

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE

POSTGRADO Y POSTÍTULO



“ROL DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR SIMVASTATINA SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO CANINO CF41. Mg”

Fernando José Reyes Leiva

Tesis para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario y al Grado de
Magíster en Ciencias
Animales y Veterinarias,
mención Patología Animal.

SANTIAGO, CHILE

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE

POSTGRADO Y POSTÍTULO



“ROL DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR SIMVASTATINA SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO CANINO CF41. Mg”

Fernando José Reyes Leiva

**Tesis para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario y al Grado de
Magíster en Ciencias
Animales y Veterinarias,
mención Patología Animal.**

SANTIAGO, CHILE

2017

Departamento y Fuentes de Financiamiento

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa del Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Financiada por el proyecto FONDECYT N° 11110148, “*Could statins decrease the canine mammary cancer stem-like cells proliferation?*”

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Cuerpo Preliminar

A.- Resumen.....	1
B.- Sumarry.....	2

Exordio

1.-Introducción.....	3
2.-Revisión bibliográfica.....	5
2.1.- Neoplasias.....	5
2.2.- Neoplasias mamaria canina.....	5
2.3.- Estatinas/simvastatina.....	10
2.4.- Autofagia.....	13
2.5 Autofagia en el cáncer.....	16
3.- Hipótesis.....	20
4.- Objetivos.....	20
4.1.- Objetivo general.....	20
4.2.- Objetivos específicos.....	20
5.- Estrategia experimental.....	21
5.1.- Objetivo 1.	21
5.2.- Objetivo 2.	22
6.- Material y método.....	23
6.1.- Materiales.....	23
6.1.1.- Biológicos.....	23
6.1.2.- Físicos.....	23
6.2.- Método.....	25
6.2.1.- Cultivo celular.....	25

6.2.2.- Cuantificación niveles de autofagia.....	25
6.2.3.- Evaluación de autofagia por inmunocitoquímica.....	26
6.2.3.1.- Bloque celular.....	26
6.2.3.2.- Tinción hematoxilina eosina.....	27
6.2.3.3.- Inmunocitoquímica.....	27
6.2.3.4.- Cuantificación.....	28
6.2.4.- viabilidad celular en respuesta a simvastatina.....	28
6.2.5.- Análisis Estadístico.....	29
7.- Resultados.....	30
7.1.- Objetivo 1.....	30
7.1.1.- Simvastatina incrementó la actividad autofágica.....	30
7.1.2.- Simvastatina incrementó la expresión de LC3/beclina1..	33
7.2.- Objetivo 2.....	36
7.2.1.- Autofagia inducida por simvastatina no incrementó la viabilidad celular.....	36
8.- Discusión.....	39
9.- Conclusión.....	45
10.- Bibliografía.....	46

RESUMEN

Introducción.

El cáncer mamario es el tipo de tumor más prevalente en la hembra canina. Información reciente demuestra que simvastatina exhibe un efecto antitumoral *in vitro* e induce autofagia sobre diversas líneas celulares neoplásicas. Sin embargo, no hay evidencia de que ocurra en células de carcinoma mamario canino. La autofagia es un proceso catabólico que permite a las células sobrevivir bajo condiciones de estrés metabólico, cumpliendo un rol dual en cáncer asociado a supresión y promoción tumoral dependiendo del contexto celular. En ese contexto, la autofagia jugaría un rol en la supervivencia y muerte de células tumorales en respuesta a agentes antitumorales. El objetivo de este estudio fue analizar los efectos de simvastatina sobre la autofagia y la viabilidad de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg.

Materiales y métodos.

Células CF41. Mg fueron cultivadas y tratadas con simvastatina (1 y 5 μ M) por 24 horas y analizadas mediante citometría de flujo utilizando naranja de acridina. Se analizó la expresión de LC3 y beclina-1 en células tratadas con simvastatina y 3-metiladenina (inhibidor de autofagia) mediante inmunocitoquímica. Adicionalmente, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante el método de exclusión de azul tripan con células tratadas con simvastatina en presencia de Q-VD-OPh (inhibidor de apoptosis) y 3-metiladenina.

Resultados

Tanto la actividad autofágica como la expresión de LC3 y beclina-1 fueron inducidas por simvastatina ($p < 0.05$). Estos efectos fueron revertidos por 3-metiladenina. Simvastatina inhibió la viabilidad celular en forma significativa, aún en presencia de 3-metiladenina ($p < 0.05$). Q-VD-OPh bloqueó el efecto antiproliferativo desencadenado por simvastatina.

Conclusiones

El efecto antiproliferativo de simvastatina sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg no es dependiente de la autofagia inducida por la misma droga. La citotoxicidad de simvastatina se explica casi completamente por la activación de caspasas.

Palabras claves: carcinoma mamario canino, simvastatina, autofagia, LC3, beclina-1

SUMMARY

Introduction

Mammary cancer is the most prevalent type of tumor in the female dogs. Recent data shows that simvastatin exhibit an antitumor effect *in vitro* and it is able to induce autophagy in some neoplastic cell lines. However, there is still no evidence in canine mammary cancer cells. Autophagy is a mayor catabolic process that allows the cells to survive under metabolic stress, performing a dual role in cancer associated to tumor suppression/progression depending on cellular context. Under this context, the autophagy may play a role in the survival and death of tumoral cell in response to anti-tumoral agents. The object of this study was to analyze the effects of simvastatin over the autophagy and viability of canine mammary carcinoma cells CF41.Mg.

