a una parte de la población tumoral y no remueve las células iniciadoras de metástasis. Este tipo de células son las causantes de nuevos focos metastásicos y conducen a la quimiorresistencia en las pacientes (Cuello M. 2013; Orellana R. y cols., 2015). Desde hace un tiempo, las pacientes son sometidas a una cirugía citorreductiva que extirpa el tumor primario (de proceder), con ello el médico cirujano intenta extraer la mayor cantidad de tejido canceroso posible y luego regímenes de quimioterapia (Gordon C. J. y cols., 2014). La cirugía busca completar dos objetivos, el primero es determinar la etapa en la que se encuentra el cáncer y el segundo es realizar una citorreducción óptima del tumor (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). Esta cirugía puede incluir la histerectomía y a veces incluso la omentectomía (extracción del omento) cuando

el cáncer se encuentra en etapa avanzada (Coward J. L. y cols 2015). El omento es una capa de tejido adiposo que cubre los contenidos abdominales y es uno de los principales focos de metástasis de este cáncer. Si hay líquido en la pelvis también este se extrae para ser analizado. Todas las muestras de tejido y líquidos obtenidas durante la operación se envían al laboratorio para determinar si hay presencia de células cancerosas. La clasificación por etapas es muy importante, debido a que se puede establecer un mejor tratamiento para el cáncer (Fuente: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>). Inicialmente, el grupo de ginecología oncológica (GOG; sigla en inglés) definió como citorreducción óptima extirpar toda masa tumoral mayor a 1cm, sin embargo, luego de varios análisis la Sociedad de Ginecología Oncológica Europea (ESGO) estableció que una citorreducción óptima incluye la extirpación de tumores que tengan un tamaño mínimo en el rango de 0,1 y 1 cm de diámetro, debido a que mejora la progresión libre de enfermedad y la supervivencia global de las pacientes (Cortez A. J. y cols., 2018). Factores adversos que pueden reducir las posibilidades de una efectiva extirpación del tejido canceroso es que la enfermedad se haya diseminado, comprometiendo la vena porta hepática, la arteria mesentérica del intestino delgado y diafragma, situaciones muchas veces observada en etapa IV de la enfermedad (según clasificación FIGO) (Pujade-Lauraine I., 2017). En etapas avanzadas (III/IV), la completa remisión del tumor no es posible. Una de las causas más comunes es que el tumor invade la arteria mesentérica y existen lesiones en el hilio hepático. En estos casos las pacientes son tratadas con tres ciclos de quimioterapia neoadyuvante, si la paciente responde al tratamiento, el médico cirujano puede intervenir con cirugía y luego continuar con quimioterapia que puede ir de los 3, 4 o 6 ciclos (Cortez A. J. y cols., 2018).

Posterior a la cirugía el oncólogo establece un plan de tratamiento con ciclos de quimioterapia. Cada 21 días las pacientes reciben regímenes 6 ciclos de quimioterapia intravenosa (Cortez A. J. y cols., 2018). Debido a la heterogeneidad de esta enfermedad muchas veces es difícil establecer un plan de tratamiento eficiente. Es claro que diferentes tipos histológicos de cáncer de ovario tienen distinto origen celular, diverso grupo de mutaciones y por lo tanto distinto pronóstico. El tratamiento estándar para el cáncer de ovario incluye el uso de quimioterapia, siendo paclitaxel y carboplatino los agentes más comúnmente utilizados (Guía Clínica Ovario Epitelial MINSAL 2013; Cortez A. J. y cols., 2018). Si bien el tratamiento para las pacientes es cirugía y luego quimioterapia, muchas veces las pacientes no pueden ser operadas y se les proporciona directamente quimioterapia. Cerca del 80% de las pacientes obtienen mejoras luego del tratamiento con quimioterapia, sin embargo, la mayoría vuelve a presentar una progresión de la enfermedad antes de los 18 meses posterior al diagnóstico (Coward J. L. y cols 2015). En algunos casos, las pacientes son sometidas a un segundo tratamiento, pero se ha observado que estos confieren baja respuesta y efectos adversos muy elevados, lo que inevitablemente conduce a las pacientes a la muerte (Stone R. y cols., 2016). Estudios han mostrado que existen algunos tipos de cáncer que se vuelven dependientes de la enzima poli adenosina difosfato (ADP) ribosa polimerasa (PARP), la cual participa en la reparación del ADN permitiendo que estas células se sigan dividiendo. Olaparib es una droga que inhibe esta enzima y se ha observado que el tratamiento con este agente en pacientes con cáncer de ovario que presentan mutación hereditaria de BRCA1 o BRCA2 y recurrencia con la primera línea de tratamientos, muestra un incremento en la sobrevida libre de progresión. Lamentablemente esta droga presenta efectos

adversos tales como alteraciones gastrointestinales y bajos recuentos sanguíneos como anemia o leucemia. Actualmente, no se ha estudiado si este fármaco es posible combinarlo con otros fármacos antineoplásicos (Pujade-Lauraine I., 2017). Existen otras terapias que se han comenzado a incluir en la clínica para las pacientes como es la terapia inmunogénica. Investigaciones en esta área han mostrado que las células tumorales son capaces de regular negativamente la acción inmunogénica de células T evadiendo la respuesta inmune a través de la presencia de receptores en sus membranas como son CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT (Coward J. L. y cols 2015; Odunsi K., 2017). Uno de los tratamientos inmunológicos que hoy en día se está estudiando es la índoleamina 2, 3 dioxigenasa, una enzima inmunoreguladora que cataliza la tasa limitante de la degradación del triptófano a lo largo de la vía kinurenina. Si bien los tratamientos inmunológicos en algunos cánceres han tenido un gran alcance con buenos resultados, reduciendo la toxicidad global en las pacientes en el cáncer de ovario la respuesta ha sido más bien moderada (Odunsi K., 2017). Si bien en el último tiempo se ha estado estudiando diferentes fármacos que puedan afectar puntos claves en la supervivencia de las células cancerígenas, todos presentan efectos secundarios que a la larga reducen la calidad de vida de estas pacientes o simplemente no generan un cambio en la supervivencia global libre de progresión. Dado este escenario, las pacientes con cáncer de ovario avanzado, que presentan recurrencia a la quimioterapia no mejoran su pronóstico con una segunda línea de tratamiento lo que las lleva a la muerte. Es por este motivo que se vuelve urgente encontrar nuevos tratamientos que sean efectivos y que reduzcan los efectos secundarios para estas pacientes.

1.5 Cáncer de ovario y trombocitosis

La asociación entre Cáncer y trombosis venosa profunda fue descrita por primera vez por Trousseau en el año 1865 (Swier N. y Versteeg H. H., 2017). Desde entonces numerosos estudios han confirmado esta asociación evaluando varios tipos de cáncer incluyendo glioblastoma, páncreas, estómago, pulmón y cáncer de ovario (Aranda E. y Owen G. I. 2009; Davis A. y cols., 2014; Swier N. y Versteeg H. H., 2017). Entre los tumores sólidos el cáncer de ovario es uno de los cánceres con la tasa más alta de incidencia de trombosis venosa, esto debido a la secreción de quimoquinas y citoquinas que contribuyen a la activación de la cascada de coagulación (Metcalf R. y cols., 2014; Swier N. y Versteeg H. H., 2017). Se ha observado que el cáncer es capaz de liberar citoquinas como interleuquinas y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), factores proangiogénicos como Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y otros mediadores promoviendo la coagulación y formación del trombo (Swier N. y Versteeg H. H., 2017). Este fenómeno incluye la presencia de alto número de plaquetas circulantes lo que se conoce como Trombocitosis. Estas plaquetas al tener un rasgo de hiperreactividad liberan un alto contenido de factores, luego de activarse, lo que favorecen procesos de proliferación, migración, supervivencia y angiogénesis (Erices R. y cols., 2013; Menter D. G. y cols 2014). Asociado a esto, se ha observado que las pacientes con cáncer presentan trombocitosis y aumento de marcadores de activación plaquetaria como P-Selectina (CD62P) y

micropartículas derivadas de plaquetas (Mezovar S. y cols 2016). Se ha calculado que cerca del 40% de las pacientes con cáncer de ovario presenta trombocitosis, (>450.000 plaquetas/ μ l) y este fenómeno se ha correlacionado a un mal pronóstico (Orellana R. y cols 2015). Estudios han mostrado que pacientes con cáncer de ovario y trombocitosis tratadas con paclitaxel y carboplatino (primera línea de tratamiento), presentan progresión en la enfermedad antes comparado con pacientes con cáncer que tienen niveles plaquetarios normales (Labelle M y cols., 2012). Incluso estudios epidemiológicos han indicado que pacientes con cáncer de ovario que presentan eventos tromboticos tienen una sobrevida promedio de 2 años, mucho menor comparado con los 3 años que tienen los pacientes con cáncer de ovario que no presentan eventos tromboticos (Metcalf R. y col., 2014). Interesantemente, un estudio que involucró 619 pacientes con cáncer de ovario evaluó la asociación entre recuento plaquetario y la sobrevida libre de progresión y se observó que la trombocitosis junto con elevados niveles plasmáticos de trombopoietina (TPO) e interleuquina 6 (IL-6) estuvieron asociadas con el avance de la enfermedad, reduciendo la sobrevida en pacientes con cáncer de ovario (Menter D. G. y cols 2014). Por otra parte, Trombocitosis está asociado con varios rasgos clínicos de cánceres agresivos incluyendo avance de la enfermedad, incremento de los niveles plasmáticos preoperativos de CA-125, estado hipercoagulable y significativa disminución de la sobrevida global y sobrevida libre de progresión (Davis A. y cols., 2014). Debido a que el cáncer de ovario es una enfermedad heterogénea, el riesgo de Tromboembolismo Venoso (VTE; sigla en inglés) puede depender de múltiples factores. Estos pueden categorizarse dentro de tres grupos. El primero de ellos es relacionado al tipo de cáncer. Pacientes diagnosticados con canceres más

agresivos tienen un significativo alto riesgo a producir VTE, algo similar ocurre en pacientes diagnosticadas que presentan ascitis, sin embargo, en estos casos existe controversia. El segundo grupo de factores de riesgo está asociado a las pacientes. Se ha observado que la presencia de múltiples comorbilidades como la diabetes, hipertensión, enfermedad renal crónica, falla cardíaca y enfermedades respiratorias, aumentan el riesgo de eventos tromboembólicos. Se incluyen a estos factores; la edad, inmovilidad prolongada, historial de VTE y alto índice de masa corporal. Estas comorbilidades alteran e impiden mecanismos de defensa del huésped lo que los vuelve más susceptibles a desarrollar otras enfermedades como cáncer y VTE. Finalmente se encuentra el grupo de factores de riesgo asociados al tratamiento que tienen las pacientes con cáncer. Se ha observado que las pacientes que son sometidas a cirugía incrementan la incidencia de VTE. Estudios indican que cerca del 75% de los eventos VTE ocurren después de la primera semana posterior a la cirugía (Lengyel E. 2010), misma situación se observa con el uso de la quimioterapia. Respecto al uso de agentes antiangiogénicos desarrollados recientemente, tales como bevacizumab, también han presentado una elevada incidencia de eventos VTE (Reinthaller A., 2016). Dado la importancia del proceso de coagulación, no es raro encontrar estudios en los cuales se estén probando inhibidores de ella, para mejorar el estado de las pacientes. Estos estudios han mostrado tener un efecto sobre la supervivencia de la paciente, independiente de la ocurrencia de tromboembolismo, sugiriendo que componentes selectivos de la cascada de coagulación también estarían involucrados en la progresión de cáncer (Trifanescu O. G. y Anghel R., 2015). En las últimas décadas, estudios clínicos han sugerido que el consumo diario de aspirina, un fármaco antiplaquetario, puede sustancialmente disminuir la incidencia,

metástasis y mortalidad del cáncer (Etulain J. y cols., 2013; Mezovar S y cols., 2016). Un metaanálisis que incluyó 7.776 pacientes y 11.843 sujetos control mostró que el uso de aspirina fue asociado a una reducción en el riesgo de desarrollar cáncer de ovario, especialmente a los pacientes que ingerían pequeñas dosis diariamente. Estos hallazgos sugieren que aspirina puede reducir el riesgo de desarrollar cáncer de ovario entre un 20% y 34% dependiendo de la dosis y frecuencia de uso de este fármaco (Davis A. y cols., 2014; Van N. y cols., 2014). En otro metaanálisis de 51 ensayos clínicos que incluyeron 77.546 pacientes, el tratamiento diario con aspirina redujo significativamente las muertes por cáncer en los pacientes (Etulain J. y cols., 2013). Interesantemente, cuando estos pacientes fueron clasificados por la extensión del tratamiento, el beneficio de aspirina sobre la reducción en la mortalidad por cáncer se mantuvo significativa solo para quienes siguieron un tratamiento mayor a 5 años (Mezovar S y cols., 2016). Es necesario tener precaución frente a estos resultados, dado que existe controversia, si el fármaco genera un beneficio real para el paciente. Es sabido que el uso de anticoagulantes como heparina de bajo peso molecular o como aspirina origina complejas hemorragias que también puede llevar a la muerte de los pacientes (Peyton K. J. y cols. 2011). En resumen, es claro que existe una relación entre cáncer, eventos VTE y plaquetas. Esta relación pareciera estar acentuada en pacientes con cáncer de ovario, dado la alta presencia de trombocitosis en las pacientes. Estos hallazgos indican que los mediadores de la cascada de coagulación y las plaquetas son blancos celulares claves para mejorar la eficacia del tratamiento quimioterapéutico y el pronóstico de las pacientes.

1.6 Plaquetas

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos que provienen de los megacariocitos, células multinucleadas grandes ubicadas en la médula ósea. Las plaquetas participan en varios procesos como la hemostasia, regeneración de tejido, inmunidad e inflamación (Van N. y cols., 2014; Swier N y Versteeg H. H., 2017) y su formación está mediada por la TPO (Ghoshal K. y Bhattacharyya M., 2014). Su concentración normal en la circulación tiene un rango entre las 150 y 350 mil plaquetas por microlitro de sangre (Mezovar S y cols., 2016). Estas circulan en el torrente sanguíneo durante 8 a 10 días, posteriormente son eliminadas en el hígado y el bazo (Li N., 2016). Dado que el periodo de vida de las plaquetas es corto, cerca de 10 mil millones de plaquetas pueden producirse cada día para mantener el nivel normal de plaquetas circulantes (Ghoshal K y Brattacharyya M., 2014; Golebiewska E. M. y Poole A. W., 2015). En condiciones normales, las plaquetas se mantienen inactivas, principalmente por la liberación de Óxido Nítrico (NO; sigla en inglés) desde células endoteliales. Cuando ocurre un daño en el endotelio, estas son capaces de interactuar con proteínas de la matriz extracelular como colágeno lo que conduce a su activación (Li N., 2016). La activación plaquetaria permite la secreción de proteínas procoagulantes incluyendo factores de coagulación, Fibrinógeno y Factor de Von Willebrand, elementos que participan activamente en la formación de trombos. El proceso comienza cuando luego de un daño, el Factor Tisular expresado en la superficie de células subendoteliales es capaz de entrar en contacto con las plaquetas y otros factores de la cascada, resultando en la producción de trombina, un fuerte agonista plaquetario, el cual genera su

activación favoreciendo la estabilidad del coágulo y permitiendo que el fibrinógeno genere la red de fibrina (Swier N. y Versteeg H. H., 2017). Durante este proceso, las plaquetas modifican su forma, liberando el contenido de sus gránulos y gradualmente forman agregados por adherencia entre ellas lo que da origen al trombo. Las plaquetas tienen dos principales gránulos de almacenamiento, llamados gránulos alfa y gránulos densos (Goubran H. A., y cols 2015). La función de estos gránulos es almacenar moléculas biológicamente activas precisamente involucradas en la iniciación de la coagulación y reclutamiento de otras células durante la inflamación (Mezovar S. y cols., 2016). En los gránulos α podemos encontrar proteínas como Fibrinógeno y Factor de Von Willebrand, mientras que en los gránulos densos encontramos Catecolaminas, Serotonina, Calcio, ADP, y Adenina Trifosfato (ATP) (Li N., 2016). Otros factores que también están presentes en los gránulos α son el VEGF y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), ambos factores participan en el proceso de vasculogénesis y angiogénesis (Reinthaller A., 2016).

La activación de plaquetas resulta también en la exposición de varias integrinas y selectinas en su membrana, una de ellas es la glicoproteína P-Selectina, un importante marcador de este proceso. Las plaquetas luego de su activación pueden liberar desde sus gránulos de secreción factores pro- y antiangiogénicos como son PDGF β , Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I; sigla en inglés), VEGF, Factor Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), angiopoietina y angiostatina, Factor Plaquetario 4 (PF4; sigla en inglés) respectivamente, dependiendo de la vía de activación que se estimule. (Spannuth W. A. y cols., 2008; Sharma D. y cols., 2014; Mezovar S. y cols., 2016). La principal acción de las plaquetas es evitar que se pierda la menor

cantidad de sangre posible luego de un daño en el endotelio, aunque también, se ha propuesto que tienen un papel clave en la fisiopatología de enfermedades como cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Li N., 2016).

1.7 Cáncer de ovario y plaquetas

La relación entre plaquetas y cáncer se conoce desde 1865 gracias a las investigaciones de Trousseau. Tiempo después, en 1960, Levin y Conley reportaron que cerca del 38% de los pacientes con tumores sólidos inoperables tenían un alto contenido de plaquetas circulantes (Labelle M. y cols., 2012). Unos años más tarde, Gasic y cols. en 1968, observaron que en ratones con trombocitopenia (bajo nivel de plaquetas circulantes) causada por pretratamiento con neuraminidasa conducía a una significativa reducción de los focos metastásicos al pulmón, esto posterior a la inoculación de células de cáncer y que, la infusión de plaquetas permitía recuperar el potencial metastásico de estas células, sugiriendo que la función plaquetaria es un elemento esencial en la propagación del cáncer (Ghoshal K y Brattacharyya M., 2014). Recientemente se ha observado que las plaquetas pueden promover la sobrevivencia de células de cáncer a través de la directa protección formando agregados o indirectamente a través de la liberación de señales paracrinas que impiden la función de células Natural Killer (NK) del sistema inmune (Goubran H. A., y cols 2015). También, se sabe que las plaquetas permiten la adhesión de células de cáncer al endotelio, favoreciendo la extravasación de estas células y por

consiguiente un nuevo foco metastásico. La interacción que existe entre plaquetas y células de cáncer no es unidireccional, debido a que, en muchos casos, se ha observado, que las células de cáncer pueden liberar ADP, un conocido agonista plaquetario, lo que lleva a un incremento de la activación y agregación plaquetaria (Ghoshal K y Brattacharyya M., 2014). También se ha reportado que las células tumorales en contacto con plaquetas inducen la liberación de Factor Nuclear Kappa Beta (NF- κ B; sigla en inglés), y TGF- β desde la plaqueta induciendo el proceso de EMT, causando mayor migración de las células tumorales lo que aumenta la extravasación, invasión, metástasis y el proceso de angiogénesis (Labelle M. y cols., 2012). Reportes indican que existen entre 50 a 80 factores contenidos en los gránulos de secreción plaquetaria, PDGF es uno de ellos y se ha observado que un incremento en su señalización se correlaciona con un incremento en el potencial metastásico en cáncer de mama (Ghoshal K y Brattacharyya M., 2014). Por otra parte, también se ha asociado con el crecimiento tumoral y la angiogénesis en muchos estudios, sin embargo, su papel no ha sido claramente definido *in vivo* (Mezovar S. y cols. 2016). Otros factores como PF4 (Factor plaquetario 4) y β -tromboglobulina (factores plaquetarios) han sido investigados desde 1980 como biomarcadores asociados con cáncer (Li N., 2016). En el caso de PF4, este puede inducir la expresión de VEGF en células de cáncer y se ha observado que la activación de esta vía puede actuar como un programa de sobrevida que se puede activar en células de melanoma. (Goubran H. A., y cols 2015). Reportes han indicado que este factor favorece numerosos procesos como la proliferación, migración, sobrevivencia y diferenciación de células endoteliales e incrementa la permeabilidad vascular (Battinelli E. M. y cols., 2011).

Se sabe que el VEGF circulante mayoritariamente proviene de las plaquetas y que su acción promueve la angiogénesis e incrementa la permeabilidad vascular, como también promueve la extravasación de células tumorales (Van N. y cols., 2014). Su sobreexpresión se ha relacionado con aumento de la irrigación tumoral, metástasis temprana y formación de ascitis (Papettin M. y Herman I. M., 2002; Van N. y cols., 2014). Lamentablemente, estudios clínicos indican que cerca del 97% de los tumores ováricos presentan una sobreexpresión de VEGF, lo que ha llevado a los investigadores a proponerlo como un biomarcador potencial en la detección y monitoreo en pacientes con cáncer (Van N. y cols., 2014, Reinheller A., 2016). Por otra parte, se ha observado que, en pacientes con cáncer de ovario avanzado, existe presencia de plaquetas en su líquido ascítico, lo que podría explicar el aumento de los niveles de VEGF circulantes en ellas. Dado el papel crítico que cumplen las plaquetas favoreciendo el crecimiento y diseminación del tumor, no es raro observar un elevado número de investigaciones dedicadas a determinar la función plaquetaria en cáncer. Se han comenzado a realizar estudios que proponen una disminución del número y activación de las plaquetas para mejorar el pronóstico de los pacientes con cáncer. Entre los estudios se han utilizado modelos experimentales para bloquear receptores plaquetarios claves y observar si esto atenúa la metástasis (Etulain J. y cols., 20213; Goubran H. A. y cols., 2013). Incluso se ha evaluado la manipulación farmacológica de la función plaquetaria para restaurar el balance de las vías alteradas involucradas (inflamatorias, hemostáticas, procoagulantes y angiogénica) en la patogénesis del cáncer. Estudios muestran que la terapia antiplaquetaria en conjunto con quimioterapia atenuaba el crecimiento del tumor y la metástasis, debido a que se restaura el balance normal angiogénico en el microambiente

tumoral, lo que sugiere que es favorable para el tratamiento contra el cáncer (Van N. y cols., 2014). Lamentablemente, la terapia antiplaquetaria presenta limitaciones directas en las pacientes debido a que conduce a un riesgo de sangrado, particularmente en las pacientes que presentan trombocitopenia (reducido número de plaquetas) luego de la quimioterapia, lo que conduce a una alterada cicatrización de heridas (Spannuth W. A. y cols., 2008).

