

## **Ensayo terapéutico preclínico de Cloroquina y 5-FU en el tratamiento de cáncer colorrectal**

*Ernesto Ridel, Juliana Ascolani, Facundo Tognola, Silvia Viale, Natalia Romero, José Luis Favant y Verónica L. Martínez Marignac*

AUTORES: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial N° 11, km 10, Oro Verde - Paraná - Entre Ríos, Argentina

CONTACTO: [vmartinezmarignac@cicyttp.org.ar](mailto:vmartinezmarignac@cicyttp.org.ar) - [veromm99@gmail.com](mailto:veromm99@gmail.com)

### **Resumen**

Se empleó un modelo de cáncer colorrectal inducido químicamente en ratones machos de la cepa Balb/c para evaluar los efectos terapéuticos de cloroquina junto a 5-fluorouracilo, droga de uso convencional en el tratamiento de cáncer. Se reporta el efecto de estas drogas y el proceso de inducción de tumores sobre la homeostasis metabólica de la glucosa. Los tumores fueron inducidos con dosis óptima y no tóxica de azoximetano y sulfato de sodio dextrano. Se asignaron en forma aleatoria al tratamiento y combinaciones de cloroquina y 5-fluorouracilo. La caracterización de las diferentes etapas del desarrollo de cáncer colorrectal se realizó utilizando técnicas de anatomía patológica clásicas (azul de metileno, H&E, PAS), microscopía electrónica e inmunohistoquímica. Los datos morfológicos fueron correlacionados con los niveles de uso de glucosa, producción de mucinas y carbohidratos e inactivación de GSK3 $\alpha\beta$ . Los resultados muestran que el tejido tumoral posee diferencias energéticas respecto a los controles y que la cloroquina restituye características de tejido normal, así como modifica la reorganización metabólica del tejido tumoral colorrectal en ratones.

**Palabras Clave:** Cloroquina; cáncer colorrectal; modelo murino; metabolismo tumoral; 5-FU

## Objetivos propuestos y cumplidos

1. Profundizar el conocimiento sobre el rol que ejercen los cambios metabólicos en el desarrollo tumoral y el valor terapéutico de la Cloroquina en un modelo de CCR murino inducido químicamente.
2. Evaluar el efecto de la inducción química tumoral sobre el eje de la vía PI3K/mTor, inactivación GSK3 $\alpha$  y  $\beta$ , y la re-organización metabólica de las células tumorales.
3. Evaluar la utilidad de Cloroquina como droga de uso preventivo y en el tratamiento del cáncer colorrectal junto a 5-FU, droga de uso convencional en quimioterapia de esta enfermedad.
4. Caracterizar la organización y reorganización bioenergética de las células del colon y recto en estado normal, inducción de tumores y bajo los diferentes tratamientos empleados.

## Marco Teórico

Se sabe que en el desarrollo del cáncer colorrectal (CCR) como durante los tratamientos se suceden reorganizaciones en el metabolismo de sus células. La Cloroquina es una droga que en tumores modula una cascada de reacciones corriente abajo de las vías AMPK/mTor y al uso de la glucosa; posee así un efecto directo sobre el metabolismo y la autofagia, cuya administración conjunta al 5-Fluorouracilo (5-FU) ha demostrado poseer un efecto sensibilizante al tratamiento en un modelo xenográfico de CCR (Liufeng Mei *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015; Zinn *et al.*, 2013). Históricamente, Cloroquina es una droga usual en el tratamiento de la malaria que actúa interfiriendo directamente con la autofagia celular y, de este modo, con una de las vías más importantes del reciclado metabólico. En lo que se relaciona con su uso alternativo y su reposicionamiento en los tratamientos contra el cáncer, en el CCR se han obtenido resultados promisorios para patologías recurrentes y resistentes de este tipo, así como en combinación con la terapia convencional de 5-FU (Choi, Yoon *et al.*, 2012; Sasaki, Tsuno *et al.* 2012). En 2018 existen más de 15 ensayos clínicos listados en el sitio [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) que poseen como eje el estudio de Cloroquina por sí misma o en combinaciones con otras drogas convencionales en diferentes tumores sólidos sin embargo al presente no se ha incorporado a ningún protocolo terapéutico.

El modelo establecido en el presente plan permitió evidenciar vías y reorganización no solo en tumores establecidos sino durante la respuesta a injurias debidas a DSS y el desarrollo tumoral; y apoya a otros autores en la conclusión de que un modelo de inducción químico de cáncer a pesar de su heterogeneidad demuestra ser un modelo poderoso para el análisis del desarrollo tumoral y mostrar la reorganización metabólica sufrida durante el desarrollo tumoral (Gengenbacher *et al.*, 2017).

Los tumores colorrectales obtenidos fueron caracterizados histológicamente en su estructura y ultraestructura y bioquímicamente para cambios asociados a su metabolismo. Nuestros hallazgos apoyan el uso de Cloroquina como candidato en revertir el tejido tumoral certificando así los resultados previos con modelos xenográficos como terapia para revertir tumores bien establecidos.

## Marco metodológico

**Muestra:** se emplearon un total de 100 animales machos Balb/c adquiridos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y del Centro de Medicina Comparada y Bioterio de Experimentación de la Universidad Nacional del Litoral, y el manejo y uso fueron aprobados y realizados bajo el reglamento del Bioterio del Laboratorio Interdisciplinario de Biología y Genética Molecular (IBIOGEM) y por el Comité de Ética y Seguridad en el Trabajo Experimental (CEySTE-CCT Santa Fe, protocolo 2015-2016) y LAMAE de UNER (protocolo 2014).

Los ratones adquiridos a semana 5 de vida fueron aclimatados por dos semanas. Para el mantenimiento en el Animalario del laboratorio IBIOGEM los ratones cepas Balb/c fueron mantenidos a un rango de

temperatura entre  $25 \pm 4$  °C, con un régimen luz/oscuridad de 12/12 h, alimentados diariamente y con suministro de agua *ad libitum*. A diferentes periodos y terminados los procesos de tratamiento y experimentación los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los segmentos desde ano a cecum fueron recolectados, enjuagados y lavados con 1X PBS, abiertos longitudinalmente y según los casos fijados en 4 % formaldehído, otros colorados brevemente con 0.02 % de azul de metileno para examinarlos macro y microscópicamente en la determinación de tumores y cortados para su inclusión en parafina.

**Inducción tumoral por exposición química:** la inducción tumoral fue realizada según el protocolo modificado de Tanaka *et al.*, 2003. En breve, un grupo de 80 animales machos entre 6-7 semanas de vida fueron inyectados intraperitonealmente con azoximetano a 12.5mg/kg de peso; una semana más tarde, los animales recibieron 2 % de dextran sulfato sódico *ad litium* por 3 días y a 1.5 % por otros 3 días en el agua de beber. El consumo de DSS en agua fue seguido diariamente y fue similar en todas las cajas. Veinte animales controles fueron inyectados intraperitonealmente solo con 1 % solución salina PBS.

