



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTITULO

**EFFECTO ANTINEOPLÁSICO DE UN EXTRACTO DE
SOLANUM DULCAMARAL. (BIRM®) SOBRE CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMARIO CANINO (*Canis Lupus Familiaris*)
CF41.Mg**

Autor:

Michelle Daniela Gallmeier Jaramillo

Profesor responsable:
Cristian Torres M.V, PhD

**Tesis para optar por al grado
de Magister en
Ciencias Animales y Veterinaria**

Santiago – Chile

2017

Informe de Aprobación

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por la (el) candidata (o) **Michelle Daniela Gallmeier Jaramillo**, con el título **Efecto antineoplásico de un extracto de *Solanum Dulcamara*L (BIRM®) sobre células de carcinoma mamario canino (*Canis Lupus Familiaris*) CF41.Mg** ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, en Examen de Defensa de tesis rendido el día 15 del mes mayo del año 2017.

Dr. Cristian Torres M.

Director de Tesis

.....

Dr. Andrónico Neira.

Comisión Evaluadora

.....

Dr. Federico Cifuentes.

Comisión Evaluadora

.....

Fuentes de Financiamiento y Departamento

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa BimRe, perteneciente al Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Biografía

Mi nombre es Michelle Daniela Gallmeier Jaramillo, de nacionalidad alemana/ecuatoriana. Nací el 4 de enero de 1985 en Quito. Desde muy temprana edad descubrí mi amor por la naturaleza, los animales y la ciencia. Es por esta razón que inicie mi preparación académica como estudiante de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile.

Estudí Medicina Veterinaria en la Universidad San Francisco de Quito y después trabajé en el hospital docente de especialidades de la misma Universidad.

Mi padre, Maximiliano Gallmeier, Enfermero de profesión, es mi mayor ejemplo de lucha y motivación para seguir adelante, como también ejemplo de solidaridad con las demás personas. Mi madre, Silvana Jaramillo, ha dedicado toda su vida a su familia y fiel pilar emocional del hogar. Mi hermana, Gabriela y mi hermano Maximiliano, mis mejores amigos, quienes siempre han sabido estar y apoyar mis decisiones.

Estoy casada con Miguel Eduardo Jarvis, quien me ha apoyado siempre en todas mis decisiones, es mi mejor amigo, colega y compañero de aventuras.

Desde este año tengo el mejor de mis regalos, mi hija Anahí Rafaela Jarvis Gallmeier, mi mayor bendición y el amor de mi vida.

Agradecimientos.

A Dios, por darme la paciencia de ser madre y terminar la Tesis

A mi profesor guía, Dr. Cristian Torres, por creer en mí. Sus conocimientos, su orientación y su manera de trabajar; además de su apoyo, dedicación, disposición y sobre todo la paciencia que han sido fundamentales para mi formación como profesional.

A mi fiel compañero de vida y mejor amigo Miguel Jervis, por estar siempre ahí alentándome en cada momento y por creer en mí.

A mis correctores, Dr. Andrónico Neira y Dr. Federico Cifuentes por su ayuda, consejos, comprensión y su excelente disponibilidad.

Al Dr. Juan Ignacio Arias, por ayudarme y facilitar el avance de mi tesis en diferentes ámbitos.

A mi amiga, Pamela Cruz por toda la ayuda y conocimientos que me entregó con mucha dedicación, paciencia y cariño.

A cada uno de los que forman parte del laboratorio BiMre, en especial a mis compañeros de laboratorio, Fernando Reyes, Consuelo Serrano, Sofía Guzmán, Alejandra Romo y María Paz Iturriaga, porque más allá de su amistad supieron ayudarme en cada proceso de mi tesis, alentándome y apoyándome en todo.

A mi hija Anahí, por ser mi inspiración desde el momento que supe que venía en camino y por acompañarme en todos mis experimentos

A mi compañero de vida y mejor amigo, Miguel, que ha sabido ayudarme, apoyarme y darme fuerzas

A mi tío Werner Gallmeier, por apoyarme tanto económica como emocionalmente para cumplir este sueño

Tabla de Contenidos

Biografía	4
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
NEOPLASIA	12
NEOPLASIA MAMARIA	12
CARCINOMA MAMARIO CANINO (CMC)	13
FACTORES DE RIESGO.....	13
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	14
DIAGNÓSTICO.	15
Tratamientos para el Carcinoma Mamario Canino.....	18
Fitoterapia – Solanum dulcamaraL.....	22
Extracto de Solanum dulcamaraL (BIRM).	23
Actividad del BIRM.....	24
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Extracto derivado de Solanum DulcamaraL.....	27
Cultivo celular	27
OBJETIVO 1	28
Ensayo de proliferación celular	28
Estudio de ciclo celular.....	28
Ensayo Clonogénico.	29
OBJETIVO 2	30
Determinación de Apoptosis.....	30
OBJETIVO 3	31
Ensayos de migración e invasión celular	31
Ensayo “scratch plate”	31
Ensayo invasión celular	31

Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
Objetivo 1	33
Solanum dulcamaraL. (BIRM) reduce la proliferación de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg	33
Objetivo 2	36
Solanum dulcamaraL. (BIRM) induce apoptosis en células de carcinoma mamario canino CF41.Mg	36
Objetivo 3	38
Solanum dulcamaraL. (BIRM) genera una reducción en la capacidad de migración e invasión de células de carcinoma mamario canino CF41. Mg.....	38
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

La neoplasia mamaria es la patología tumoral de mayor frecuencia de presentación en la hembra canina. Dado que las terapias disponibles son limitadas, no selectivas y pueden desencadenar potenciales efectos adversos, se hace necesario estudiar nuevas alternativas de tratamiento antitumoral más inocuas e idealmente selectivas. El extracto comercial derivado de la planta *Solanum dulcamara L* -BIRM- ha sido usado empíricamente para una amplia variedad de enfermedades, incluyendo cáncer. Sin embargo, hay escasos estudios que revelan su potencial antitumoral. BIRM induce un efecto antiproliferativo y pro-apoptótico sobre células de carcinoma de próstata humana, especialmente en células andrógeno-dependientes, donde disminuye la expresión y promueve la degradación del receptor de andrógenos (RA). Ya que sobre el 80% de las neoplasias mamarias caninas de alto grado histológico exhiben la presencia del RA, pareció interesante analizar si BIRM induce también efectos antiproliferativos sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, línea celular representativa de tumores mamarios de alto grado. Con este objeto, se estudió proliferación, capacidad clonogénica y potencial citotóxico de dichas células en presencia de BIRM. Complementariamente, se analizó el efecto del extracto sobre la habilidad de estas células para migrar e invadir.

BIRM disminuyó la proliferación celular y capacidad clonogénica de las células estudiadas, efectos que fueron dependientes de la concentración. Afín a estos resultados, el extracto indujo un arresto en G0/G1. BIRM no es selectivo, dado que disminuyó también la proliferación de células no tumorales MDCK. Adicionalmente, BIRM indujo apoptosis y una disminución significativa en la migración e invasión de células CF41.Mg.

Estos resultados demuestran que BIRM, induce un efecto antiproliferativo y anti-invasivo sobre células de carcinoma mamario canino y sustenta la idea que este representaría un potencial agente terapéutico para el manejo del cáncer mamario canino.

Palabras clave: carcinoma mamario canino, *Solanum dulcamaraL.*, BIRM, células CF41.Mg

ABSTRACT

Mammary tumors are the most frequent oncologic pathology in the female dog. Since available therapies are limited, non-selective and may trigger potential adverse effects, it's becomes necessary to study new, harmless and ideally selective antitumor treatment alternatives. Commercial herbal extract derived from *Solanum Dulcamara*L -BIRM- has been used empirically for a wide variety of diseases, including cancer. However, there are few studies that reveal its antitumor potential. BIRM induces an antiproliferative and pro-apoptotic effect on human prostate carcinoma cells, especially in androgen-dependent cells, where it decreases expression and promotes androgen receptor (AR) degradation. Since over 80% of high histological grade canine mammary tumors exhibit the presence of RA, it appeared interesting to analyze whether BIRM also induces antiproliferative effects on CF41.Mg canine mammary carcinoma cells, a cell line representative of high grade mammary tumors. For this purpose, proliferation, clonogenic capacity and potential cytotoxicity were studied in the presence of BIRM. In addition, the effect of the extract on the ability of CF41.Mg cells to migrate and invade was analyzed.

BIRM decreased cell proliferation and clonogenic ability of the cells studied, effects that were concentration-dependent. In parallel, the extract induced an arrest in G0/G1. BIRM is not selective, since the proliferation of non-tumoral MDCK cells also decreased in presence of herbal extract. Moreover, BIRM induced apoptosis and a significant decrease in the migration and invasion of CF41.Mg. cells.

These results demonstrate that BIRM induces an antiproliferative and anti-invasive effect on canine mammary carcinoma cells and, supports the idea that it would represent a potential new therapeutic agent for the management of canine mammary cancer.

Keywords: canine mammary carcinoma, *Solanum dulcamara* L., BIRM, CF41.Mg cells

INTRODUCCIÓN

El carcinoma mamario canino (CMC) es una de las neoplasias más comunes en hembras, especialmente en aquellas sin esterilizar (Merlo et al. 2008), representando cerca del 42% de todos los tumores observados en caninos (Sorenmo, 2003). Sin embargo, se han reportado variaciones en la tasa de incidencia dependiendo del origen del estudio y de las características de la población analizada (Sorenmo *et al.*, 2013). Existen varios factores de riesgo identificados para el desarrollo de esta patología, incluyendo la edad, exposición a hormonas esteroidales (estradiol/progesterona), raza, y en menor medida la dieta y condición corporal (Sorenmo *et al.*, 2013).

Las estrategias terapéuticas para el CMC incluyen la cirugía y la quimioterapia (Henry y Higginbotham. 2010), no obstante estas carecen de selectividad neoplásica y pueden inducir efectos adversos. Es así que, el estudio y potencial incorporación de terapias complementarias toma importancia, ya que podrían generar un mejor control de la enfermedad mejorando la calidad de vida de los pacientes (Hack *et al.*, 2015).

La fitoterapia es un tipo de terapia complementaria, en la cual se usan plantas o extractos derivados de ellas para el tratamiento de algunas patologías como el cáncer (Vickers y Cassileth 2006). La planta *Solanum dulcamara L.* se ha utilizado para tratar ciertos tumores desde el tiempo de Galeno (cerca de 180 DC), basado básicamente en experiencias que han promovido su uso (Kupchan *et al.*, 1965). Sin embargo, es escasa la investigación que se ha realizado al respecto. Esta planta pertenece a la familia de las solanáceas y se localiza en zonas templadas de Asia, Sudamérica y Europa (Knapp 2013).

En la actualidad, un extracto de esta planta (BIRM®) ha mostrado efectos citotóxicos sobre células de cáncer de próstata humano, donde se ha observado una inhibición en la proliferación celular de hasta un 50% (Araki *et al.*, 2006; Devendra *et al.*, 2003). En Medicina Veterinaria no existe información con respecto a los potenciales efectos antitumorales que podría ejercer este extracto. Dada la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento para el CMC, se vuelve interesante estudiar si BIRM ejerce algún efecto antineoplásico *in vitro* sobre

células de CMC, de manera de sustentar preclínicamente futuros estudios en perros con neoplasia mamaria.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

NEOPLASIA.