Materials and methods

CF41.Mg cells were treated with simvastatin (1 y 5 μ M) for 24 hours and analyzed by flow cytometry using acridine orange dye. The expression of LC3 and beclin-1 in cells treated with simvastatin/3-methyladenine (autophagy inhibitor) by immunocytochemistry was analyzed. Cell proliferation assays with trypan blue dye in presence of simvastatin, Q-VD-Oph hydrate (pancaspase inhibitor) and 3-methyladenine were performed.

Results

Both autophagy activity and LC3/beclin-1 expression were induced by simvastatin ($p < 0.05$). These effects were reversed by 3-methyladenine. This statin inhibited the cell viability, even in the presence of 3-methyladenine ($p < 0.05$). Q-VD-Oph hydrate blocked the anti-proliferative effect of simvastatin.

Conclusions

The anti-proliferative effect of simvastatin over canine mammary carcinoma cells CF41.Mg it's non-depending of the autophagy induced by the drug. The cytotoxicity of simvastatin it's explained almost completely by the caspases activation.

Key words: Canine mammary carcinoma, simvastatin, autophagy, LC3, beclin-1.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la amplia gama de enfermedades que afectan a los animales de compañía, las neoplasias se presentan con gran frecuencia, siendo el tumor mamario uno de los más prevalentes en la hembra canina. Alrededor del 50% de ellos son malignos, lo cual se traduce en invasión local y metástasis, siendo esta última, la principal causa de muerte.

La presentación clínica de la neoplasia mamaria canina se caracteriza por la presencia de una o más masas de tamaño y consistencia variable. El diagnóstico definitivo se realiza mediante el estudio histopatológico, el que otorga a su vez, una aproximación pronóstica del paciente. Se han descrito diversos factores de riesgo como la edad avanzada, la dieta y la obesidad, entre otros.

Actualmente, el tratamiento de elección es la cirugía, acompañado de una quimioterapia adyuvante si la situación lo amerita. Estos tratamientos carecen de selectividad celular, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas más específicas.

Numerosos estudios han demostrado que el uso de fármacos pertenecientes a la familia de las estatinas (inhibidores de la síntesis del colesterol), exhiben un efecto antineoplásico en modelos oncológicos murinos, incluyendo el cáncer mamario. Uno de ellos, la simvastatina, ha demostrado tener efectos antiproliferativos, antiangiogénicos, antimetastásicos y pro-apoptóticos. Lo anterior ha sido comprobado sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, por lo que podría ser considerado para futuros estudios clínicos en perros con carcinoma mamario de alto grado histológico.

Existe evidencia que simvastatina puede inducir un proceso biológico denominado autofagia sobre diversas líneas celulares tumorales, sin embargo, no hay datos previos que hayan estudiado este efecto sobre células tumorales mamarias caninas. La autofagia es un evento que consiste básicamente en un

reciclamiento de componentes celulares con la finalidad de obtener energía y metabolitos necesarios para sobrevivir en el caso que las células se encuentren desprovistas de nutrientes. Este mecanismo de “sobrevida” puede llegar al extremo, conduciendo a las células a su muerte. Así, estudiar autofagia en células neoplásicas en respuesta a alguna droga citotóxica adquiere relevancia en el marco que estas células pueden tener bloqueadas algunas vías promotoras de apoptosis.

En esta tesis se estudió el potencial efecto de simvastatina sobre la actividad autofágica en una línea celular derivada de carcinoma mamario canino CF41.Mg, analizando su relación con la supervivencia y muerte celular.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neoplasia.

Las patologías neoplásicas se caracterizan por una proliferación descontrolada de células mutadas, al incrementar señales de proliferación e inhibir aquellas que las suprimen (Hanahan *et al.*, 2011). Adicionalmente, este conjunto de células son capaces de mantener ilimitadamente este elevado ritmo proliferativo (“inmortalidad”), evitando entrar en senescencia y desarrollando resistencia a mecanismos de muerte celular programada (apoptosis) (Blasco, 2005).

Las células neoplásicas son capaces de evadir la respuesta citotóxica del sistema inmune del hospedero, más aún, reaccionan aumentando su proliferación a causa de diversos factores de crecimiento asociados al proceso inflamatorio. Por otro lado, estas células son potencialmente capaces de invadir sitios distantes a los de su origen (metástasis), siendo esta la principal causa de muerte en pacientes con cáncer (Hanahan *et al.*, 2011).

2.2 Neoplasia mamaria canina.

Las glándulas mamarias son glándulas sudoríparas modificadas, las cuales se ubican en paralelo a la línea media abdominal. La hembra canina suele tener 5 pares de glándulas. Los 2 primeros pares craneales se denominan glándulas mamarias torácicas craneales y caudales, los dos pares siguientes son denominados glándulas mamarias abdominales craneales y caudales, mientras que el par más caudal corresponden a las glándulas mamarias inguinales (Sleeckx *et al.*, 2011).