**Ensayo preclínico-administración de medicamentos:** una vez confirmada la inducción tumoral, a partir de semana 11 a la 24 se suministraron semanalmente en forma intraperitoneal 5-fluorouracilo (50mg/kg) (CHEM IMPEX INT'l Inc. IL, USA) y Cloroquina a 3.5mg/kg (Cloroquina difosfato sódico - CHEM IMPEX INT'l Inc. IL, USA) solos (CH o 5-FU) o combinados (5-FU+CH). Un total de 70 animales fueron asignados a estos grupos y 10 inducidos químicamente pasaron a conformar el grupo no tratado control (NT).

**Determinación de niveles metabólicos relacionados a carbohidratos:** para evaluar el efecto de la inducción química sobre el metabolismo celular se caracterizaron el consumo de glucosa y producción de lactato en colonocitos aislados a 24 horas de incubación en cuarta y novena semana de inducción.

**Purificación de colonocitos y criptas:** los animales fueron sacrificados a semana 4 y 9 por dislocación cervical, y sus intestinos desde ano a cecum fueron removidos, los colonocitos fueron aislados por quelación con EDTA de acuerdo al protocolo de Amhad *et al.* (2000). El intestino grueso escindido se lavó con solución de Krebs-Henseleit Ringer  $Ca^{2+}$  libre, y luego con EDTA al 0.1M con la ayuda de una jeringa y aguja de 20 gauge. El intestino distendido es incubado a 37° C por 20 minutos en nueva solución Krebs-Henseleit Ringer sin calcio. Ahora las células epiteliales y criptas disociadas son lavadas con la solución por pasajes con jeringa y colectadas por centrifugación por 5 minutos a 1500rpm. Las células son luego lavadas dos veces con 1X PBS, y re suspendidas en medio de cultivo. El número de células vivas es medido en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripano, un total de 1500 células es cargado a pocillos de una placa de 96 pocillos y luego de 24hrs de incubación a 37 °C en atmosfera húmeda de 5 % CO<sub>2</sub> se prosiguió con la cuantificación del consumo de glucosa y la reducción de lactato de acuerdo al protocolo colorimétrico del kit Lactato Liquid Plus de GT Laboratorios SRL (Rosario, Argentina) y el de Glucosa Liquid Plus (GT Laboratorio SRL, Rosario, Argentina). 200ul de supernadante fue medido para ambos metabolitos y los valores expresados en mg/ml para el contenido de lactato y ng por 1000 células para glucosa.

### **Análisis histológico y ultraestructural:**

A semana 0 y 20 se recolectaron muestras NT y controles para evaluar la ultra estructura. El análisis por microscopía electrónica de transmisión (Hitachi HU-11C), luego de la toma, la muestra fue incluida en resina Epoxi, se obtuvieron secciones ultra finas de (70nm) montadas sobre grillas y posteriormente las secciones fueron fotografiadas por el microscopio electrónico de transmisión (TEM) HITACHI HU-11C, en films de rayos X que luego de revelados fueron escaneados digitalmente y guardados en formato pdf para su posterior análisis. El correspondiente análisis fue realizado por medio del programa *ImageJ* y sus *plugins* WandAutoMeasure.txt y Cell counter, haciendo uso de la función Analyze-Analyze Particles luego de modificaciones del umbral de intensidades (NIH, Versión 1.51).

Al momento de tomar las fotografías, dichas muestras fueron codificadas para enmascarar el origen y de esta manera no influir en el análisis posterior de los resultados.

**Morfología y niveles de carbohidratos:** Secciones de intestino distal en semanas 10, 16, 20 y 35 fueron recolectadas y luego de enjuagadas fueron fijadas en formalina al 10 % por 2 a 24 hrs y embebidas en parafina. Secciones de 4-5um del material embebido fue desparafinado para tinciones histológicas de hematoxilina y eosina (Biopur SRL, Argentina) o para análisis del metabolismo de carbohidratos y mucinas con el ácido Periódico y reactivo de Schiff (PAS, Biopur SRL, Argentina). Esta última caracterización se realizó en semanas 10 a la 35, y en semanas 5, 10, 15, 20 y 25 luego de la administración de los tratamientos.

**Análisis de toxicidad de las dosis de los medicamentos ensayados-daño al ADN:** para evaluar posible toxicidad off target de las dosis administradas se desarrolló el ensayo cometa, este ensayo garantiza información toxicológica al detectar daño en el ADN a nivel celular. En breve, se desarrolló el ensayo de acuerdo al protocolo de Singh *et al.* (1988) con modificaciones de Klaude *et al.* (1996) y Simoniello *et al.* (2009). Se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena dorsal o safena de los ratones a semana 13, luego de dos semanas de comenzada la administración de drogas (semana 2 de tratamiento). La recolección fue a través de capilares heparinizados estériles de unos 30-50ul de sangre. Los porta objetos teñidos con bromuro de etidio fueron fotografiados por cámara digital en Leica DM500 bajo el filtro de 488nm.

**Inmunohistología y uso de la glucosa durante la inducción química de tumores:** Muestras incluidas en parafina de controles, y no tratados a semanas 4, 8, 16 y 20 se obtuvieron para identificar la reorganización metabólica durante la inducción y establecimiento de tumores. Para el análisis inmunohistológico secciones de 5um montadas fueron incubadas en Tritón X-100 al 0.1 % en 1XPBS durante 15 minutos y suero normal o albumina de suero bovino al 5 % por media hora. Posteriormente se lavaron durante 5 minutos en 1X PBS y se incubaron en el anticuerpo primario para GSK3  $\alpha$  Ser21/ $\beta$  Ser9 (Cell Signalling Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$  (Ser21/9) #9331) durante la noche a las diluciones apropiadas en buffer de bloqueo. Cumplido este tiempo las secciones fueron lavadas en 1xPBS durante 15 minutos e incubadas en el anticuerpo secundario fluorescente (Alexa 488) por 1 hr, posteriormente fueron lavadas en 1x PBS y las secciones fueron montadas con bálsamo natural de Canadá (Biopack<sup>o</sup>) y un número de 10 campos fueron fotografiados en *microscopio* óptico directo de *fluorescencia*, marca Olympus BX50 del servicio de LAMAE UNER.

**Análisis estadístico:** Para comparar la respuesta de los diferentes tratamientos se prosiguió al uso de una clasificación y valoración de las características observadas por un análisis no paramétrico. Se utilizaron ensayo exacto de Fisher para obtener conclusiones respecto del efecto de los tratamientos y los mecanismos posibles involucrados (autofagia, consumo de glucosa, glicólisis/producción de lac+) así como categorizaciones según la clasificación histológica de los tumores inducidos. Para evaluar diferencias entre niveles de activación de GSK3 y diferentes categorías (tratamientos), se empleó un test- t no apareado. El nivel de significancia permitido fue de  $\leq 0,05$  y se utilizó el paquete estadístico SigmaStat para análisis paramétricos y no paramétricos.

## Resultados y conclusiones

### Establecimiento de tumores inducidos y reorganización metabólica:

**Inducción por AOM/DSS de CCR en murinos:** La inducción con AOM/DSS se evidenció en semana 3, 8 y 16 con tinción de azul de metileno y en forma microscópica; esta técnica permite observar el nivel de criptas aberrantes en el tejido tumoral significativamente en incremento ( $p < 0,04$ ).