En el organismo eucarionte normal, los tejidos logran un equilibrio en su crecimiento. Esto es definido como el punto en el cual la producción de nuevas células es igual a la tasa de mortalidad de ellas, de modo que no hay ganancia neta de tejido (Kitchell y Dervisis, 2010).

En el caso de los tumores, la proliferación celular supera la necesidad fisiológica, denominándose neoplasia al crecimiento celular descontrolado (Kusewitt, 2012). Estas células pueden presentar fallas en uno o varios mecanismos de control del ciclo celular, y su proceso de división se influencia por estímulos externos de crecimiento, los cuales se vuelven insensibles a señales pro-apoptóticas. Finalmente, se genera un desequilibrio entre la división y muerte celular, desarrollándose un tumor (Kusewitt, 2012).

Cuando el crecimiento tumoral ocurre de una forma localmente confinada, la neoplasia es benigna. Por otro lado, se considera a una neoplasia maligna (cáncer) cuando sus células invaden tejido normal adyacente y/o colonizan con éxito localizaciones orgánicas distantes a través del fenómeno metastásico (Kitchell y Dervisis, 2010).

NEOPLASIA MAMARIA

La glándula mamaria, es una glándula sudorípara modificada túbulo-alveolar compuesta, que se divide en lóbulos por el tejido conectivo interlobular. El tejido mamario puede sufrir alteraciones a nivel celular debido a factores externos o internos lo que llevaría a desarrollar una neoplasia, siendo esta última, una de las patologías más frecuentes en hembras caninas sin esterilizar (Sleeckx *et al.*, 2011).

CARCINOMA MAMARIO CANINO (CMC)

Las neoplasias malignas de origen epitelial son denominadas como carcinomas (Kusewitt, 2012). Dentro de los carcinomas de la glándula mamaria podemos encontrar distintos tipos histológicos como carcinomas in situ, carcinomas simples, carcinomas micropapilares, carcinomas sólidos, entre otros (Goldschmidt *et al.*, 2011).

La tumorigénesis de la glándula mamaria se asocia probablemente a alteraciones genéticas, muchas de ellas permanecen desconocidas hasta la actualidad. La determinación del genoma canino completo debería facilitar la apertura de estas nuevas vías (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). Hasta el momento no se ha identificado una mutación común en animales con neoplasia mamaria, sin embargo, se han publicado diversos artículos que discuten sobre este punto. Al respecto, el gen supresor de tumores p53 es el más frecuentemente mutado en neoplasias humanas; este también se ha estudiado en perros con esta enfermedad, habiéndose publicado resultados divergentes en relación a sobre-expresión y a frecuencia de mutaciones. Algunos estudios han encontrado una incidencia de mutaciones en p53, con rangos variables de presentación (Sorenmo, 2003; Rao *et al.*, 2008). Se ha descrito que el oncogén c-erbB2 se presenta sobre-expresado en la mayoría de las neoplasias mamarias malignas estudiadas (Dutra *et al.*, 2004). En pocos casos se ha documentado, además, mutaciones en el gen supresor de tumores BCRA1, responsable en parte de los tumores de mama humanos de carácter hereditario (Sorenmo, 2003; Perez-Alenza *et al.*, 2010).

FACTORES DE RIESGO

Los principales factores de riesgo que se han identificado para el desarrollo del CMC son: la edad, la exposición a hormonas esteroidales (estradiol y progesterona principalmente) y la raza. En menor medida, la dieta y condición corporal, siendo la obesidad un factor de riesgo predisponente y coadyuvante para esta enfermedad (Sorenmo *et al.*, 2013; Sleeckx *et al.*, 2011).

El estado reproductivo es un factor de riesgo importante para el desarrollo de CMC, principalmente la exposición a hormonas ováricas en los primeros 2 años de vida (Kristiansen *et al.*, 2013), lo que se comprueba con la evidencia de que en aquellas hembras sometidas a OVH a una edad temprana, especialmente antes del primer celo, se les reduce significativamente el riesgo de presentar una neoplasia mamaria posterior (Kristiansen *et al.*, 2013).

El tratamiento para prevenir el estro en base a progestágenos (acetato de megestrol o medroxiprogesterona) aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad tumoral mamaria (Sorenmo, 2003). Los mecanismos involucrados en esta inducción incluyen una regulación positiva de progesterona sobre la síntesis de hormona del crecimiento (GH) por parte de la glándula. A su vez GH estimula directa e indirectamente el crecimiento del tejido mamario a través del factor de crecimiento insulínico-I (IGF-I) (Van Garderen y Schalken, 2002). IGF-I regula la proliferación celular normal, así como los procesos de transformación maligna, estando este factor de crecimiento involucrado en el establecimiento de diferentes tipos de tumores, al interferir con la apoptosis y actuar como un potente agente mitogénico (Van Garderen y Schalken, 2002).

Su frecuencia de presentación es mayor en perros de raza pura (Springer Spaniel, Cocker Spaniel, Ovejero Alemán, Maltes, Yorkshire Terrier, entre otras) que en perros mestizos, además que, en ejemplares de talla baja hay mayor ocurrencia (Salas *et al.*, 2015). Los casos observados ocurren en edades avanzadas (7 a 13 años) (Sorenmo, 2003), siendo poco común en perras menores de 5 años (Schneider *et al.*, 1969).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La mayoría de las perras que presentan neoplasias mamarias están en buen estado de salud al inicio y durante la enfermedad (Sorenmo, 2003). Los hallazgos de estas neoplasias se dan principalmente en consultas de rutina, especialmente en animales sin esterilizar (Sleeckx *et al.*, 2011).

Se ha informado que estas neoplasias se presentan más en la glándula mamaria inguinal (60%) que en las glándulas mamarias abdominales (27%)

(Shafiee *et al.*, 2013), lo cual no tiene valor pronóstico. Los signos clínicos asociados son poco específicos, presentándose fatiga, letargo, decaimiento, pérdida de peso, linfodema, cojera, entre otros (Sorenmo, 2003).

La severidad y pronóstico de esta patología está dado por su estadificación clínica-patológica, grado histológico, tamaño del tumor primario, presencia de ulceración tumoral y peritumoral, entre otros (Goldschmidt *et al.*, 2011).

DIAGNÓSTICO.

Existen varias herramientas que permiten alcanzar un correcto diagnóstico de CMC.

Historia clínica y examen físico. Como ya se describió, la mayoría de los pacientes con CMC en las primeras etapas de su desarrollo están aparentemente sanos. Los tumores mamarios suelen ser fáciles de detectar mediante un examen físico de rutina. Idealmente, las glándulas mamarias se deben examinar con el paciente en decúbito dorsal. Cada glándula mamaria necesita ser completamente palpada e inspeccionada. Los CMC generalmente corresponden a nódulos firmes y bien demarcados que varían en diámetro desde unos pocos milímetros hasta 10-20 cm (Sorenmo, 2003). Los principales diagnósticos diferenciales son mastitis o dermatitis severas, donde la glándula mamaria puede aparecer edematosa, tumefacta, cálida y dolorosa (Sorenmo *et al.*, 2011).

Imagenología. Los CMC tienen una gran capacidad invasiva y por lo tanto de inducir metástasis; es así que exámenes imagenológicos como radiografías, ecografía y tomografía computarizada proporcionarán una visión más global de tórax y/o abdomen para así poder definir el grado de avance de la enfermedad. Su capacidad de repetición y la rapidez con la que se pueden realizar, los convierten en la forma más adecuada para detectar la presencia de metástasis pulmonar y de otras localizaciones anatómicas (Forrest y Kraft, 2012).

Citología-Histopatología. Con la técnica de aspiración con aguja fina para citología se puede realizar una aproximación diagnóstica, pues esta técnica permite fundamentalmente diferenciar procesos inflamatorios de aquellos de origen neoplásico (Sorenmo *et al.*, 2013). Así, la citología en el contexto de la

patología mamaria, no es diagnóstica. No obstante, la citología es una buena herramienta para definir metástasis linfonodular (Sorenmo *et al.*, 2013).

La prueba estándar de oro para el diagnóstico neoplásico es la biopsia e histopatología. La determinación exacta del tipo de neoplasia y el grado histológico se determina a través de la histopatología, lo cual definirá el régimen terapéutico más apropiado para cada paciente con CMC. En la mayoría de los casos, se requiere de sedación o anestesia local/general y, de la toma de varias muestras de manera de realizar un muestreo representativo (Sorenmo *et al.*, 2013).

En el año 2013, se estableció que el método de Elston y Ellis, utilizado en patología mamaria humana, era confiable para la clasificación histopatológica de las neoplasias mamarias en caninos (Tavasoly *et al.*, 2013). El método de Elston y Ellis, se basa en la evaluación de tres características morfológicas, (1) grado de diferenciación glandular evaluado por la formación túbulos mamarios; (2) pleomorfismo nuclear y (3) actividad mitótica. A cada parámetro se le asigna un puntaje de 1-3. Las puntuaciones de los tres componentes se suman para definir finalmente el grado histológico (Tavasoly *et al.*, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Sistema de graduación histológica para carcinomas mamarios caninos y felinos (Tavasoly *et al.*, 2013).

CARACTERÍSTICAS	Cuantificación		
1. <u>Formación de túbulos</u> : un punto si el corte histológico tiene formación de túbulos bien marcados; tres puntos si hay pocos o no hay túbulos	1	2	3
2. <u>Hipercromatismo y mitosis</u> : un punto si se observa ocasionalmente un núcleo hipercromático o una mitosis por campo de alto aumento; tres puntos si el número es más alto	1	2	3
3. <u>Núcleos de tamaño y forma irregular</u> : un punto si los núcleos son uniformes en tamaño forma y tinción; tres puntos si el pleomorfismo es marcado	1	2	3

<u>Cuantificación total</u>	<u>Grado de malignidad</u>
3-5	I
6-7	II
8-9	III

La estadificación clínica-patológica definirá finalmente la extensión del tumor, permitiendo establecer un tratamiento y pronóstico. Para tumores mamarios caninos, esta se realiza según lo propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual establece cinco estadios clínicos a través del sistema TNM, donde se considera el tamaño del tumor primario (T), la presencia o ausencia de metástasis a linfonodos regionales (N) y a distancia (M), según lo descrito en las Tablas 2 y 3 (Sorenmo *et al.*, 2011).

Tablas 2 y 3. Estadificación clínica-patológica de la neoplasia mamaria canina. Clasificación modificada de la clasificación de neoplasias de la OMS (citado por Sorenmo *et al.*, 2011).

T: tumor primario
T ₁ < 3 cm de diámetro máximo
T ₂ 3 – 5 cm de diámetro máximo
T ₃ > 5 cm de diámetro máximo
N: linfonodos regionales
N ₀ no metástasis histológica o citológicamente
N ₁ metástasis histológica o citológicamente
M: metástasis a distancia
M ₀ no metástasis
M ₁ metástasis

Estadío clínico			
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	cualquier T	N ₁	M ₀
V	cualquier T	cualquier N	M ₁

Tratamientos para el Carcinoma Mamario Canino.

La cirugía es la principal forma de tratamiento para perros con CMC (Muhammadnejad *et al.*, 2012), ya que permite la toma de muestras para el posterior examen histopatológico y aumenta el tiempo de supervivencia como también la calidad de vida del paciente. La cirugía puede ser curativa en algunos casos, como en tumores localizados sin evidencia de metástasis. (Cassali *et al.*, 2011). A pesar que en tumores mamarios malignos el tratamiento de elección sigue siendo la cirugía (Sorenmo *et al.*, 2013), la tasa de supervivencia posterior a esta es baja debido a recurrencia local y metástasis temprana (Muhammadnejad *et al.*, 2012).