Dentro de los distintos tipos de neoplasia, los tumores mamarios se presentan con mayor frecuencia, tanto en mujeres como en hembras caninas (Dolka *et al.*, 2013; Sleeckx *et al.*, 2014), representando alrededor de un 52% de todas las neoplasias en estas últimas (Pedraza *et al.*, 2008), con una prevalencia del 0,2%

(Klopfleisch *et al.*, 2011). Las glándulas abdominales caudales y las inguinales son las más afectadas (Sleeckx *et al.*, 2011). Alrededor de un 50 % de los pacientes pueden presentar tumores múltiples, siendo aproximadamente el 50% de naturaleza maligna (Sleeckx *et al.*, 2014). Esta malignidad implica capacidad de invasión local y metástasis, la cual puede afectar principalmente a linfonodos regionales y pulmones, no obstante pueden afectarse otros sitios como hígado, bazo, hueso, riñones, corazón, encéfalo, páncreas, entre otros (Shafiee *et al.*, 2013).

Esta patología raramente ocurre en machos y puede presentarse en hembras de cualquier raza y edad (Shafiee *et al.*, 2013). Se describen razas con mayor predisposición a desarrollar la enfermedad como lo son el Boston Terrier, Fox terrier, Airedale Terrier, Dachshund, entre otras (Ochoa *et al.*, 2012), sugiriendo la existencia de un componente genético, sin embargo no se ha encontrado alguna mutación genética en común (Sleeckx *et al.*, 2011). En la mujer, mutaciones en los genes BRCA 1/2 están asociados a una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer mamario, la que aumenta entre un 56% - 84%. En perras Springer Spaniel, la mutación de estos genes tienen una implicancia etiopatogénica parecida a lo recién descrito en mujeres (Sleeckx *et al.*, 2011).

La edad de mayor presentación es entre los 8 a 11 años de edad (Cassali *et al.*, 2011); perras con neoplasias benignas tienen una edad de presentación promedio de 8,5 años, mientras que aquellas que presentan malignidad, tienen una edad promedio de 9,5 años de edad (Sleeckx *et al.*, 2011).

En su mayoría, las neoplasias mamarias muestran dependencia de hormonas esteroidales como estradiol y progesterona, las cuales bajo condiciones fisiológicas y patológicas promueven la proliferación del tejido mamario (Sleeckx *et al.*, 2011). Así, una ovariectomía (OVH) temprana (previo al primer celo) tiene un efecto preventivo significativo, el cual se pierde si se realizan esterilizaciones posteriores al segundo o tercer celo (Dore *et al.*, 2003; Sorenmo *et al.*, 2010; Kristiansen *et al.*, 2013;).

Se ha descrito a la obesidad como otro factor de riesgo relevante para esta enfermedad. Existe una asociación positiva entre una condición corporal elevada y un incremento en los niveles circulantes de estradiol (Jardé *et al.*, 2009). Por otro lado, el exceso de tejido adiposo sintetiza y secreta la hormona leptina, la cual también se ve involucrada en la proliferación de células tumorales mamarias al aumentar la expresión y actividad de la enzima aromatasa, generando más estradiol (Jardé *et al.*, 2009). Estradiol induce proliferación de células de carcinoma mamario a través de la activación de diversas vías de señalización intracelular, lo cual induce un aumento en la expresión de ciclinas e inactivación de inhibidores del ciclo celular como la proteína supresora de tumores pRb (proteína del retinoblastoma) (Garofalo *et al.*, 2006).

Frente a lo expuesto anteriormente, en las perras (al igual que en humanos), tratamientos previos con progestágenos, edad avanzada, obesidad y una dieta alta en contenido graso, representan importantes factores de riesgo para el desarrollo de esta patología (Uva *et al.*, 2009).

La presentación clínica es variable, pero la mayoría de las perras con neoplasia mamaria se encuentran relativamente sanas al momento del examen clínico. Estas suelen presentar una o más masas, la/s cual/es pueden ser detectadas por los mismos propietarios o por el médico veterinario al momento del examen clínico pertinente (Cassali *et al.*, 2011). Estas masas pueden ser de consistencia y tamaño variable y, pueden presentar inflamación e incluso ulceración en la piel. En caso de presentar metástasis, los pacientes pueden mostrar sintomatología inespecífica como letargia, fatiga, disminución de peso, disnea, tos, linfoedema, cojera, entre otros. Estos signos dependerán del sitio anatómico invadido por focos tumorales metastásicos (Sleeckx *et al.*, 2011).

El diagnóstico de la enfermedad tumoral mamaria se lleva a cabo mediante una historia clínica lo más completa posible, recabando información acerca del curso clínico de la enfermedad, estado reproductivo, edad al momento de la OVH en caso

de haber sido sometida a esterilización, tratamientos previos con progestágenos, tipo y frecuencia de la dieta, entre otros. Adicionalmente se debe realizar una exploración clínica exhaustiva de ambas cadenas mamarias (Cassali *et al.*, 2011), inspeccionando y palpando cada una de las mamas, idealmente con el paciente de cúbito dorsal, para facilitar la detección de masas. Siempre hay que considerar un examen clínico general, en el contexto que la mayoría de los ejemplares afectados son viejos (Cassali *et al.*, 2011; Sleenckx *et al.*, 2011).

Es relevante que al momento del examen clínico se realice una palpación de los nódulos linfáticos regionales y un aspirado de aguja fina para posteriormente realizar un análisis citológico cuando exista sospecha de metástasis (Sleenckx *et al.*, 2011). El diagnóstico definitivo se obtiene mediante el análisis histopatológico, el cual determinará el tipo y grado de la neoplasia, generando una aproximación al pronóstico del paciente (Cassali *et al.*, 2011). Este método permite evaluar aspectos importantes tales como invasión vascular sanguínea o linfática, morfología de las células, grado de diferenciación, índice mitótico, presencia o ausencia de necrosis, entre otros (Cassali *et al.*, 2011; Sleenckx *et al.*, 2011).