Según lo muestra la figura 1, en animales en semana 8 se observan aberraciones en la estructura de las criptas, y en semana 16 la formación tumoral hace imposible visualizar estructuras normales en el tejido de intestino grueso distal y colon.

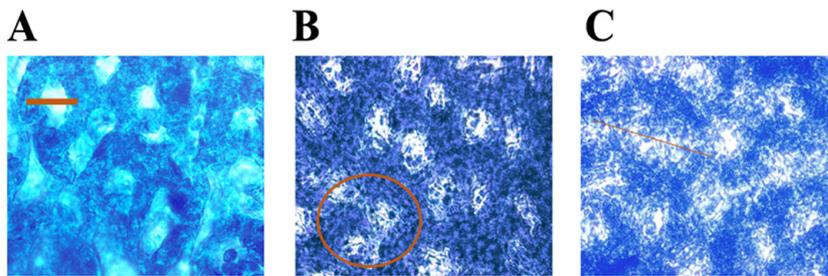
Las criptas aberrantes muestran las siguientes señales histológicas que las determinan como hiperplasias y displasias según la descripción de Wargovich *et al.* (2010) desde semana 3 a la 16:

1. A vista macroscópicamente las tinciones con azul de metileno en semanas 8 y 16 es muy oscura;
2. El tamaño de las criptas es mayor o indefinido;
3. El diámetro es mayor en semana 3, heterogéneo en semana 8 y cerrado y heterogéneo en semana 16;
4. La morfología celular es redonda en semana 3 y para semana 8 y 16 es estratificada.

Conjuntamente, en figura 2 se observan las diferencias macroscópicas entre tejido control (CTL) que no han recibido inducción química con AOM/DSS y un grupo de muestras de intestino grueso distal y recto de animales inducidos con AOM/DSS en semana 16. Se observan formaciones tumorales y adenomas evidentes.

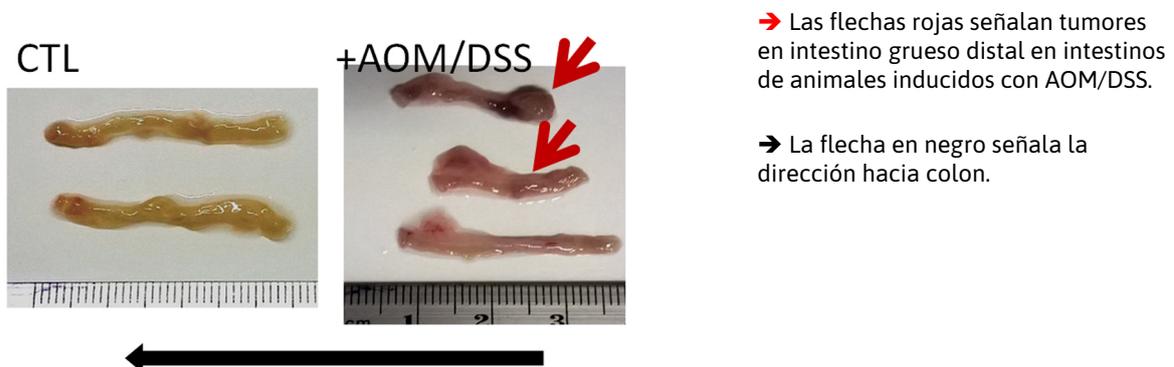
El análisis morfológico por H&E en semana 16 de muestras inducidas y no tratadas demuestra además inclusión de células inflamatorias, células de núcleos aumentados que dominan en mucosa y submucosa y morfología alterada en criptas con ejemplos de bifurcaciones basales (Figura 3).

Los análisis de la ultraestructura demostraron incremento significativo del tamaño de núcleos y de las mitocondrias ( $p < 0.04$ ) en el tejido tumoral en semana 20, asimismo, se puede observar una reorganización del retículo endoplasmático y la aparición de estructuras vacuolares pequeñas en las muestras que recibieron inducción química por AOM/DSS (Figura 4).

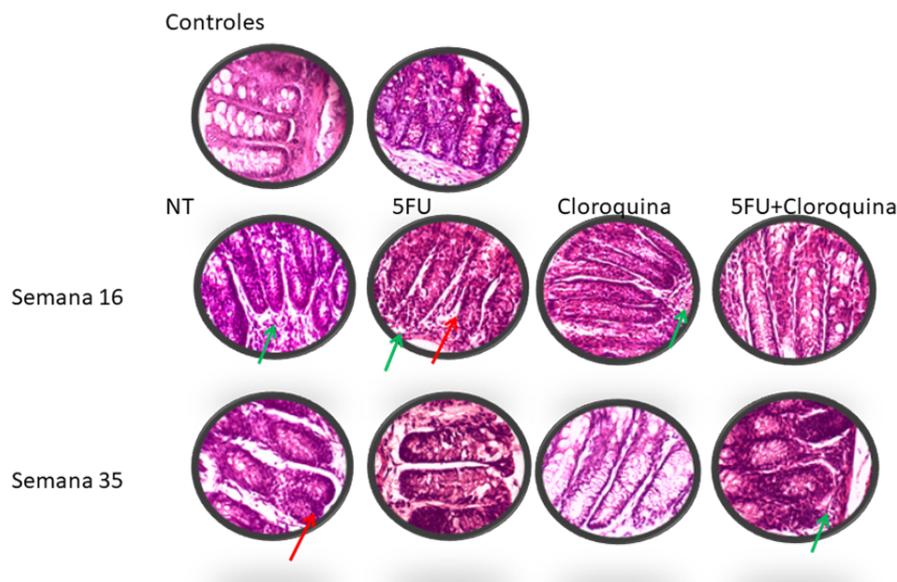


**FIGURA 1.** Tinción con azul de metileno 0,02 % e identificación de criptas aberrantes en tejido inducido con AOM/DSS. Microscopia a 40X

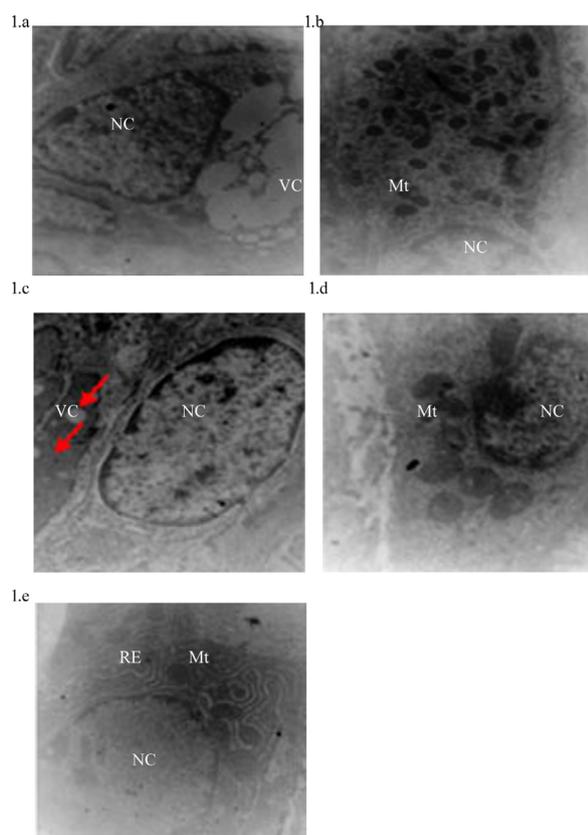
REFERENCIAS: A. Muestra de tejido de intestino grueso distal en semana 3 de animales tratados con AOM/DSS, se observa agrandamiento de las criptas (línea roja) pero no tejido neoplásico; B. Tejido de semana 8 con presencia de desorganización del tejido epitelial y de criptas; C. Se observa completas aberraciones y tejido epitelial de las criptas.