1.8 Plaquetas y angiogénesis tumoral

Angiogénesis es el proceso en el cual ocurre un crecimiento de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, permitiendo el suministro de nutrientes y oxígeno. Este proceso bajo condiciones normales es altamente ordenado, regulado por un número de moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas que son necesarias para la homeostasis fisiológica (Reinhaller A., 2016). Junto con la vasculogénesis, la mayoría de los procesos de angiogénesis ocurren en estadio embriológico, donde se establece el primer árbol vascular. Durante la vida, ocurre otro proceso angiogénico en estadio adulto, durante el ciclo ovárico, para la reparación fisiológica del proceso (Spannuth W. A. y cols., 2008). Las células tumorales al igual que las células normales requieren suministro de nutrientes y oxígeno, por lo que promueven el proceso de angiogénesis para su obtención. La mayoría de los tumores sólidos primarios, se mantienen avasculares hasta alcanzar un tamaño de 1 a 2 mm de diámetro. Luego estas células activan el proceso de angiogénesis, reclutando a su alrededor, células endoteliales de vasos maduros, que

iniciarán la prolongación de nuevos vasos sanguíneos, permitiendo que el tumor crezca, y se disemine (Battinelli E. M. y cols., 2011). A diferencia de los vasos sanguíneos generados por procesos fisiológicos normales, los vasos tumorales tienen múltiples anormalidades morfológicas como la ausencia de una membrana basal continua y pericitos, aumentando la permeabilidad (fenestraciones), lo que conduce a fugas o hemorragias y un flujo sanguíneo turbulento (Gay L. y Felding-habermann B., 2011; Kyoto H. y cols., 2011). Se ha observado que células tumorales son capaces de liberar VEGF para estimular el proceso de angiogénesis y de esta manera obtener el suministro de nutrientes y oxígeno. Un amplio número de cánceres humanos como cáncer de mama, de pulmón, gastrointestinal, vesícula biliar, riñón y cáncer de ovario, presentan altos niveles del ligando y receptor de VEGF en el tejido vascular asociado al tumor, sugiriendo que este factor cumple un importante rol en la angiogénesis tumoral (Kerbel R. S., 2000). La causa del incremento de la expresión de VEGF es mediada por el ambiente, como es la presencia de factores epigénéticos tales como hipoxia, bajo pH, citoquinas proinflamatorias, hormonas sexuales, factores de crecimiento y quimoquinas o factores genéticos como la activación de numerosos oncogenes tales como Phosphatase and tensin homolog (PTEN; sigla en inglés) o p53 (Spannuth W. A. y cols., 2008). Por otra parte, las plaquetas son otra fuente de VEGF ya que una vez estas se activan dependiendo la vía de activación estas pueden inclinar la liberación de factores proangiogénicos en vez de factores antiangiogénicos favoreciendo el proceso angiogénico. Se sabe que las plaquetas pueden interactuar con el endotelio (ver esquema de figura 1) y liberar factores pro- y antiangiogénicos, incrementando o disminuyendo la angiogénesis (Erices R. y cols., 2013). Estudios han asociado

trombocitosis con un mal pronóstico en las pacientes que presentan cáncer de ovario, principalmente porque el incremento de plaquetas favorece el proceso proangiogénico y proliferación a través de los factores que contienen (Metfcal R. y cols., 2014; Mezovar y cols., 2016; Jiang L. y cols., 2017;).

Las plaquetas contienen gran variedad de factores en sus gránulos de secreción, entre ellos existen los factores proangiogénico como el PDGF, VEGF y TGF- β y, entre los factores antiangiogénicos se encuentra el PF4 y la endostatina; que al ser liberados pueden modular el proceso de angiogénesis de células endoteliales (Aranda E. y Owen G. I., 2009; Labelle M. y cols., 2012). Se ha observado incluso que las plaquetas en contacto con células de cáncer de ovario pueden estimular la liberación de factores proangiogénicos y reducir la liberación de factores antiangiogénico, por un mecanismo dependiente de ADP (Menter D. G., y cols., 2014; Gaducci A. y cols., 2015). En otros estudios se ha observado que la señalización puede ser desde plaquetas hacia células de cáncer de ovario, permitiendo la liberación de factores proangiogénicos desde las células de cáncer, denominado potencial proangiogénico (Esquematizado en figura 1) (Egan K. y cols., 2011). Estudios *in vitro* han mostrado que estos factores liberados al medio por células cancerígenas pueden aumentar la angiogénesis de células endoteliales (Gaducci A. y cols., 2015). Estos antecedentes dan cuenta de la clave función que cumplen las plaquetas en la progresión del cáncer, siendo un importante blanco celular de estudio para mejorar el tratamiento de esta enfermedad. Dado que las plaquetas pueden liberar VEGF y que en cáncer de ovario existe una sobreproducción de este factor, no es extraño que investigadores se enfocaran en desarrollar maneras de bloquear la unión de VEGF (ligando) a

su receptor. Además, es sabido que las células endoteliales son más genéticamente estables por lo que no adquieren resistencia a drogas como las células cancerosas frente al uso de tratamientos (Gay L. y Felding-Habermann B., 2011).

Dado estos estudios se diseñó un anticuerpo monoclonal que neutraliza las principales isoformas de VEGF, llamado Bevacizumab (nombre comercial: Avastin). Este anticuerpo impide que este factor se una a su receptor, inhibiendo la proliferación de células endoteliales y formación de vasos (Egan K. y cols., 2011). Este agente fue aprobado, por la FDA (US Food And Drug Administration), su uso en el tratamiento de cáncer de colon metastásico en combinación con regímenes de fluorouracil y posteriormente ha sido empleado en diferentes malignidades como cáncer de mama, cáncer de célula no pequeña de pulmón, cáncer renal y cáncer de ovario (Egan K. y cols., 2011). Estudios recientes indican que una monoterapia con Bevacizumab alcanza un 18% de tasa de respuesta en pacientes con cáncer de ovario, mostrando buenos resultados en la progresión libre de enfermedad (Kyoto H. y cols., 2011), beneficios que no superan los efectos adversos que produce este fármaco, como es: hipertensión, trombosis, hemoptisis, proteinuria y dolor de cabeza. Además, su uso ha mostrado que causa una alta tasa de perforaciones gastrointestinales en pacientes con cáncer de ovario y no se ha observado un aumento en la supervivencia global, causando en muchas ocasiones alta toxicidad (Welti J., 2013). (Battinelli E. M. y cols., 2011). Otros estudios han mostrado que el uso de bloqueadores de VEGF resulta insuficiente para prevenir la progresión, debido a que causa resistencia e incluso puede incrementar la invasión y metástasis, aunque todavía es materia de investigación (Welti J., 2013).

Por otra parte, dado su clave rol en el proceso angiogénico, es claro que las plaquetas pueden ser un importante blanco para el tratamiento del cáncer. Se ha observado que la terapia antitrombótica reduce la angiogénesis tumoral y los eventos tromboembólicos en las pacientes. Lamentablemente, este tipo de terapia no está exenta de efectos secundarios, como la hemorragia, que reducen la calidad de vida de las pacientes (Kumar S. y cols., 2013; Erices R. y cols., 2017). Estos antecedentes sugieren la necesidad de investigar otras alternativas de tratamiento que reduzca la acción de las plaquetas en el desarrollo y diseminación del cáncer de ovario.

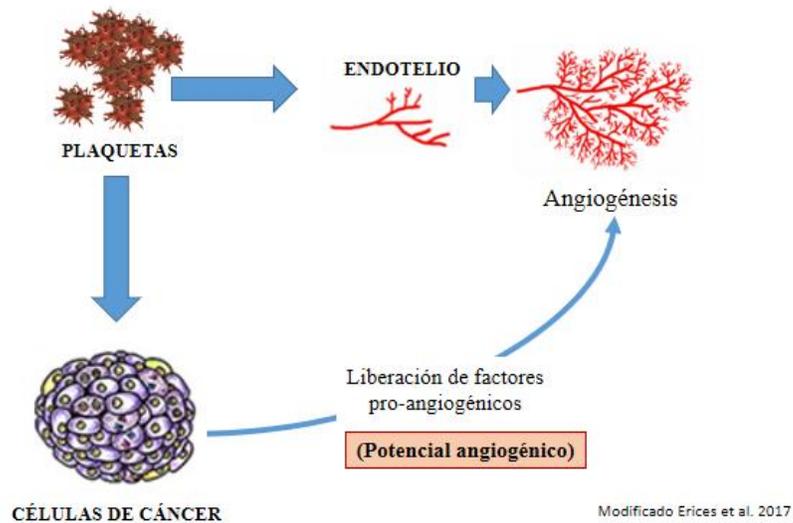


Figura 1.- Acción de las plaquetas sobre el proceso de angiogénesis y el desarrollo del tumor. Plaquetas actúan directamente sobre células endoteliales y ha sido reportado que incrementan la formación de estructuras tipo capilar y el proceso de angiogénesis. Plaquetas actúan sobre células de cáncer favoreciendo la liberación de factores proangiogénico, incremento el potencial angiogénico de estas células.

1.9 Metformina y su uso en clínica

Metformina (1,1 dimetilbiguanida hidroclorehidrica) es una biguanida utilizada como primera línea de tratamiento para pacientes con diabetes mellitus tipo II y pacientes con resistencia a la insulina (Evans J. M. y cols., 2005). Recientemente, investigaciones han permitido ampliar su uso a otras patologías como la diabetes mellitus gestacional, síndrome de ovario poliquístico y para la prevención de la diabetes (Lei Y. y cols., 2017). Otros hallazgos indican que Metformina disminuye la ingesta de alimento y peso corporal, como también, ha mostrado un efecto positivo en marcadores de riesgo cardiovascular, incluyendo perfil lipídico, grasas hepáticas y modulación de marcadores inflamatorios (Pernicova I. y Korbonits M., 2014). Se sabe que Metformina en disolución tiene carácter polar y es capaz de ingresar a la célula hepática a través del transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1), siendo su primer blanco molecular la inhibición del complejo I mitocondrial (Dowling R. J. y cols., 2016; Christodoulou M. I. y Scorilas A., 2017). Esta inhibición causa un desbalance de la razón AMP/ATP, permitiendo la activación de quinasa dependiente de AMP (AMPK), proteína quinasa involucrada en la regulación del metabolismo energético celular. Luego de la fosforilación de esta quinasa se induce el metabolismo catabólico, el que activa procesos como autofagia y a su vez se inhibe la señalización del metabolismo anabólico, el cual involucra la inhibición de procesos tales como la síntesis de ácidos grasos y síntesis de proteínas. (Dowling R. J. y cols., 2016). Este cambio en el metabolismo celular resulta en la inhibición de la señalización de mammalian Target of Rapamycin (mTOR) un importante inductor de la proliferación celular y angiogénesis. Otros

efectos incluyen la inhibición de genes claves en el proceso de gluconeogénesis en el hígado, y la captación de glucosa en el musculo esquelético, reduciendo los niveles de glucosa en sangre. También, incrementa la sensibilidad del receptor de insulina a su ligando, aumenta la glicolisis y la oxidación de ácidos grasos, lo que explica su beneficio en la resistencia a la insulina en el tejido periférico (Dowling R. J. y cols., 2016). La activación del sensor metabólico AMPK ocurre específicamente por la fosforilación en la subunidad catalítica α en el residuo Thr172, residuo que se expone, posterior al cambio conformacional de la quinasa cuando AMP se une en su subunidad γ (Christodoulou M. I. y Scorilas A., 2017). La quinasa hepática B1 (LKB1) y la proteína quinasa β dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina ($\text{CAMKK}\beta \text{Ca}^{2+}$) son dos quinasas que están río arriba de AMPK y fosforilan la subunidad α de la proteína (Gündüz D. y cols., 2015; Sosnicki S. y cols., 2016).

Metformina es un fármaco que lleva cerca de 50 años usándose para el tratamiento de la diabetes mellitus y otros síndromes. Recientemente, Evans y cols. en el 2005 publicaron la primera evidencia que asociaba el uso de este fármaco con una disminución en el riesgo de desarrollar cáncer en pacientes diabéticos (Evans J. M. y cols., 2005). Esta evidencia causó gran impacto en la comunidad científica, volcando toda la atención en determinar los posibles efectos anticancerígenos de la droga y el posible mecanismo que estaría involucrado en este efecto anticancer. Posterior a la publicación de este reporte, otros estudios reforzaron la idea del efecto antineoplásico de Metformina en múltiples tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de ovario (Kasznicki J. y cols., 2014; Gaducci A. y cols., 2016; Gao Z. y cols., 2016; Sosnicki S. y cols., 2016). Recientemente, las investigaciones evaluando el efecto de Metformina en cáncer han

incrementado, principalmente para la determinación del mecanismo de acción de Metformina, ya que los estudios podrían identificar nuevos blancos terapéuticos para tratar el cáncer e incluso promover su uso en pacientes con cáncer que no necesariamente padezcan de diabetes mellitus.

1.10 Metformina y Cáncer

Es sabido que existe una asociación positiva entre la Diabetes Mellitus y el riesgo de desarrollar neoplasia. Se ha observado que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan incrementan el riesgo a desarrollar cáncer o morir por esta malignidad (Soraya H. y cols., 2012). Dado la asociación que existe entre estas dos enfermedades, investigadores han estudiado el posible efecto anticáncer que podrían tener alguno de los diferentes fármacos comúnmente utilizados para tratar la diabetes. Uno de esos estudios fue el de Evans y cols. (2005) que publicó por primera vez que el tratamiento con Metformina en pacientes diabéticos reducía en un 23% el riesgo de desarrollar cáncer, sugiriendo que tal vez este fármaco podría tener un efecto anticancerígeno en estos pacientes. Posteriormente, un metaanálisis realizado con más de 4000 pacientes con diabetes mellitus tipo II comparó el efecto de Metformina y otros fármacos antihiperlipemiantes, (utilizados para tratar la diabetes) sobre el riesgo de desarrollar cáncer. En el estudio se obtuvo que sólo Metformina reduce en un 31% el riesgo de desarrollar cáncer de ovario, sin embargo, el mecanismo involucrado en su efecto anticáncer se desconoce (Decensi A. y cols., 2010). Adicionalmente, estudios prospectivos han mostrado que el uso de este fármaco en pacientes diabéticas con cáncer de ovario retrasa la progresión del cáncer, respecto a pacientes diabéticas con cáncer que no usan este tratamiento (Evans J. M. y cols.,

2005; Hirsch H. A. y cols., 2013; Qu C. y cols., 2014). También se ha observado que dosis bajas de Metformina ejercen efectos anticancerígenos, por ejemplo, un reporte indicó que 250mg de Metformina al día, reduce la proliferación y la formación de criptas con morfología aberrante en el epitelio rectal de pacientes no diabéticas comparado con el placebo (Dowling R. J. y cols., 2016). Por otra parte, estudios *in vitro* han mostrado que concentraciones milimolares de Metformina son capaces de inducir apoptosis en células de cáncer de mama por una vía que involucra la función mitocondrial (Cufi S. y cols., 2010). También han indicado que Metformina bloquea la vía Src reduciendo la inflamación a través de una vía que involucra la inhibición de NF- κ B (Gao Z. y cols., 2016). Posteriormente, un estudio evaluó si Metformina podía revertir la resistencia de células de cáncer de mama a la quimioterapia. En el estudio se observó que células de líneas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB231 luego del tratamiento con Metformina a concentraciones micromolares, aumentaba la apoptosis inducida por fluorouracil (fármaco para tratar el cáncer), en estas células. Estos resultados sugieren que Metformina vuelve a sensibilizar estas células a la quimioterapia. En este mismo estudio, lograron también revertir el proceso de EMT en estas células. (Cheng R. y Ma J., 2015). Para confirmar si estos resultados dependían de la activación de AMPK, los investigadores utilizaron compuesto C, un conocido y ampliamente utilizado inhibidor de la activación de AMPK. Ellos observaron que el efecto de Metformina desaparecía cuando Compuesto C estaba presente, sugiriendo entonces que el efecto anticáncer de Metformina es mediado por la activación de este importante sensor metabólico (Dolasik I., 2013; Cheng R. y Ma J., 2015). Si bien estos resultados son alentadores, deben ser considerados con prudencia ya que otro estudio indicó que Compuesto C puede

reducir la proliferación de células de glioma a través de una vía independiente a la señalización de AMPK, sugiriendo que el agente puede tener efectos por sí solo (Cheng R. y Ma J., 2015). Nuestro laboratorio realizó estudios similares en células de cáncer de ovario, el objetivo fue determinar si concentraciones micromolares de Metformina incrementaba el efecto citotóxico de paclitaxel y carboplatino. Se observó que el pretratamiento y posterior co-tratamiento de Metformina junto con la quimioterapia produce un efecto sinérgico de la toxicidad en las células de línea celular de cáncer de ovario A2780 y SKOV3. Una observación interesante fue el hecho de que Metformina por sí sola no afectaba la viabilidad de las células (Erices R. y cols., 2013). El descubrimiento de un posible efecto de Metformina sobre el cáncer ha causado gran interés en el mundo científico, sin embargo, aún no es posible establecer un mecanismo de acción del fármaco para estos efectos anticancerígenos. Lamentablemente los estudios que buscan determinar el efecto antineoplásico de Metformina tienen limitaciones. Por ejemplo, en los estudios clínicos, existe cierto sesgo de los criterios de inclusión de los pacientes, debido las comorbilidades (obesidad, tratamientos previos, fumar, hipertensión, etc.) que presentan al comenzar el estudio. En el caso de los estudios preclínicos, una de las limitantes es que los investigadores usan concentraciones milimolares de Metformina en un rango de 1mM a 40 mM (165-6600 mg/l), las cuales superan las concentraciones alcanzadas en el plasma de pacientes diabéticos que son tratados con este fármaco que se ha observado oscilan entre 2, 8 a 50 μ M (0,465-2,5 mg/l) (Dowling R. J. y cols., 2016; Yi Q. y cols., 2016). Esta diferencia en las concentraciones utilizadas vuelve imposible extrapolar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* y observarlos en la clínica (Dolasik I., 2013; Cheng R. y Ma J., 2015; Gao Z. y cols.,

2016; Li W. D. y cols., 2017). El uso de concentraciones suprafarmacológicas en los estudios *in vitro* se basa en hallazgos que dan cuenta que el fármaco se acumula en el tejido, observándose concentraciones mayores a las presentes en el plasma, posiblemente, debido a que este fármaco no es metabolizado en el hígado (Swier N. y Versteeg H. H., 2017). Sin embargo, el uso de concentraciones muy elevadas puede conducir a efectos citotóxicos en los pacientes, donde el principal efecto colateral es acidosis láctica (Yi Q. y cols., 2016). Actualmente, Metformina se está incluyendo en estudios clínicos en fase 2 para pacientes con cáncer de ovario que no necesariamente padecen de diabetes, siendo una alternativa promisoriosa para el tratamiento adyuvante en estas pacientes. Se espera que los resultados de este estudio estén disponibles en abril del año 2021 (Christodoulou M. I. y Scorilas A., 2017).

1.11 Metformina y su acción en la angiogénesis

Es sabido que un alto porcentaje de pacientes diabéticos presentan alteraciones vasculares, una de ellas es la persistente angiogénesis, que puede desencadenar otro tipo de patologías micro y macrovasculares (Yu J. y cols., 2016). El mantener un balance angiogénico en el microambiente tumoral es clave para evitar la estimulación del proceso de angiogénesis en las células endoteliales adyacentes al tumor (Kerbel R. S., 2000). Este balance puede ser afectado por diferentes factores como el estrés oxidativo, citoquinas y factores inflamatorios (Lu C. y cols., 2008). Metformina es el principal fármaco indicado para pacientes con diabetes mellitus tipo 2

y se ha observado en diferentes artículos que puede contrarrestar los niveles de citoquinas, el estrés oxidativo, la hiperglicemia y el proceso inflamatorio en ciertas patologías, incluida la diabetes (Kinaan M. y cols., 2015; Kannarkatt J. y cols., 2016; Yi Q. y cols., 2016). Existen algunos trabajos en los que han evaluado el efecto de Metformina en la angiogénesis observada en la retinopatía diabética, en ellos se ha observado que la droga es capaz de inhibir la angiogénesis afectando la expresión de VEGF, sin embargo, no es claro si Metformina puede reducir la angiogénesis en condiciones no diabéticas (Ton B. K., 2009; Yu J. y cols., 2016). Durante la última década, investigadores han realizado estudios para identificar los efectos que pueda tener Metformina, esto adicionalmente a la evidencia que se tiene del efecto que produce en las pacientes diabéticas. Respecto a ello, estudios epidemiológicos han indicado que el uso de Metformina a largo plazo ofrece otros efectos protectores (Nisson M. b. y cols., 2005; Kim Y. y cols., 2011; Sosnicki S. y cols., 2016). Por ejemplo, un estudio indicó que el uso del fármaco reduce la probabilidad de desarrollar complicaciones vasculares independiente del control glicémico (Etulain J. y cols., 2013). Esto es de particular interés para clarificar el rol de Metformina en el tratamiento de la angiogénesis tumoral. Es sabido que Metformina tiene como blanco molecular la proteína AMPK, la cual es un modulador crítico del metabolismo celular, regulando varios procesos celulares claves como apoptosis, autofagia, diferenciación celular y la angiogénesis (Kim Y. y cols., 2011; Gündüz D. y cols., 2015; Sosnicki S. y cols., 2016; Li W. D. y cols., 2017). Se ha propuesto que el efecto antiangiogénico de Metformina podría estar asociado al cambio en el metabolismo energético en las células de cáncer y células endoteliales que forman parte de la irrigación tumoral. Sin embargo, los estudios realizados con Metformina

no están exentos de controversia, debido a que existen reportes que indican que es un agente antiangiogénico, mientras otros publican que Metformina puede promover la angiogénesis (Protti A. y cols., 2012; Gao S. y cols., 2015; Xin G. y cols., 2016). Respecto a los reportes que indican que, Metformina reduce la angiogénesis, se ha observado que el fármaco es capaz de reducir los niveles de IL-6, un potente agente proangiogénico que incrementa la migración en células endoteliales y que se sabe está significativamente aumentada en pacientes con cáncer de ovario (Menter D. G. y cols., 2014) (Trifanescu O. G. y Anghel R., 2015). Lamentablemente, es difícil determinar la acción que tiene Metformina sobre la angiogénesis, porque la mayoría de los estudios *in vitro* que han evaluado la acción antiangiogénica de Metformina han utilizado concentraciones milimolares del fármaco lo que impide comprobar este efecto en pacientes. Es posible que la controversia existente sobre los efectos de Metformina se deba principalmente al uso de concentraciones suprafarmacológicas, las cuales difieren en varios ordenes de magnitud, respecto a los usados en la clínica, sugiriendo, además, que su acción podría ser dependiente de su concentración (Nisson M. b. y cols., 2005; Kim Y. y cols., 2011; Gao Z. y cols., 2016; Kannarkatt J. y cols., 2016).