Aproximadamente un 50% de estos tumores son clasificados histológicamente como malignos, lo que se traduce en invasión local y/o metástasis (Cassali *et al.*, 2011; Im *et al.*, 2013b; Klopffleisch *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2011), siendo esta última la causa más común de muerte en ejemplares con neoplasias, tal como se mencionó anteriormente (Klopffleisch *et al.*, 2011).

La estadificación clínico-patológica del paciente permitirá definir un pronóstico y un tratamiento pertinente. Este sistema se basa en la evaluación del tamaño tumoral (T), infiltración neoplásica de linfonodos regionales (N) y presencia de metástasis (M). El tamaño es considerado como un factor pronóstico, ya que tumores menores a 3 cm están correlacionados con una alta supervivencia. Por otro lado, pacientes que presentan metástasis en linfonodos regionales exhiben una disminución significativa en su expectativa de vida (Cassali *et al.*, 2011).

Para la prevención de metástasis, es necesario un diagnóstico precoz y la instauración rápida de una terapia (Novosad, 2003). En medicina veterinaria, las opciones terapéuticas son limitadas en comparación con el cáncer mamario humano (Sleeckx *et al.*, 2011), e incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia (Novosad, 2003), inmunoterapia (Michishita *et al.*, 2010) y terapia hormonal (Zamani-Ahmadmahmudi *et al.*, 2013). La elección de las opciones terapéuticas dependerá de la condición general del paciente, estadio clínico, tipo y grado histológico (Funakoshi *et al.*, 2000).

Actualmente, el tratamiento de elección es la cirugía, la cual puede estar acompañada por una quimioterapia adyuvante en casos donde se presenta reaparición local o metástasis. El procedimiento quirúrgico consta básicamente en remover la totalidad de la masa, pudiendo ser de carácter curativo mientras las características macroscópicas de la/s lesión/es permitan una escisión completa y no exista presencia de metástasis (Cassali *et al.*, 2011; Sleeckx *et al.*, 2011).

A pesar que en tumores mamaros malignos el tratamiento de elección sigue siendo la cirugía (Zamani-Ahmadmahmudi *et al.*, 2013) en conjunto con la quimioterapia, la tasa de supervivencia es baja debido a una alta probabilidad de recidiva local y metástasis (Muhammadnejad *et al.*, 2012). Estos tratamientos se caracterizan por carecer de selectividad y ser poco eficientes en casos diseminados (Sorenmo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015). Aún más, considerando la gran capacidad que tienen las células neoplásicas para desarrollar resistencia a la quimioterapia, producto del desarrollo de variados mecanismos como la capacidad de excretar drogas, reparar el ADN, evadir apoptosis, entre otros (Król *et al.*, 2010), se genera una necesidad de buscar alternativas farmacológicas más específicas e inocuas para el tratamiento de esta patología (Gopalan *et al.*, 2013a).

2.3 Estatinas/simvastatina.

Las estatinas son un grupo de drogas utilizadas en humanos para reducir los niveles plasmáticos de colesterol (Gopalan *et al.*, 2013b). Actualmente, se describe que estas drogas exhiben un efecto antineoplásico, comprobado en modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de pulmón, próstata, melanoma, colon y glándula mamaria (Mandal *et al.*, 2011; Demierre *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014; Falcone *et al.*, 2013; Guterres *et al.*, 2013), haciéndolas de gran interés de estudio en el modelo tumoral mamario canino.

Su principal uso clínico es en pacientes con hipercolesterolemia y con patologías cardiovasculares (Demierre *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2013), ya que son capaces de inducir efectos protectivos sobre la función vascular y plaquetaria (Al-Husein *et al.*, 2013; Zanfardino *et al.*, 2013). En este contexto, las estatinas son también prescritas para tratar patologías como la aterosclerosis, enfermedad coronaria e infartos miocárdicos (Wang *et al.*, 2013). Adicionalmente, poseen efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y antioxidantes (Fang *et al.*, 2013; Zanfardino *et al.*, 2013).

Esta familia de drogas involucra un gran número de fármacos, los cuales se clasifican en lipofílicos e hidrofílicos, siendo los primeros los de mayor utilidad al tener un efecto más potente que los segundos. Lovastatina, fluvastatina, atorvastatina y simvastatina corresponden a estatinas lipofílicas, las cuales tienen la capacidad de ingresar a las células atravesando la membrana plasmática por difusión simple (Fang *et al.*, 2013). Estos fármacos interrumpen la biosíntesis de mevalonato, lo que se traduce en una disminución de la síntesis de colesterol y otras moléculas como los isoprenoides geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) y farnesil pirofosfato (FPP) (Garwood *et al.*, 2010).

Estas drogas son capaces de inhibir la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A-reductasa de manera competitiva (Ahmed *et al.*, 2013), ya que son análogos estructurales de su sustrato (Zhou *et al.*, 2012), impidiendo la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (3-HMG-CoA) a mevalonato (Bjarnadottir *et al.*, 2013). De esta forma, las estatinas pueden afectar la generación de moléculas críticas para la progresión tumoral (Ahmed *et al.*, 2013), tales como los isoprenoides GGPP y FPP. Estos se unen a varias proteínas de señalización intracelular, modificándolas post-traduccionalmente (prenilación), lo cual permite su anclaje a la membrana celular y posterior activación (Demierre *et al.*, 2005).