**FIGURA 2.** Imagen macroscópica de secciones de intestino grueso distal y recto en animales controles (CTL) y en los suministrados con Azoximetano y dextran sodio sulfato (+AOM/DSS)



**FIGURA 3.** Tinción histológica con Hematoxilina & Eosina de tejido colónico en animales control y tratados y no tratados durante las semanas 16 y 35. Núcleos aumentados y células inflamatorias (flechas verdes) y morfología alterada de criptas (bifurcaciones basales, flechas rojas). Asimismo, se evidencian criptas alargadas en la semana 16 con los tratamientos de cloroquina y cloroquina y 5FU



**FIGURA 4.** Microfotografías. a y b. Controles a 10000X; c a e NT a 10000X. se observan aumento de tamaño en núcleos, mitocondrias y reorganización del reticulum endoplasmatico como mayor número de vacuolas en tejido inducido en semana 20

**Cambios bioenergéticos durante el establecimiento y desarrollo tumoral:** Además de los cambios estructurales durante la inducción de tumores se comprobó que las células sufren una reorganización bioenergética registrada en la semana novena del ensayo y semana quinta luego de la inducción (Tabla 1). La purificación de los colonocitos y células epiteliales demostraron luego de 24hr de incubación diferencia significativa en la producción de lactato, producto final del consumo de glucosa por glicolisis entre el grupo control (CTL, animales no inducidos a CCR) y los animales tratados con AOM/DSS (NT) ( $p < 0,02$ ). Sin embargo, el consumo de la glucosa entre los dos grupos CTL y NT no presentó diferencias significativas. Por lo que se concluye que las células de animales inducidos a desarrollar tumores colorrectales poseen diferentes formas de utilizar la glucosa consumida, utilizando vías alternativas a la glucolisis tales como la glucogenólisis, vía de la pentosa fosfato o como fue sugerido por Shibuya *et al.* (2015) una vía alternativa no glicolítica y más de fosforilación oxidativa que necesita confirmarse en estudios futuros. Aquí en el presente modelo murino, nuestros análisis de la vía GSK3 demostraron que en el caso de inducción con AOM/DSS en ratones Balb/c la reorganización metabólica en respuesta a injurias en tejido colorrectal se debería a una activación de las vías glucogénicas y de utilización de la glucosa y su almacenamiento en forma de colesterol.

**TABLA 1.** Producción de lactato y consumo de glucosa en semana 9 de animales inducidos y no a carcinomas de colon distal por suministro de AOM/DSS

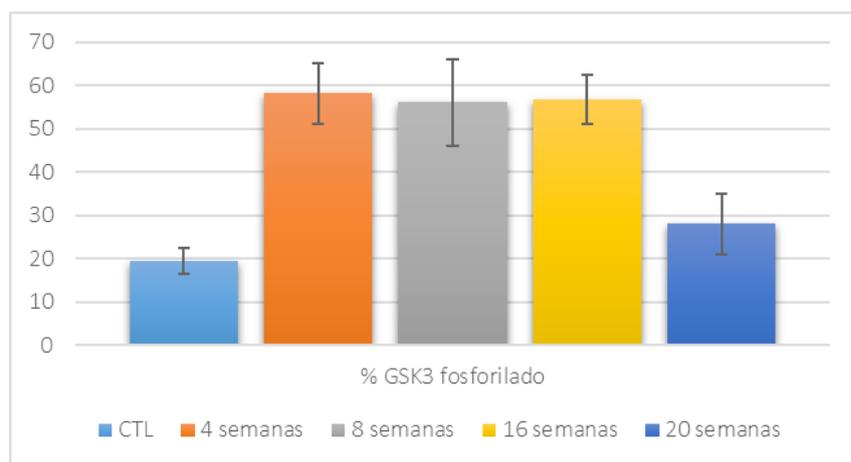
Muestra	Lactato producido <sup>1</sup>	Glucosa consumida <sup>2</sup>	GLUC/LAC+
NT1	0.114	0.170	1.5
NT2	0.036	0.160	4.4
NT3	0.031	0.077	2.5
CTL1	0.209	0.176	0.8
CTL2	0.208	0.351	1.7
Valor de probabilidad entre CTLs y NTs	$P < 0.02$	$P > 0.19$	

1 y 2 valores en mg/ml por 1000 células después de 24hrs de incubación. CTLs controles y NTs no tratados.

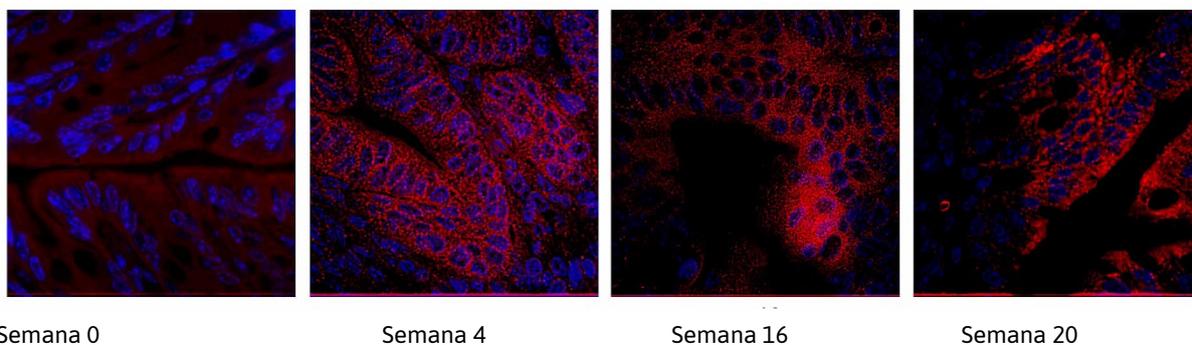
En el presente trabajo, nosotros analizamos con el fin de determinar la reorganización observada en el uso de glucosa y producción de lactato, el estado de inhibición por fosforilación de los sitios Ser21 y Ser9 de la *Glucógeno sintetasa quinasa 3* (GSK3)  $\alpha$  y  $\beta$  los cuales no fosforilados inactivan la enzima. Se sabe que la oxidación de la glucosa puede seguir diferentes vías de utilización, la glicolisis acoplada al ciclo de Krebs, otra no acoplada donde el piruvato genera lactato, por otro lado la glucosa puede ser empleada en las vías de glucogénesis, síntesis de ácidos grasos o pentosa fosfato. Se conoce que la inhibición de GSK3  $\alpha$  y  $\beta$  por fosforilación evita la inactivación de la glucógeno sintetasa, y que la fosforilación de GSK3 se halla disminuida en cáncer colorrectal y su actividad preservada en células y tejidos no tumorales (Shakoori *et al.*, 2005). En modelos de tejido muscular, tumoral y hepático cuando GSK3 se halla inactivo, la glucosa es utilizada en la glucogénesis y reserva de nutrientes (McManus *et al.*, 2005).