1.12 Metformina y plaquetas

Metformina ha sido estudiada en varias patologías, sin embargo, poco se sabe acerca del posible efecto que puede tener sobre las plaquetas. Esto es materia de gran interés, ya existe evidencia del rol que tienen las plaquetas en la promoción de la angiogénesis, un proceso clave en el desarrollo y progresión del cáncer (Erices R. y cols., 2013; Kumar S. y cols., 2013; He L. y Wondisford F. E., 2015; Erices R. y cols., 2017). Un estudio realizado en pacientes diabéticos indicó que Metformina disminuye el promedio de volumen plaquetario (MPV; sigla en inglés) (Inzucchi S. E. y cols., 2014). Este parámetro ha sido establecido como un indicador de la activación plaquetaria, indicando que Metformina estaría reduciendo este indicador. Otros dos estudios uno *in vitro* y un estudio clínico mostraron efectos similares en la activación plaquetaria (Bottsford-Miller J. y cols., 2015; Jiang L. y cols., 2015). Estas observaciones podrían explicar la reducción en los eventos trombóticos en pacientes tratados con este fármaco, sin embargo, las concentraciones de Metformina observadas en estos estudios superan el rango de concentraciones observadas en el plasma de pacientes diabéticas que son tratadas con él.

Entonces, dado que la angiogénesis puede ser promovida por las plaquetas y que existe evidencia que Metformina puede ejercer un efecto antiangiogénico a concentraciones suprafarmacológicas, el objetivo de esta investigación se enfoca en determinar si Metformina a concentraciones farmacológicas es capaz de reducir la angiogénesis promovida por las plaquetas en el cáncer de ovario y el mecanismo de acción que está involucrado en este efecto. Nuestro

trabajo podría permitir su uso terapéutico en el cáncer de ovario, específicamente reduciendo la angiogénesis estimulada por las plaquetas.

2. HIPOTESIS

Metformina previene los efectos plaquetarios asociados al aumento de la capacidad angiogénica de células endoteliales y al aumento del potencial pro-angiogénico de células de cáncer de ovario, a través de la activación de la proteína AMPK en ambos tipos celulares.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si Metformina, a través de la vía AMPK, reduce los efectos proangiogénicos de las plaquetas sobre las células endoteliales y sobre las células de cáncer de ovario.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Estudiar el efecto directo de Metformina sobre la capacidad angiogénica del endotelio en ausencia y presencia de plaquetas.

4.1.1 Evaluar el efecto de concentraciones crecientes de Metformina sobre la capacidad angiogénica de células endoteliales

4.1.2 Evaluar si Metformina (20uM) puede inhibir la angiogénesis promovida por plaquetas en células endoteliales (línea y cultivo primario)

4.2 Establecer si Metformina inhibe el potencial angiogénico que tienen las plaquetas sobre las células de cáncer de ovario, reduciendo la angiogénesis promovida por medio condicionado proveniente de estas células.

4.3 Estudiar si la acción inhibitoria de Metformina ocurre directamente en las células endoteliales y las células de cáncer de ovario o sobre plaquetas o en ambas.

4.3.1 Determinar si un pretratamiento a las plaquetas con Metformina reduce la angiogénesis de células endoteliales aumentada por plaquetas.

4.3.2 Determinar si un pretratamiento a las células endoteliales con Metformina reduce el incremento de la angiogénesis generada por las plaquetas.

4.4 Determinar el mecanismo por el cual Metformina inhibe la angiogénesis directa e indirectamente inducida por las plaquetas.

4.4.1 Determinar si la vía AMPK está involucrada en los efectos biológicos sobre las células endoteliales inducido por las plaquetas.

4.4.2 Determinar si la vía AMPK está involucrada en los efectos biológicos sobre las células de cáncer de ovario inducido por plaquetas.

4.4.3 Determinar la participación de mediadores involucrados en el efecto antiangiogénico de Metformina, luego de la activación de la vía AMPK.

5. MATERIALES

5.1 Células

Se utilizan las líneas celulares SKOV3, UCI 101, provenientes de ascitis adquiridas en el centro global de bio recursos ATCC. Se cuenta con muestras de ascitis de pacientes con cáncer de ovario donadas, bajo autorización por consentimiento informado, al proyecto postdoctoral FONDECYT 3150028 de Rafaela Erices y proyecto BMRC 13CTI 21526-P6 (GO) los cuales cuentan con la aprobación del comité de ética de los centros de salud de procedencia.

5.2 Reactivos

Medio endotelial humano; MFS (Life Technologies, Gran Island, NY, USA), Suplemento de crecimiento de célula endotelial (Merck Milipore, Billerica, MA, USA), Medio DMEMF12 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), Anti AMPK y AMPK-P (Cell Signaling), Tubulina (Santa Cruz), CD61 y CD62 (Ursula Biggemann), Metformina (D150959; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Compuesto C ((ab120843; Abcam, Cambridge, UK), membranas de nitrocelulosa (Biorad, Hercules, CA, USA), anticuerpo secundario (Biorad, Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate; Cat. N°170-6515, USA), reactivo quimioluminiscente (Pierce ECL Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Rojo Ponceau (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,

USA), matrigel (Cat N° 356231, growth factor reduced matrigel matrix, phenol red free, BD Biosciences), PGE1 (P5515, Sigma),

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivos primarios de ascitis

Las muestras incluidas para nuestra investigación como cultivo primario fueron obtenidas a través del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica y el Hospital Gustavo Fricke, Viña del Mar. La obtención de estas muestras cumple con la aprobación ética de las instituciones y los servicios de salud correspondientes y por el comité de ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Cada muestra fue obtenida, posterior a que la paciente firmara el consentimiento informado por escrito. Este proyecto FONDECYT N° 3150028 post-doctoral de la Dra. Rafaela Erices, está aprobado por los servicios de salud correspondientes y está bajo el nombre de *“Las plaquetas promueven el potencial angiogénico y el fenotipo metastásico de las células de cáncer de ovario, y este efecto es inhibido por Metformina”*.

6.2 Muestras de cordón umbilical

Células endoteliales fueron aisladas desde cordones umbilicales de pacientes que firmaron consentimiento informado aprobado por el comité ético del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile. Las células fueron obtenidas por tratamiento con colagenasa y mantenidas en medio libre de suero (SFM) endotelial de humano (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y suplemento de crecimiento de célula endotelial (concentración final 6 µg/ml) (Merck Milipore, Billerica, MA, USA)

6.3 Líneas cultivo celular

Líneas de células de cáncer de ovario SKOV3 y UCI101 fueron mantenidas en medio DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

6.4 Purificación de Plaquetas

La extracción de sangre venosa se realizó utilizando 2 mL de buffer ACD-A (citrate trisódico, 2.5g/100mL; ácido cítrico 1.37g/100mL; 2g/100mL, pH 4.5) por cada 10mL de sangre. La sangre fue puesta en tubos de 15mL y centrifugada por 9 min a 200g. El plasma rescatado se centrifugó por 9 min a 2700g. El pellet fue resuspendido en buffer CAF (137mM NaCl; 2.68mM KCl; 11.9mM NaHCO₃, 0.36mM Na₂HPO₄X 2H₂O; 2mM MgCl₂, PGE 120mM) hasta alcanzar un volumen de 10mL. Se centrifugó el sobrenadante 2 veces por 9 min a 200g, finalmente se centrifugó por 9 min a 2700g. El precipitado fue resuspendido en buffer CAF. Se tomó 100μL de la solución, se centrifugaron por 2 min a 10000 RPM y fue resuspendido en 20μL de Yoduro de propidio (0.75mM), una alícuota de 10μL fue observada bajo microscopio de fluorescencia y se contaron los núcleos teñidos para determinar el grado de contaminación con leucocitos, los conteos fueron siempre menores a 1 por cada 10⁵ plaquetas. Luego se cuantifico el número de plaquetas en el contador de partículas (Counter Particle Counter WS-ZIDUALPC) y se ajustó con su concentración a 600.000 plaq/μL.

6.5 Activación y separación de componentes plaquetarios

Un contenido de 300×10^6 plaquetas purificadas, fueron resuspendidas en 1mL de medio de cultivo DMEM F12, e incubadas durante 15 min a 37°C con trombina 0,5 U/mL para inducir su activación, luego se realizó una centrifugación a 2700g por 9 min, el sobrenadante que contiene los factores liberados obtenido fue utilizado para estimular las células de cáncer en un volumen final de 2mL, mientras que el precipitado que contiene restos membranosos de plaquetas fue nuevamente lavado en PBS para luego agregarlo al cocultivo con las células de cáncer.

6.6 Western blot

Se extrajeron las células de cáncer y células endoteliales utilizando un “scrapler”, luego el contenido fue centrifugado a 7000 RPM por 7 min a 4°C . El precipitado fue resuspendido en 50 μL de buffer de lisis (960 μL de buffer MISO + 40 μL IP 25x) e incubado por 20 min a 4°C , en el caso de proteínas fosforiladas el buffer de lisis adicionalmente contenía ortovanadato. Luego las células fueron sonicadas y centrifugadas a 7000 RPM durante 7 min a 4°C . A partir del sobrenadante se cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método Bradford. Se realizó un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. Se dejó migrar durante 1 hora y 30 min a 120 Volt. Luego el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa durante 120 min a 300 mA, para posteriormente bloquear sitios de unión con PBS Tween 3% BSA durante 1h en rampa de agitación a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo primario

(Anti AMPK y AMPK - P 1:1000) durante 16 horas. Luego se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS. Tween 0,1%. El anticuerpo secundario anti conejo fue incubado durante 2h a concentración 1:1000 en PBS BSA 3%. Membranas fueron expuestas a MyECL (ThermoScientific, Whaltman, MA, USA) y la carga inicial de proteína fue evaluada por la tinción de rojo ponceau (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La densidad óptica de las bandas fue cuantificada usando el software Image J v 1.6. Las densidades ópticas fueron expresadas como la razón del tratamiento/control.

6.7 Citometría de Flujo

Para el análisis de activación plaquetaria, se extrajeron plaquetas frescas y se incubaron durante 30 min a 37° C en medio DMEM F12 sin suero más vehículo de Metformina (agua), medio DMEM F12 sin suero con Metformina 20 μ M, en buffer CAF (control negativo) y en medio DMEM F12 sin suero con trombina 1U/mL (control positivo). Las plaquetas incubadas en buffer CAF fueron separadas en tres tubos. El primero fue utilizado como control negativo, por lo que se mantuvo con el buffer CAF. El segundo se incubó con 5 μ L de anti CD61 y 5 μ L de IgG de ratón; y el tercer tubo se incubó con 5 μ L de anti CD61 y 5 μ L de Anti CD62. Los tubos fueron leídos por el citómetro en el cual se obtuvieron un mínimo de 5000 eventos por condición.

6.8 Ensayo de viabilidad celular

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una confluencia de 2500 a 3000 cél/pocillo. Se incubaron las células en una curva de concentración creciente de Metformina 10, 20, 50, 100 y 200 μM en presencia o ausencia de plaquetas. En el caso de Compuesto C se evaluó la concentración 10 nM solo o en combinación con Metformina y en presencia o ausencia de plaquetas. El vehículo de Compuesto C fue DMSO (dimetilsulfóxido) al 0,1%. Previo al ensayo se cambió medio a DMEM F12 sin suero (4 horas min). Luego de 12 horas de incubación se agregó la combinación de los reactivos de MTS. El ensayo se leyó usando el equipo EPOCH a 490 nm.

6.9 Ensayo de formación de estructuras tipo capilar (Angiogenesis *in vitro*)

El ensayo de formación de estructuras tipo capilar fue realizado (de ahora en adelante lo llamaremos angiogénesis), usando células HUVEC y EAhy926 como se describe en Aranda E. Owen G. I., 2009. Brevemente, las células EA.hy926 y células HUVEC (30.000 cel/poc, en medio DMEM F12 0% SFB) fueron sembradas sobre pocillos cubiertos con magtrigel (placa de 48 pocillos) e incubados a 37° C por 12 horas. Los cultivos fueron fotografiados usando 4X y 10X de magnificación y todos los resultados fueron cuantificados usando el software “Angiogenesis Analyzer” desde el programa Image J v 1.6. Para el índice angiogénico fueron usadas las imágenes tomadas con aumento 4X y se estableció la siguiente formula:

Índice Angiogénico = N ° de ramificaciones X Largo total de la ramificación

6.10 Análisis estadístico

Experimentos que presentaron una variable fueron analizados usando ANOVA con una prueba a posteriori de Tukey (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Cuando los datos involucraban dos variables se utilizó ANOVA de dos vías con la prueba a posteriori de Bonferroni. Todos los experimentos tanto en células de cultivo primario HUVEC o de ascitis de paciente con cáncer de ovario avanzado, así como las líneas de celulares de cáncer de ovario o células endoteliales fue realizado con 3 o más repeticiones y fue considerado $P < 0,05$ como significativo.

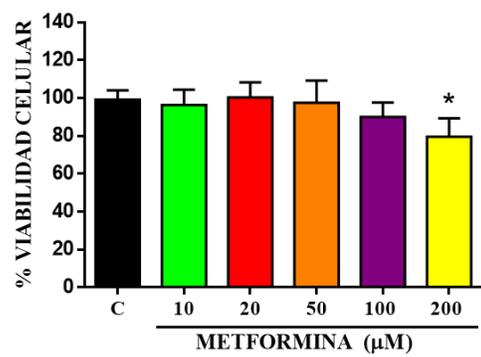
7. RESULTADOS

7.1 Metformina a concentraciones clínicas no reduce la angiogénesis

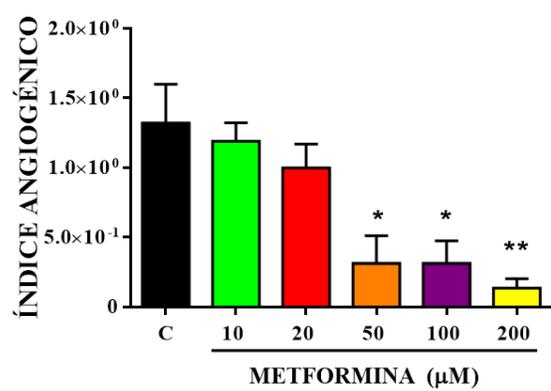
Para determinar si Metformina puede tener un efecto antiangiogénico sobre células endoteliales coincubadas con plaquetas, primero se evaluó si el fármaco puede generar un efecto citotóxico en las células endoteliales pudiendo estar causando su muerte. La viabilidad celular se estudió a través de un ensayo de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Se realizó una curva de concentración respuesta que incluyó las concentraciones 10, 20, 50, 100 y 200 μM de Metformina y las células endoteliales fueron sembradas en cada una de las condiciones. Se estableció como concentraciones terapéuticas (10 y 20 μM), concentraciones que se encuentran en el rango de concentraciones de Metformina observadas en plasma de pacientes con diabetes que son tratados con el fármaco. Las concentraciones consideradas “supra farmacológicas” (50, 100 y 200 μM), fueron concentraciones más elevadas que las observadas en plasma de pacientes tratados con el fármaco. Como se observa en la figura 2A, Metformina tiene un efecto citotóxico sobre células endoteliales sólo a 200 μM , causando significativamente la muerte de estas células. Sin embargo, a concentraciones menores Metformina no afecta la viabilidad celular. Debido a que sólo 200 μM generó una disminución significativa de la viabilidad celular, se determinó si este fármaco reducía la angiogénesis. Para ello se utilizó el ensayo de formación de estructuras tipo capilar (la cual llamaremos de aquí en adelante ensayo de angiogénesis), una aproximación

cuantitativa que comúnmente es utilizada para evaluar el proceso de angiogénesis. En este ensayo se utilizaron las mismas concentraciones de Metformina previamente estudiadas. En la figura 2B y 2C se observa el panel de fotografías representativas de las condiciones y sus cuantificaciones. Metformina a concentraciones menores o iguales a $20\mu\text{M}$ tiende a reducir la angiogénesis de células endoteliales, pero no es significativa, sin embargo, a concentraciones superiores o iguales a $50\mu\text{M}$ se observa que estas estructuras se pierden y se evidencian células con un fenotipo redondeado. Estos resultados indican que Metformina reduce el proceso de angiogénesis en un rango de concentraciones de $50\mu\text{M}$ a $100\mu\text{M}$, asociando este efecto a un rol antiangiogénico del fármaco. A la concentración $200\mu\text{M}$ existe una disminución del proceso de angiogénesis, sin embargo, es posible que esta disminución esté asociada a una disminución de la viabilidad celular y no a un efecto sobre la angiogénesis.

A)



B)



C)

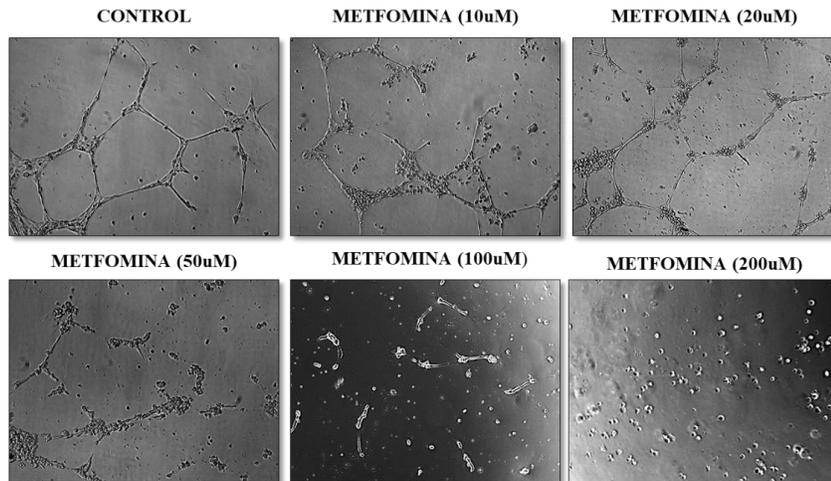


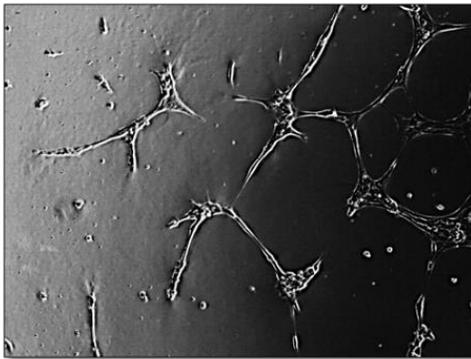
Figura 2.- Metformina a concentraciones terapéuticas para pacientes diabéticos no tiene un efecto significativo sobre la angiogénesis de las células endoteliales. Cultivo primario de células HUVEC sembradas sobre matrigel en medio DMEM sin suero en presencia y ausencia de Metformina a concentración ascendente (10, 20, 50, 100 y 200 uM). El vehículo fue agua. A) Viabilidad de células endoteliales expuestas a concentraciones crecientes de Metformina. Sólo a 200uM, ocurre una disminución significativa de la viabilidad. B) Cuantificación de la angiogénesis con software Image J (pluggin “angiogénesis”); Angiogenic Score = Number branches * total branches leng. C) Imágenes representativas del efecto de concentraciones crecientes de Metformina sobre la angiogénesis de células endoteliales en ausencia de plaquetas. Fotografías tomadas a las 12 horas posterior a la incubación. n=4.

7.2 Metformina a concentraciones terapéutica para pacientes diabéticos reduce la angiogénesis promovida por plaquetas

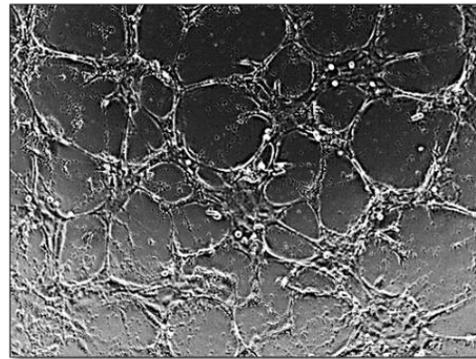
Dado que cerca de un tercio de las pacientes con cáncer de ovario presenta trombocitosis y que el aumento de plaquetas puede incrementar la angiogénesis, proceso clave en el desarrollo y diseminación del cáncer (ver figura 1). Se evaluó si las plaquetas eran capaces de incrementar la angiogénesis en nuestro modelo. Como se observa en la figura 3, las plaquetas luego de 12 horas incubadas con células endoteliales sembradas sobre matrigel son capaces de aumentar la angiogénesis significativamente.