Dentro de estas proteínas se encuentran GTPasas que pertenecen a las familias Ras y Rho, preniladas por FPP y GGPP respectivamente (Demierre *et al.*, 2005). Ras y Rho son capaces de regular el potencial proliferativo e invasivo de variados tipos de células tumorales, incluidas células de cáncer mamario (Mandal *et al.*, 2011), modulando vías intracelulares gatillantes de supervivencia, proliferación y motilidad (Ahmed *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2011). Así, al inhibir la síntesis de estos isoprenoides, las estatinas impiden esta modificación post-traducciona, explicando en parte los efectos que tienen estas drogas sobre diferentes aspectos de la biología neoplásica (Demierre *et al.*, 2005).

Simvastatina es una estatina lipofílica de origen fúngico (Demierre *et al.*, 2005), que mantiene los efectos ya descritos para las estatinas contra algunas neoplasias (Gopalan *et al.*, 2013a). Se ha demostrado que este fármaco bloquea la proliferación e induce apoptosis sobre la línea celular CF41.Mg derivada de carcinoma mamario canino (Torres *et al.*, 2015). Dicha línea celular tiene características similares a las observadas en carcinomas de alto grado de malignidad (Saito *et al.*, 2013), haciendo de gran interés su estudio en respuesta a drogas con potencial antineoplásico.

Como ya se ha mencionado, diversos estudios demuestran que simvastatina es capaz de inducir apoptosis (Demierre *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2015), aunque

actualmente se desconocen en detalle todos los mecanismos involucrados (Gopalan *et al.*, 2013b). Los mecanismos implicados en estos efectos incluyen la activación de la vía de señalización JNK, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), activación de especies reactivas de óxido nítrico inducibles (aumento de óxido nítrico intracelular), supresión de la quinasa Akt y del factor de transcripción NF-kB, activación de la proteína pro-apoptótica Bax, entre otros.

Adicionalmente, se ha demostrado que simvastatina genera un aumento en la expresión y activación de p53 (Wang *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015), proteína supresora de tumores encargada de desencadenar arresto celular por daño en el ADN celular. Esto llevará a la reparación del mismo, o bien, conducirá a la célula a apoptosis en el caso que el daño no pueda ser reparado (Klopfleisch *et al.*, 2011). Esta mayor expresión de p53 (Mandal *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013) inducida por la estatina genera una disminución en la síntesis de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (Manu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013), un aumento de Bax y activación de caspasa 9 (Gopalan *et al.*, 2013a, Wang *et al.*, 2013) y caspasa 3 (Tuerdi *et al.*, 2013).

Esta estatina puede conducir a arresto del ciclo celular o senescencia, mediante el aumento de la expresión del gen p21, el cual codifica para la proteína CDKN1A, capaz de detener el ciclo celular (Gutters *et al.*, 2013).

Por otra parte, simvastatina induce un incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual genera un incremento en la expresión de p53, y como se mencionó previamente, esto puede finalizar en la muerte de las células por apoptosis. En este contexto, la estatina es capaz de modular diversas cascadas de señalización intracelular asociadas a apoptosis como la vía JNK/CHOP/DR5. El mecanismo mediante el cual simvastatina incrementa la expresión de JNK es desconocido, sin embargo, se sabe que esta quinasa incrementa la expresión de CHOP, el cual activa a DR5, finalizando en la activación de caspasa 8, desencadenando apoptosis (Gopalan *et al.*, 2013b).

En células neoplásicas, la activación de la vía PI3K/Akt ha sido relacionada con tumorigénesis, progresión tumoral y desarrollo de mecanismos antiapoptóticos (Ghosh-Choudhury *et al.*, 2010). Por otro lado, la proteína supresora de tumores PTEN inhibe esta vía, la cual suele estar mutada en diversos tipos de neoplasias de origen humano, perdiéndose la regulación ejercida sobre la vía PI3K/Akt. Recientemente, se ha demostrado que simvastatina modula la actividad de NF- κ B, generando como resultado una disminución de Bcl-xl (proteína anti-apoptótica) y un incremento de PTEN, modulando negativamente la vía PI3K/AKT y sensibilizando a las células a la apoptosis (Ghosh-Choudhury *et al.*, 2010).

Estos efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos son mayores en células neoplásicas que en normales (Demierre *et al.*, 2005; Gopalan *et al.*, 2013a; Zanfardino *et al.*, 2013). Esto podría deberse a que las células tumorales presentan una elevada expresión de HMG-CoA (Demierre *et al.*, 2005; Borgquist *et al.*, 2008) y un mayor requerimiento de isoprenoides derivados de la vía del mevalonato, en comparación con células normales (Demierre *et al.*, 2005), lo cual le otorgaría un grado de selectividad terapéutica a estas drogas. Adicionalmente, las estatinas son moléculas con un amplio margen de seguridad, ya que son bien toleradas aún en dosis elevadas (Garwood *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2014) 10 a 50 veces más altas que lo prescrito rutinariamente para enfermedades cardiovasculares (Al-Husein *et al.*, 2013), a diferencia del estrecho margen que poseen los fármacos utilizados en quimioterapia.