Pese a que hay información limitada acerca de su real eficacia, la quimioterapia es utilizada como terapia adyuvante en algunos casos de neoplasias mamarias caninas. Este tipo de drogas son indicadas en presencia de metástasis a distancia, en casos de alta probabilidad de diseminación y cuando a través del diagnóstico histopatológico se evidencia la presencia de algunos tipos de neoplasias malignas como carcinomas sólidos, carcinoma micropapilar, carcinoma anaplásico y carcinosarcoma. Dentro de los protocolos propuestos en la literatura se incluyen drogas como Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Carboplatino o Mitoxantrona, sin embargo, se requieren más estudios para determinar protocolos eficientes para el tratamiento de esta patología (Cassali *et al.*, 2011).

Una alternativa estudiada recientemente, que podría ser considerada para el tratamiento y control en hembras caninas con neoplasias mamarias avanzadas, corresponde a los inhibidores de COX-2 (Cassali *et al.*, 2011). COX-2 es una enzima inducible que cataliza la síntesis de prostaglandinas propio de los

procesos inflamatorios y que se encuentra sobre-expresada en neoplasias mamarias malignas (Kusewitt, 2012).

Como ya fue mencionado, los tumores mamarios en perros tienen una influencia hormonal en su desarrollo, pues expresan receptores hormonales como el de estradiol tipo α (ER α) y progesterona (PR) en una gran proporción de estos (Queiroga *et al.*, 2011). En este contexto, la terapia hormonal podría ser una alternativa de tratamiento como lo es en medicina humana, sin embargo, son necesarios nuevos estudios para determinar su utilidad y eficacia (Cassali *et al.*, 2011).

Debido al efecto protector que tiene la OVH efectuada a una edad temprana para el desarrollo de esta enfermedad, se han realizado numerosos estudios para evaluar si la OVH tiene utilidad como terapia adyuvante, al momento de la cirugía. Al respecto, no se ha evidenciado un efecto protector de la OVH en la aparición de nuevos tumores, metástasis o aumento de sobrevida de estos pacientes (Cassali *et al.*, 2011). Sin embargo, en un estudio reciente se mostró una reducción significativa en el riesgo de desarrollo de nuevos tumores en hembras con tumores mamarios benignos que se sometieron en forma paralela a resección tumoral y OVH (Kristiansen *et al.*, 2013).

Los tratamientos utilizados en neoplasias mamarias malignas como la quimioterapia, no son muy efectivos en prevenir la recurrencia tumoral y en aumentar efectivamente el tiempo de sobrevida (Sorenmo *et al.*, 2013). Numerosas son las causas que impiden el éxito de la quimioterapia, debido a la habilidad que tiene el cáncer para volverse resistente a diferentes tipos de drogas. Los tratamientos eliminan gran parte de las células neoplásicas, no obstante, algunas de estas pueden resistir y crecer nuevamente. Esta habilidad de sobrevivir a la quimioterapia es explicada en parte por una alta capacidad de excreción de drogas, capacidad aumentada de reparación, tolerancia elevada al daño del ADN, alto potencial anti-apoptótico, permeabilidad disminuida y desactivación enzimática (Król *et al.*, 2010).

Es importante considerar de manera adicional que, la terapia para CMC involucra alternativas terapéuticas no selectivas (Sorenmo *et al.*, 2013) por lo que,

resulta atractivo analizar nuevas drogas que tengan un potencial efecto antineoplásico y que idealmente sean inocuas sobre células normales.

Factores Pronósticos

El pronóstico es un término médico que busca predecir como progresará la enfermedad desde el momento del diagnóstico (Zaidan Dagli, 2008). En perros con neoplasias de glándula mamaria se han identificado variados factores pronósticos como edad, tamaño tumoral, estadio clínico, tipo histopatológico, grado histológico, expresión de ER y PR, expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal, proliferación celular, densidad vascular, expresión de moléculas de adhesión y alteraciones genéticas moleculares (Sorenmo *et al.*, 2011).

Los tumores que miden menos de 3 cm de diámetro se asocian con un pronóstico significativamente mejor que aquellos cuyos diámetros son mayores, por lo tanto, siempre se debe considerar este parámetro en la evaluación de animales con cáncer mamario, especialmente cuando se hace necesario decidir el uso de terapia adicional a la cirugía. El estadio de la enfermedad usando el sistema de estadificación de la OMS brinda importante información pronostica. Ejemplares con la patología tumoral mamaria en estadios avanzados tienen el peor pronóstico (estadios IV y V) (Sorenmo *et al.*, 2011).

El tipo tumoral y el grado histológico tienen relevancia pronostica como ya se ha mencionado anteriormente; de acuerdo a la clasificación histológica de la OMS, la conducta biológica de los tumores depende en parte de la diferenciación histológica. La graduación histológica es un indicador objetivo de diferenciación celular y tisular de las neoplasias malignas de la glándula mamaria, por lo tanto, tiene valor pronóstico de malignidad similar a aquel que posee el análisis del antígeno de proliferación celular Ki-67 (Sorenmo *et al.*, 2011).

El desarrollo de un gran número de tumores mamarios caninos parece ser dependiente de estrógenos ya que muchos de ellos expresan niveles ostensibles del receptor de estradiol tipo alfa (RE α). Existe una relación inversa entre la expresión de RE α y la diferenciación histológica, y entre esta última y el índice de

proliferación nuclear. Así, los tumores benignos y bien diferenciados son RE α positivos, mientras que los tumores mal diferenciados y anaplásicos tienden a ser RE α negativos. Al parecer, los tumores cuyos comportamientos biológicos son muy agresivos no expresan RE α . Además de la información pronóstica, la expresión del RE α permite predecir la respuesta a una terapia hormonal (Illera *et al.*, 2006). Así, pacientes portadores de tumores ER α positivos podrán beneficiarse con la ablación estrogénica o con el bloqueo del ER α . En el caso de humanos, la decisión de implementar una terapia hormonal en mujeres con cáncer mamario depende de la expresión de ER α . Por otra parte, la expresión de PR, otro factor de utilidad en el pronóstico, se ha asociado a períodos de sobrevida más largos (Sorenmo, 2003).

El receptor 2 del factor de crecimiento epidermal (EGF) (EGFR2 o c-erbB2 o HER2/neu) es una glicoproteína localizada en la membrana plasmática que aparece sobre-expresada en alrededor de un 30% de los carcinomas mamarios humanos (Treeck *et al.*, 2003). Diversos grupos de investigación han detectado la sobre-expresión proteica y génica de c-erbB2 en carcinomas mamarios caninos, siendo estos resultados similares a aquellos obtenidos en humanos, en los que la sobre-expresión de HER2/neu se asocia a un mal pronóstico (Martin de las Mulas *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2004).

Recientes estudios de expresión génica en neoplasias mamarias humanas han identificado 5 subtipos moleculares de carcinomas de mama, los cuales difieren tanto patológica como clínicamente: grupo luminal A, luminal B, sobre-expresión de HER-2, tipo basal y tipo glándula mamaria normal. Los subtipos luminal A y B se basan en la expresión de RE α , mientras que los subtipos basales se caracterizan por la ausencia de los RE α y la presencia de marcadores basales. Los tumores clasificados como luminal A, positivos para ER α y negativos para HER2, se asocian frecuentemente con el tipo histológico complejo, poseen un grado histológico bajo, son de baja invasividad y tienen una baja tasa de proliferación celular. Aquellos tumores clasificados en los subtipos basal y sobre-expresadores de HER2, se asociaron con los tipos histológicos simple y carcinosarcoma, poseen un grado histológico alto, presentan invasión linfo-vascular y

tienen una alta tasa proliferativa, características concordantes con neoplasias mamarias de carácter basal y altamente malignas (Gama *et al.*, 2008).

La pérdida en tumores mamarios malignos de la expresión de moléculas de adhesión, tales como e-cadherina, se ha asociado con tiempos de supervivencia menores. La reducción en la expresión de e-cadherina se ha relacionado a una localización anómala de connexinas, proteínas que forman uniones intercelulares tipo “gap junctions”, que normalmente se localizan en las membranas plasmáticas. Los procesos de carcinogénesis y proliferación celular se asocian a la alteración de estas comunicaciones intercelulares (Zaidan Dagli, 2008).

Fitoterapia – *Solanum dulcamara*L.

La Fitoterapia es uno de los tratamientos más antiguos del mundo y ha sido practicada en todas las culturas, inicialmente basada en tradiciones locales y en la experiencia (Klose *et al.*, 2014). La denominada fitoterapia moderna, sigue los principios de la medicina basada en la evidencia, lo que implica demostrar su potencial utilidad terapéutica mediante ensayos preclínicos y clínicos, a través del método científico. Así, los procesos de elaboración están estandarizados, sus indicaciones son definidas con precisión y la relación entre dosis y efecto terapéutico se estudia farmacológicamente (Klose *et al.*, 2014).

Existen varios estudios que sustentan el uso de la fitoterapia en diferentes patologías en animales y humanos; por ejemplo el uso del Ajo (*Allium sativum*) en hiperlipidemias (Ackermann *et al.*, 2001). En cáncer de pulmón, existen estudios en la disminución de nódulos metastásicos hasta un 26.7% después de un tratamiento con semillas de uva (*Vitis vinífera*) (Martínez *et al.*, 2005). El uso de Aloe (Aloe vera) en fibrosarcomas ha demostrado promover la apoptosis gracias a un carbohidrato conocido como acemannan, el cual junto a interferón α , inducen citotoxicidad (Harris *et al.*, 1991).

Por otro lado, extractos de *Solanum nigrum* han demostrado tener efectos sobre la fisión mitocondrial de células de cáncer de mama humano y de esta manera ayudar a disminuir la metástasis, proliferación y migración de estas células (Vickers y Cassileth, 2006). Es así que, la fitoterapia puede ampliar la gama de

tratamientos contra neoplasias, ya que algunas drogas derivadas de plantas exhiben propiedades antiinflamatorias, anti proliferativas, analgésicas y antioxidantes (Robinson, 2013), efectos que podrían ser beneficiosos en pacientes oncológicos. La principal ventaja de utilizar este tipo de tratamiento es la baja probabilidad de gatillar efectos tóxicos secundarios.

Extracto de *Solanum dulcamara* L (BIRM).

Las plantas del género *Solanum* tienen aproximadamente 1.400 especies las cuales se encuentran distribuidas en diversas regiones geográficas con climas temperados y tropicales. Sin embargo, la mayor diversidad de grupos y especies de *Solanum* se encuentran en la Amazonía (Knapp, 2013). Es así que, la tribu amazónica Shuar, localizada fundamentalmente en Ecuador, ha usado esta planta ancestralmente para tratar una gran diversidad de dolencias (Devendra *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Mutlu *et al.*, (2012), se describe que el extracto derivado de la planta *Solanum dulcamara* L. -BIRM®- ha sido utilizada para tratar ciertas patologías cutáneas, neoplasias, artritis, colitis ulcerativa, inflamaciones oculares y neumonías, entre otras. BIRM se comercializa como un extracto acuoso de raíces secas de *Solanum dulcamara* L, cultivadas en la amazonia ecuatoriana. Entre sus propiedades físicas esta su color marrón verdoso con olor agridulce, siendo termoestable a 100°C y resistente a la digestión enzimática con proteinasa K (Devendra *et al.*, 2003).