A)

CONTROL



PLAQUETAS (150.000pl/μL)



B)

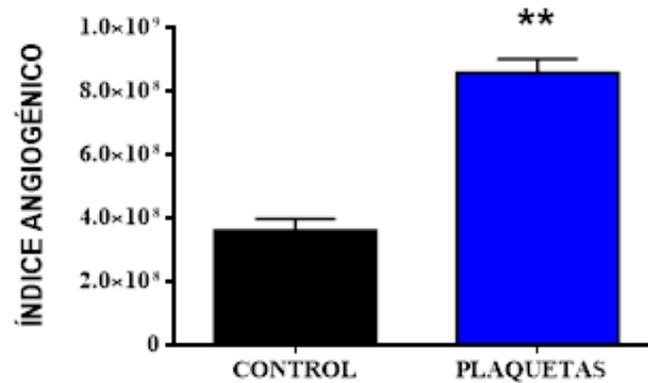
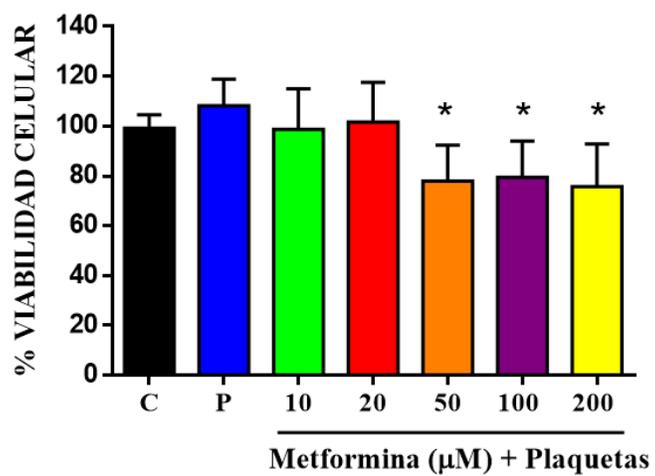


Figura 3.- Plaquetas incrementa la angiogénesis de células endoteliales. Cultivo primario de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) sembradas sobre matrigel en medio SFB 0%. A) Panel de fotografías representativas del efecto proangiogénico de las plaquetas sobre células endoteliales. B) Cuantificación de la angiogénesis. Fotografías tomadas a las 12 horas posterior a la incubación. n=4 condición control, N=5 condición plaquetas. Test T *** p >0,001

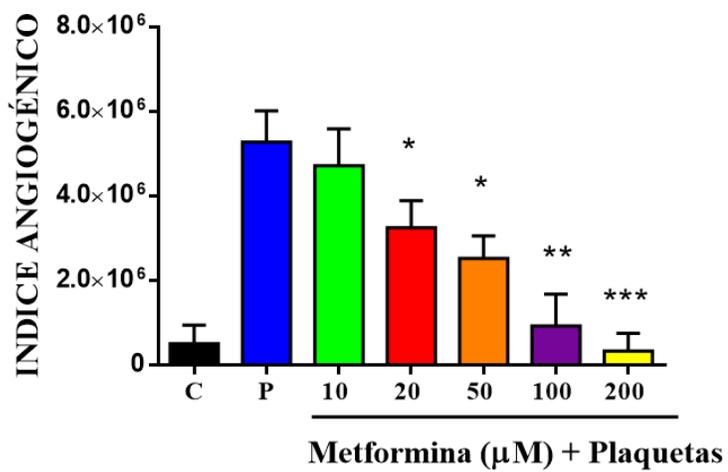
Dado el interés por evaluar el posible efecto antiangiogénico de Metformina que ha sido sugerido en recientes estudios y los reportes que han establecido que las plaquetas promueven la sobrevivencia celular (Egan K. y cols., 2011; Davis A. y cols., 2014), se estudiaron las mismas concentraciones de Metformina sobre la viabilidad de células endoteliales en presencia de plaquetas. Sorpresivamente, como se evidencia en la figura 4A, a partir de la concentración 50 μ M ocurre muerte en las células debido a un efecto citotóxico del fármaco. Posteriormente se evaluó si la presencia de Metformina podría inhibir la angiogénesis promovida por plaquetas. Para ello, previo a los estudios, se confirmó que las plaquetas en el modelo utilizado incrementan la angiogénesis (ver Figura 3A). Durante 12 horas se incubaron células endoteliales y plaquetas

en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de Metformina. Posterior a la incubación se observó que a partir de la concentración $20\mu\text{M}$ la angiogénesis de células endoteliales promovida por plaquetas es inhibida significativamente (ver Figura 4B-4C). Estos resultados sugieren que la disminución de la formación de estructuras capilar observada a la concentración $20\mu\text{M}$ en presencia de plaquetas sería por un efecto antiangiogénico y no citotóxico del fármaco. Es importante indicar que a concentraciones mayores a $20\mu\text{M}$ se observa una desestabilización de las estructuras y células redondeadas que aumentan en número hacia la concentración $200\mu\text{M}$. A esta concentración ya no es posible observar estructuras tipo capilar. Dado que la concentración $20\mu\text{M}$ esta concentración al estar incluida dentro del rango de concentraciones de Metformina alcanzadas en el plasma de pacientes diabéticos tratados con el fármaco consideramos continuar nuestros ensayos utilizando esa concentración.

A)



B)



C)

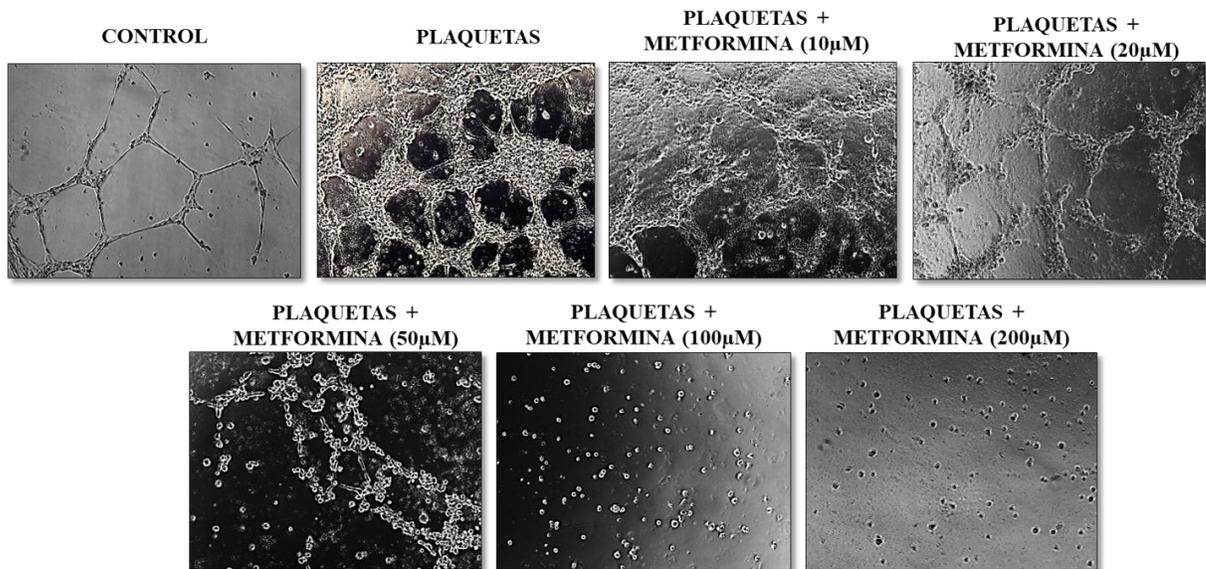


Figura 4: Metformina 20uM reduce significativamente el efecto proangiogénico de las plaquetas sobre células endoteliales HUVEC (cultivo primario). Metformina (20uM); plaquetas (150.000 pl/uL). A) Viabilidad de células endoteliales expuestas a concentraciones crecientes de Metformina. B) Grafico muestra cuantificación de la angiogénesis. ANOVA de una vía con prueba a posteriori Dunnett's N=3. Fotos tomadas a las 12 horas de coincubación. C) Panel de fotografías representativas de ensayo angiogénesis con células HUVEC.

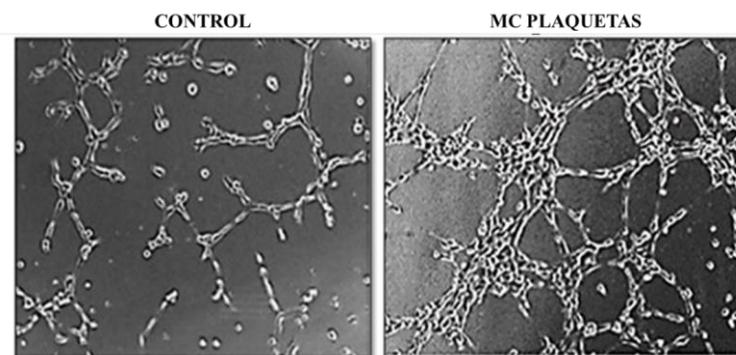
7.3 Metformina reduce el potencial angiogénico de células de cáncer de ovario promovido por plaquetas

Reportes han indicado que células de cáncer pueden promover la activación de plaquetas y liberación de factores que favorecen la proliferación y supervivencia de estas células (Aranda E. y Owen G. I., 2009; Labelle M. y cols., 2012). Por otra parte, se ha visto que las plaquetas pueden modificar la expresión de factores antiapoptóticos, antiautofágicos, proliferativos y proangiogénicos en líneas de células de cáncer de ovario (Egan K. y cols., 2011; Trifanescu O. G. y Anghel R., 2015). Debido a estos antecedentes, se evaluó si el medio condicionado de líneas de células de cáncer de ovario incubadas con plaquetas podría aumentar la angiogénesis de células endoteliales. Se sembraron células de línea de cáncer de ovario, UCI101 incubadas con plaquetas durante 24 horas. Posteriormente el Medio Condicionado obtenido fue utilizado para tratar a células endoteliales sembradas sobre matrigel durante 12 horas y se determinó la capacidad angiogénica. Se observó (ver figura 5) que el Medio Condicionado proveniente de células de cáncer de ovario coincubadas con plaquetas aumenta significativamente la angiogénesis comparado con la condición control. Dado estos resultados se determinó si Metformina 20 μ M era capaz de inhibir este incremento. Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de ovario; UCI101 y SKOV3. Las células fueron sembradas durante 24 horas en presencia o ausencia de plaquetas y Metformina. El medio condicionado obtenido fue utilizado para sembrar células endoteliales sobre matrigel durante 12 horas. Resultados muestran (ver figura 6) que medio condicionado proveniente de la condición que tenía células de cáncer incubadas con Metformina no mostró, en ninguna de las dos líneas celulares, un efecto sobre la

angiogénesis de células endoteliales comparado con la condición control. También se observó que el Medio Condicionado proveniente de la coincubación de células de cáncer y plaquetas en ambas líneas, incrementó la angiogénesis de células endoteliales. Sin embargo, este incremento en ambas líneas fue prevenido significativamente en presencia de Metformina. Es posible que este efecto correspondiera de la acción directa de Metformina presente en el medio sobre el endotelio, sin embargo, al evaluar el medio condicionado de Metformina en ausencia de células, se observó que no tiene efecto sobre la angiogénesis comparado con la condición control. Para asegurar que el efecto de Metformina no se asocia sólo a una determinada línea celular se evaluó si el efecto de Metformina era replicable en células de ascitis provenientes de pacientes con cáncer de ovario. Se utilizó muestras de ascitis de pacientes con cáncer de ovario en estadio avanzado (ver data clínica en Tabla 1) y las incubamos con plaquetas en presencia y ausencia de Metformina durante 24 horas. El medio condicionado se agregó a las células endoteliales y evaluamos el potencial angiogénico luego de 12 horas. Como se observa en la figura 7 la coincubación de cultivo primario de células de ascitis de pacientes con cáncer de ovario y plaquetas incrementó el potencial angiogénico en todas las muestras de las pacientes comparado con su control respectivo, mientras que el efecto inhibitorio de Metformina se observó en 3 de las 4 pacientes. Es esperable que una de las pacientes no respondiera al tratamiento con Metformina, debido a que es sabido que el cáncer es una enfermedad heterogénea, por lo que cada paciente puede responder de manera diferente a un mismo tratamiento. Estos resultados muestran que Metformina podría estar evitando el proceso angiogénico promovido por la interacción de plaqueta - célula de cáncer, sin embargo, se requieren más estudios para

determinar si el efecto de Metformina es directo sobre la plaqueta, sobre la célula de cáncer de ovario o ambas.

A)



B)

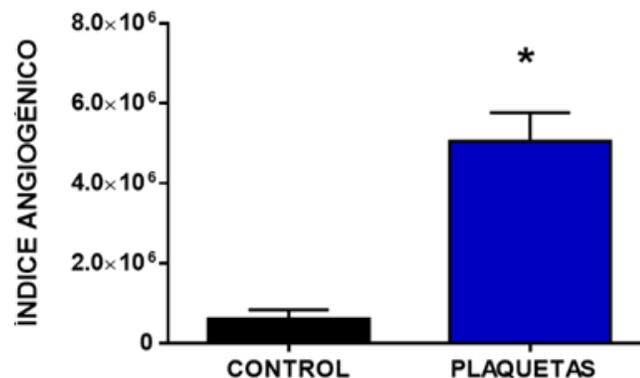


Figura 5.- Plaquetas incrementan el potencial angiogénico de las células de cáncer de ovario. Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) sembradas sobre matrigel con Medio Condicionado proveniente de la coincubación de células de cáncer de ovario (SKOV3) y plaquetas durante 24hrs. A) Panel de fotografías representativas del potencial angiogénico de las plaquetas sobre células de cáncer de ovario. B) Cuantificación de la angiogénesis. Fotografías tomadas a las 12 horas posterior a la incubación. n=3. Test T ** p < 0,01

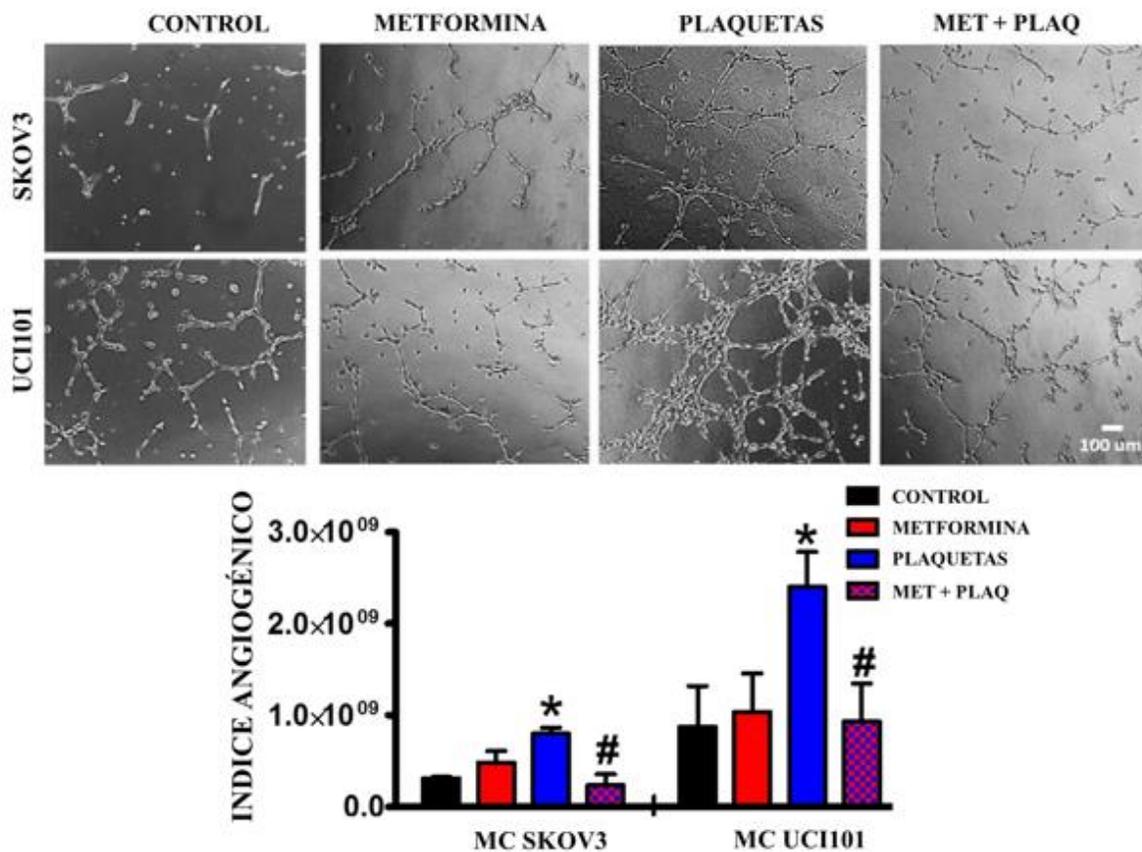


Figura 6.- Metformina inhibe el incremento del potencial angiogénico de células de cáncer de ovario promovido por plaquetas. A) Panel de fotos representativas de la angiogénesis de células endoteliales. B) Cuantificación de angiogénesis de células endoteliales en presencia de medio condicionado proveniente de células de cáncer de ovario. Células SKOV3 y UCI101 fueron coincubadas con plaquetas (150.000pl/uL) en presencia y ausencia de Metformina (20uM); vehículo utilizado fue agua. Luego de 24 horas los medios condicionados (MC) proveniente de estas células fueron utilizados para evaluar angiogénesis de células endoteliales (Eahy926). Fotografías tomadas 12 horas posterior al sembrado de las células endoteliales sobre matrigel. n = 4. * p <0,05 respecto de control # p < 0,05 respecto de control.

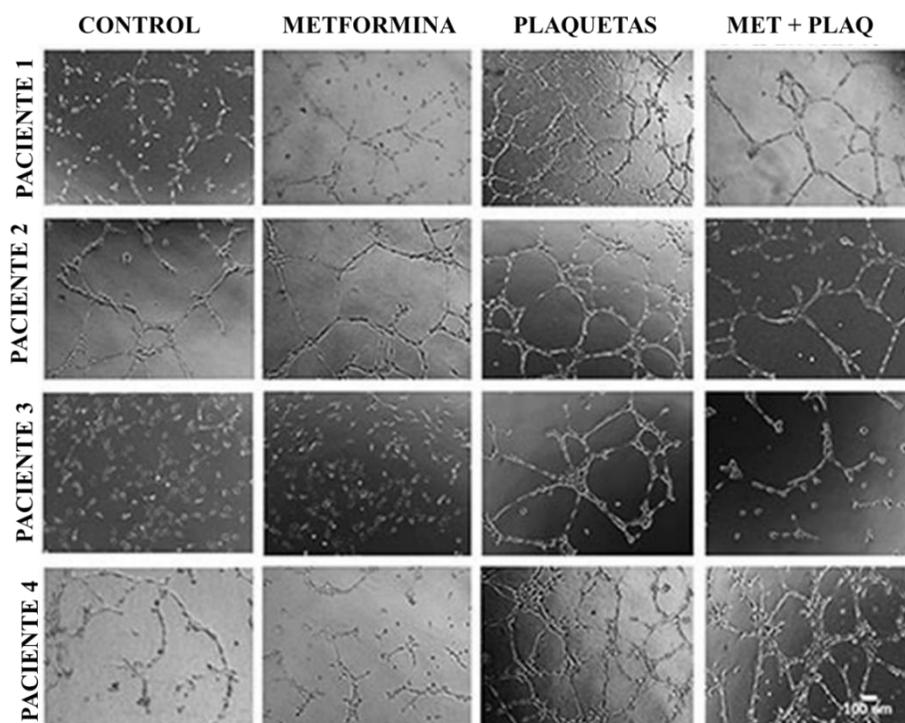


Figura 7.- Metformina previene el incremento del potencial proangiogénico de células de cultivo primario proveniente de ascitis de pacientes con cáncer de ovario, generado por las plaquetas. Panel de fotografía de angiogénesis de células endoteliales. Células Eahy926 fueron utilizadas para evaluar medio condicionado proveniente de muestras de paciente 1 y 2. Para pacientes 3 y 4 se usaron células HUVEC incubadas durante 12 horas con medio condicionado proveniente de cultivo primario de pacientes tratados durante 24 horas con control (vehículo), Metformina (20uM), plaquetas (150.000pl/μL) y Metformina + plaquetas.

Tabla 1: Data clínica de las muestras de ascitis de pacientes con cáncer de ovario que fueron utilizadas para la obtención de cultivos primarios.

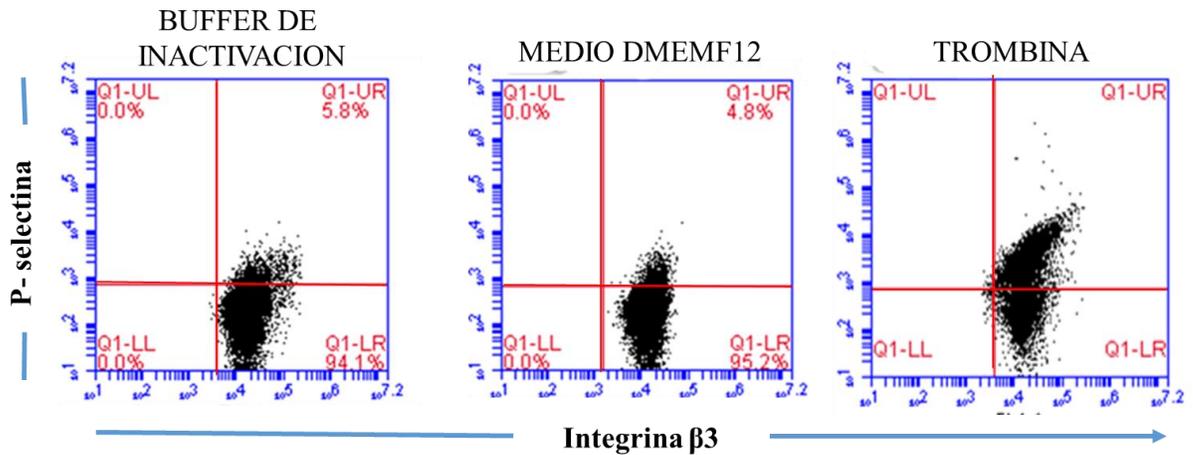
Código	Número de paciente	Etapa	Tipo
UC163	1	IV	Carcinoma alto grado seroso
GF127	2	IIIC	Adenocarcinoma ovárico invasivo pobremente diferenciado
GF179	3	IIIC	Carcinoma tubulopapilar seroso con cuerpos de psamoma
T02UC	4	IIIB	Mezcla de carcinoma ovárico, endometrioides y papilar seroso

7.4 Metformina no incrementa la activación plaquetaria

Los resultados han indicado que las plaquetas incrementan la angiogénesis por dos mecanismos, uno involucra la acción directa sobre las células endoteliales y el otro es de manera indirecta a través de Medio Condicionado proveniente de células de cáncer de ovario incubadas con plaquetas. En ambos casos la presencia de Metformina inhibe significativamente el efecto de las plaquetas, sin embargo, se desconoce cuál es el blanco celular de este fármaco. Una posibilidad es que Metformina afecta a las células (células endoteliales – células de cáncer) impidiendo que estas respondan a los estímulos proangiogénicos plaquetarios o bien Metformina afecta la activación plaquetaria, pudiendo evitar la liberación de factores proangiogénicos e incluso promover la liberación de factores antiangiogénicos, cambiando el balance de factores angiogénicos del microambiente tumoral. La biología de las plaquetas ha mostrado que estas son capaces de activarse fácilmente, sin embargo, en la circulación estas se mantienen inactivas debido a la liberación de NO desde células endoteliales. Para el estudio *in vitro* de las plaquetas se utilizó un buffer de inactivación que contiene citrato y PGE1, un conocido inhibidor plaquetario. Para determinar si Metformina era capaz de alterar la activación plaquetaria, las plaquetas fueron retiradas de su buffer de inactivación y resuspendidas en medio de cultivo DMEM F12 sin suero (condición control) en presencia y ausencia de Metformina. La cantidad de plaquetas activadas se comparó con la activación alcanzada con trombina (control positivo), un conocido agonista plaquetario (Labelle M. y cols., 2012). La activación plaquetaria

se obtuvo a través de la medición de los niveles de P-selectina (CD62) una proteína que se expone en la membrana de las plaquetas luego que estas se activan. Se midió los niveles de CD62 del contenido total de plaquetas que fue marcado con CD61 utilizando el ensayo de citometría de flujo. La figura 8 muestra que plaquetas incubadas en medio de cultivo DMEM F12 sin suero durante 30 min no produce una significativa activación plaquetaria. Por otra parte, se obtuvo que la presencia de Metformina 20 μ M durante 30 min a 37 °C no aumenta la activación plaquetaria comparado con la condición control (ver figura 9). Estos resultados indican que Metformina no afecta directamente la activación plaquetaria y sugiere la posibilidad de que su acción antiangiogénica sea directamente sobre células endoteliales y células de cáncer de ovario.