Por otra parte, simvastatina es capaz de inducir un aumento en la actividad de la macroautofagia (Wei *et al.*, 2013), “mecanismo de sobrevida celular programada”, el cual puede finalizar en la muerte de células neoplásicas en algunos casos (Yousefi *et al.*, 2006). Este punto es de vital importancia considerando que las células neoplásicas pueden tener suprimida la apoptosis producto de modificaciones genéticas o epigenéticas (Hanahan *et al.*, 2011).

2.4 Autofagia.

La palabra autofagia proviene del griego, que significa “La digestión de uno mismo”. Este es un mecanismo fisiológico que ocurre a bajos niveles dentro de las células de manera constante, el cual se encuentra finamente regulado (Dalby *et al.*, 2010). Se pueden identificar tres tipos de autofagia, macroautofagia (referida como autofagia de aquí en adelante), microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (Kang *et al.*, 2011), siendo la primera la de interés en este estudio.

La autofagia es un proceso esencial, evolutivamente muy conservado, el cual consiste en la degradación selectiva de componentes celulares, como proteínas citoplasmáticas, macromoléculas e incluso organelos tales como el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias (Dalby *et al.*, 2010; Klionsky *et al.*, 2007; Thorburn, 2008). Este mecanismo también corresponde a la única vía lisosomal por la cual es posible degradar organelos por completo (Klionsky *et al.*, 2007).

La función esencial de la autofagia es lograr mantener la homeostasis energética celular, como también el control de la calidad de las proteínas, asegurando así, la sobrevivencia de la célula (Gong *et al.*, 2012). Este proceso celular ocurre tanto en células normales como en células neoplásicas, dado que diversos factores estresantes pueden gatillar el aumento de la actividad autofágica (Levine, 2007).

La autofagia consta principalmente de seis pasos, iniciación, nucleación, elongación, cierre, maduración y degradación. En la iniciación, toma gran relevancia la proteína mTOR (por sus siglas en inglés, mammalian target of rapamycin) (Zhang *et al.*, 2013). Esta proteína es uno de los principales reguladores inhibitorios de la autofagia, la cual impide la formación de complejos proteicos de Atg (por sus siglas en inglés, autophagy-related genes) tales como ULK1- Atg13-Atg17, Vsp34- Atg6-Vps15. mTOR también regula la actividad de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (LC3 y Atg12-Atg5). De esta manera, al inhibir proteínas Atg y la formación

de complejos proteicos de los mismos, mTOR regula negativamente el proceso de autofagia (Tanida *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013).

mTOR es regulada a su vez por quinasas sensibles a cambios en la relación AMP/ATP (AMPK), la cual en bajos niveles de ATP, fosforila a mTOR, inactivándola (Zhang *et al.*, 2013). La inhibición de la síntesis de mevalonato y la consecuente disminución en los niveles celulares de GGPP inducidos por simvastatina (y otras estatinas), activan a AMPK, la que a su vez inactiva a mTOR, generando un aumento en la actividad autofágica (Wei *et al.*, 2013). Por otra parte, la actividad autofágica es regulada por Akt, quinasa que activa a mTOR (vía denominada Akt/mTOR). Las dos vías de señalización recién mencionadas son moduladas por simvastatina, la cual incrementaría la actividad autofágica (Wang *et al.*, 2015; Ghosh-Choudhury *et al.*, 2010).

Otros mecanismos asociados a iniciación autofágica incluyen a p21 y p53, moléculas que son moduladas por simvastatina, tal cual ya ha sido mencionado. Así, simvastatina genera un aumento en la expresión de p21, la cual al fosforilarse se relocaliza desde el núcleo hacia el citosol, actuando como señal de estrés del retículo endoplásmico, siendo este último un estímulo que funciona como señal intracelular para iniciar autofagia (Zhang *et al.*, 2013). El incremento en la expresión de p53 nuclear tras el tratamiento con simvastatina activa la expresión de genes de autofagia y así induce este proceso. Sin embargo, si p53 se localiza en el citosol, podría actuar como un regulador negativo de autofagia. Es necesario más investigación para dilucidar completamente el rol de esta proteína en la regulación de la autofagia (Zhang 2013).

Después de la fase de iniciación, comienza la fase de nucleación, donde un conjunto de proteínas forman un complejo que dará origen finalmente al fagoforo (membrana que rodea y secuestra las estructuras celulares a ser degradadas y recicladas) (Gong *et al.*, 2012). Esta etapa es regulada por beclina-1, siendo esta molécula un importante biomarcador de autofagia (Gong *et al.*, 2012). Beclina-1

interactúa con una fosfoinositol 3-quinasa clase III (PI3K- clase III), llamada Vsp34 y un conjunto de otras proteínas, las cuales permitirán el crecimiento de la membrana (Ong *et al.*, 2010).

Al crecimiento de la membrana del fagoforo se denomina como la etapa de elongación, la cual finaliza al tener contacto ambos extremos de la membrana (etapa de cierre) (Gong *et al.*, 2012). De esta manera se forma una estructura denominada autofagosoma. Estas etapas son mediadas por dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (LC3 y Atg12-Atg5), los cuales permiten formar un complejo proteico Atg16L y el procesamiento de LC3 a LC3-II (otro biomarcador de autofagia) (Ong *et al.*, 2010).