Este extracto, se encuentra patentado en la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos de América como un suplemento nutricional de origen herbal de uso medicinal (USPOT, serial N° 78488638). La marca BIRM se presenta en la categoría de productos farmacéuticos y alimenticios de base. BIRM es ampliamente usado en el hemisferio occidental principalmente como un potenciador inmune de origen herbal, comercializado por Ecu-BIRM Inc., Quito, EC (sitio web [www.ecuabirm.com]). El producto se vende como medicina complementaria para patologías tales como SIDA, Lupus eritematoso, artritis y

variados cánceres refractarios a la terapia convencional (Shamaladevi *et al.*, 2016).

Se ha descrito que BIRM tiene propiedades antineoplásicas tanto *in vitro* como *in vivo*, específicamente sobre células de cáncer de próstata humano. Estos efectos incluyen una capacidad antiproliferativa, pro-apoptótica y anti-invasiva (Devendra *et al.*, 2003; Shamaladevi *et al.*, 2016).

Actividad del BIRM

BIRM ha mostrado capacidad antiproliferativa y citotóxica sobre distintos tipos de células de carcinoma de próstata humana (Devendra *et al.*, 2003). Sin embargo, no existen estudios sobre el potencial efecto de este compuesto sobre células tumorales de otro origen, lo que incluye células de carcinoma mamario canino.

En el estudio de Devendra *et al.*, (2003), se demostró que BIRM induce un efecto antiproliferativo sobre células de carcinoma de próstata humana andrógeno-dependientes e independientes, generando arresto en la fase G₀/G₁ del ciclo celular, disminución en la actividad clonogénica y apoptosis por medio de la activación de caspasas. Estos efectos se indujeron sobre distintas líneas de células tumorales de próstata humana y fueron dependientes de la concentración utilizada (Devendra *et al.*, 2003). Además, en este estudio se describió que BIRM ejerce una actividad anti-tumorigénica y anti-metastásica, utilizando un modelo murino de trasplante subcutáneo de células neoplásicas prostáticas de rata. La administración oral del extracto indujo un retardo en el crecimiento tumoral local, una disminución en el número y volumen de focos metastásicos pulmonares y excelente tolerabilidad (Devendra *et al.*, 2003).

Con respecto a los potenciales mecanismos de acción de BIRM, se ha descrito que este regula negativamente la expresión del receptor de andrógenos (RA) en células de carcinoma de próstata humana andrógeno-dependientes, donde el extracto induce, además, una degradación del receptor mediado por el proteasoma, previa disminución de su fosforilación (Araki *et al.*, 2006; Shamaladevi *et al.*, 2016).

Estos efectos enlentecerían la progresión del cáncer de próstata en la fase dependiente de andrógenos. En neoplasias mamarias caninas se ha reportado una alta expresión del RA en carcinomas de alto grado histológico (grado III), presencia que podría contribuir a la progresión de estos tumores (De Cáceres *et al.*, 2016). Así, BIRM podría ejercer algún efecto antitumoral en este tipo de tumores con alta expresión del RA.

Devendra *et al.*, (2003) describen que BIRM inhibe la actividad de la enzima hialuronidasa tipo I (HAase), la cual está presente en la matriz extracelular. Esta enzima degrada ácido hialurónico (HA) y suele estar expresada y secretarse en diversos carcinomas humanos incluyendo el de glándula mamaria, donde promovería invasión celular, fenómeno biológico clásico de estas neoplasias. Así mismo, HAase puede estimular angiogénesis, lo que incrementaría la capacidad de crecimiento tumoral (Tan *et al.*, 2011). Por lo tanto, sumado a su capacidad anti proliferativa, BIRM podría ejercer un efecto anti-invasivo concordante con la capacidad de bloquear metástasis ya descrita.

Por otro lado, en estudios realizados por Ravalji *et al.*, (2015), en un modelo no oncogénico de dolor neuropático crónico, informa que BIRM disminuye la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) a través de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa (COX1-2). En el mismo trabajo, se describe que la actividad de estas enzimas, especialmente COX-2, promueven proliferación, migración y angiogénesis tumoral en el contexto del cáncer mamario.

La actividad citotóxica de este extracto vegetal estaría dada por la presencia de carbohidratos ricos en ácido urónico en su formulación. El procesamiento enzimático del extracto con proteinasa K o la extracción con carbón-dextrano, no modificó su efecto antiproliferativo, por lo cual su actividad biológica no radicaría en su componente proteico ni lipídico soluble (Devendra *et al.*, 2003). Shamaladevi *et al.*, 2016, describieron recientemente que BIRM contiene entre 25 a 80 µg de ácido urónico en distintas fracciones obtenidas a partir de extracciones con diferentes solventes, manteniendo todas estas fracciones la actividad antiproliferativa e inhibidora sobre la expresión del RA. Adicionalmente, el extracto es rico en moléculas similares a condroitin y heparán

sulfato y, ácido hialurónico, desconociéndose hasta ahora cuáles son sus constituyentes exactos y el rol que cumple cada uno de ellos (Shamaladevi *et al.*, 2016).

Las células de carcinoma mamario canino CF41.Mg corresponden a una línea celular que exhibe características morfológicas mesenquimáticas, por lo que exhibe una conducta invasiva, siendo un buen modelo de estudio *in vitro* de tumores mamarios de alto grado histológico (Saito *et al.*, 2013).

La búsqueda de nuevas terapias para el control del CMC hace que este extracto sea objeto de estudio para tratar de definir sus potenciales efectos antineoplásicos sobre células de cáncer mamario. En esta tesis, se estudió el efecto de BIRM sobre la proliferación, apoptosis y migración de células CF41.Mg, de manera de buscar evidencia para realizar futuros estudios clínicos en perros con neoplasia mamaria.

HIPÓTESIS

El extracto de *Solanum dulcamara L.* (BIRM) exhibe propiedades anti-proliferativas y anti-invasivas sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg

OBJETIVO GENERAL

Evaluar proliferación, apoptosis e invasión de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg expuestas a un extracto de *Solanum dulcamara L.* (BIRM)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar proliferación de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg en respuesta a un extracto derivado de *Solanum dulcamara L.* (BIRM).

Determinar apoptosis en células de carcinoma mamario canino CF41.Mg en respuesta a un extracto de *Solanum dulcamara L.* (BIRM).

Determinar migración e invasión de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg en presencia del extracto *Solanum dulcamara L.* (BIRM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Como ya se describió, esta tesis fue ejecutada en el Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa (BiMre), del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los ensayos de citometría de flujo fueron realizados en el Laboratorio de citometría de flujo del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Extracto derivado de *Solanum Dulcamara*L

BIRM corresponde a un extracto acuoso de raíces secas provenientes de una planta del genero *Dulcamara*, familia de las Solanaceas que crecen en Ecuador y que es comercializada como una suspensión color café de sabor dulce-amargo. BIRM se elabora por extracción acuosa seguida por procesos de oxidación/reducción del extracto, los cuales están estandarizados para reducir la variabilidad entre diferentes lotes. Considerando lo anterior, preliminarmente se estudió la proliferación de células de carcinoma mamario canino en respuesta a 2 lotes diferentes de BIRM, cuyos resultados no arrojaron diferencias. En todos los ensayos llevados a cabo en esta tesis, se usó una solución de BIRM clarificado, obtenido por centrifugación a 10.000 x g por 15 minutos del extracto original, según lo descrito por Devendra *et al.*, 2003.

Cultivo celular

La línea celular CF41.Mg (CRL-6232, ATCC) se cultivó en medio DMEM alto en glucosa (4.5 g/L), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina, 10.000 U/mL de penicilina G, 1.000 µg/mL de estreptomycin y 0.25

µg/mL de anfotericina B. Células no neoplásicas derivadas de epitelio tubular renal de perro MDCK (ATCC® CCL-34™) fueron cultivadas en medio de cultivo MEM, 10% SFB, 10.000 U/mL de penicilina G, 1.000 µg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ y el medio fue cambiado cada 48 horas, previo lavado de las células con DPBS. Para la desagregación de células, una vez que se alcanzó un 70-80% de confluencia, estas fueron lavadas con buffer DPBS y luego incubadas con tripsina 2,5%/ETDA 0.2g/L por 10 minutos. La reacción fue detenida con DMEM más 10% SFB. Luego, las células fueron centrifugadas a 200 x g. por 10 minutos a 4°C y finalmente se recuperó el pellet, se contó y resembró. La concentración de células vivas se evaluó a través del método de exclusión con azul tripán y hemocitometría.

OBJETIVO 1

Ensayo de proliferación celular

Para los ensayos de viabilidad celular, se sembraron 5000 células por pozo en placas de 24 pocillos. Se esperó 24 horas para que las células se adhirieran y luego se incubó con diferentes concentraciones v/v de BIRM (0-10 µl/ml) por 24 y 48 horas, según lo descrito por Devendra *et al.*, 2003. Se realizó recuento de las células vivas mediante el método de exclusión con azul tripán y hemocitometría. En paralelo, se realizaron los mismos experimentos recién descritos con células MDCK incubadas por 48 hrs. con BIRM, para analizar si este extracto modula la actividad proliferativa en células no neoplásicas. Estos experimentos se realizaron en triplicado y se hicieron al menos 3 repeticiones independientes. Los resultados se expresaron en número relativo de células, lo cual se obtuvo dividiendo el número de células en cada condición experimental por su respectivo input (número de células adherentes 24 hrs. post siembra).

Estudio de ciclo celular.

Para el ensayo de ciclo celular, se realizó tinción celular con Yoduro de Propidio (PI) para identificar potenciales cambios en la proporción de células en

las distintas fases del ciclo celular en respuesta a BIRM®. Se sembraron 1×10^5 células CF41.Mg en botellas de 25 cm² en duplicado. 48 horas después, se lavó con DPBS y se cambió el medio para después incubar con 0 y 10 µl/ml de BIRM por 24 horas. Al cabo de ese tiempo, las células fueron desprendidas con tripsina/EDTA por 10 minutos con previo lavado con DPBS. Se conservó el sobrenadante y se contó el número de células vivas por botella. Las células fueron centrifugadas a 1800 rpm (200 x g) por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se fijó con 1 mL de etanol al 70% frío añadiéndose gota a gota mientras se vortaba; así se aseguró la fijación celular y se evitó la aglomeración de las mismas. Se dejó a 4°C por 30 minutos. Al finalizar este tiempo, se centrifugó a 850 x g por 5 minutos y se extrajo cuidadosamente el sobrenadante. Se lavó 2 veces con DPBS y se agregó 50 µl RNAsa (concentración de 100 µg/ml) directamente a los pellets celulares. Finalmente, se agregó 400 µl (concentración de 50 µg/ml) de Yoduro de Propidio por millón de células, se homogenizó e incubó por 10 minutos y se analizó en un citómetro de flujo multiparamétrico Fortessa X-20 (BD Biosciences). Para el análisis a posteriori, se utilizó el software Flowjo, LLC.

Ensayo Clonogénico.