La inactivación de GSK3 por fosforilación es mediante Akt y otras quinasas y ha estado asociado a la progresión tumoral e inducción a transición mesenquimática del epitelio (EMT) (McCubrey *et al.*, 2014) por lo que la inducción tumoral en el modelo murino AOM/DSS no solo estaría afectando la respuesta inflamatoria a una injuria, la acumulación de mutaciones y la reparación de ADN (por alquilación de guaninas) sino induciendo la progresión a tejido mesenquimático y la proliferación celular (De Robertis *et al.*, 2011).

La inducción química de tumores en intestino grueso distal en la cepa Balb/c la hemos asociado con un incremento en la fosforilación de los sitios Ser21 y Ser9 de GSK3  $\alpha$  y  $\beta$  ( $P < 0.02$ ) respectivamente y en semana 20 de la inducción se observó una relocalización de GSK3 fosforilado en secciones de células epiteliales de la cripta (Figura 5 e histograma 1) siendo el aumento significativo a  $P = 0.035$ . El aumento significativo observado se corresponde con lo demostrado en tejido tumoral inducido por AOM/DSS en ratones de otra cepa (Shimizu et al., 2008) y aquí lo hemos podido asociar con reorganización metabólica y uso de la glucosa.



**HISTOGRAMA 1.** Porcentajes de regiones fosforiladas según el análisis de área roja por ImageJ (uso de la herramienta Área y Color Threshold)



**FIGURA 5.** Inmunofluorescencia de sitios Ser21 y Ser9 de GSK3  $\alpha$  y  $\beta$  en tejidos de colon distal. Al comienzo del ensayo (CTL), a semana 4 (en inducción), 16 y 20 de tejido inducido con AOM/DSS y no tratado (NT)

#### Uso de la cloroquina y 5 fluorouracilo como tratamiento:

A través de tinciones de haematoxilina y eosina se evidenciaron cambios de la morfología del tejido colónico en controles y muestras tratadas y no tratadas en diferentes semanas. Los cambios corresponden a reversiones de la morfología a tejido de control y semana 0, con algunas características retenidas de tejido tumoral. En tabla 2 y figura 3 se muestran estos cambios morfológicos y que los tratamientos con cloroquina poseen mayores efectos respecto a los tratamientos con 5 fluorouracilo únicamente o que la combinación 5 fluorouracilo y cloroquina.

**Clasificación de los distintos estadios de diferenciación del epitelio intestinal bajo o no los diferentes tratamientos.**

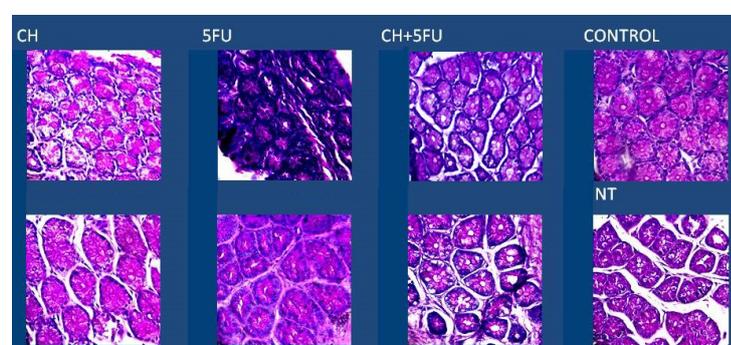
Por medio de tinciones con hematoxilina y eosina se analizaron al menos 3 animales y no menos de 10 campos por muestras codificadas pertenecientes a tejido colorrectal de semanas 16 y 35 de los diferentes tratamientos, controles y no tratadas e inducidas. Para el registro de diferencias morfológicas se empleó el programa ImageJ (versión 1.50p- NIH) y su plugins WandAutoMeasure.txt o solo el Cell Counter.

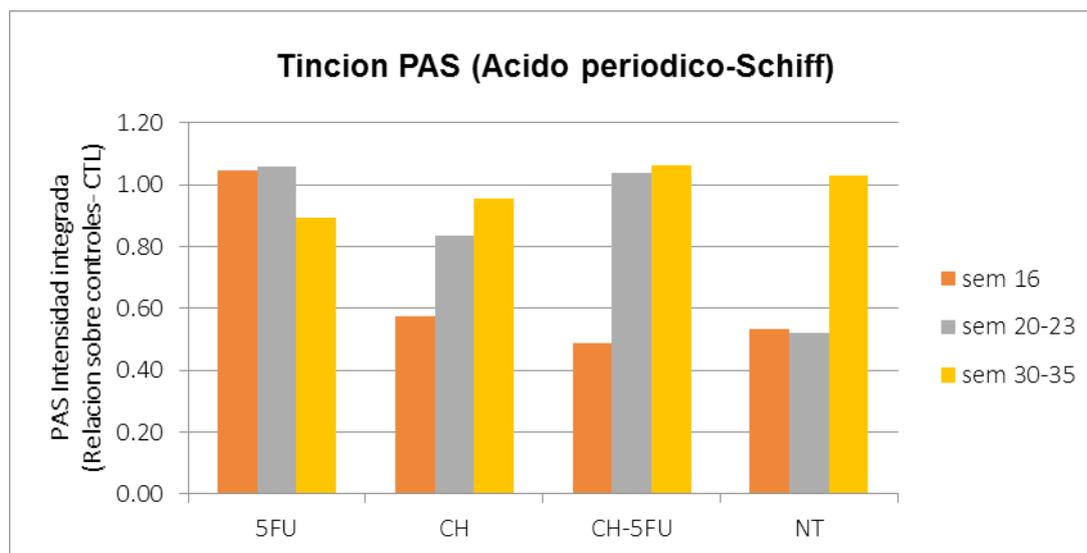
Se observaron cambios morfológicos calculados por funciones del programa ImageJ, como ser una mayor tinción con hematoxilina en tejidos tumorales concordante con tamaños mayores de núcleos en tejido tumoral (NC), y cambios en la longitud de las criptas respecto a controles (Lcr), por otro lado solo se registraron en forma cualitativa las siguientes características de las muestras enmascaradas por codificación: mayor número de células en submucosa y lamina propia (CM) que resultó ser mayor en muestras tumorales coincidente con descripciones de tejido tumoral y normal previos (Wargovich et al., 2010; Fleming et al., 2012). Asimismo, se observó según los tratamientos daño de la mucosa (DM), disrupción de criptas con orígenes bifurcados (CBi), hemorragias (He), y edemas (He) mientras que el tejido colónico normal de observan las criptas regulares con numerosas células Goblets productoras de mucina y ausencia de hemorragias, y mucosa y submucosa regular. Las características descriptivas y que variaban según los tratamientos correspondieron a longitud de criptas, mayor o menor número de células productoras de mucina en mucosa o submucosa y una mayor desorganización de criptas. Se empleó la clasificación y descripción morfológica de Wargovich et al. (2010), Pretlow y Pretlow (1998) y Fleming et al. (2012). Para comparar los diferentes tratamientos y la respuesta a estos se prosiguió con el uso de la siguiente clasificación y valoración (tabla 2). Según la valoración morfológica se observa que el tratamiento con cloroquina por sí misma demuestra una reversión de las características tumorales ( $P < 0.01$ ) demostrando una ventaja sobre los tratamientos con 5 fluorouracilo o en combinación 5 fluorouracilo con cloroquina, este reintegro de la morfología microscópica colorrectal se halla acompañada de cambios en la producción de mucinas/glucógeno/polisacáridos y una mayor longitud de las criptas así como rasgos de inflamación a nivel submucosa.