Finalmente, la maduración se encuentra mediada por LC3-II y beclina-1, proteínas lisosomales como LAMP1 y LAMP2, además del pH ácido otorgado por los mismos, los cuales se fusionan con el autofagosoma, para así formar el autofagolisosoma. De esta manera se generan las condiciones necesarias para la degradación de los componentes subcelulares (Kang *et al.*, 2011), su reciclaje y la reutilización de algunos de ellos (Levine, 2007).

Es de esta forma como las células se proveen de nutrientes y energía para lograr sobrevivir bajo condiciones de stress (Levine, 2007). Adicionalmente, este proceso ayuda a la eliminación de organelos dañados, proteínas tóxicas agregadas y organismos invasores (Gong *et al.*, 2012). En pocas palabras, la autofagia cumple un rol de "supervivencia celular programada" durante los períodos de estrés celular. Sin embargo, las funciones de "auto-canibalismo" paradójicamente pueden ser perjudiciales y conducir a muerte celular, considerado este proceso como muerte celular programada tipo II (Levine, 2007; Maiuri *et al.*, 2007; Thorburn, 2008).

2.5 Autofagia en el cáncer

La autofagia regula el crecimiento neoplásico mediante la inhibición o promoción de la proliferación neoplásica y tumorigénesis, dualidad que es dependiente del contexto celular (White E., 2017).

Se ha descrito que en alrededor de un 40% a un 75% de los cánceres ováricos, mamarios y prostáticos humanos, el gen que codifica para beclina-1 se encuentra monoalélicamente mutado lo cual implicaría supresión de autofagia (Jin *et al.*, 2008; Dalby *et al.*, 2010). Algunos ensayos celulares apoyan estas observaciones, sugiriendo que la supresión de la autofagia promueve el crecimiento neoplásico (referencia). En el caso de la neoplasia mamaria canina, el único reporte relacionado sugiere que la pérdida de la expresión de beclina-1 se asocia significativamente con progresión tumoral y bajas tasas de supervivencia (Liu *et al.*, 2013). Sin embargo, la posibilidad que beclina-1 sea un gen supresor de tumores es discutida actualmente dado que en algunos casos su pérdida alélica promueve la activación de p53 reduciendo la tumorigénesis, efecto biológico opuesto a lo ya mencionado (Huo *et al.*, 2013)

La regulación sobre proteínas, organelos y homeostasis energética propio de la autofagia, permiten a la célula mantener el control sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) y evitar la acumulación de proteínas mal plegadas. Estos dos elementos (principalmente las ERO's) son capaces de generar activación de la respuesta a daño del ADN e inestabilidad genómica, lo cual puede ser un punto crucial en la génesis tumoral (Dalby *et al.*, 2010; Hanahan *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2008). Así, esta inestabilidad genómica generada por defectos en la autofagia puede tener como consecuencia una alteración en el mecanismo de apoptosis o en su regulación, impidiendo así la muerte celular y promoviendo la proliferación de células tumorales (Hanahan *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2008).

Por otro lado, una vez que un tumor se ha establecido y su crecimiento alcanza sobre los 2 mm, comienza un estrés metabólico progresivo a medida que el tumor crece. El oxígeno, factores de crecimiento y nutrientes como la glucosa y

aminoácidos no logran difundir eficientemente por el tejido a causa de una inadecuada vascularización (Folkman *et al.*, 2006). Razón por la cual, este estrés metabólico es capaz de inducir un incremento en la actividad autofágica de células neoplásicas con la finalidad de mantener la homeostasis energética. Desde esta perspectiva, la autofagia es considerada como un factor de mal pronóstico en diversos tipos de cáncer como el carcinoma hepatocelular y el mamario (Dalby *et al.*, 2010; Gozuacik *et al.*, 2004), y podría considerarse como un proceso biológico que promueve el crecimiento neoplásico.

A pesar de que el proceso de autofagia mantiene a las células neoplásicas dentro de un margen aceptable de homeostasis energética debido a un proceso catabólico mayor, las funciones de “auto-canibalismo” paradójicamente pueden ser perjudiciales y conducir a muerte celular, considerado este proceso como muerte celular programada tipo II, presentando de esta manera, un rol dual sobre la viabilidad de las células neoplásicas (Levine, 2007; Maiuri *et al.*, 2007; Thorburn, 2008). Diversos estudios demuestran que la autofagia podría incluso sensibilizar a las células neoplásicas frente a estímulos proapoptóticos (Yousefi *et al.*, 2006).

En la actualidad, el mecanismo de muerte celular atribuida a autofagia no se encuentra del todo claro. Un estudio reciente sugiere que este proceso se encontraría mediado por bombas de Na⁺/K⁺-ATPasas en la membrana nuclear, pero no se tiene información concreta de cómo se desarrolla y que proteínas regulan dicho proceso (Liu *et al.*, 2015).

La muerte celular programada tipo II es de gran importancia debido a que muchas células neoplásicas exhiben resistencia a los mecanismos de muerte celular programada, específicamente a apoptosis (Hanahan *et al.*, 2011). Diversos estudios demuestran que este proceso cumpliría un rol en la muerte de células neoplásicas en las cuales el mecanismo de apoptosis sea deficiente o difícil de inducir, comprobado incluso en células de carcinoma mamario humano (Akar *et al.*, 2008; Dalby *et al.*, 2010). Mientras que estudios más recientes soportan la idea de que la autofagia

cumple un rol citoprotectivo en el el contexto de la terapéutica oncológica, lo cual podría asociarse a quimioresistencia (Kang *et al.*, 2014; Misirkic *et al.*, 2012; Vilimanovich *et al.*, 2015).