El ensayo clonogénico permite evaluar la capacidad de formación de colonias a partir de una sola célula. BIRM, al tener potenciales características citotóxicas, evitaría la formación de las mismas. Para este ensayo se llevó a cabo el método de agar suave, donde se realizó un fondo de agar al 0,5% en placas de 35 mm². Una vez que se solidificó este agar, se añadió 1×10^5 células resuspendidas en agar suave al 0,25% y se adicionó el extracto a concentraciones de 0 a 10 µl/ml. Estas condiciones se mantuvieron por 21 días en un incubador a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Al cabo de ese tiempo, las células fueron lavadas con DPBS y fijadas con metanol y se agregó 1-2 ml de cristal violeta 1% por 30 minutos. Luego se removió esta solución y se lavaron las placas con agua destilada. Finalmente, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y se realizó el recuento de colonias (se consideró una colonia cuando al menos

contenía 50 células). Se realizó recuento completo usando el software Image J. Para una correcta determinación del número de colonias/tratamiento se utilizó la siguiente fórmula, donde PE se refiere a la eficiencia de formación de colonias:

$$PE = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias formadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células sembradas}} \times 100$$

OBJETIVO 2

Determinación de Apoptosis.

Para el ensayo de muerte celular apoptótica se realizó un ensayo de Anexina V / PI (Thermo Fisher Scientific, Inc.) el cual identifica la proporción de células que se encuentran en apoptosis, permitiendo además discriminar desde un punto de vista temporal, si este proceso es temprano o tardío. Se sembraron 1×10^5 células CF41.Mg en botellas de 25 cm² bajo condiciones de cultivo estándar ya mencionadas. 24 horas después, se lavó con DPBS y se cambió el medio para después incubar con 0 y 10 $\mu\text{l/ml}$ BIRM por 24 horas en duplicado. Luego, las células fueron desprendidas y contadas para definir el número de células/botella. Las células fueron centrifugadas a 200 x g por 10 minutos y el pellet celular se resuspendió en solución buffer de unión a Anexina a una razón de 100 μl cada 1×10^5 células. Luego, se añadió 5 μl de Anexina V conjugado con Alexa Fluor 488 más 1 μl de PI (10 $\mu\text{g/ml}$) cada 100 μl de suspensión celular. Se incubó por 15 minutos en hielo y oscuridad y, posteriormente se añadió 400 μl de buffer de unión. Se consideraron como controles células sin adición de reactivos de Anexina V para definir autofluorescencia basal, controles Anexina V, PI, Anexina V/PI y control positivo (células expuestas a luz UV por 30 min). Finalmente, las suspensiones celulares se analizaron en un citómetro de flujo multiparamétrico Fortessa X-20 (BD Biosciences). Para el análisis a posteriori, se utilizó el software Flowjo, LLC.

OBJETIVO 3

Ensayos de migración e invasión celular

Ensayo “scratch plate”

En este ensayo se sembraron 1×10^4 células por pozo en placas de 24 pocillos, y se esperó 48 horas hasta observar una confluencia cercana al 70-80%. Posteriormente, se realizaron las heridas con una punta plástica de 200 μ l. La herida se realizó entre dos puntos previamente marcados en el centro de cada pocillo. Luego, se realizaron dos lavados con PBS estéril para eliminar los restos de células desplazadas y se incubó con distintas concentraciones no citotóxicas de BIRM (0-4 μ l/ml) por 48 horas. Los pozos fueron fotografiados al tiempo 0, 24 y 48 hrs. Al cabo de este tiempo, las células se tiñieron con 0,025% de azul de Coomasie en 10% ácido acético/45% metanol durante 10 minutos. Los pocillos fueron observados en un microscopio óptico invertido y las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara Motic Images Plus v2.0 a los tiempos 0, 24 y 48 horas después de la estimulación. El cierre de la “herida” (migración celular) se determinó sobreponiendo las microfotografías de dos tiempos (0 y 24; 0 y 48), haciéndolas coincidir mediante los puntos de referencia utilizando el software GIMP 2 (GNU, Berkeley, USA). Así, se determinó la diferencia de área entre el tiempo 0, tiempo 24 y tiempo 48, lo que corresponde al área de migración de las células. Este proceso de análisis se hizo mediante el software Image J (NIH, Maryland, USA) y su herramienta “MRI Wound Healing”, diseñada para el ensayo de cierre de herida. El cierre de la “herida” (migración celular) se determinó entonces calculando el porcentaje de cierre de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cierre} = \frac{\text{Número de pixeles de células coloreadas que migran}}{\text{Número de pixeles en la zona de la herida en el tiempo 0}} \times 100$$

Ensayo invasión celular

Para este ensayo se usaron canastillos tipo transwell con membranas de policarbonato con poros de 8 μ m de diámetro posicionados dentro de placas de 24

pocillos. Primero, se activó la membrana de policarbonato con 100 µl de medio más SFB y se dejó por 30 segundos, se retiró y se añadió a cada canastillo 100 µl de Matrigel (concentración de 12 µg/ml; BD-Biosciences) y se dejó en la incubadora por 2 horas. Al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante del matrigel y se sembraron $2,5 \times 10^4$ células en 300 µl de medio sin SFB. En los pocillos, se añadió 500 µl de medio más 5% SFB como agente quimioatrayente. Se incubaron las células con concentraciones no citotóxicas (0 y 4 µl/ml) de BIRM, considerando un volumen total de 800 µl por 48 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se removió el medio de cada canastillo, y se lavó dos veces con PBS, se fijó y permeabilizó con metanol para después ser teñidas con Giemsa 1%. Después, con un hisopo estéril se removieron las células presentes sobre la membrana del transwell donde fueron sembradas, de manera que solo queden las células que atravesaron la membrana, es decir las células con capacidad invasiva. Luego, se removió la membrana de policarbonato con un bisturí para montarla sobre un portaobjetos. Finalmente, se seleccionaron y fotografiaron al azar 6 campos de 10X, realizándose el recuento de células invasivas con el software Image J y su herramienta "cell counter". En paralelo, se realizaron experimentos de migración celular utilizando transwells, de la misma forma a lo ya descrito para invasión, con la única diferencia que los transwells no fueron incubados previo a la siembra, con Matrigel.

Análisis estadístico.

La descripción de los resultados se obtuvo mediante medias y desviaciones estándar. Se determinó normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Para la determinación de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos con tratamiento, se utilizó ANOVA junto con un análisis de Tukey o Kruskal Wallis. Se consideró significancia estadística un $p < 0.05$. Se utilizó el software Infostat.

RESULTADOS

Objetivo 1

***Solanum dulcamara*L. (BIRM) reduce la proliferación de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg**

Tal como lo sucedido en células neoplásicas de próstata humana, BIRM indujo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la proliferación de células CF41.Mg, efecto que fue dependiente de la concentración y del tiempo. A las 24 horas de incubación, 8 y 10 $\mu\text{l/ml}$ del extracto indujeron tal disminución (Figura 1), mientras que la exposición por 48 hrs., ejerció un efecto antiproliferativo a partir de la concentración 6 $\mu\text{l/ml}$ (Figura 2).

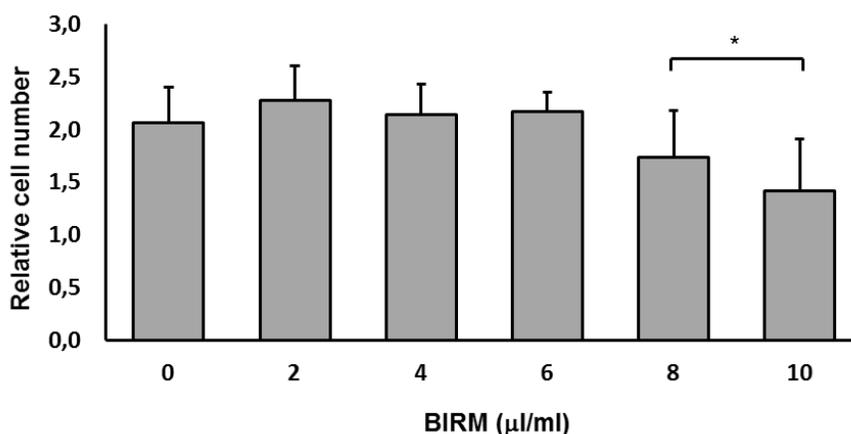


Figura 1. Proliferación de células CF41.Mg en respuesta a distintas concentraciones de BIRM (0-10 $\mu\text{l/ml}$) por 24 horas. Método de exclusión de azul tripán. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. * $p < 0,05$ entre los tratamientos v/s el control negativo.

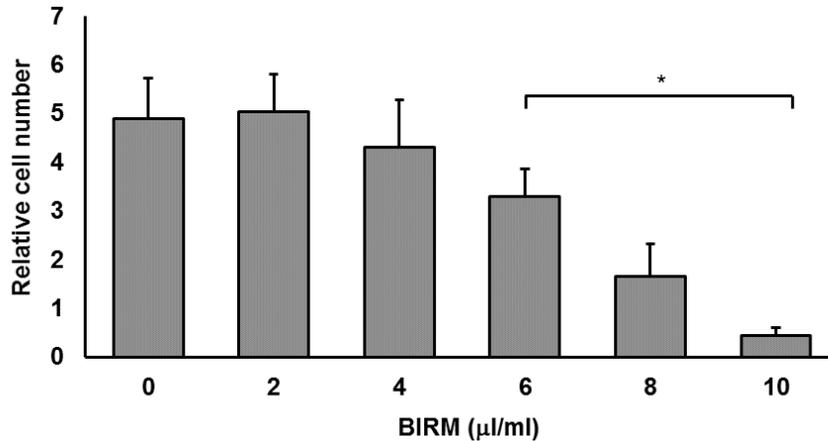


Figura 2. Proliferación de células CF41.Mg en respuesta a distintas concentraciones de BIRM (0-10 µl/ml) por 48 horas. Método de exclusión de azul tripán. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. * $p < 0,05$ entre los tratamientos v/s el control negativo.

Dado los resultados recién descritos, fue relevante estudiar si BIRM induce también un efecto antiproliferativo sobre células no neoplásicas, de manera de determinar si este extracto exhibe selectividad en su efecto. Para esto, se estudió la proliferación de células MDCK derivadas de epitelio tubular renal canino en presencia de BIRM por 48 hrs. El extracto indujo una inhibición significativa ($p < 0,05$) de la proliferación de estas células (contadas a las 48 hrs. de incubación en relación al conteo en el tiempo 0 (input)) en las concentraciones de 6, 8 y 10 µl/ml (Figura 3), resultados similares a los observados en las células neoplásicas CF41.Mg. Sin embargo, las células MDCK parecen más sensibles al extracto dado que a la mayor concentración estudiada no se observaron células vivas, a diferencia de los visualizado en las células neoplásicas.

Para complementar las observaciones ya descritas, se llevaron a cabo 2 aproximaciones experimentales; un ensayo clonogénico y un análisis de ciclo celular. El ensayo clonogénico permite determinar la capacidad de formación de colonias a partir de una sola célula, capacidad que se encuentra activada en células neoplásicas. Las células CF41.Mg sometidas a diferentes concentraciones de BIRM, disminuyeron su capacidad clonogénica (expresada en la eficiencia para formar colonias en función del número de células sembradas) después de 21 días,

observándose un significativo menor número de colonias a partir de la concentración 6 $\mu\text{l/ml}$ (0.6; 0.54; 0.5 v/s control (0.74)). Como se aprecia en la Figura 4, esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), lo cual es concordante con el efecto antiproliferativo ya expuesto.