**TABLA 2.** Parámetros cuantitativos y cualitativos morfológicos e histológicos valorados para evaluar respuesta a los diferentes tratamientos del tejido adenomatoso inducido

Parámetro	Ctl	NT semana 16	NT semana 35	5FU semana 16	5FU semana 35	Cloroquina semana 16	Cloroquina semana 35	5FU+Clsemana 16	5FU+Clsemana 35
Criptas irregularidad	X	√	√	√	√	X	X	X	√
CBi	X	√	√	X	X	√	X	√	√
Lcr									
Mucosa irregularidad									
He	X	√	√	X	√	√	X	√	X
CM	X	√	√	√	√	√	X	√	√
NC	X	√	√	√	√	√	X	√	√
DM	X	√	√	√	√	√	X	√	√
Submucosa Irregularidad									
He	X	√	√	√	X	√	√	√	X
CM	X	√	√	√	√	√	X	√	√
NC	X	√	√	√	√	√	X	√	√
Valor de normalidad	100	0	0	22	22	11	89	11	22

La administración de cloroquina a partir de semana 11 del ensayo produjo una disminución significativa ( $P < 0.01$ ) de la incidencia de características histológicas tumorales e inflamación en semana 30 (Figura 3 y tabla 2), asimismo todos los tratamientos revierten el estado metabólico (Figuras 6) demostrado por medio de tinciones de carbohidratos y mucina con PAS; el reintegro de la morfología microscópica colorrectal se halla acompañada de cambios en la producción de mucinas y una mayor longitud de las criptas así como ciertos rasgos de inflamación a nivel submucosa (Figura 3, 6 e histograma 2).

**FIGURA 6.** Tinción ácido periódico Schiff: microfotografía de 40X de controles, no tratados semana 30 y tratados en semana 16, y 30-35



**HISTOGRAMA 2.** Intensidad integrada de las tinciones PAS empleando el Promedio de la Intensidad Integrada, "IntDen" (producto del área y el promedio de valores grises) en relación a controles, obtenidos por análisis con ImageJ 1.44c

El efecto de Cloroquina por sí misma como en combinaciones de tratamiento con 5-FU sobre el metabolismo asociado a la glucogénesis (tinciones histológicas con PAS) sugiere que es este metabolismo en el que se sustentan las células tumorales y se sugiere que puede ser blanco de la acción de este compuesto y otras drogas terapéuticas. Se conoce que la glucogénesis es aumentada en senescencia y envejecimiento en ratas (Seo *et al.*, 2008), así como es aumentada en células musculares tratadas con cloroquina. Esto permite concluir que revelar el aumento sucedido en semanas 30-35 en todas las muestras puede estar asociado al envejecimiento de esta cepa de ratones más que a los tratamientos. Por otro lado, no solo en este modelo cloroquina afecta activando Akt como ha sido reportado anteriormente sino que es asimismo estimuladora de diferentes vías río debajo de Akt entre ellas la fosforilación/inactivación de GSK3 y activación de la glucógeno sintetasa (GS) (Halaby *et al.*, 2013). En un metabolismo aumentado de glucogénesis donde además se ha reportado inhibición de factores inductores de apoptosis como Mcl-1 y Bim (Zhao *et al.*, 2007) donde además existe la inhibición de GSK3 lo cual agrega a un sistema de reparación del ADN disminuido (Yang *et al.*, 2011). En conclusión es factible que cloroquina se halla actuando específicamente sobre la vía que ha servido para el establecimiento tumoral en ratones Balb/c y que diferencia a células tumorales de normales, generando una retroalimentación negativa y debilitada o extenua al sistema. En consecuencia se sugiere confirmar si la acumulación de glucógeno genera en células hipoxia, estrés oxidativo, inducción a senescencia y afecta el desarrollo tumoral respecto al tejido normal (Ros y Schulze, 2012; Zois y Harris, 2016).

**En conclusión, hemos podido** demostrar que los tejidos del intestino distal inducidos por medio de AOM/DSS a adenomas tempranos revelan como en previos estudios a nivel ultraestructural un incremento del tamaño del núcleo, mitocondrias y retículo endoplasmático, así como un mayor número de vacuolas o lisosomas sugiriendo un rol de la autofagia en el establecimiento de cáncer colorrectal en el modelo murino al mismo tiempo se sugiere que la inducción química de tejido adenomatoso produce una reorganización metabólica que involucra la vía de GSK3/AKT y uso de glucosa a través de la vía de glucogénesis. Conjuntamente, se observó que, como previamente reportado, 5FU y cloroquina afectan el metabolismo tumoral especialmente al uso de la glucosa y producción de carbohidratos y mucinas (Won *et al.*, 2010; Cheong *et al.*, 2012) y favorecen la disminución de la fosforilación de GSK3

lo que debería disminuir la síntesis de glucógeno desde la glucosa (Zois y Harris, 2016) lo que puede justificar el valor terapéutico en el modelo químicamente inducido.

En un modelo inducido químicamente de cáncer colorrectal el tratamiento con cloroquina revierte significativamente las características de tejido normal ( $p < 0.05$ ) en comparación a los tratamientos de cloroquina y 5-FU o 5-FU; esto sugiere la necesidad de continuar los estudios con la evaluación bioquímica de estos resultados, análisis de expresión génica y evaluación del estado energético a través de niveles de carbohidratos y glucolípidos por medio de tinciones que los discriminen. Previamente, estudios en base a inclusión de tejido xenográfico y en cultivo celular permitieron determinar la importancia terapéutica de cloroquina (Liufeng Mei et al., 2015; Zhao et al., 2015; Zinn et al., 2013), y ya para el 2018 más de 15 ensayos clínicos fueron listados en el sitio web [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) que estudian los efectos de cloroquina por sí misma o en combinaciones y a diferentes niveles de las fases de estudios clínicos, sin embargo aún no existe protocolo terapéutico que incorpore a cloroquina al tratamiento tumoral o de poliposis.