A)



B)

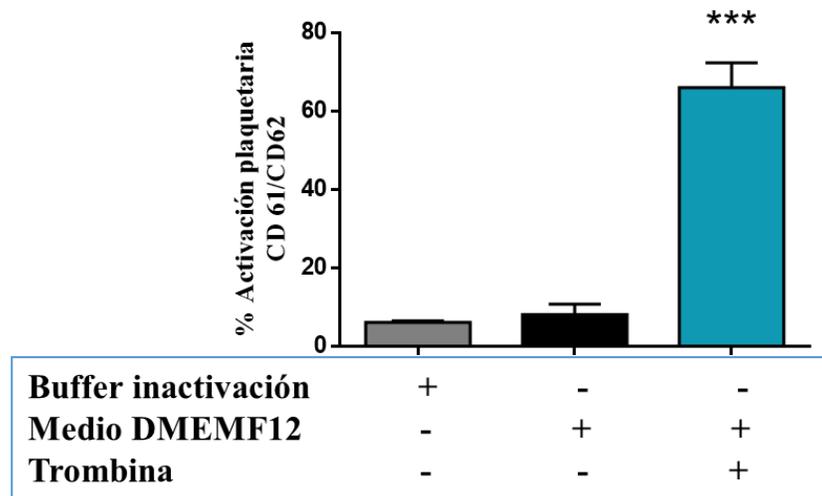
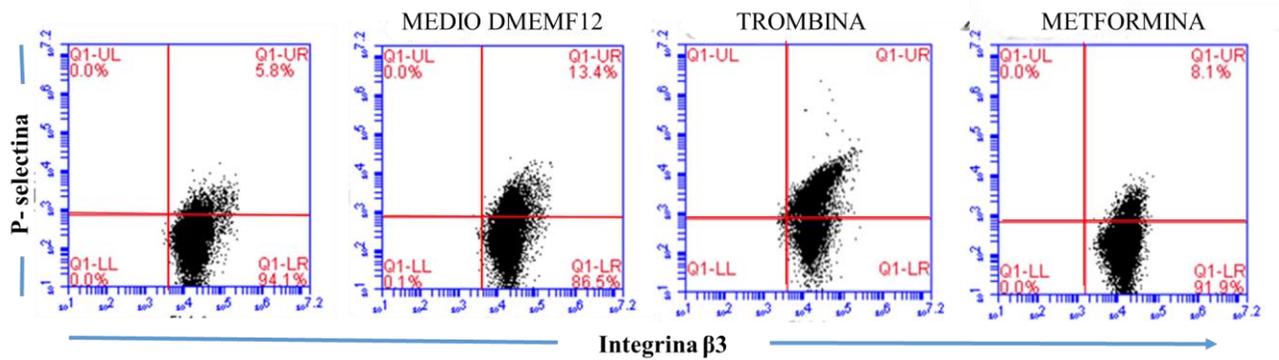


Figura 8.- Medio DMEMF12 sin suero no incrementa la activación plaquetaria. A) Plaquetas fueron incubadas con CAF durante 30 min a 37° (buffer de inactivación; control negativo), DMEMF12 (sin suero) o Trombina (control positivo; 1U/ml). La población total se determinó usando Integrina β 3 (CD61), mientras que para la población de plaquetas activadas se utilizó p-selectina (CD62). A) Diagrama de puntos de citometría de flujo de plaquetas CD61 + que expresan CD62 (P- selectina) en su superficie. B) Gráfico de análisis de diagrama de puntos de citometría de flujo; Test T * $p < 0,05$ relativo al control; $n = 3$.

A)



B)

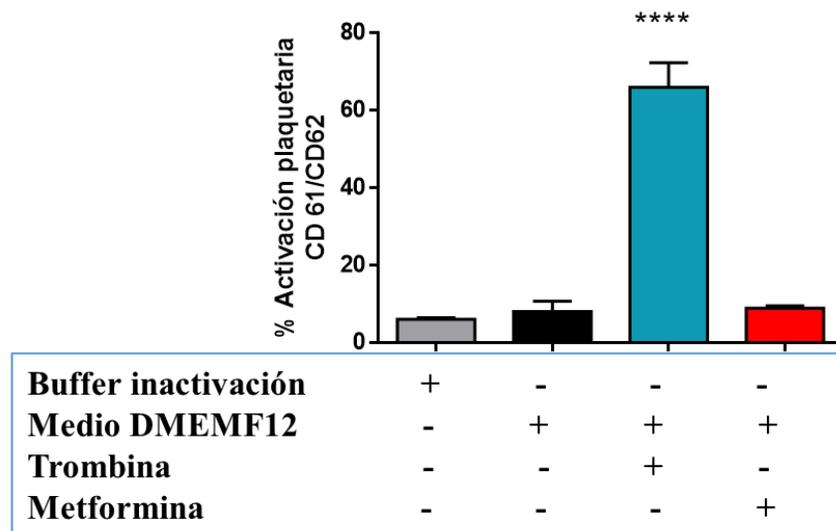
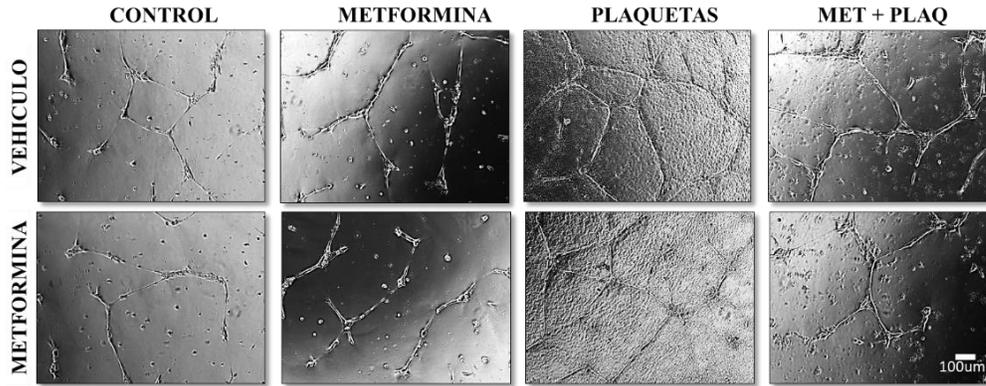


Figura 9.- Metformina (20 μ M) no afecta la activación plaquetaria. A) Plaquetas fueron incubadas con CAF durante 30 min a 37 $^{\circ}$ (buffer de inactivación; control negativo), DMEMF12 (sin suero) Trombina (control positivo; 1U/ml) o Metformina 20 μ M. La población total se determinó con Integrina β 3 (CD61), mientras que para la población de plaquetas activadas se utilizó p-selectina (CD62). A) Diagrama de puntos de citometría de flujo de plaquetas CD61 + que expresan CD62 (P-selectina) en su superficie. B) Gráfico de análisis de diagrama de puntos de citometría de flujo; Test T **** p < 0,001 relativo al control (medio); n = 3.

7.5 Células endoteliales pretratadas con Metformina no reduce la angiogénesis incrementada por plaquetas

Debido a que no se encontró que Metformina afectara la activación plaquetaria, se sugirió una posible acción directa del fármaco sobre las células endoteliales. Para ello, se evaluó si un pretratamiento de las células endoteliales con Metformina podría reducir la angiogénesis incrementada por las plaquetas. Previo a ello se determinó a qué tiempo las células endoteliales comienzan la formación de estructuras tipo capilar en presencia y ausencia de plaquetas. Como se observa en la figura complementaria 1, las células endoteliales en ausencia de plaquetas comienzan a mostrar un cambio en su fenotipo a las 4 horas, sin embargo, en presencia de plaquetas este cambio se comienza a observar a partir de las 2 horas. Con estos antecedentes se estableció que 2 horas de pretratamiento con Metformina es adecuado para evaluar si el fármaco previene el incremento de la angiogénesis promovida por las plaquetas. Previo a la incubación de plaquetas la Metformina presente en el pretratamiento fue eliminada, realizando 2 lavados con medio de cultivo. En la figura 10 se observa que un pretratamiento a las células endoteliales no previene la angiogénesis promovida por las plaquetas comparado con la condición control (comparar ambas barras azules; figura 10). Estos resultados sugieren que para que el fármaco ejerza su efecto antiangiogénico, este debe estar presente durante todo el tiempo que las plaquetas se encuentren incubadas con las células endoteliales.

A)



B)

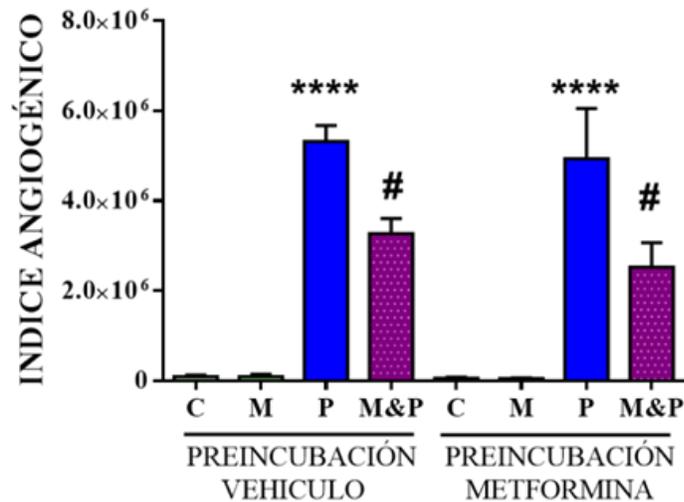


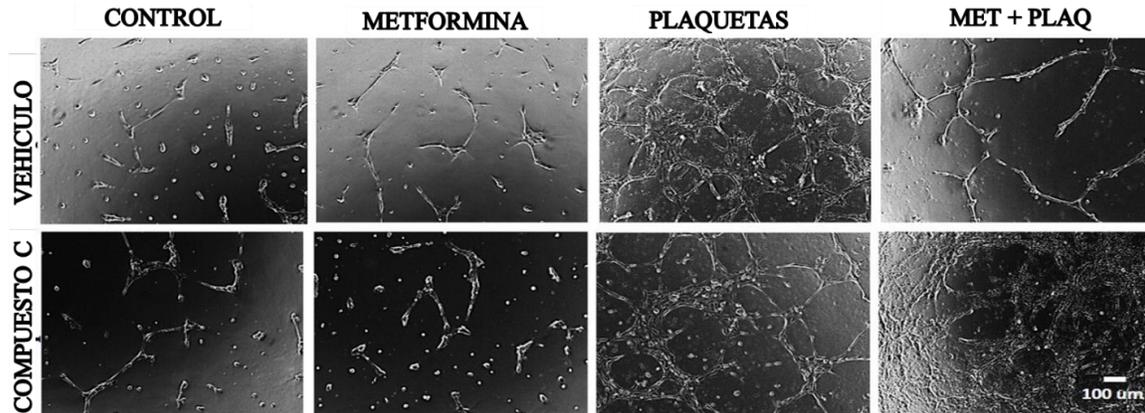
Figura 10.- Pretratamiento de células endoteliales con Metformina (20uM) durante 2 horas no reduce la angiogénesis incrementada por las plaquetas. A) Panel de fotografías del ensayo de angiogénesis. B) Cuantificación de angiogénesis de células endoteliales pretratadas con vehículo o Metformina durante 2 horas. Células endoteliales HUVEC (30.000cel/pocillo) fueron sembradas sobre matrigel en presencia y ausencia de un pretratamiento de 2hrs con Metformina (20uM). Las condiciones incluyeron control Medio DMEMF12 sin suero (vehículo; agua), Metformina (20uM), plaquetas (150.000pl/ μ L) y la combinación Metformina Plaquetas. Fotos fueron tomadas a las 12horas de incubación. n=4. * p <0,05 Plaquetas v/s control; # p <0,05 Plaquetas (pretratamiento metformina) v/s Control (pretratamiento metformina).

7.6 Metformina no requeriría la activación de AMPK para ejercer su efecto antiangiogénico

Metformina es un fármaco que lleva varios años prescribiéndose para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo II, sin embargo, aún se mantiene en estudio su mecanismo de acción. Se sabe que Metformina es capaz de activar la proteína quinasa activada por adenina monofosfato (AMPK; sigla en inglés). El fármaco causa una inhibición del complejo I mitocondrial, aumentando los niveles de AMP, el cual favorece la fosforilación de la subunidad catalítica $\alpha 1$ de la proteína quinasa (Yi Q. y cols., 2016). Dado estos antecedentes se evaluó si Metformina requiere la activación de AMPK para ejercer su efecto antiangiogénico. Para ello se utilizó Compuesto C (Dorsomorphin), un conocido y ampliamente utilizado inhibidor de la fosforilación de la subunidad catalítica $\alpha 1$ de la proteína AMPK (Bamberger E. S. Perrett C. W., 2002; Cheng R. y Ma J. 2015). Se evaluó el índice angiogénico de células endoteliales incubadas con plaquetas en presencia o ausencia de Metformina y del principal inhibidor de su blanco molecular Compuesto C, esto luego de 12 horas. La figura 11, muestra que la presencia de compuesto C no afectó el incremento en la angiogénesis de células endoteliales promovido por plaquetas, comparado con la condición control (vehículo de Compuesto C). Esto indica que las plaquetas no requieren de la activación de AMPK para ejercer su rol proangiogénico. Por otra parte, se observó que la presencia de Compuesto C eliminó la inhibición ejercida por Metformina de la angiogénesis incrementada por plaquetas. Estos resultados sugieren que Metformina requiere la activación de AMPK en las células endoteliales para inhibir la angiogénesis promovida por las plaquetas. Curiosamente, reportes han proporcionado evidencia

que Metformina ejerce efectos que son independientes de la activación de AMPK. Debido a ello, se determinó si Metformina 20 μ M era capaz de generar un incremento de la fosforilación de AMPK. Se obtuvo lisado de proteínas de células endoteliales tratadas con Metformina y se determinó los niveles de fosforilación de la subunidad catalítica α 1 de AMPK. Las células endoteliales (línea celular y cultivo primario) se incubaron con Metformina 20 μ M y 20mM en una curva temporal (15min, 30min, 1hrs, 2 horas y 4 horas). La concentración 20 mM de Metformina se utilizó como control positivo de la activación de AMPK, dado la evidencia obtenida en previas publicaciones utilizando el fármaco. En la Figura 12 no se observan cambios significativos en los niveles de fosforilación de AMPK a ninguna de las 2 concentraciones de Metformina y en ninguno de los tiempos evaluados. Estos resultados indican que Metformina 20 μ M no incrementa la fosforilación de la quinasa AMPK o bien el tiempo de tratamiento utilizado no comprende el tiempo en el cual Metformina podría estar activando esta quinasa. En resumen, los datos obtenidos en este estudio sugieren que Metformina ejerce una acción antiangiogénica sobre la acción proangiogénica de las plaquetas, pero esta no involucraría la activación de la proteína quinasa AMPK.

A)



B)

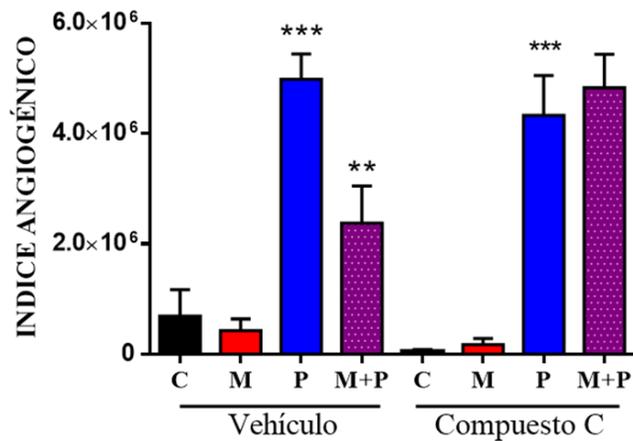
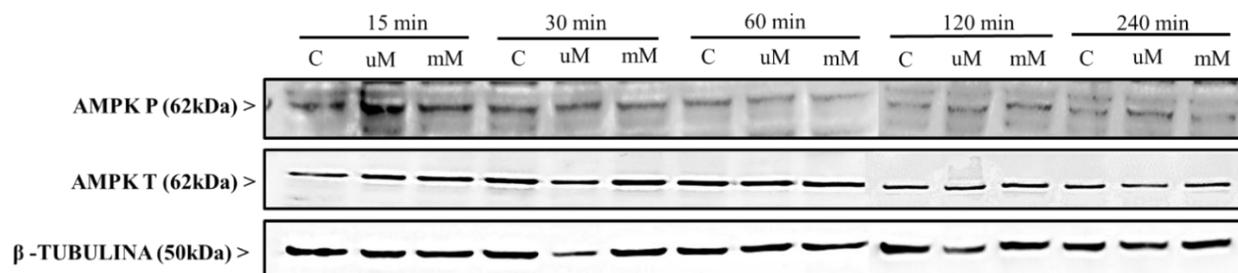


Figura 11.- El inhibidor de AMPK (Compuesto C), revierte el efecto inhibitorio de Metformina sobre la angiogénesis incrementada por plaquetas. Células endoteliales HUVEC (30.000cel/pocillo) fueron sembradas sobre matrigel e incubadas con Medio de cultivo DMEMF12 sin suero (control, vehículo; agua y DMSO;), Metformina (20uM), Plaquetas (150.000pl/ μ L) y la combinación Metformina más Plaquetas durante 12horas en ausencia y presencia de Compuesto C (10uM). A) Panel de fotografías representativas de la coincubación de plaquetas y células endoteliales en presencia y ausencia de Metformina y Compuesto C. B) Gráfico de la cuantificación del índice angiogénico. N=4 * P< 0.05 relativo a Control # P< 0.05 relativo a Plaquetas.

A)



B)

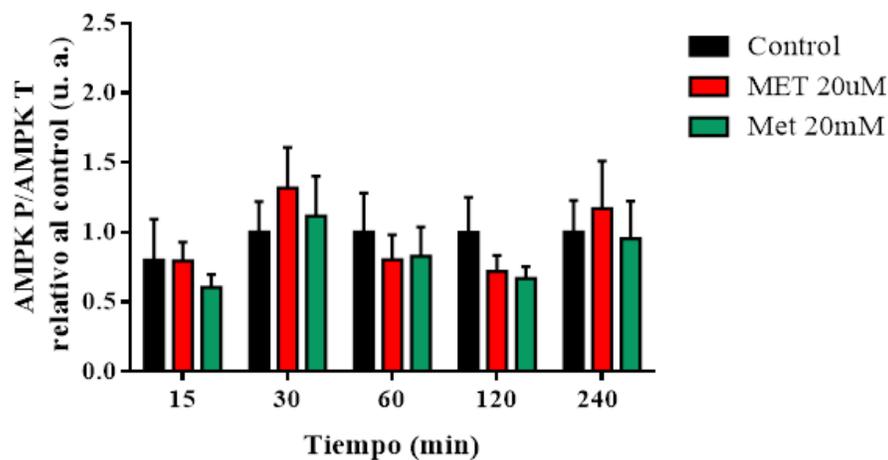
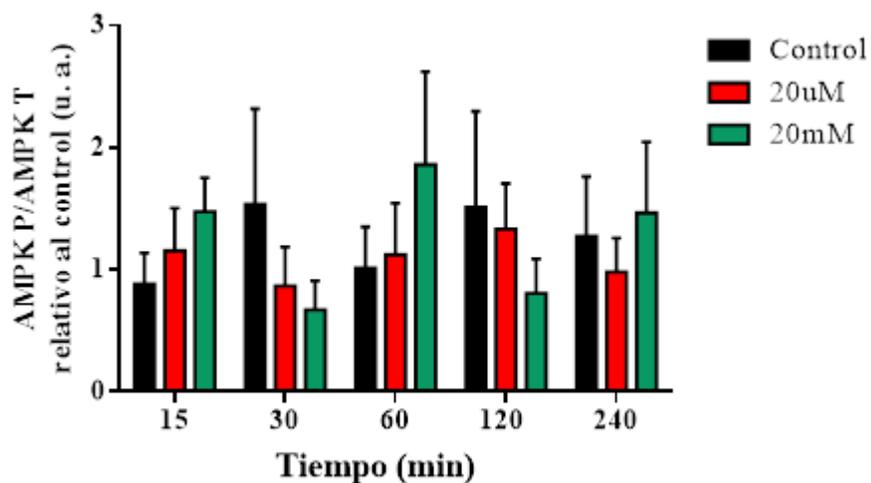
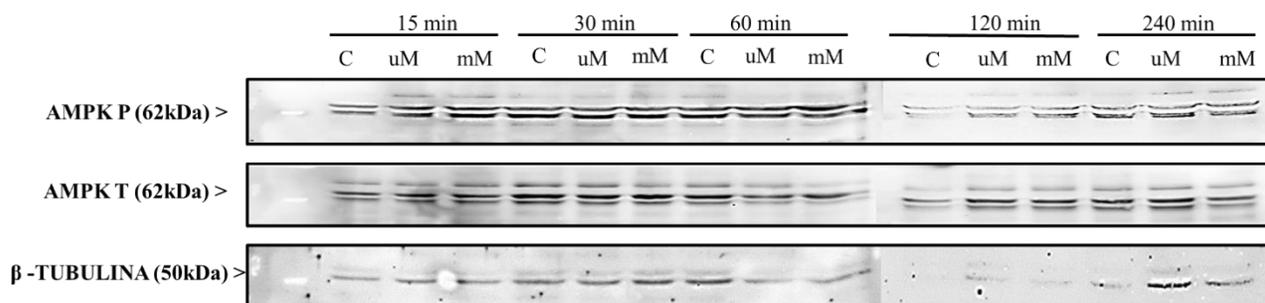


Figura 12: Metformina no cambia los niveles de fosforilación de AMPK en células EaHY926. A) Panel de imágenes de western blot, proteína β Tubulina fue utilizada como control de carga. B) Análisis de western blot. Células endoteliales EaHY926 fueron tratadas con Metformina 20 μ M (color rojo), 20 mM (color verde) o vehículo a 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas y 4 horas. Luego se avaló los niveles de fosforilación de la treonina 172 de la subunidad α de la proteína AMPK. n=5

A)



B)

Figura 13: Metformina no cambia los niveles de fosforilación de AMPK en células endoteliales HUVEC. A) Panel de imágenes de western blot, proteína β Tubulina fue utilizada como control de carga. B) Análisis de western blot. Células endoteliales HUVEC fueron tratadas con Metformina 20 μ M (color rojo), 20 mM (color verde) o vehículo a 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas y 4 horas. Luego se evaluó los niveles de fosforilación de la treonina 172 de la subunidad α de la proteína AMPK. n=6

8. DISCUSIÓN

La desregulación de la angiogénesis es clave en el desarrollo y diseminación del tumor, por lo que inhibir este proceso es una potencial estrategia para varios tipos de neoplasias incluyendo el cáncer de ovario (Gaducci A. y cols. 2015). Es sabido que las plaquetas activadas pueden promover directamente sobre el endotelio el proceso de angiogénesis favoreciendo el suministro de nutrientes y oxígeno al tumor. Recientes investigaciones indican que cerca del 40% de las pacientes con cáncer de ovario presentan un alto contenido plaquetario (Trombocitosis) y esto se ha correlacionado con un mal pronóstico en ellas. Metformina, un fármaco comúnmente indicado para pacientes con diabetes mellitus tipo II ha mostrado tener efectos antineoplásicos y recientemente antiangiogénicos. Sin embargo, el uso de concentraciones supra farmacológicas en estudios *in vitro* ha generado controversia y se desconoce si tales efectos son observables en pacientes a las mismas concentraciones usadas en la clínica (He. L. y Wondisford F. E., 2015; Dowling R. J. y cols., 2016; Christodoulou M. I. Scorilas A., 2017). Existen algunos reportes que han estudiado el efecto de Metformina sobre la función plaquetaria, sin embargo, no se sabe si el fármaco puede generar una inhibición de la angiogénesis promovida por las plaquetas.