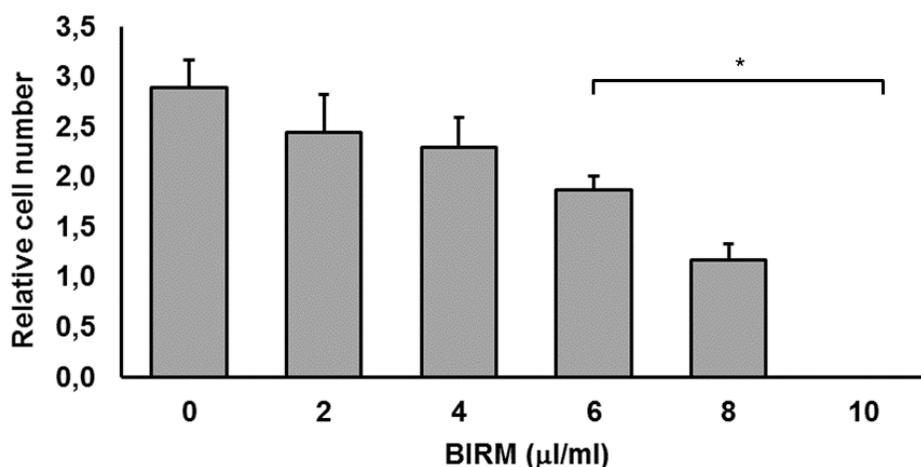


Figura 3. Proliferación de células MDCK en respuesta a distintas concentraciones de BIRM (0-10 $\mu\text{l/ml}$) por 48 horas. Método de exclusión de azul tripán. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. * $p < 0,05$ entre los tratamientos v/s el control negativo.

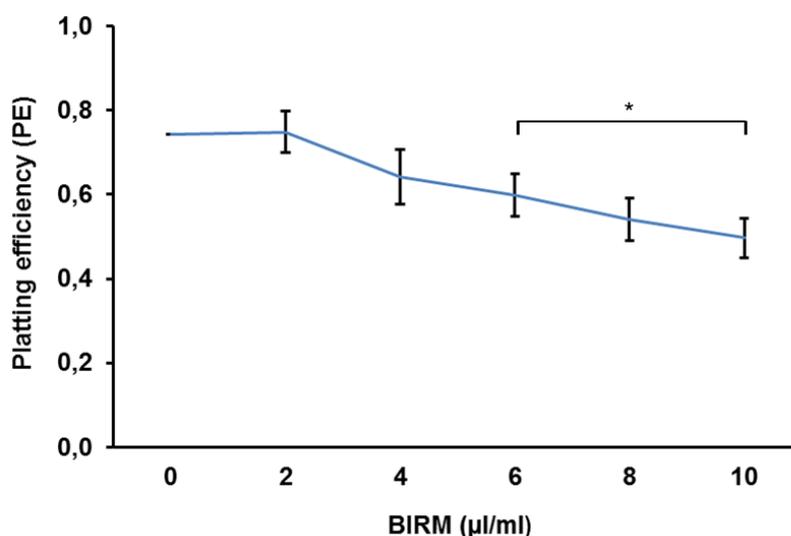


Figura 4. Ensayo clonogénico (eficiencia de formación de colonias según el número de células sembradas (PE)) de células CF41.Mg en respuesta a distintas concentraciones de BIRM (0-10 $\mu\text{l/ml}$). Los valores son promedios \pm

DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *p<0,05 entre los tratamientos en relación al control negativo.

En el análisis de ciclo celular, se observó que la mayor concentración de BIRM estudiada en esta tesis, indujo un arresto celular dado que incrementó la proporción de células en fase G0/G1 ($59,6 \pm 4,1$ v/s $69,2 \pm 5,7$ en el control) y disminuyó las células en fases S y G2/M comparado con la condición control. Los detalles pueden ser observados en la Tabla 1.

Tabla 4. Proporción de células CF41.Mg en las distintas fases de ciclo celular en respuesta a 10 μ l/ml de BIRM por 24 horas. Análisis de citometría de flujo con Yoduro de Propidio.

BIRM	% células en G0/G1	% células en S	% células en G2/M
0	$59,6 \pm 4,1$	$39,5 \pm 5,6$	$1,67 \pm 0,98$
10	$69,2 \pm 5,7$	$28,8 \pm 3,5$	$0,18 \pm 0,09$

Objetivo 2

***Solanum dulcamara L.* (BIRM) induce apoptosis en células de carcinoma mamario canino CF41.Mg**

Para evaluar el potencial efecto citotóxico (apoptosis) de 10 μ l/ml de BIRM sobre células CF41.Mg, se utilizó el ensayo de Anexina V/Yoduro de propidio. Este método detecta la expresión de fosfatidilserina, fosfolípido que se expresa en la cara extracelular de la membrana plasmática como un evento temprano en la activación de apoptosis y adicionalmente, permite diferenciar a las células viables de aquellas muertas que no excluyen Yoduro de propidio. BIRM incrementó en forma significativa ($p<0.05$) el número de células en apoptosis tardía (26.2% en comparación al control), disminuyendo la cantidad de células vivas. El número de células en apoptosis temprana no se modificó en respuesta al extracto por el

tiempo estudiado (Figura 5 y 6). Adicionalmente, el extracto no indujo citotoxicidad por lisis celular (Figura 5).

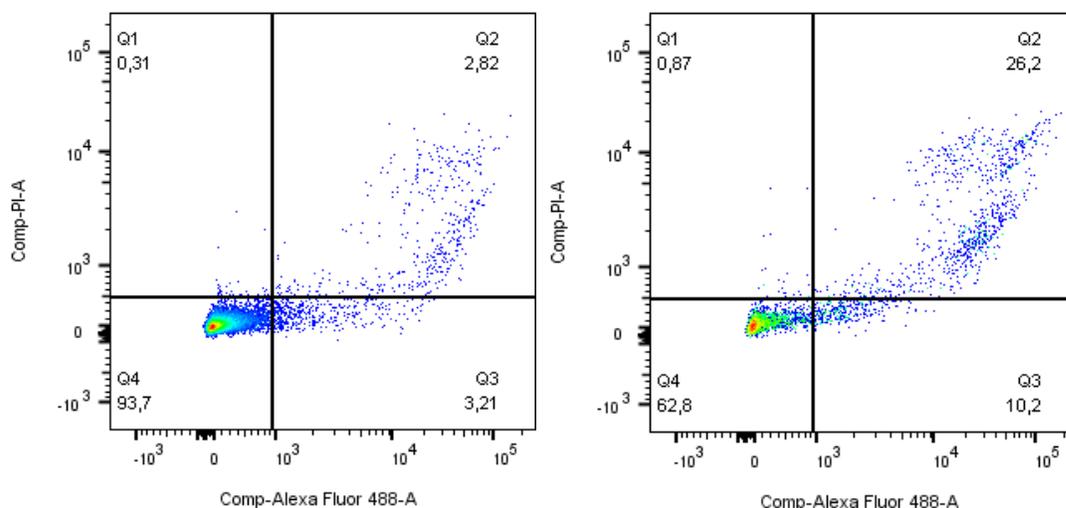


Figura 5. Imagen representativa del análisis de apoptosis en células CF41.Mg tratadas con 0 (panel izquierdo) y 10 (panel derecho) $\mu\text{l/ml}$ de BIRM por 24 horas. Método de Anexina V/PI.

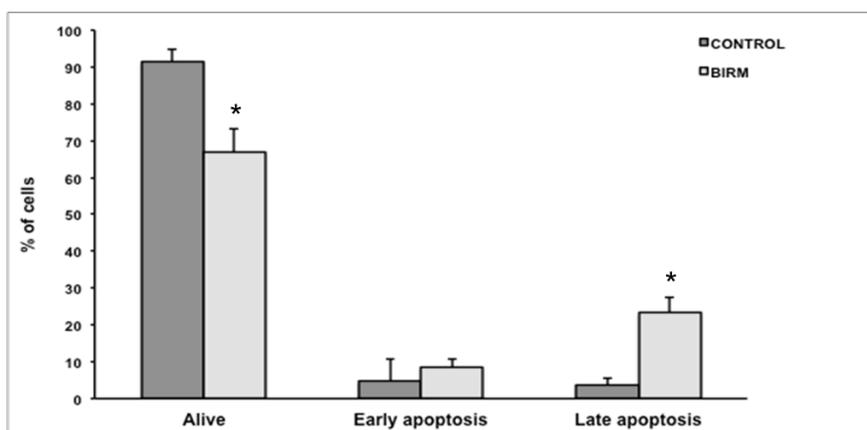


Figura 6. Cuantificación del análisis de apoptosis en células CF41.Mg tratadas con 10 $\mu\text{l/ml}$ de BIRM por 24 horas. Método de Anexina V/PI. Los valores son promedios \pm DE de 2 experimentos independientes en duplicado. * $p < 0,05$ en relación al respectivo control.

Objetivo 3

***Solanum dulcamara L.* (BIRM) genera una reducción en la capacidad de migración e invasión de células de carcinoma mamario canino CF41. Mg.**

Con el objetivo de determinar la actividad anti-migratoria y anti-invasiva de BIRM, se realizaron ensayos de migración (“scratch plate” y transwell) e invasión (transwell con matrigel) con células CF41.Mg expuestas a concentraciones no citotóxicas de BIRM (0-4 μ l/ml). En el ensayo “scratch plate”, BIRM no indujo modulación de la actividad migratoria de las células analizadas, tal como se muestra en la Figura 7.

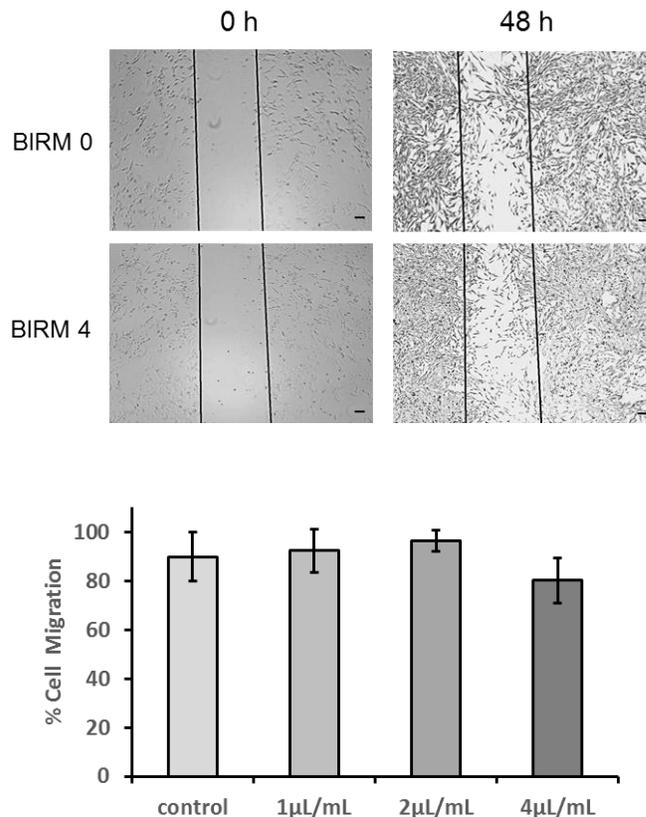


Figura 7. Análisis de migración celular en células CF41.Mg tratadas con 0-4 μ l/ml de BIRM por 48 horas. Panel superior: microfotografías representativas del área de migración a las 48 hrs. de incubación con 0 y 4 μ l/ml de BIRM. Panel inferior: cuantificación del área de migración a las 48 hrs. de incubación con BIRM (0-4 μ l/ml). Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. Método scratch plate.