Finalmente, se logró establecer un modelo preclínico para el estudio de cáncer colorrectal en la región que puede prestar servicios a otros grupos académicos en la evaluación del valor terapéutico de compuestos. El modelo de estudio preclínico permitió además evidenciar en parte vías y reorganización no solo durante el establecimiento del tejido adenomatoso sino durante los tratamientos y en respuesta a los compuestos empleados, conjuntamente, por las características inherentes al modelo de inducción, así como en el caso de otros modelos (cultivo celular, e implantes xenográficos) el modelo carece de homogeneidad y de poder predictivo sin embargo resulta ser un modelo poderoso en el análisis del desarrollo tumoral asociado a procesos inflamatorios, y de reorganización metabólica (Gengenbacher et al., 2017).

### Agradecimientos

El presente estudio se realizó por medio de un Proyecto de investigación científica, desarrollo e innovación tecnológica -PID UNER 6155- financiado por la Universidad Nacional de Entre Ríos. A la Dra. Martinez Marignac. Además queremos agradecer especialmente a la Lic. Natalia Romero y al Hospital San Roque de la ciudad de Paraná por la asistencia en técnicas de histología patológica.

### Bibliografía

- Ahmad, M. S. et al., 2000. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. *Gut*, Apr, 46(4), pp. 493-499.
- Chen, J., Huang, X.-F., Qiao, L. & Katsifis, A., 2011. Insulin caused drug resistance to oxaliplatin in colon cancer cell line HT29. *J Gastrointest Oncol*, Mar, 2(1), pp. 27-33.
- Cheong H, Chao Lu, Tullia Lindsten y Craig B. Thompson. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol*. 2012 Jul 10; 30(7): 10.1038/nbt.2285.
- Choi, J.-H. et al., 2012. Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *APMIS*, Jul, 120 (7), pp. 597-604.
- De Robertis M, E. Massi, ML. Poeta, S. Carotti, S. Morini, L. Cecchetelli, E. Signori y VM Fazio. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*. 2011; 10: 9.
- Fleming M, Ravula S., Tatishchev SF,\* y HL. Wang (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Sep; 3(3): 153-173.
- Gengenbacher N, Singhal M, Augustin HG (2017). Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nat Rev Cancer*. 2017 Dec; 17(12):751-765. doi: 10.1038/nrc.2017.92. Epub 2017 Oct 27.

- Halaby MJ, Kastein BK, Yang DQ. Chloroquine stimulates glucose uptake and glycogen synthase in muscle cells through activation of Akt. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 435, Issue 4, 14 June 2013, Pages 708-713.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*. 1996 Jun 12; 363(2):89-96.
- McCubrey JA, L S Steelman, F E Bertrand, N M Davis, S L Abrams, G Montalto, A B D'Assoro, M Libra, F Nicoletti, R Maestro, J Basecke, L Cocco, M Cervello y A M Martelli. Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/ $\beta$ -catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia* volume28, pages15-33 (2014).
- McManus EJ1, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J*. 2005 Apr 20; 24(8):1571-83. Epub 2005 Mar 24.
- Mei L, Yicheng Chen, Zhimeng Wang, Jian Wang, Jiali Wan Chunrong Yu, Xin Liu, y Wenhua Li. Synergistic anti-tumour effects of tetrandrine and chloroquine combination therapy in human cancer: a potential antagonistic role for p21. *Br J Pharmacol*. 2015 May; 172(9): 2232-2245.
- Pretlow TP, Pretlow TG. Putative preneoplastic changes identified by enzyme histochemical and immunohistochemical techniques. *J Histochem Cytochem*. 1998 May; 46(5):577-83.
- Ros S, y A. Schulze. Linking Glycogen and Senescence in Cancer Cells. *Cell Metabolism* 16, December 5, 2012:685-688.
- Sasaki, K. et al., 2012. Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine, an in vivo study.. *Anticancer Drugs*, Aug, 23(7), pp. 675-682.
- Seo YH1, Jung HJ, Shin HT, Kim YM, Yim H, Chung HY, Lim IK, Yoon G. Enhanced glycogenesis is involved in cellular senescence via GSK3/GS modulation. *Aging Cell*. 2008 Dec; 7(6):894-907. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00436.x. Epub 2008 Sep 8.
- Shakoori, A. Ougolkov, Zhi Wei Yu, B.Zhang, Mohammad H. Modarressi, Daniel D. Billadeau, Masayoshi Mai, Yutaka Takahashi, Toshinari Minamoto. Deregulated GSK3b activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (2005) 1365-1373.
- Shibuya N. Inoue K. Tanaka G. Akimoto K. Kubota K. Augmented Pentose Phosphate Pathway Plays Critical Roles in Colorectal Carcinomas. *Oncology* 2015; 88:309-319.
- Shimizu M, Y. Shirakami, H. Sakai, Seiji Adachi, Kazuya Hata, Y. Hirose, H. Tsurumi, T. Tanaka and H. Moriwak. Epigallocatechin Gallate Suppresses Azoxymethane-Induced Colonic Premalignant Lesions in Male C57BL/KsJ-db/db Mice. *Cancer Prev Res* 2008; 1:298-304.
- Simoniello MF et al., 2009. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bull Environ Contam Toxicol* (2009) 83:155-158.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar; 175(1):184-91.
- Wargovich MJ, Vondina R. Brown, y Jay Morris. Aberrant Crypt Foci: The Case for Inclusion as a Biomarker for Colon Cancer. *Cancers (Basel)*. 2010 Sep; 2(3): 1705-1716.
- Won HJ, Ha TK, Kwon SJ, Cho HY, Hur SJ, Baik HH, Suh SI, Ha E, Kim YH. (2010). Differential effects of 5-fluorouracil on glucose transport and expressions of glucose transporter proteins in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2010 Mar; 21(3):270-6.
- Wu, S., Wang, X., Chen, J. & Chen, Y., 2013. Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells.. *Biochem Biophys Res Commun*, May, 434(4), pp. 898-903.
- Yang ES, Somaira Nowsheen, Tong Wang, Dinesh K. Thotala, and Fen Xia. Glycogen synthase kinase  $\beta$  inhibition enhances repair of DNA double-strand breaks in irradiated hippocampal neurons. *Neuro Oncol*. 2011 May; 13(5): 459-470.

- Zhao, Rui-jie Sun, Xiao-yan Yang, Da-yu Liu, Da-peng Lei, Tong Jin, Xin-liang Pan. Chloroquine-Enhanced Efficacy of Cisplatin in the Treatment of Hypopharyngeal Carcinoma in Xenograft Mice. PLoS One. 2015; 10(4): e0126147.
- Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Dimascio LN, Ilkayeva O, Kelekar A, Reya T, Rathmell JC. Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. Mol Cell Biol. 2007 Jun; 27(12):4328-39. Epub 2007 Mar 19.
- Zhao, Y., Butler, E. B. & Tan, M., 2013. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics.. Cell Death Dis, Volume 4, p. e532.
- Zinn RL, EEGardner, I.Dobromilskaya, S. Murphy, L. Marchionni, C.L Hann, y C. M Rudin. Combination treatment with ABT-737 and chloroquine in preclinical models of small cell lung cancer. Mol Cancer. 2013; 12: 16.
- Zois C E. y Harris AL. (2016). Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. Journal of Molecular Medicine. February 2016, Volume 94, Issue 2, 137-154.