El objetivo de este trabajo fue dilucidar si Metformina a concentraciones comúnmente utilizadas en el tratamiento de pacientes diabéticos era capaz de ejercer un efecto antiangiogénico sobre la angiogénesis promovida por las plaquetas. Los resultados de la presente investigación demostraron que Metformina, a concentraciones terapéuticas, fue capaz de reducir la angiogénesis y el potencial angiogénico incrementado por plaquetas.

8.1 Efecto directo de Metformina sobre la angiogénesis promovida por las plaquetas

Metformina se conoce principalmente, por su efecto en la regulación del metabolismo de la glucosa, disminuyendo los niveles de insulina y mejorando su señalización. Recientemente se ha observado que el fármaco también ejerce un efecto anti-inflamatorio en el síndrome de ovario poliquístico y una acción anti-proliferativa sobre células de músculo liso de los vasos sanguíneos (Zhou G. y cols. 2001; Biao H. y cols. 2018) Además, se ha observado que Metformina disminuye la liberación de factores proangiogénicos en el síndrome de ovario poliquístico y disminuye los niveles de VEGF en pacientes diabéticos obesos (Huang SW., y cols. 2013). Esto es consistente con previos estudios que indican que la droga es capaz de reducir los niveles de densidad microvascular en líneas de células de cáncer de ovario y reduce niveles de VEGF en xenograft de células de cáncer de ovario (Rattan R. y cols., 2011; Shank J. J., 2012). Sin embargo, en nuestro modelo de formación de estructuras tipo capilar usando células endoteliales de línea celular o de cultivo primario, sólo a concentraciones mayores a 50 μ M de Metformina

se observó una disminución en la angiogénesis, la cual se asoció a una reducción de la viabilidad celular y no a un efecto antiangiogénico del fármaco.

La relación entre plaquetas y el proceso angiogénico ha sido reportado ampliamente, utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* (kerbel R. y cols 2000; Menter D. y cols. 2014; Van N. y cols. 2014; Li N. y cols. 2014). Resultados obtenidos en el laboratorio utilizando el modelo de formación de estructuras tipo capilar, confirmó que las plaquetas favorecen el incremento de la angiogénesis y se determinó por primera vez que Metformina a concentraciones terapéuticas previene este incremento, tanto en células endoteliales de línea celular como cultivo primario (HUVEC). Esta disminución en la angiogénesis en presencia de plaquetas no estuvo asociada a un efecto citotóxico del fármaco, debido a que no se observó una disminución en la viabilidad celular.

Se ha reportado que, luego de la activación, las plaquetas son capaces de liberar factores anti y pro angiogénicos, dependiendo del estímulo que cause la activación. Por ejemplo, cuando las plaquetas son estimuladas con ADP ellas liberan VEGF, un conocido factor proangiogénico, pero no libera endostatina. Por otra parte, cuando la activación plaquetaria es estimulada por Tromboxano A₂, las plaquetas son capaces de liberar endostatina en ausencia de VEGF, mediando la señalización anti angiogénica en células endoteliales HUVEC. Estos antecedentes plantean la posibilidad de que Metformina actúe directamente sobre las plaquetas, modulando la liberación de estos factores o bien inhibiendo la activación plaquetaria. Recientemente, un clínico, utilizando plaquetas provenientes de pacientes diabéticos y otro estudio *in vitro*,

utilizando plaquetas provenientes de ratas, indicaron que altas concentraciones de Metformina pueden reducir la activación plaquetaria a través de la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (Protti A. y cols., 2012; Xin G. y cols., 2016). Es sabido que pacientes diabéticos presentan un incrementado estrés oxidativo y esto conduce a peroxidación de lípidos, activación y agregación plaquetaria, explicando el aumento en los eventos trombóticos en estos pacientes (Kim J. y cols., 2013). Sin embargo en el presente estudio no se observó que, Metformina a concentraciones terapéuticas, afectara la activación plaquetaria comparado con estudios realizados con altas concentraciones del fármaco, por lo que se descarta, la posibilidad que Metformina afecte la activación plaquetaria explicando el efecto antiangiogénico observado en los ensayos de formación de estructuras tipo capilar con células endoteliales.

Otra posibilidad es que Metformina inhiba o modifique señales al interior de las células endoteliales que cambien su respuesta a la presencia de plaquetas, previniendo el incremento de la angiogénesis. Estudios clínicos han demostrado que pacientes diabéticos tratados con Metformina tienen menor probabilidad de desarrollar complicaciones vasculares, independiente del control glicémico. Incluso, se ha observado que Metformina tiene varias acciones vasculares como mejorar la disfunción endotelial, efectos antioxidantes, inhibición del complejo I mitocondrial, las cuales no están limitadas solo a pacientes diabéticos (Kannarkatt J. y cols. 2016; Triggle C. R. y Ding H., 2017). Recientemente, estudios *in vitro*, muestran que el pretratamiento de células endoteliales con Metformina a concentraciones clínicas durante 24 horas revierte disfunción endotelial mediada por OxLDL (Hung C. H. y cols., 2016) y que el pretratamiento con Metformina 5mM durante 12 horas disminuye la expresión de NF- κ B, un

importante mediador de la angiogénesis, en células endoteliales (Han J. y cols., 2018). Dado estos antecedentes, se estudió el pretratamiento de células endoteliales con Metformina 20 μM durante 2 horas, sin embargo, no previno el incremento en la angiogénesis promovida por las plaquetas. Es posible que la diferencia en los resultados obtenidos respecto a los previamente reportados se deba a que Metformina al ser retirada del medio pierda su efecto, sugiriendo que el fármaco se requiera presente todo el tiempo con la coincubación de las células endoteliales y las plaquetas para ejercer su efecto antiangiogénico

8.2 Efecto de Metformina sobre el potencial angiogénico de células de cáncer de ovario incrementado por plaquetas

Es sabido que la interacción entre células de cáncer y plaquetas puede conferir numerosas ventajas en el desarrollo y diseminación del cáncer. Por ejemplo, las células de cáncer inducen la activación plaquetaria lo que favorece la liberación de factores proangiogénicos, proliferativos y antiapoptóticos. Respecto a esta interacción, un estudio demostró que la interacción es bidireccional, ya que la presencia de plaquetas induce la señalización proangiogénica en células de cáncer de ovario (Egan K. y cols 2011). Sin embargo, la interacción entre células de cáncer de ovario y plaquetas aún sigue siendo estudiada. El uso de medio condicionado es comúnmente utilizado para determinar cómo las células de cáncer pueden responder a diferentes estímulos presentes en su microambiente. El medio condicionado de células de cáncer de ovario coincubadas con plaquetas en nuestro estudio, mostró un

incremento en la angiogénesis (denominado potencial angiogénico), sugiriendo la presencia de factores proangiogénicos que incrementan la formación de estructuras tipo capilar por parte de las células endoteliales, cuando estas fueron incubadas con este medio. Los factores proangiogénicos presentes en el medio condicionado proceden de las células de cáncer de ovario y no de las plaquetas. Esto fue confirmado luego de incubar células endoteliales con medio condicionado proveniente de la incubación de plaquetas en ausencia de células de cáncer de ovario durante 24 horas y no se observó un incremento en la angiogénesis. Es posible que las plaquetas al coincubarse con células de cáncer promuevan la liberación de factores proangiogénicos desde las células de cáncer de ovario. Estos resultados se condicen con un reporte que demostró, a través de un análisis de un array de expresión, que células de cáncer de ovario incrementan la expresión de factores proangiogénicos (ej: PDGFb) cuando son coincubadas con plaquetas (Egan K. y cols 2011). Por otra parte, otro estudio indica que la vida media de factores liberados desde plaquetas no supera las 24 horas y en algunos casos como TGF- β no supera los 90 min, apoyando la idea de que el incremento de la angiogénesis debido a factores, presentes en medio condicionado de la coincubación de plaquetas y células de cáncer de ovario, provengan de estas últimas y no de las plaquetas (Rattan R. y cols., 2011). La presencia de Metformina previno el incremento de este potencial angiogénico en células de 2 líneas de cáncer de ovario (SKOV3 y UCI101) y también en 3 de 4 muestras de cultivo primario de ascitis de pacientes con cáncer de ovario avanzado, sugiriendo que el efecto de Metformina no está limitado al uso de una determinada línea celular y que puede ser un potencial tratamiento antiangiogénico en estas pacientes. También se observó que Metformina no pudo prevenir el

aumento en el potencial angiogénico de una de las muestras de ascitis de células de cáncer de ovario generado por plaquetas. Este efecto es esperable, debido a que se ha observado que pacientes que presentan el mismo tipo de cáncer no responden de igual manera a un mismo tratamiento, apoyando la idea de que cada cáncer es único. Por otra parte, estos resultados confirman que la interacción entre célula de cáncer y plaqueta promueve el desarrollo de un ambiente más proangiogénico, ya sea por un incremento de factores proangiogénico o por una disminución de factores antiangiogénicos, interacción que en la comunidad científica ya se conocía, pero que en este estudio se pudo prevenir con el uso de concentraciones terapéuticas de Metformina.

8.3 La acción antiangiogénica de Metformina no involucra la activación de AMPK

El mecanismo de señalización que se conoce de Metformina involucra la inhibición del complejo I mitocondrial que causa indirectamente la activación de la proteína quinasa AMPK, específicamente en la subunidad catalítica $\alpha 1$ (residuo Thr172) (Evans J. M. y cols., 2005; Kumar S. y cols. 2013). Ha sido reportado que la mayoría de los efectos de Metformina son mediados a través de la activación de la proteína quinasa AMPK. Por ejemplo, un estudio utilizando células endoteliales con siRNA $\alpha 1$ y tratadas con Metformina, no previno el incremento en la angiogénesis, sugiriendo que la activación de la quinasa AMPK es clave para que el fármaco ejerza su efecto antiangiogénico (Dallaglio K y cols. 2014). Compuesto C es un

agente comúnmente utilizado para inhibir la activación de AMPK y caracterizar el rol de esta proteína en varios procesos fisiológicos (Peyton K. J. y cols., 2011). Compuesto C en el presente estudio fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de Metformina sobre la angiogénesis promovida por plaquetas. Curiosamente en ausencia de Metformina, Compuesto C no afectó el rol proangiogénico de las plaquetas, esto sugiere que AMPK no es requerido por éstas para incrementar la angiogénesis. Sin embargo el uso de Compuesto C es controversial, debido a que se ha observado en un reporte que su uso puede inhibir angiogénesis al igual que Metformina en células endoteliales tratadas fluvastatina (promovedor de la angiogénesis) (Gündüz D. y cols., 2015). Dado estos antecedentes, se plantean dos posibilidades, la primera es que Compuesto C ejerza otros efectos, independientes de la inhibición de la activación de la proteína AMPK y, que curiosamente, no alteran la capacidad proangiogénica de las plaquetas. Recientemente, se ha reportado que Compuesto C, a través de la vía Akt/mTOR, puede inducir la autofagia en células de cáncer, independiente del bloqueo de la señalización de AMPK. Los autores utilizaron un siRNA contra las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ para disminuir la expresión de AMPK e imitar el efecto de Compuesto C, sin embargo, no observaron inhibición de la vía Akt (Kim Y. y cols., 2011). Otro estudio realizado en células de musculo liso tratadas con Compuesto C mostró que el agente fue capaz de reducir la proliferación y migración de estas células, independiente de la inhibición de AMPK, ya que el silenciamiento de AMPK, no imita la acción inhibitoria de Compuesto C sobre el crecimiento y la migración de estas células. (Peyton K. J. y cols., 2011). Estos antecedentes, sugieren el uso de otro agente más selectivo en la inhibición de AMPK, sin embargo, la evidencia proporcionada por este estudio, indica que la acción antiangiogénica de

Metformina no involucra la activación de AMPK, por lo que se rechaza la hipótesis propuesta en un comienzo.

Existe una segunda posibilidad que explicaría como Metformina ejerce su efecto antiangiogénico independiente de la vía AMPK. Evidencia indica que para observar niveles de fosforilación de AMPK (Thr172) en células HCT116 (células de cáncer colon rectal) similares a las observadas en tumores *in vivo*, se requieren concentraciones del rango de 10-20mM, siendo 300 veces más altas que los niveles de Metformina encontrados en el plasma de los ratones tratados con la droga. Estos resultados sugieren que Metformina podría estar ejerciendo efectos antitumorales (ej. Antiangiogénicos) sin necesariamente aumentar la actividad de AMPK (Dowling R. J. y cols., 2016). Evidencia proporcionada por Foretz y cols. demuestra que concentraciones agudas de Metformina inhibe la producción de glucosa hepática en ausencia de AMPK. Recientemente se han publicado otros estudios que sugieren que Metformina puede ejercer efectos independientes de la activación de la proteína AMPK. Un estudio realizado en células endoteliales reportó que el tratamiento con Metformina 20 μ M durante 1 hora, previene la fosforilación de Akt y PKC. Es sabido que Akt es un mediador de la activación de mTOR (promovedor de la angiogénesis), esto apoya la posibilidad que el mecanismo utilizado por Metformina para inhibir la angiogénesis involucre la inhibición de mTOR independiente de la activación de AMPK (Kannarkatt J. y cols. 2016). Otro estudio utilizando fibroblasto de embrión de ratón determino que el tratamiento con Metformina puede inhibir la acción de mTOR por una vía independiente de la activación de AMPK, pero dependiente de Rag GTPasa (Kalender A. y cols 2010). Resultados similares encontró otro estudio, en el cual el tratamiento

con Metformina a células de fibroblasto incremento los niveles de REDD1 (DDIT4 en humanos; proteína inducible por daño del ADN), un conocido regulador negativo de mTOR, reduciendo la proliferación de estas células (Ben Sahra I. y cols 2011). Estos antecedentes plantean la posibilidad que la activación de la vía mTOR en células endoteliales promovida por una posible señalización de VEGF liberado desde plaquetas activadas, produjeran un incremento de la angiogénesis. Sin embargo, en presencia de Metformina esto se previniera por la acción de PTEN una fosfatasa que mantiene inhibido a mTOR reduciéndose la angiogénesis en el presente estudio. Recientemente, se han publicado reportes que indican que Metformina reduce la respuesta inflamatoria a través de una inhibición de NF- κ B (Isoda K. y cols 2006; Tan B. y cols. 2009), ofreciendo otra posible acción que reduce la angiogénesis en el presente estudio. Uno de los reportes determinó que las pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico luego de ser tratadas con Metformina durante 6 meses disminuyen la angiogénesis mediada por la señalización NF- κ B/Erk1/2/Erk5 comparado con las pacientes previo al tratamiento. Esta acción involucra un incremento en los niveles circulantes de Trombospondina 1 (factor antiangiogénico, liberado principalmente desde plaquetas), debido a que el uso de un anticuerpo contra Trombospondina 1 revierte el efecto de Metformina (Tan B. y cols. 2009). Otro estudio utilizando células de musculo liso vascular determino que el tratamiento con Metformina 1 mM durante una hora, inhibe la señalización de NF- κ B y reduce la fosforilación de Akt (Isoda K. y cols 2006). Es ampliamente conocido que la inhibición de la vía NF- κ B/ Akt en las células endoteliales disminuye la angiogénesis promovida por proceso inflamatorio, sin embargo, se desconoce si esta acción requiere la activación AMPK por lo que no se descarta que la acción

antiangiogénica de Metformina observada en el presente estudio pueda involucrar la inhibición de una de estas vías (Tan B. y cols 2009; Hirsch H. A. y cols 2012; Zhao Z. y cols 2014). Esto debido a que se conoce que plaquetas puede promover tanto la proliferación celular a través de la liberación de factores de crecimiento (ej: PDGF) presentes en sus gránulos de secreción, como también puede promover el proceso inflamatorio a través de la liberación de citoquinas (ej: IL-6), activando estas vías. Futuros experimentos se requieren para establecer el completo mecanismo de acción del fármaco en nuestro modelo de estudio.

9. LIMITACIONES EN LOS ESTUDIOS PRECLÍNICOS UTILIZANDO METFORMINA

El efecto anticáncer de Metformina que se ha observado recientemente ha mostrado estar determinado por la concentración y el tiempo de tratamiento. Los efectos anticáncer que posee Metformina se han asociado con una acción dependiente (indirecta) e independiente (directa) de la regulación de la insulina. Esta dualidad de acción de Metformina ha incrementado la complejidad de su evaluación clínica, incluyendo la interpretación de las observaciones preclínicas. Los mecanismos de acción que han propuesto estos estudios incluyen una amplia variedad de blancos terapéuticos que incluso varían dependiendo del tipo de cáncer, dificultando la determinación de su mecanismo de acción. Por otra parte, muchos de los estudios preclínicos utilizan concentraciones muy elevadas de Metformina en relación a la concentración que alcanza en los pacientes. Se ha observado un rango de concentraciones de Metformina que va desde 1 a 40 mM (165-6600mg/l), la cual está por sobre los niveles plasmáticos observados en humanos (0,465-2,5mg/l) (Dowling R., y cols 2012), generando debate si los resultados obtenidos con ellas puedan ser observadas en la clínica. Otra dificultad para establecer un mecanismo de acción de Metformina es que en los estudios in vitro se utilizan diferentes protocolos para la mantención de los cultivos los cuales, someten a las células a constantes concentraciones suprafisiológicas de numerosos factores de crecimiento, hormonas y glucosa, lo que puede alterar la recaptación de Metformina por la célula y su potencial respuesta a la droga. Además, existen reportes que indican que Metformina puede acumularse dentro de las mitocondrias de hepatocitos, lo que dificulta establecer la concentración mínima a la cual el fármaco puede generar el efecto deseado, por lo que su uso y sus efectos siguen en estudio (Qu

C. y cols., 2014; Dowling R. J. y cols., 2016). Dado estos antecedentes, es posible que en nuestro estudio el tratamiento de células endoteliales HUVEC con 20 μ M de Metformina, resulte en una concentración intracelular mayor, (que no fue determinada en este estudio), la cual fue suficiente para prevenir la angiogénesis y el potencial angiogénico de células de cáncer de ovario promovida por plaquetas, pero insuficiente para observar un incremento en la fosforilación de AMPK en estas células. Aunque existe vasta evidencia que Metformina tiene un efecto anticáncer, el mecanismo molecular involucrado aún se sigue estudiando. Futuras investigaciones requieren incluir estos factores en sus modelos de estudio, utilizando rangos de concentraciones de Metformina que sean clínicamente relevantes para establecer el mecanismo anticáncer de este fármaco. El presente estudio propone la acción antiangiogénica de Metformina como una de las posibles acciones anticáncer del fármaco. Esto puede ayudar a entender los efectos clínicos beneficiosos mostrados por el fármaco en pacientes con cáncer de ovario y apoya su inclusión en ensayos clínicos para su uso en la terapia convencional de esta patología

10. CAMBIOS METODOLÓGICOS DEL ESTUDIO

Luego de finalizar el presente estudio, se analizó la metodología utilizada y se observó que es posible sugerir algunos cambios para asegurar la obtención de resultados claros y robustos con el modelo utilizado. Primero, dado que el presente estudio se enfoca en el proceso de angiogénesis que ocurre en el cáncer de ovario, por ende ocurre sólo en mujeres y que, se sabe que las células endoteliales (HUVEC) presentan diferencias significativas en varias respuestas dependiendo del género de procedencia, se debiese ocupar células endoteliales provenientes de cordón umbilical femenino (Addis R. y cols 2014). Esto principalmente porque, la regulación hormonal puede modificar la función de las células endoteliales y esta cambia dependiendo de la procedencia de estas células (femenino-masculino). Existen estudios que apoyan esto, por ejemplo un estudio demostró que el estrógeno en condiciones patológicas como cáncer de mama, incrementa la angiogénesis a través del receptor de estrógeno presente en las células endoteliales (Losordo D. y Isner M. 2000). Esto sugiere que células endoteliales provenientes de cordón umbilical femenino pueden ser más sensibles a señales angiogénicas comparado con las células provenientes de masculino. Es posible que en nuestro modelo de estudio la señalización angiogénica de las plaquetas incrementen significativamente la angiogénesis de células endoteliales provenientes de cordón umbilical femenino comparado con las provenientes de cordón umbilical masculino. El uso de ambas células provenientes de cordón umbilical femenino y masculino en el presente estudio, puede explicar la elevada desviación de los resultados obtenidos dificultando su análisis y enmascarando el real efecto.