Sin embargo, al hacer un ensayo de migración celular en insertos tipo transwell, se observó que la concentración de 4 $\mu\text{l/ml}$ del extracto indujo una reducción significativa en la capacidad migratoria de las células CF41.Mg (Figura 8), lo cual se corroboró en el ensayo de invasión usando los mismos transwell pero cubiertos con elementos de membrana basal (Matrigel). En estos experimentos, la misma concentración de BIRM gatilló una marcada reducción en la capacidad invasiva de las células estudiadas, efecto muy similar al inducido por 1 μM de simvastatina, droga que exhibe un efecto anti-invasivo bien conocido (Figura 9).

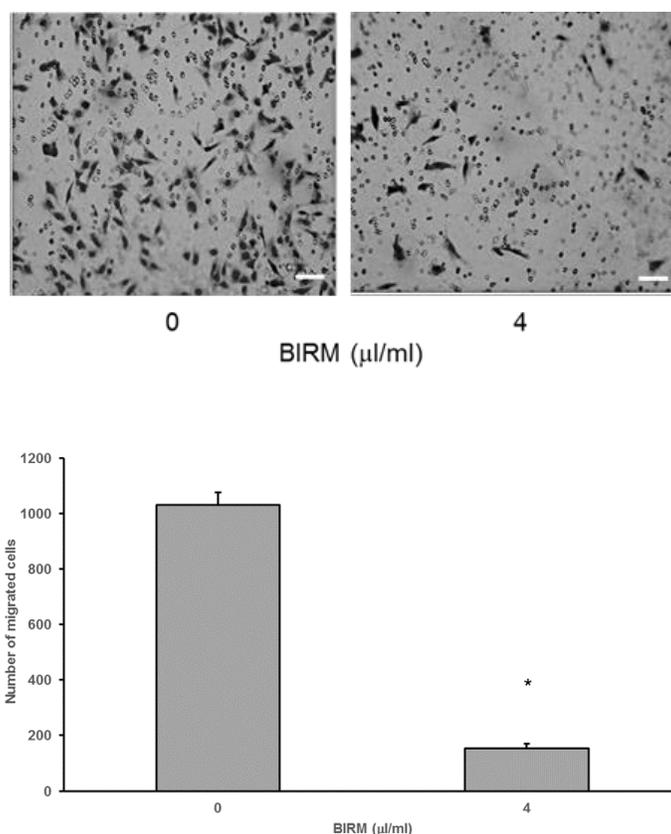
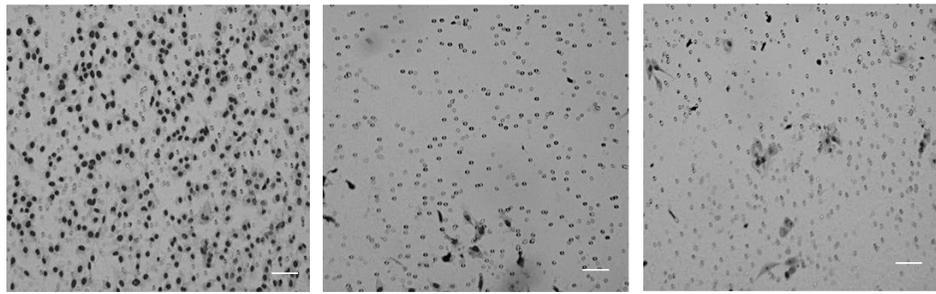


Figura 8. Microfotografías representativas de migración de células CF41.Mg tratadas con 0 y 4 $\mu\text{l/ml}$ de BIRM por 48 horas (panel izquierdo); cuantificación del número de células migradas (panel derecho). Método Transwell. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos en duplicado. * $p < 0,05$ en relación a la condición control. Barra = 30 μm .



BIRM 0

BIRM 4

SIM 1

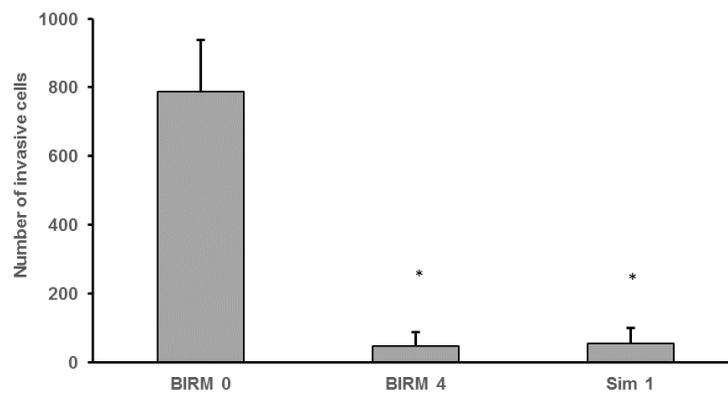


Figura 9. Microfotografías representativas del análisis de invasión celular en células CF41.Mg tratadas con 0 y 4 μ l/ml de BIRM por 48 horas (panel superior); cuantificación del número de células invasoras (panel inferior). Método Transwell. Los valores son promedios \pm DE de 3 experimentos independientes en duplicado. * $p < 0,05$ en relación al control. Barra = 30 μ m.

DISCUSIÓN

La neoplasia mamaria canina tiene limitadas opciones terapéuticas, las cuales incluyen básicamente la cirugía y la quimioterapia. Ambas alternativas carecen de selectividad, pueden inducir efectos adversos y en casos de tumores de alto grado histológico, sólo cumplen una función paliativa (Sorenmo *et al.*, 2013). Es en este contexto, que se ha generado la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos y nuevas alternativas de terapia que mejoren las desventajas ya descritas asociadas a los tratamientos antitumorales convencionales.

La Fitoterapia representaría una buena alternativa como complemento terapéutico antineoplásico, dado su descrita baja toxicidad (Vickers y Cassileth, 2006). El extracto herbal derivado de la planta *Solanum Dulcamara*L. -BIRM- es un suplemento nutricional que se comercializa en Ecuador para fines médicos, incluyendo algunas enfermedades neoplásicas (Devendra *et al.*, 2003; Shamaladevi *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el momento se han hecho escasos estudios que evalúan su potencial eficacia antitumoral; estas pesquisas sólo se han llevado a cabo sobre células de carcinoma de próstata humana (Devendra *et al.*, 2003; Shamaladevi *et al.*, 2016). En Medicina Veterinaria, no hay estudios publicados acerca de BIRM y su efecto sobre algún tipo de neoplasia que afecte a animales domésticos. Por lo tanto, es relevante generar conocimiento al respecto, dado que este extracto es usado empíricamente como opción terapéutica.

Es importante mencionar que este estudio es el primero que explora los potenciales efectos antitumorales *in vitro* de BIRM sobre células de cáncer mamario en perros. BIRM indujo un efecto antiproliferativo sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg dependiente del tiempo y de su concentración. Complementariamente, el extracto indujo un arresto de las células tratadas en las fases G0/G1 del ciclo celular (disminuyendo la proporción de células en fase S y G2/M) e indujo un efecto inhibitorio sobre la capacidad de estas células para formar colonias (efecto clonogénico negativo). Estos resultados son concordantes con lo descrito previamente, con la gran diferencia que esos efectos antiproliferativos fueron observados en células de carcinoma prostático humano (Devendra *et al.*, 2003; Shamaladevi *et al.*, 2016). Shamaledvi *et al.*,

(2016) describen que los efectos antiproliferativos de BIRM son más marcados en aquellas células donde se estimula su crecimiento con Dihidrotestosterona (DHT), donde precisamente el extracto inhibe la expresión y fosforilación del RA, incrementando su degradación. El efecto observado en células CF41.Mg expuestas a BIRM parece ser menos intenso que lo observado en células tumorales de próstata humana RA-dependientes, lo cual podría explicarse por una eventual ausencia del RA, no obstante, hasta el momento se desconoce si estas células de carcinoma mamario canino expresan un RA funcional. Como ya se mencionó, BIRM indujo un arresto en G0/G1, sin embargo, es necesario ampliar estas observaciones a un terreno mecanístico. En este contexto, Shamaledvi *et al.*, (2016) han informado que el extracto de *S. Dulcamara*L. reduce la fosforilación de la proteína quinasa Akt, disminuyendo su activación y gatillando probablemente una regulación negativa sobre genes anti-apoptóticos, lo cual induciría finalmente una inhibición de la sobrevivencia celular. Estos efectos podrían explicar parcialmente el arresto celular inducido por BIRM en células CF41.Mg.

Según lo descrito anteriormente, BIRM podría inducir una disminución en la actividad de las enzimas COX (Ravalji *et al.*, 2015), posible mecanismo que debe ser investigado en detalle y que podría promover una disminución en la capacidad proliferativa tumoral. Las células CF41.Mg expresan ambas isoformas de COX (1 y 2) (Iturriaga *et al.*, 2017), por lo tanto, es posible que BIRM esté induciendo su efecto antiproliferativo, mediado en parte, por algún tipo de modulación sobre la presencia y actividad de estas enzimas.

Con el objetivo de determinar si BIRM tiene un efecto antitumoral *in vitro* selectivo, se llevaron a cabo experimentos de proliferación sobre células no tumorales e inmortalizadas MDCK, las cuales derivan de epitelio tubular renal. El extracto indujo una disminución de la proliferación celular dependiente de su concentración, efecto que mostró una tendencia a ser más intenso que lo observado en las células neoplásicas estudiadas, lo que se vio reflejado en la condición de 10 μ l/ml de BIRM, donde no se observaron células vivas. Así, el extracto no exhibió un efecto selectivo en los modelos celulares estudiados aquí. Las células MDCK tienen una cinética de crecimiento similar a las CF41.Mg

(Iturriaga *et al.*, 2017), lo cual podría explicar, al menos parcialmente, la misma sensibilidad exhibida por ambas líneas celulares en respuesta al extracto.

Por otro lado, 10 $\mu\text{l/ml}$ de BIRM indujo apoptosis sobre células CF41.Mg, lo cual implica que el efecto antiproliferativo observado está dado por una desaceleración del ciclo celular y un efecto citotóxico desencadenado por el extracto. Lo anterior es similar a lo descrito por Devendra *et al.*, (2003), quienes describen un efecto pro-apoptótico de BIRM sobre células de carcinoma de próstata humana, efecto que es mediado por la activación de caspasas. Al respecto, un estudio reciente relata que el efecto pro-apoptótico de BIRM está dado por la activación de la vía extrínseca y no la intrínseca de la apoptosis, pues hay activación de caspasa 8 y no de la 9, caspasas de ambas vías de activación respectivamente. Además, al agregar un inhibidor específico de la activación de caspasa 8 (Ac-IETD-CHO), se inhibió la apoptosis inducida por la solución de *Dulcamara*, lo cual corrobora que la apoptosis inducida ocurre por la vía extrínseca (Shamaledevi *et al.*, 2016). El extracto no indujo lisis celular en las células CF41.Mg, por ende, la citotoxicidad inducida por el extracto es exclusivamente mediada por apoptosis. Por otro lado, la disminución de la fosforilación de Akt ya descrita, podría estar participando en la inducción de apoptosis por la vía extrínseca.

Afín con algunos resultados descritos por Devendra *et al.*, (2003), BIRM indujo una disminución intensa en la capacidad de migración e invasión *in vitro* de células CF41.Mg sometidas al estímulo quimiotáctico de suero fetal bovino (5%), comparable al efecto anti-invasivo de 1 μM de simvastatina, droga que es conocida por su efecto sobre la motilidad celular (Torres *et al.*, 2015). Se ha descrito que el uso oral de BIRM en ratones que han sido sometidos previamente a trasplante ortotópico de células de carcinoma de próstata humana, disminuye el número de focos tumorales metastásicos (Devendra *et al.*, 2003), lo cual se relaciona con el efecto anti-invasivo descrito en esta tesis. Estos efectos podrían estar relacionados con la inhibición de hialuronidasa inducida por este extracto (Devendra *et al.*, 2003; Shamaladevi *et al.*, 2016), efecto que se asocia

directamente con una menor capacidad motil e invasora, y también con una menor habilidad de desarrollar angiogénesis (Shamaladevi *et al.*, 2016).