### **Indicadores de producción**

Gracias al presente financiamiento se logró establecer un modelo preclínico del estudio de cáncer colorrectal en la región que puede prestar servicios a otros grupos académicos en la evaluación del valor terapéutico de compuestos. Este proyecto se continua a través del PID UNER 6176 para validar el estudio de materiales bioactivos protectivos de radiaciones ionizantes, y a través del PICT 2014 2457 para el estudio del metabolismo tumoral y reposicionamiento de drogas como antitumorales con finalización en 2018. Al mismo tiempo, el bioterio ha logrado completar las etapas para ser registrado en los sistemas nacionales del Ministerio de Ciencia, Técnica e Innovación Productiva de la Nación.

Congresos y formación de RRHH (dirección becarios y nuevas líneas de investigación con financiamiento)

### **Formación de recursos humanos:**

#### *a. Dirección tesis:*

Doctorado: Bioquímico José Luis Favant. CICYTTP.

Doctorado: Lic. Luciano Anselmino. Lugar IIDEFAR-Max Planck CONICET.

Tesina graduación: codirección Lucas González, Universidad de Quilmes. 2015-2017.

#### *b. Dirección y codirección de becarios o estudiantes:*

Lic. Luciano Anselmino, Beca doctoral Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)-2015-2020.

Facundo Tognola, Beca incentivo a la Investigación, Consejo Interuniversitario (CIN 2015-2016).

Ridel Ernesto Beca iniciación a la investigación para estudiantes, PID 2014-6155 y 2017 6176. Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER 2017-2019).

Juliana Ascolani, Beca iniciación a la investigación para estudiantes, PID 2014-6155. Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER 2015-2016).

#### *c. Pasantes:*

Bioing. Ingird Spessotti.

Sr. Diego Bonadeo.

Lic. Leonardo Dandeu.

Durante los tres años del PID UNER 6155 se presentó y aprobó tesina:

Lic. Lucas González (finalizada 2017, UNQ).

Srta. Ana Clara Sánchez (en ejecución, UNLP).

**Congresos:**

Los resultados del presente proyecto fueron presentados desde el 2015 en 4 congresos y encuentros científicos y académicos, asimismo permitió el desarrollo de la línea de investigación que llevó al PICT 2014 2457 en ejecución y a convenio marco con la Universidad Adventista del Plata para la realización de estudios sobre líneas celulares, con la presente presentación a PICT 2018.

1. 4to Congreso Bioquímico del Litoral y III Congreso Bioquímico del NEA, 4<sup>th</sup> Congress in Biochemistry of the Littoral and III Biochemistry Congress of the NEA. "Ensayo de cloroquina y 5-fu sobre modelo de cáncer colorrectal en murinos". June, 2017, Paraná, Argentina.
2. 4to Congreso Bioquímico del Litoral y III Congreso Bioquímico del NEA, 4<sup>th</sup> Congress in Biochemistry of the Littoral and III Biochemistry Congress of the NEA. "Generación de un modelo murino en el estudio de la acción de sustancias bioactivas, scavengers de radiaciones ionizantes X". June 2017, Paraná, Argentina.
3. Workshop "Autophagy: Physiological and Pathological Roles" los días 23-24 de Noviembre, Santiago, Chile.
4. Joint Meeting of the Argentine Society of Clinical Investigation (SAIC), the Argentine Society of Immunology (SAI) and the Argentine Society of Experimental Pharmacology (SAFE). 16-19 November 2016. Mar del Plata, Argentina.
5. ETIF: 9º Congress and exhibition for pharmaceutical, biotechnological, veterinarian and cosmetics science and technology. October 18-20, 2016, Buenos Aires, Argentina. Poster.
6. Congreso Argentino de Gastroenterología y Endoscopia Digestiva, Disertante invitada a Mesa redonda: "la vuelta al mundo en 90 minutos", SM de Tucumán, 19 de setiembre, 2015.
7. Verónica Martínez Marignac, Juliana Ascolani, Facundo Tognola. Póster "Reposicionamiento de Drogas en el tratamiento de cáncer Colorrectal: asociado al PID 6155 en Jornadas INEXA 2015, 13 de noviembre, UNER Concordia, Entre Ríos.

**Asistencia a reuniones científicas y tecnológicas:**

1. VII Conferencia InterAmericana de Oncología. 5 y 6 de octubre, 2017 Buenos Aires.
2. Simposio Internacional Programa Raíces, Red científicos argentinos en el Noreste de Estados Unidos: "Ganando la guerra contra el cáncer". Ministerio de Ciencias, Tecnología e Innovación Productiva, Programa Raíces, 12-13 de mayo, 2016. Fac. Cs Exactas y Naturales, UBA. CABA.

**Publicaciones asociadas al proyecto:**

1. Anselmino L, M V Baglioni, MJ Rico, VR Rozados, O. G. Scharovsky, C. Fernández, VL Martínez-Marignac, M Menacho-Márquez (2017). Drug repositioning for colon cancer treatment: exploring the putative use of metformin and propranolol. *Medicina*, Vol.77 Supl. I: 308. ISSN 1669-9106
2. Martínez Marignac VL, E Ridel, I Spessotti, S M Richard, M Menacho Marquez (2017). Chloroquine: repositioning of a malaria drug for colorectal cancer treatment new data from a chemically induced intestinal tumorigenesis models. *Medicina*, Vol. 77 Supl. I: 309. ISSN 1669-9106
3. Pinedo-Carpio, Davidson D., Martínez Marignac Verónica L, Panasci Justin, Raquel Aloyz (2016). Adaptive metabolic rewiring to chronc SFK inhibition. *Oncotarget*, Mar 17, DOI: 10.18632/oncotarget.8146.
4. Richard SM; Martínez Marignac Verónica (2015). Sensitization to oxaliplatin in HCT116 and HT29 cell lines by metformin and ribavirin and differences in response to mitochondrial glutaminase inhibition. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* - ISSN 0973-1482. India. Mumbai. Medknow Publications.

**PID 6155**

**Denominación del Proyecto**

Ensayo terapéutico preclínico de Cloroquina y 5-fu en el tratamiento de cáncer colorrectal

**Directora del proyecto**

MARTINEZ MARGNAC, Verónica Lucrecia (director externo)

**Codirectores**

FAVANT, José Luis; PARAVANI, Enrique Valentín

**Unidad Ejecutora**

Facultad de Ingeniería

**Dependencia**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Área o disciplina científica**

Estudios sobre metabolismo tumoral

**Contacto**

[vmartinezmarignac@cicyttp.org.ar](mailto:vmartinezmarignac@cicyttp.org.ar) - [veromm99@gmail.com](mailto:veromm99@gmail.com)

**Integrantes del Proyecto**

Richard, Silvina Mariel

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

01/04/2015 y 30/09/2018

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° 359/18 (13-12-2018)

[<< VOLVER AL INICIO](#)