El segundo cambio sugerido es la utilización de plaquetas provenientes sólo de pacientes con cáncer de ovario avanzado. En el presente estudio, por motivos de disponibilidad de muestra, se utilizaron plaquetas provenientes de voluntarios sanos, y estos fueron tanto hombres como mujeres. Es sabido que existe un ambiente hipercoagulable en pacientes con cáncer de ovario, esto principalmente porque las células de cáncer promueven la activación plaquetaria y porque, a su vez, las plaquetas están más sensibles a activarse comparado con plaquetas provenientes de voluntarios sanos (Amirkhosravi A. y cols 2006). Es posible que las plaquetas provenientes de pacientes con cáncer de ovario, al ser hiperreactivas, liberen factores que incrementan la angiogénesis comparado con plaquetas provenientes de voluntarios sanos. En el presente estudio no se evaluó si Metformina era capaz de inhibir la angiogénesis promovida por estas plaquetas, futuros experimentos son necesarios para determinar si Metformina puede inhibir la angiogénesis promovida por estas plaquetas.

Uno de los resultados controversiales de este estudio fue obtenido con el uso de Compuesto C en nuestros experimentos. Esto porque se ha observado que este agente puede generar efectos independientes al bloqueo de la activación AMPK y reducir la actividad de otras quinasas utilizando la misma concentración requerida para inhibir AMPK. Para evitar esta ambigüedad en los resultados obtenidos, recientemente se ha identificado que SBI- 0206965, un derivado de pirimidina que actúa como un directo inhibidor de AMPK. Este agente presenta 40 veces mayor potencia y una mejor selectividad comparado con Compuesto C (Dite T., y cols. 2018). El uso de este agente podría determinar si AMPK está realmente involucrada en la acción antiangiogénica de Metformina en el presente estudio. Respecto a la participación de AMPK en

el efecto de Metformina en el presente estudio, no se evaluó si las plaquetas pueden modificar los niveles de fosforilación de la quinasa, sería interesante evaluar si plaquetas puede promover este efecto y si la presencia del fármaco puede prevenirla en células endoteliales, ya que se podrían proponer nuevos blancos moleculares para evitar esta acción.

En el presente estudio se evaluó el efecto de Metformina sobre la activación de las plaquetas, una vez son retiradas del buffer que contiene su principal inhibidor PGI₂, sin embargo, sería interesante evaluar si Metformina previene la activación plaquetaria generada por Trombina u otro agonista, de esta manera podría sugerirse como tratamiento para la trombosis en pacientes con cáncer.

La aplicación de estos cambios, en el presente estudio permitirá clarificar el mecanismo de acción de Metformina y los mediadores que están involucrados en la inhibición de la angiogénesis promovida por las plaquetas.

11. CONCLUSIÓN

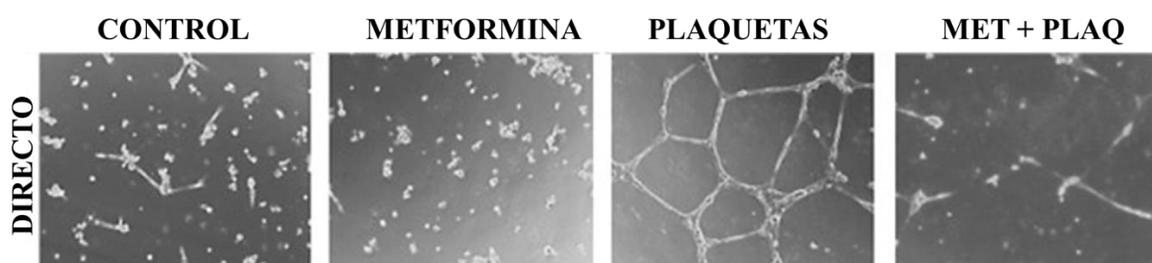
En el presente estudio se obtuvo que Metformina ejerce un efecto antiangiogénico sobre células endoteliales (directo) y células de cáncer de ovario (indirecto) coincubadas con plaquetas. Metformina requiere estar presente todo el tiempo durante la incubación de células endoteliales y plaquetas para ejercer su efecto antiangiogénico, ya que un pretratamiento con Metformina a las células endoteliales o las plaquetas no afecta la angiogénesis promovida por plaquetas. La adición de Compuesto C (un conocido inhibidor de AMPK, aunque con otras acciones reportadas) no afecta la acción proangiogénica de las plaquetas sobre células endoteliales, indicando que la acción de AMPK no es requerida para la activación plaquetaria o promoción de la angiogénesis. A pesar que la presencia de Compuesto C revirtió la acción de Metformina, no observamos activación de AMPK en células endoteliales y por ende, futuros experimentos permitirán identificar estas vías de transducción internas usadas por Metformina para eliminar la respuesta a plaquetas. La obtención del mecanismo de acción Metformina en cáncer requiere establecer una serie de parámetros entre ellos la concentración del fármaco. El uso de una concentración adecuada y dentro del rango permitido en pacientes podrá mostrar que efectos observables en estudios *in vitro* son posible de observar en la clínica.

12. PROYECCIONES CLÍNICAS

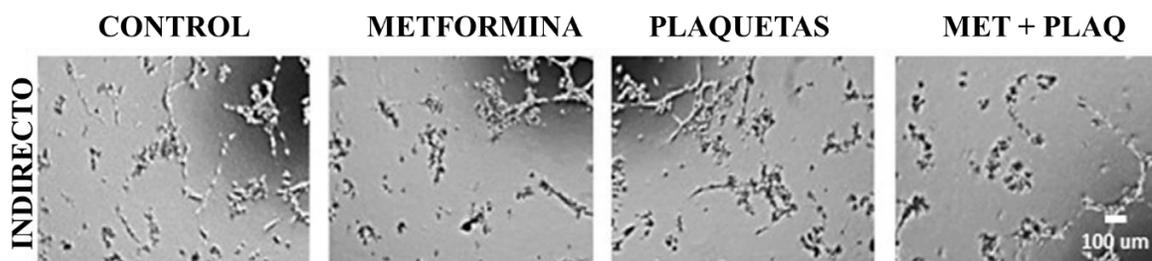
Los resultados presentados en esta tesis muestran la preventiva acción de Metformina sobre la acción plaquetaria que favorece la progresión del cáncer. Esto permite comprender los efectos clínicos beneficiosos mostrados por la droga en pacientes con cáncer de ovario. Esta acción antiplaquetaria puede no estar solo limitada a cáncer, ya que su uso ha demostrado reducir la masa promedio y volumen plaquetario en pacientes con riesgo de enfermedades aterosclerótica (Dolasik I., 2013). Dado lo anterior, junto con los efectos positivos sobre adhesión vascular, niveles de colesterol y marcadores inflamatorios, Metformina puede tener una participación en la reducción del desarrollo de aterosclerosis. Este estudio, por otra parte, apoya la idea de separar en dos disciplinas la investigación sobre Metformina en cáncer. La primera, es el uso de concentraciones $<50\mu\text{M}$ que podrían ayudar a determinar cómo Metformina disminuye la incidencia de cáncer y mejora los resultados en pacientes que toman el fármaco. La segunda, corresponde al uso de altas (milimolares) concentraciones que permitirá evaluar si Metformina por si sola o en conjunto con regímenes terapéuticos contra el cáncer, pudiese ser beneficiosa para la salud del paciente. El presente trabajo, demuestra que Metformina posee acciones que, más allá de respaldar los ensayos clínicos en curso, evalúan la inclusión de Metformina a la terapia convencional contra el cáncer.

13. APÉNDICE

A)

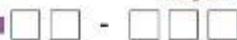


B)



Apéndice A: Plaquetas incubadas a 37° C por 24 horas son capaces de incrementar la formación de estructuras tubulares en matrigel. A) Directo: células endoteliales (HUVEC) fueron sembradas sobre matrigel e incubada en presencia de medio de cultivo (control), Metformina (20μM) plaquetas (150.000/μL) o Metformina + plaquetas. B) Indirecto: Células HUEVC fueron sembradas sobre matrigel e incubadas en presencia de Medio Condicionado (MC) de plaquetas con medio cultivo (control), Metformina (20μM), plaquetas, o Metformina + plaquetas.

**DOCUMENTO DE
CONSENTIMIENTO INFORMADO**



“CONSENTIMIENTO GENÉRICO PARA ENTREGA DE MUESTRAS DE CÁNCER DE OVARIO Y SANGRE PARA INVESTIGACIÓN MÉDICA”

Investigadores

Responsables:

Dr. Gareth Owen, gowen@bio.puc.cl, fono: 223542874
 Dr. Mauricio Cuello, macuello@med.puc.cl, fono: 223543034
 Dra. Maria Loreto Bravo, mlbravo@uc.cl, fono: 223542874
 Dra. Lorena Abarzúa, labarzuua@uc.cl, fono: 223543409
 Dra. Rafaela Erices, rafaela.erices@gmail.com, fono:223541935
 Dra. Mónica Márquez, mamarque@uc.cl, fono 223541935

Depto./UDA:

Departamento de Fisiología, Unidad de Reproducción y Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile,
 Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar en una investigación médica donando parte de tejidos biológicos sobrante de sus intervenciones médicas.

Tome el tiempo que requiera para decidirse, lea cuidadosamente este documento y hágale las preguntas que desee al médico o al personal de los estudios.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Nosotros estamos interesados en conocer mejor el comportamiento de cáncer de ovario con el fin de encontrar nuevos tratamientos que sean eficaces. También buscamos nuevas formas de identificar la respuesta que los

pacientes presentan a los diferentes tratamientos contra este cáncer e identificar un patrón de marcadores biológicos que prediga la respuesta a determinados tratamientos anticáncer de ovario.

Para realizar este estudio es necesario que participen tanto pacientes quienes hayan sido recientemente diagnosticadas con cáncer de ovario, así como también mujeres sin cáncer y que se encuentren afectadas de otras patologías ginecológicas de carácter benigno (por ejemplo, un mioma, un prolapso uterino, endometriosis o un tumor benigno del ovario). Ello con la intención de poder comparar ambos grupos (pacientes con y sin cáncer), una serie de factores que se relacionarían con la evolución del cáncer de ovario.

PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Si usted padece de cáncer de ovario y el equipo médico a su cargo ha decidido realizar cirugía que involucra la extirpación parcial o completa de las masas tumorales y/o la extracción de líquido ascítico. Le solicitamos que, de las masas o líquido extirpado, que serán enviados al Laboratorio de Anatomía-Patológica, nos permita tomar una pequeña muestra para el desarrollo de poblaciones de células las cuales se pueden mantener vivas en medios de cultivo especiales. Además, le solicitamos que nos permita tomar una muestra de sangre (10 mL, equivalentes a una cucharada de sopa) el día antes o en momentos previos a su cirugía.

Si usted no padece cáncer de ovario, pero si de otra patología (por ejemplo, mioma, un prolapso uterino, endometriosis o un tumor benigno del ovario), por lo cual el equipo médico a su cargo ha decidido realizar la cirugía que involucra extirpación parcial o completa de las masas tumorales y/o la extracción de líquido ascítico. De las masas o líquido extirpado, que serán enviados al Laboratorio de Anatomía-Patológica, solicitamos que usted nos permita tomar una pequeña muestra para el desarrollo de poblaciones de células las cuales se pueden mantener vivas en medios de cultivo especiales. Además, le solicitamos que nos permita tomar una muestra de sangre (10 mL, equivalentes a una cucharada de sopa) el día antes o en momentos previos a su cirugía.

En las muestras de sangre, se realizarán diferentes estudios genéticos relacionados a la forma en que el organismo elimina los medicamentos anti-cáncer de ovario.

No se harán otros estudios genéticos. En caso de que quisiéramos usarlas en el futuro para otros estudios no relacionados con el cáncer de ovario se le pedirá que firme un nuevo consentimiento.

Las muestras serán almacenadas en un banco de muestras por tiempo indefinido, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, a cargo de los investigadores responsables Dr. Gareth Owen, Dr. Mauricio Cuello, Dra. María Loreto Bravo y Dra. Lorena Abarzúa. Las muestras serán almacenadas

codificadas, es decir el acceso a su nombre e información médica está limitado sólo a los investigadores arriba identificados.

Hacemos énfasis en que ninguno de los estudios que haremos dañará su salud, ni afectará el proceso de diagnóstico o tratamiento de su patología. Si de la investigación se obtuviesen datos que fuesen relevantes para usted y su enfermedad, se le comunicarán los resultados obtenidos, así como a su médico tratante. Dado que estamos en etapas muy tempranas de las investigaciones, es muy improbable que los resultados de estas modifiquen el diagnóstico y/o el tratamiento que está recibiendo para su enfermedad.

BENEFICIOS

Usted no se beneficiará por participar en esta investigación médica. Sin embargo, la información que se obtendrá será de utilidad para conocer más acerca de su enfermedad y eventualmente podría beneficiar a otras personas con su misma condición.

Los posibles beneficios de este estudio son la contribución al avance científico y a la comunidad médica para mejorar la calidad de tratamiento de pacientes con cáncer de ovario en Chile.

RIESGOS

Las investigaciones que deseamos hacer en el material biológico (masas tumorales) no tienen riesgo para usted. La obtención de sangre le puede causar dolor, un pequeño hematoma y muy rara vez infección en el sitio de la punción.

COSTOS

Su participación en este estudio no implica ningún costo para usted. Asimismo, su decisión de acceder o no a participar, en nada afectará el cuidado que tendrá por parte de su equipo médico y en los costos de su tratamiento, los cuales son financiados por usted.

COMPENSACIONES

Su participación en este estudio no contempla ninguna compensación por participación, daños o lesiones relacionadas con su propia enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN

La información obtenida se mantendrá en forma confidencial. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre no será conocido. Los datos obtenidos serán custodiados, garantizando discreción y confidencialidad. Las muestras obtenidas serán codificadas a modo de mantener su anonimato. Asimismo, solo su equipo médico tratante o relacionado con la investigación podrá tener acceso a los datos relacionados con su enfermedad especificados en su ficha médica.

VOLUNTARIEDAD

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirarse de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, usted no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución y no se verá afectada la calidad de la atención médica que merece.

Si usted retira su consentimiento, sus muestras serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

PREGUNTAS

Si tiene preguntas acerca de esta investigación médica puede contactar a los investigadores responsables Dr. Gareth Owen, gowen@bio.puc.cl, fono: 223542874, Dr. Mauricio Cuello, macuello@med.puc.cl, fono: 23543034.

Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede contactar a la Dra. Beatriz Shand K., presidenta del Comité de Ético Científico de la facultad Investigación de La Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, al mail: cecmeduc@med.puc.cl o al fono: 223548173.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

- Se me ha explicado el propósito de esta investigación médica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.
- Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzada a hacerlo.
- No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.
- Se me comunicará de toda nueva información relacionada con el estudio que surja durante el estudio y que pueda tener importancia directa para mi condición de salud.
- Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación según mi parecer.
- Yo autorizo al investigador principal y a sus colaboradores el acceso y uso de los datos contenidos en mi ficha clínica.
- Se me entrega copia firmada de este documento.

FIRMAS:

- Participante

Nombre:..... Firma:.....

Fecha:.....

- Investigador:

Nombre:..... Firma:.....

Fecha:.....

- Director de la institución o su Delegado:

Nombre:..... Firma:.....

Fecha:.....

Consentimiento genérico para entrega de muestras de cáncer de ovario y sangre para investigación médica
versión 2 agosto, 2016

Apéndice B: Consentimiento informado para la obtención de muestras de tejido y ascitis desde
pacientes con cáncer de ovario avanzado.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Estudio: Metformina reduce la promoción del cáncer de ovario otorgada por las plaquetas

Patrocinador del Estudio / Fuente Financiamiento: Dr. Gareth Owen Profesor Asociado del Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile

Investigador Responsable: PhD (c) Mónica Márquez G.

Teléfono de contacto: (+56 (2) 23541935

Depto/UDA: Fisiología

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar en una investigación médica llamada: "Metformina reduce la promoción del cáncer de ovario otorgada por las plaquetas".

Tome el tiempo que necesite para decidirse, lea cuidadosamente este documento y hágale las preguntas que desee al médico o al personal del estudio.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio al cual lo/a estamos invitando a participar pretende determinar cuál es el rol de Metformina en la contribución de las plaquetas en la promoción del cáncer de ovario. Deseamos evaluar los efectos que tienen las plaquetas provenientes de donantes sanos/sanas directamente sobre las células de cáncer de ovario, evaluando su capacidad para formar nuevos vasos sanguíneos y capacidad de promover el crecimiento del tumor, y además poder ver si estos efectos son inhibidos por el medicamento llamado Metformina

Usted ha sido invitado/a participar como voluntario sano/sana.

COSTOS

Todos los estudios realizados en esta investigación NO tienen costo para usted.

COBERTURA DE DAÑOS

En caso de que usted sufriera algún perjuicio como resultado de su participación en esta investigación, se le proporcionarán primeros auxilios y tratamiento médico gratuito por el perjuicio lo que será costado por el Beca gastos operacionales para tesis asignada por Conicyt a la Dr. © Mónica Márquez G.

COMPENSACIONES

Este estudio no contempla ningún tipo de compensación por la participación en él.

CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN

La información obtenida se mantendrá en forma confidencial.

Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo, su nombre no será conocido. Los datos obtenidos serán custodiados garantizando discreción y confidencialidad.

La muestra de sangre obtenida será codificada a modo de mantener su anonimato.

VOLUNTARIEDAD

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria. Usted tiene el derecho a no aceptar participar de esta investigación o a retirar su consentimiento y abandonar el estudio en el momento que lo estime conveniente. Si usted retira su consentimiento las muestras de sangre/plaquetas se eliminarán y la información obtenida no será utilizada.

PREGUNTAS

Si usted tiene preguntas acerca de esta investigación médica, puede contactar a Mónica Márquez investigador responsable alumna de doctorado del Programa de Doctorado de Ciencias Biológicas, Investigador Responsable del estudio, al teléfono es el +56(2) 23541935. Si usted presenta complicaciones médicas puede contactarse con la Dra. Rafaela Erices, al teléfono +56(2) 23541935. En caso de cualquier duda respecto de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede contactarse con:

Dra. Beatriz Shand

Presidenta

Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina

Pontificia Universidad Católica de Chile

Marcoleta 381-piso 4- oficina 42

Teléfono +56 (2) 23548173

e-mail_ética.investigacion@med.puc.cl

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

1. Se me ha explicado el propósito de esta investigación médica, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que me asisten y que me puedo retirar de ella en el momento que lo desee.
2. Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado/ forzada a hacerlo.
3. No estoy renunciando a ningún derecho que me asista.
4. Se me comunicará toda la nueva información relacionada con el estudio que surja durante el estudio y que pueda tener importancia directa para mi condición de salud.
5. Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar mi participación según mi parecer, en cualquier momento y sin tener que dar explicaciones.
6. Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

FIRMAS OBLIGATORIAS:

- Participante: nombre, firma y fecha
- Investigador: nombre, firma y fecha
- Director de la Institución o su Delegado: nombre, firma y fecha

Modelo de Consentimiento Informado CEC-MedUC,
versión 2, Septiembre 2016



Apéndice C: Consentimiento informado para la obtención de plaquetas desde extracción de sangre de voluntarios sanos.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Addis R., Campesi I., Fois M., Capobianco G., Dessole S., Fenu G., Montella A., Cattaneo M., Vicentini L., Franconi F. (2014) Human umbilical endothelial cells (HUVECs) have a sex: characterisation of the phenotype of male and female cells. *Biology of Sex Differences* vol 5 pág. 1-12
- 2.- Amirkhosravi A., Bigsby G., Desai H, Amaya M., Coll E., Robles L., Faust P., Langer F., Drexler A., Reyes E., Francis J. Hypercoagulability in Ovarian Cancer Revisited: A Prospective Analysis of Coagulation and Platelet Activation Markers. *Blood* 2006 Vol. 108 pág. 5447-5489
- 3.- AMERICAN CANCER SOCIETY 2018 (<https://www.cancer.org/>)
- 4.- Aranda E., Owen G. I. (2009) A semi quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the ea.hy296 endothelial cell line. *Biol Res.* Vol. 42 pag 377-389
- 5.- Bamberger E. S., Perrett C. W. (2002) Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Mol Pathol.* Vol. 55 pag. 348–359.
- 6.- Battinelli E. M., Markens B. A., Italiano J. E. Jr. (2011) Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood.* Vol. 4 pag. 1359-1369.
- 7.- Ben Sahra I., Regazzetti C., Robert G., Laurent K., Le Marchand-Brustel Y., Auburger P., Tanti J., Giorgetti-Peraldi S., Bost F. (2011) Metformin, Independent of AMPK, Induces mTOR Inhibition and Cell-Cycle Arrest through REDD1. *Cancer Research* vol. 71 pag 4366-4372
- 8.- Biao H. Yan X., Fang S., Xiangshu L., Jing H., Maobo T., Shiyan D., Qiang W. (2018) Metformin-induced activation of AMPK inhibits the proliferation and migration of human aortic smooth muscle cells through upregulation of p53 and IFI16. *Int J Mol Med.* Vol. 41 pag. 1365–1376.
- 9.- Bottsford-Miller J., Choi H. J., Dalton H. J., Stone R. L., Cho M. S., Haemmerle M., Nick A. M., Pradeep S., Zand B., Previs R. A., Pecot C. V., Crane E. K., Hu W., Lutgendorf S. K.,

- 10.- Afshar-Kharghan V., Sood A. K. (2015) Differential platelet level affect response to taxane-based therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* Vol. 1 pag. 602-610.
- 11.- Cheng R., Ma J. X. (2015) Angiogenesis in diabetes and obesity. *Rev Endocr Metab Disord.* Vol. 16 pag. 67-75
- 12.- Christodoulou M. I., Scorilas A. (2017) Metformin and anti-cancer therapeutics: hopes for a more enhanced armamentarium against human neoplasias? *Curr Med Chem* Vol. 24 pag. 14-56
- 13.- Cortez A. J., Tudrej P., Kujawa K. A., Lisowska K.M. (2018) Advances ovarian cancer therapy *Cancer Chemother Pharmacol.* Vol. 81 pag. 17-38.
- 14.- Coward J. I., Middleton K., Murphy F. (2015) New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *Int J Womens Health.* Vol. 7 pag. 189–203.
- 15.- Cuello M. (2013) Ges en cancer de ovario epitelial: un avance sanitario. *Rev. chil. obstet. ginecol.* Vol.78 pag. 161-166
- 16.- Cufí S., Vazquez-Martin A., Oliveras-Ferraros C., Martin-Castillo B., Joven J., Menendez J. A. (2010) Metformin against TGF beta induce epithelial to mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging associated fibrosis *Cell Cycle.* Vol. 15 pag. 4461-4468
- 17.- Dallaglio K., Bruno A., Cantelmo A. R. Esposito A. I., Ruggiero L., Orecchioni S., Calleri A., Bertolini F., Pfeffer U., Noonan D. M., Albin A. (2014) Paradoxical effects of metformin on endothelial cells in angiogenesis. *Carcinogenesis.* Vol. 35 pag. 1055-1066.
- 18.- Davis A., Afshar-Kharghan V., Sood A. K., M.D. (2014) Platelet effects on ovarian cancer *Semin Oncol.* Vol. 41 pag. 378–384.
- 19.- Decensi A., Puntoni M., Goodwin P., Cazzaniga M., Gennari A., Bonanni B., Gandini S. (2010) Metformin and cancer risk in diabetes patients; a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res.* Vol. 3 pag. 1451-1456
- 20.- De Caterina R., Marchetti P., Bernini W., Giannarelli R., Giannessi D., Navalesi R. (1989) The direct effects of metformin on platelet function in vitro. *Eur J Clin Pharmacol.* Vol. 37 pag. 211-213.
- 21.- Dilokthornsakul P., Chaiyakunapruk N., Termrungruanglert W., Pratoomsot C., Saokaew S., Sruamsiri R. (2013) The effects of metformin on ovarian cancer: a systematic review. *Int J Gynecol Cancer.* Vol. 23 pag. 1544-1551.