Recientemente, se ha descrito que un extracto acuoso derivado de *Solanum Nigrum* induce un efecto antiproliferativo, arresto celular, apoptosis e inducción de stress oxidativo en células de carcinoma mamario humano estradiol-dependientes MCF-7. Adicionalmente, este extracto induce modificaciones en la expresión de moléculas asociadas a transición epitelio-mesénquima (TEM) (proceso clave en invasión celular y asociado a quimiorresistencia), aumentando la presencia de e-cadherina e inhibiendo la expresión de N-cadherina y vimentina, lo cual implica que la TEM es regulada negativamente (Lai *et al.*, 2016). Estos efectos muestran que extractos derivados de algunas plantas de la familia de las *Solanáceas* exhiben efectos antitumorales *in vitro* sobre células neoplásicas mamarias, resultados asociados con las observaciones descritas en esta tesis.

Estos resultados indican que el extracto BIRM cumple una función antitumoral *in vitro* sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, lo cual sustenta futuros estudios clínicos en perros con neoplasia mamaria, especialmente en ejemplares con tumores de alto grado histológico, que se traten complementariamente con esta formulación. Indudable es, la necesidad de ampliar el conocimiento acerca de este extracto, en términos de conocer con precisión los mecanismos involucrados en los efectos observados, y en dilucidar cuáles son los componentes específicos del extracto donde residen estos efectos.

CONCLUSIONES

- El extracto de *Solanum dulcamara L.* -BIRM- induce un efecto antiproliferativo y proapoptótico en células de carcinoma mamario canino CF41.Mg
- BIRM exhibe un efecto antiproliferativo no selectivo
- El extracto herbal BIRM induce una disminución en la capacidad invasiva de células carcinoma mamario canino CF41.Mg

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann R, Mulrow C , Ramirez G, Gardner C D, Morbidoni L, Lawrence V A. (2001). "Garlic Shows Promise for Improving Some Cardiovascular Risk Factors." *Archives of Internal Medicine* 161 (6): 813–824.
- Araki S, Lyn D, Balakrishna L. Lokeshwar L. (2006). "BIRM, an Andean Plant Extract, down Regulates Androgen Receptor and Shows Anti-Tumor Activity in Prostate Cancer." *Cancer Research* 66 (8): 897–897.
- Cassali G *et al.* (2011). Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz J Vet Pathol* 4 (2): 153-180.
- Devendra D, Lokeshwar V, Cevallos-Arellano E., Soloway M, Lokeshwar B L. (2003). "An Orally Active Amazonian Plant Extract (BIRM) Inhibits Prostate Cancer Growth and Metastasis." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 52 (1): 59–66.
- De Cáceres A , Pérez-Alenza C, Peña I (2016). "Profile of Steroid Receptors and Increased Aromatase Immunoexpression in Canine Inflammatory Mammary Cancer as a Potential Therapeutic Target." *Reproduction in Domestic Animals* 51 (2): 269–275.
- Dutra AP, Granja NV, Schmitt FC, Cassali GD. 2004. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res.* 37 (11): 1673-1681.
- ECUABIRM CIA. LTDA. 2006. BIRM. United States patent: US 005 - Primary Class. US 78488638 (3124676)

- Forrest LJ, Kraft SL (2012). Imaging in Oncology. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Saunders, 5th Edition. 98-110
- Gama A, Alves A, Schmitt F. 2008. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch.* 453(2): 123-32.
- Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. (2011). "Classification and Grading of Canine Mammary Tumors." *Veterinary Pathology* 48 (1): 117.
- Hack C, Lange S, Paul E, Conrad S, Dobos G J, Beckmann M. (2015). "Lokale Und Systemische Therapien Der Patientin Mit Mammakarzinom : Kurzfristige Symptome Lindern Mit Methoden Der Integrativen Medizin. Local and Systemic Therapies for Breast Cancer Patients: Reducing Short-Term Symptoms with the Methods of Integrative Medicine. *Thieme Medical* 75: 1–8.
- Harris C, Pierce K, King G, Yates K M, Hall J, Tizard I. (1991). "Efficacy of Acemannan in Treatment of Canine and Feline Spontaneous Neoplasms." *Molecular Biotherapy* 3 (4): 207–213.
- Henry CJ, Higginbotham ML (2010). Tumors of the head and Neck. In: *Cancer Management in Small Animal Practice.* Elsevier: Canada: 195-203
- Kitchel BE, Dervisis NG (2010). Pathophysiology and Tumor Cell Growth. In: *Cancer Management in Small Animal Practice.* Elsevier: Canada: 1-9.
- Klose P, Kraft K, Cramer H, Lauche R, Dobos G, Langhorst J. (2014). "Phytotherapie in Den Medizinischen S3-Leitlinien Der Arbeitsgemeinschaft Der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften - Eine

- Systematische Übersichtsarbeit.” *Forschende Komplementärmedizin / Research in Complementary Medicine* 21 (6): 388–400.
- Knapp S. (2013) “A Revision of the Dulcamaroid Clade of *Solanum* L. (Solanaceae).” *PhytoKeys*, 22: 1–432.
- Kristiansen VM, Nødtvedt A, Breen AM, Langeland M, Teige J, Goldschmidt M, Jonasdottir TJ, Grotmol T, Sørenmo K (2013). Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. *J Vet Intern Med* 27(4):935-42.
- Król M, Pawtowski KM, Majchrzak K, Szyszko K, Motyl T (2010). Why chemotherapy can fail?. *Pol J Vet Sci* 13 (2): 399-406.
- Kupchan M, Barboutis J, J Knox R, Cam Lau C. (1965). Tumor Inhibitor Beta-Solamarine: Isolated from *Solanum Dulcamara*. *Science*; 150: 0–1.
- Kusewitt DF (2012). Neoplasia and Tumor Biology. In: *Pathological Basis of Veterinary Disease*. Elsevier, Fifth edition. 289-321.
- Lai Y, Chen-Jei T, Chia-Woei W, Chen-Yen C, Bao-Hong L, Yeu-Ching S Cheng-Jeng T. (2016). Anti-Cancer Activity of *Solanum Nigrum* (AESN) through Suppression of Mitochondrial Function and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Breast Cancer Cells. *Molecules* 21 (5): 553.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438: 803-819.
- Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Jiménez MA, Silvan G, Dunner S, Peña L. 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 71: 541-

548.

Iturriaga MP, Paredes R, Arias JI, Torres CG (2017). Meloxicam decreases the migration and invasion in CF41.Mg canine mammary carcinoma cells. *Oncology Letters*, In Press.

Martín de las Mulas, J, Ordás, J, Millán, Y, Fernández-Soria, V, Ramón y Cajal, S. 2003. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat.* 80 (3): 363-367.

Martínez C, Ortega V, Yáñez Gascón M, García Reverte J, Canteras J, Alcaraz Baños M. (2005). “[Experimental Model for Treating Pulmonary Metastatic Melanoma Using Grape-Seed Extract, Red Wine and Ethanol].” *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 7 (3): 115–121.

Merlo D.F., Rossi L, Pellegrino C., Ceppi M., Cardellino U., Capurro C., Ratto A, Sambucco PL, Sestito V, Tanara G, Bocchini V. (2008). “Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy.” *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22 (4): 976–984.

Muhammadnejad A, Keyhani E, Mortazavi P, Behjati F, Haghdoost IS (2012). Overexpression of HER-2/neu in malignant mammary tumors; translation of clinicopathological features from dog to human. *Asian Pac J Cancer Prev* 13 (12): 6415-6421

Mutlu E, Arzu B Y, Arzu Uçar T. (2012). “In Vitro Micropropagation, Antibacterial and Antitumor Activity of Bittersweet (*Solanum Dulcamara*L.)” *New*

- Biotechnology 29: 174–175.
- Perez-Alenza, MD, Peña, L, Del Castillo, N, Nieto, AI. 2000. Factors influencing the incidente and prognosis in canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* 41: 287-291.
- Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo* 25 (3): 455-465.
- Ravalji M, Buch P, Uggini G. K, Awasthi A, Cevallos-Arellano E; Balakrishnan S (2015). Amazonian Plant Extract Birm Reverses Chronic Neuropathic Pain In Rat Sciatic Nerve Chronic Constriction Injury Model. *Pharmacology Online*. (3) 33-43
- Rao NA, Van Wolferen ME, Van den Ham R, Van Llenen D, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, Mol JA. 2008. cDNA microarray profiles of canine mammary tumour cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype. *Anim Genet*. 39(4):333-45.
- Robinson N G. (2013). “16 – Complementary and Alternative Medicine for Cancer: The Good, the Bad, and the Dangerous.” *In: Withrow and MacEwen’s Small Animal Clinical Oncology*: Elsevier, Fort Collins, Colorado, USA. 280–292.
- Saito T, Dai T, Asano R. The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells. (2013). *Oncol Lett* ;5(3):1068-1074.
- Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L. (2015). “Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem.” *PLoS ONE* 10 (5): 1–15.

- Schneider R, Dorn C, Taylor O. (1969). "Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival." *Journal of the National Cancer Institute* 43 (6): 1249–1261.
- Shamaladevi N, Araki S, Lyn DA, Ayyathurai R, Gao J, Lokeshwar VB, Navarrete H, Lokeshwar BL (2016). The andean anticancer herbal product BIRM causes destabilization of androgen receptor and induces caspase-8 mediated-apoptosis in prostate cancer. *Oncotarget* 7(51): 84201-84213.
- Sleeckx N, Rooster H, Veldhuis Kroeze EJB, Van Ginneken C, Van Brantegem L. (2011). "Canine Mammary Tumours, an Overview." *Reproduction in Domestic Animals* 46 (6): 1112–1131.
- Sorenmo K U, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt M H. (2011). "Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms." *Veterinary Pathology* 48 (1): 85–97.
- Sorenmo K, Deanna R W, Goldschmidt M. (2013). "Tumors of the Mammary Gland Mammary Gland Tumors in Dogs." *In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*: Elsevier, Fort Collins, Colorado, USA. 280–292.
- Sorenmo K. (2003). "Canine Mammary Gland Tumors." *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33 (3): 573–596.
- Tan JX, Wang XY, Su XL, Li HY, Shi Y, Wang L, Ren GS. (2011). Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One*;6(7):1-9
- Tavasoly A, Golshahi H, Rezaie A, Farhadi M (2013). Classification and grading of canine malignant mammary tumors. *Vet Res Forum* 4(1):25-30.

Torres CG, Olivares A, Stoore C (2015). Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncology Rep* 33: 2235-2244.

Treeck O, Diedrich K, Ortman O. 2003. The activation of an extracellular signal-regulated kinase by oestradiol interferes with the effects of trastuzumab on HER2 signalling in endometrial adenocarcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 39: 1302-1309.

Van Garderen, E, Schalken, JA. 2002. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Mol Cell Endocrinology* 197: 153-165.

Vickers A J, Cassileth B. (2006). "Complementary and Alternative Medicine for Cancer." *Oncology: An Evidence-Based Approach*, 194–203.

Zaidan Dagli ML. 2008. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook. *Vet J.* 177 (1): 3-5.