- 22.- Dite T., Langendorf C., Hoque A., Galic S., Rebello R., Ovens A., Lindqvist L., Ngoei K., Naomi Ling X., Furic L., Kemp B., Scott J., Oakhill J. (2018) AMP-activated protein kinase selectively inhibited by the type II inhibitor SBI-0206965. *J Biol Chem*. Vol. 8 pág. 8874-8885
- 23.- Dolasik I., Sener S. Y., Celebi K., Aydın Z. M., Korkmaz U., Canturk Z. (2013) The effect of metformin on mean platelet volume in diabetic patients. *Platelets*. Vol. 24 pag. 118-121
- 24.- Dowling R. J., Niraula S., Stambolic V., Goodwin P. J. (2012) Metformin in cancer: translational challenges. *J Mol Endocrinol*. Vol. 29 pag. 31-43
- 25.- Dowling R. J., Lam S., Bassi C., Mouaaz S., Aman A., Kiyota T., Al-Awar R., Goodwin P. J., Stambolic V. (2016) Metformin pharmacokinetics in mouse tumors implications for human therapy. *Cell Metab*. Vol. 12 pag. 567-568
- 26.- Egan K., Crowley D., Smyth P., O'Toole S., Spillane C., Martin C., Gallagher M., Canney A., Norris L., Conlon N., McEvoy L., Ffrench B., Stordal B., Keegan H., Finn S., McEneaney V., Laios A., Ducrée J., Dunne E., Smith L., Berndt M., Sheils O., Kenny D., O'Leary J. (2011) Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signaling in ovarian cancer cell. *PLoS One* Vol 6 pag. 1-13
- 27.- Erices R., Bravo M. L., Gonzalez P., Oliva B., Racordon D., Garrido M., Ibañez C., Kato S., Brañes J., Pizarro J., Barriga M. I., Barra A., Bravo E., Alonso C., Bustamante E., Cuello M. A., Owen G.I. (2013) Metformin at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells. *Reprod Sci*. Vol. 20 pag. 1433-1446
- 28.- Erices R., Cubillos S., Aravena R., Santoro F., Marquez M., Orellana R., Ramírez C., González P., Fuenzalida P., Bravo M. L., Oliva B., Kato S.1, Ibañez C., Brañes J., Bravo E., Alonso C., García K., Arab C., Torres V. A., Godoy A. S., Pereira J., Bustos G., Cardenas J. C., Cuello M. A., Owen G. I. (2017) Diabetic concentrations of metformin inhibit platelet-mediated ovarian cancer cell progression, *Oncotarget*. Vol. 28 pag. 20865-20880
- 29.- Etulain J., Fondevila C., Negrotto S., Schattner M. (2013) Platelet-mediated angiogenesis is independent of VEGF and fully inhibited by aspirin. *Br J Pharmacol*. Vol. 170 pag. 255-265
- 30.- Evans J. M., Donnelly L. A., Emslie-Smith A. M., Alessi D. R., Morris A. D. (2005) Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. Vol. 4 pag. 1304-1305
- 31.- Fathalla M. F. (2013) Incessant ovulation and ovarian cancer – a hypothesis re-visited. *Facts Views Vis Obgyn* Vol 5 pag 292 -297
- 32.- Formoso G., De Filippis E. A., Michetti N., Di Fulvio P., Pandolfi A., Bucciarelli T., Ciabattini G., Nicolucci A., Davì G., Consoli A. (2008) Decreased in vivo oxidative stress and

decreased platelet activation following metformin treatments in newly diagnosed type 2 diabetes subjects. *Diabetes Metab Res Rev.* Vol. 24 pag. 231-237.

33.- Gadducci A., Lanfredini N., Sergiampietri C. (2015) Antiangiogenic agents in gynecological cancer: state of art and perspectives of clinical research *Crit Rev Oncol Hematol.* Vol. 96 pag. 113-128

34.- Gadducci A., Biglia N., Tana R., Cosio S., Gallo M. (2016) Metformin use a gynecological cancer a novel treatment option emerging from drug repositioning. *Crit Rev Oncol Hematol.* Vol. 105 pag. 73-83

35.- Gallagher E. J., LeRoith D. (2015) Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality. *Physiol Rev.* Vol. 95 727-748

36.- Gao S., Jiang J., Li P., Song H., Wang W., Li C., Kong D. (2015) Attenuating tumour angiogenesis: a preventive role of metformin against breast cancer. *Biomed Res Int.* Vol 20 pag. 1-6

37.- Gao Z. Y., Liu Z., Bi M. H., Zhang J. J., Han Z. Q., Han X., Wang H. Y., Sun G. P., Liu H. (2016) Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro. *Exp Ther Med.* Vol. 11 pag. 1700-1706

38.- Gay L. J., Felding-Habermann B. (2011) Contribution of platelets to tumor metastasis *Nat Rev Cancer.* Vol. 11 pag 123-34

39.- Ghoshal K., Bhattacharyya M. (2014) Overview of platelets physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal.* Vol. 2014 pag. 1-16

40.- Golebiewska E. M., Poole A. W. (2015) Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* Vol 29 pag. 153-162

41.- Gordon C J., Kohn E. C., Kitchener H. C, Ledermann J. A. (2014) Ovarian cancer. *The lancet.* Vol 384 pag. 1376-1388

42.- Goubran H. A., Burnouf T., Radosevic M., El-Ekiaby M. (2013) The platelet-cancer loop. *Eur J Intern Med.* Vol. 24 pag. 393-400

43.- Gündüz D., Klewer M., Bauer P., Tanislav C., Sedding D., Rohrbach S., Schulz R., Aslam M. (2015) Compound c inhibits in vitro angiogenesis and ameliorates thrombin-induced endothelial barrier failure. *Eur J Pharmacol.* Vol. 5 pag. 165-172.

44.- Han J., Li Y., Liu X., Zhou T., Sun H., Edwards P., Gao H., Yu F. S., Qiao X. (2018) Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One.* Vol. 7 pag. 1-12

- 45.- He L., Wondisford F. E. (2015) Metformin action: concentrations matter. *Cell Metab.* Vol. 3 pag 159-162
- 46.- Hirsch H. A., Iliopoulos D., Struhl K. (2013) Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 15 pag. 972-977
- 47.- Huang SW, Wu CY, Wang YT, Kao JK, Lin CC, Chang CC, Mu SW, Chen YY, Chiu HW, Chang CH, Liang SM, Chen YJ, Huang JL, (2013) p53 modulates the AMPK inhibitor compound C induced apoptosis in human skin cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* Vol. 267 pag. 113–124.
- 48.- Hung C. H., Chan S. H., Chu P. M., Lin H. C., Tsai K. L. (2016) Metformin regulates oxLDL-facilitated endothelial dysfunction by modulation of Sirt1 repressing Lox-1 modulated oxidative signaling. *Oncotarget.* Vol. 8 pag. 10773-10787.
- 49.- Hur K. Y., Lee M. S. (2015) New mechanisms of metformin action: focusing on mitochondria and the gut. *J Diabetes Investig.* Vol. 6 pag. 600-609
- 50.- Isoda K., Young J., Zirlik A., MacFarlane L., Tsuboi N., Gerdes N., Schönbeck U., Libby P. (2006) Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- κ B in Human Vascular Wall Cell Arterioscler Thromb Vasc Biol. Vol. 26 pag 611-617
- 51.- Inzucchi S. E., Lipska K. J., Mayo H., Bailey C. J, McGuire D. K. (2014) Metformin in patients with type 2 diabetes and kidney disease a systematic review. *JAMA.* Vol. 24 pag. 2668-2675.
- 52.- Jiang P., Ren Y. L., Lan Y., Li J. L., Luo J., Li J., Cai J. P. (2015) Phagocytosis of platelets enhances endothelial cell survival under serum deprivation. *Exp Biol Med.* Vol. 240 pag. 876-883
- 53.- Jiang L., Luan Y., Miao X., Sun C., Li K., Huang Z., Xu D., Zhang M., Kong F., Li N (2017) Platelet releasate promotes breast cancer growth and angiogenesis via VEGF-integrin cooperative signaling. *Br J Cancer.* Vol. 22 pag. 695-703
- 54.- Kalender A., Selvaraj A., Young S. Gulati P., Br lé S., Viollet B., Kemp B., Bardeesy B., Dennis P., Schlager J., Marette A., Kozma S., Thomas G. (2011) Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 In a Rag GTPase-Dependent Manner. *Cell Metab.* Vol. 11 pag 390-401
- 55.- Kannarkatt J., Alkharabsheh O., Tokala H., Dimitrov N. V. (2016) Metformina and angiogenesis in cancer-revisited. *Oncology.* Vol. 91 pag. 179-184.

- 56.- Kasznicki J, Sliwinska A., Drzewoski J. (2014) The influence of metformin in the etiology of selected cancers. *Ann Transl Med.* Vol. 2 (6): 57-68
- 57.- Kerbel R. S. (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis.* Vol. 21 pag. 505-515
- 58.- Kim J. H., Bae H. Y., Kim S. Y. (2013) Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab J.* Vol. 37 pag. 423-428
- 59.- Kim Y. M., Kim M. Y., Kim H. J., Roh G. S., Ko G. H., Seo H. G., Lee J. H., Chang K. C. (2011) Compound c independent of ampk inhibits icam 1 vcam 1 expression in inflammatory stimulants-activated endothelial cell in vitro and in vivo. *Atherosclerosis.* Vol. 219 pag. 57-64
- 60.- Kim Y. W., Byzova T. V. (2014) Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood.* Vol. 30 pag. 625-631
- 61.- Kinaan M., Ding H., Triggle C. R. (2015) Metformin an old drug for the treatment of diabetes but a new drug for the protection metforminof the endothelium. *Med Princ* Vol. 24 pag. 401-415.
- 62.- Kurman R J, Shih IeM. (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Am J Surg Pathol.* Vol. 34 pag. 433-443
- 63.- Kumar S., Meuter A., Thapa P., Langstraat C., Giri S., Chien J., Rattan R., Cliby W., Shridhar V. (2013) Metformin intake is associated with better survival in ovarian cancer. *Cancer.* Vol. 1 pag. 555-562
- 64.- Kyoko H., Taisuke K., Noritaka O., Kosuke A., Yasuhiro H., Masanobu S. (2011) Altered angiogenesis in the tumor microenvironment. *Pathology International.* Vol 61 Pag. 630-637
- 65.- Labelle M., Begum S., Hynes R. O. (2012) Direct signaling between platelets and cancer cell induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell.* Vol. 15 pag. 576-590
- 66.- Lei Y., Yi Y., Liu Y., Liu X., Keller E. T., Qian C. N., Zhang J., Lu Y. (2017) Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer.* Vol. 26 pag. 1- 9
- 67.- Lengyel E. (2010) Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 2010 Sep;177(3):1053-64
- 68.- Liu Y., Park J. M., Chang K. H., Huh H. J., Lee K., Lee M. Y. (2016) AMP-activated protein kinase mediates the antiplatelet effects on the thiazolidinediones rosiglitazone and proglitazone. *Mol Pharmacol.* Vol. 89 pag. 313-321

- 69.- Li N. (2016) Platelets in cancer metastasis: to help the “villain” to do evil. *Int J Cancer*. Vol. 1 pag 2078-2087
- 70.- Li W. D., Li N. P., Song D. D., Rong J. J., Qian A. M., Li X. Q. (2017) Metformin inhibits angiogenesis in endothelial progenitor cells through inhibiting MMP2, MMP9 and uPA expression via AMPK-mTOR autophagy pathway. *Int J Mol Med*. Vol. 39 pag. 1262-1268
- 71.- Losordo D. y Isner J. (2001). Estrogen and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. A Review*. Vol 21 pág. 6-12.
- 72.- Lu C., Thaker P. H., Lin Y. G., Spannuth W., Landen C. N., Merritt W. M., Jennings N. B., Langley R. R., Gershenson D. M., Yancopoulos G. D., Ellis L. M., Jaffe R. B., Coleman R. L., Sood A. K. (2008) Impact of vessel maturation on antiangiogenic therapy in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. Vol. 198 pag. 1-9
- 73.- McCarrel T., Fortier L. (2009) Temporal growth factor release from platelet-rich plasma trehalose lyophilized platelets and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res*. Vol. 27 pag. 1033-1042
- 74.- Menter D. G., Tucker S. C., Kopetz S., Sood A. K., Crissman J. D., Honn K. V. (2014) Platelets and cancer a casual o causal or causalrelationship: revisited. *Cancer Metastasis Rev*. Vol. 33 pag. 231-269
- 75.- Metcalf R. L., Fry D. J., Swindell R., McGurk A., Clamp A. R., Jayson G. C., Hasan J. (2014) Thrombosis in ovarian cancer: a case control study. *Br J Cancer*. Vol. 4 pag. 1118-1124
- 76.- Metformin hydrochloride tablets. (<https://www.drugs.com/pro/metformin.html>)
- 77.- Mezouar S., Frère C., Darbousset R., Mege D., Crescence L., Dignat-George F., Panicot-Dubois L., Dubois C. (2016) Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: experimental and clinical evidences *Thromb Res*. Vol. 139 pag. 65-76
- 78.- Miller R. A., Birnbaum M. J. (2010) An energetic tale an energetic tale of ampk-independent effects of metformin. *J Clin Invest*. Vol. 120 pag. 2267-2270
- 79.- Ministerio de salud (MINSAL) (2013) Guía Clínica AUGÉ Ovario Epitelial.
- 80.- Mo L., Bachelder R. E., Kennedy M., Chen P. H., Chi J. T., Berchuck A., Cianciolo G., Pizzo S. V. (2015) Syngeneic murine ovarian cancer model reveals that ascites enriches for ovarian cancer stem. *Mol Cancer Ther*. Vol. 14 pag. 747-756
- 81.- Mukesh V. (2009) Epidemiology ovarian cancer in *Cancer Epidemiology (capitulo 20)*; 413-438

- 82.- Nilsson M. B., Langley R. R., Fidler I. J. (2005) Interleukin 6 secreted by human ovarian carcinoma cells is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res.* Vol. 1 pag. 10794–10800.
- 83.- Odunsi K. (2017) Immunotherapy in ovarian cancer. *Ann Oncol.* Vol. 28 pag. 1-7
- 84.- Orellana R., Kato S., Erices R., Bravo M. L., Gonzalez P., Oliva B., Cubillos S., Valdivia A., Ibañez C., Brañes J., Barriga M. I., Bravo E., Alonso C., Bustamante E., Castellon E., Hidalgo P., Trigo C., Panes O., Pereira J., Mezzano D., Cuello M. A., Owen G. I. (2015) Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers and act as chemoattractants increasing the migration of ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* Vol. 15 pag. 1-15
- 85.- Papetti M., Herman I. M. (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* Vol. 282 pag. 947-970.
- 86.- Pernicova I., Korbonits M. (2014) Metformin mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol.* Vol. 10 pag. 143-156
- 87.- Peyton K. J., Yu Y., Yates B., Shebib A. R., Liu X. M., Wang H., Durante W. (2011) Compound C inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration in an AMPK-activated protein kinase-independent fashion. *J Pharmacol Exp Ther.* Vol. 338 pag. 476-484
- 88.- Prat J. (2012) New insights into cancer pathology. *Annals of Oncology,* Vol. 23 pag. 111-117
- 89.- Protti A., Lecchi A., Fortunato F., Artoni A., Greppi N., Vecchio S., Fagiolari G., Moggio M., Comi G. P., Mistraretti G., Lanticina B., Faraldi L., Gattinoni L. (2012) Metformin overdose causes platelet mitochondrial dysfunction in humans. *Crit Care.* Vol. 3 pag. 1-9
- 90.- Pujade-Lauraine E. (2017) New treatments in ovarian cancer. *Annals of Oncology.* Vol. 28, pag 57–60
- 91.- Qu C., Zhang W., Zheng G., Zhang Z., Yin J., He Z. (2014) Metformin reverses multidrug resistance and epithelial mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem.* Vol. 386 pag. 63-71
- 92.- Ramalingam P. (2016) Morphologic, immunophenotypic and molecular features of epithelial ovarian cancer. *Oncology.* Vol. 30 pag. 166-176.
- 93.- Rattan R., Graham R. P., Maguire J. L., Giri S., Shridhar V. (2011) Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia.* Vol. 13 pag. 483-491.

- 94.- Reinthaller A. (2016) Antiangiogenic therapies in ovarian cancer. *Memo*. Vol. 9 pag. 139-143
- 95.- Shank J. J., Yang K., Ghannam J., Cabrera L., Johnston C. J., Reynolds R. K. Buckanovich R. J. (2012) Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol*. Vol. 127 pag. 390-397
- 96.- Sharma D., Brummel-Ziedins K. E., Bouchard B. A., Holmes C. E. (2014) Platelets in tumor progression: a host factor that offers multiple potential target in the treatment of cancer. *J Cell Physiol*. Vol. 229 pag.1005-1015
- 97.- Soraya H., Esfahanian N., Shakiba Y., Ghazi-Khansari M., Nikbin B., Hafezzadeh H., Maleki Dizaji N., Garjani A. (2012) Anti-angiogenic effects of metformin, an AMPK activator, on human umbilical vein endothelial cells and on granulation tissue in rat. *Iran J Basic Med Sci*. Vol. 15 pag. 1202-1209
- 98.- Sośnicki S., Kapral M., Węglarz L. (2016) Molecular targets of metformin antitumor action. *Pharmacol Rep*. Vol. 68 pag. 918-925
- 99.- Spannuth W. A., Sood A. K., Coleman R. L. (2008) Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. Vol. 5 pag. 194-204
- 100.- Stone R. L., Nick A. M., McNeish I. A., Balkwill F., Han H. D., Bottsford-Miller J, Rupairmoole R., Armaiz-Pena G. N., Pecot C. V., Coward J., Deavers M. T., Vasquez H. G., Urbauer D., Landen C. N., Hu W., Gershenson H., Matsuo K., Shahzad M. M., King E. R., Tekedereli I., Ozpolat B., Ahn E. H., Bond V. K., Wang R., Drew A. F., Gushiken F., Lamkin D., Collins K., DeGeest K., Lutgendorf S. K., Chiu W., Lopez-Berestein G., Afshar-Kharghan V, Sood A. K. (2012) Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med*. Vol. 16 pag 610-18
- 101.- Swier N., Versteeg H. H. (2017) Reciprocal links between venous thromboembolism, coagulation factors. *Thromb Res*. Vol. 150 pag. 8-18
- 102.- Tan B. K., Adya R., Chen J., Farhatullah S., Heutling D., Mitchell D., Lehnert H., Randeve H. S. (2009) Metformin decreases angiogenesis via NF Kb and ERK 1/2 ERK 5 pathways by increasing the antiangiogenic thrombospondin 1. *Cardiovasc Res*. Vol. 1 pag. 566-574.
- 103.- Trifanescu O. G., Anghel R. (2015) Antiangiogenic treatment in ovarian cancer in the era of evidenced-based medicine. *Maedica (Buchar)*. Vol. 10 pag. 376-381.
- 104.- Van N., Sturk A., Middeldorp S., Nieuwland R. (2014) Effect of cancer on platelets *Semin Oncol*. Vol. 41 pag 311-318.

105.- Welte J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. (2013) Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* Vol. 123 pag. 190-200

106.- Xin G., Wei Z., Ji C., Zheng H., Gu J., Ma L., Huang W., Morris-Natschke S. L., Yeh J. L., Zhang R., Qin C., Wen L., Xing Z., Cao Y., Xia Q., Lu Y., Li K., Niu H., Lee K. H., Huang W. (2016) Metformin uniquely prevents thrombosis by inhibiting platelet activation and mtDNA release. *Sci Rep.* Vol. 2 pag. 1-12

107.- Yi Q. Y., Deng G., Chen N., Bai Z. S., Yuan J. S., Wu G. H., Wang Y.W., Wu S. J. (2016) Metformin inhibits development of diabetic retinopathy through inducing alternative splicing of vegfA. *Am J Transl Res.* Vol. 15 pag. 3947-3954

108.- Yu J. W., Deng Y. P., Han X., Ren G. F., Cai J., Jiang G. J. (2016) Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/ENOS pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol.* Vol. 18 pag. 1-10

109.- Zhao Z., Cheng X., Wang Y., Han R., Li L., Xiang T., He L., Long H., Zhu B., He Y. (2014) Metformin inhibit the IL-6 induced epithelial mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. *PLoS One.* Vol. 30 pag. 1-12

110.- Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N, Hirshman MF., Goodyear LJ. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* Vol. 108 pag. 1167–1174