En relación a lo anterior, diversos estudios sugieren que la inhibición de la autofagia aumenta los efectos citotóxicos de una serie de drogas antineoplásicas (Firat *et al.*, 2012; Sotelo *et al.*, 2006). Actualmente un gran número de estudios clínicos en humanos se encuentran estudiando inhibidores de la autofagia como la cloroquina/hidroxy-cloroquina comprobando este último punto (Sui *et al.*, 2013).

Actualmente se ha comprobado que drogas quimioterapéuticas como epirrubicina son capaces de inducir autofagia en células de carcinoma mamario humano MCF-7, protegiéndolas del efecto apoptótico de los mismos fármacos; incluso se ha demostrado que el uso de cloroquina es capaz de sensibilizar a los efectos de la quimioterapia (Sun *et al.*, 2011; Maycotte *et al.*, 2012).

En consecuencia, la autofagia se ha estudiado con la finalidad de determinar si es posible modularla como un mecanismo de muerte celular directa o indirectamente (promoviéndola o inhibiéndola), en células neoplásicas donde la apoptosis esté suprimida total o parcialmente debido a mutaciones en genes supresores de tumores (Yousefi *et al.*, 2006).

Simvastatina es capaz de inducir apoptosis como también autofagia en diversas líneas celulares (Torres *et al.*, 2015; Vilimanovich *et al.*, 2015). Este último proceso, cumple un rol dual y contradictorio sobre la viabilidad celular, el cual ha sido descrito previamente. A pesar de aquello, diferentes estudios sugieren que frente al estímulo citotóxico de simvastatina, el rol de la autofagia sería mantener la sobrevivencia celular más que promover en ellas su muerte (Vilimanovich *et al.*, 2015).

Diversos estudios han demostrado que la inhibición de la autofagia junto a la adición de estatinas, induce una sensibilización a la apoptosis generada por estas

drogas (Kang *et al.*, 2014; Misirkic *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2010), demostrando el efecto citoprotectivo que tendría este proceso celular.

Por lo tanto, se vuelve relevante estudiar el efecto que tiene simvastatina sobre autofagia en células de carcinoma mamario canino, dado la inexistencia de datos en este contexto celular, y para incrementar el conocimiento acerca del potencial rol terapéutico que podría tener esta droga.

En el presente trabajo se estudió la viabilidad de células de carcinoma mamario canino tratadas con simvastatina, evaluando el potencial rol citoprotectivo de la autofagia frente a dicho tratamiento.

3. HIPÓTESIS

Simvastatina induce autofagia sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, incrementando su viabilidad frente a los efectos pro-apoptóticos del mismo fármaco.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto de simvastatina sobre la viabilidad de células CF41.Mg en relación a autofagia y apoptosis inducidos por el fármaco.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el nivel de autofagia en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina.

2. Determinar viabilidad en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina en presencia de un inhibidor de autofagia y de un inhibidor de apoptosis.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

5.1 Objetivo 1: Determinar el nivel de autofagia en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina.

Como ya se ha descrito, simvastatina induce autofagia en diversas líneas celulares neoplásicas (Wei *et al.*, 2013) incluyendo células de carcinoma mamario humano (Wang *et al.*, 2015). No obstante, no existe evidencia en células derivadas de carcinoma mamario canino.

Para cuantificar los niveles de autofagia inducidos por simvastatina sobre células CF41.Mg derivadas de carcinoma mamario canino, se realizó un análisis por citometría de flujo con naranja de acridina y se determinó la expresión de LC3 y beclina-1 mediante inmunocitoquímica.

Para el análisis de citometría de flujo, las células fueron tratadas por 24 hrs con rapamicina como control positivo, vehículo para el control negativo y dos concentraciones de simvastatina, 1 y 5 μ M. Las concentraciones que se estudiaron han demostrado inducir autofagia sobre diversas líneas celulares (Vilimanovich *et al.*, 2015).

Para determinar la expresión de LC3 y beclina-1, células CF41.Mg fueron tratadas bajo las condiciones experimentales ya descritas por 24 horas. Sumado a estos grupos, se utilizó un inhibidor de autofagia (3 MA, 5 mM) para determinar si la expresión de dichas proteínas es específica del proceso de autofagia.

5.2 Objetivo 2: Determinar viabilidad en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina en presencia de un inhibidor de autofagia y de un inhibidor de apoptosis.

Si bien el proceso de autofagia puede finalizar en muerte celular (Levine, 2007; Maiuri *et al.*, 2007; Thorburn, 2008), su principal función es la de mantenerlas vivas bajo condiciones de estrés. Actualmente, existe evidencia que indica que la autofagia inducida por simvastatina cumple un rol citoprotectivo frente a los efectos pro-apoptóticos del mismo fármaco (Vilimanovich *et al.*, 2015).

Para determinar si el incremento de autofagia en células CF41.Mg cumpliría una función citoprotectiva frente a los efectos pro-apoptóticos de simvastatina, se realizó un estudio de viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul tripán. Las células fueron tratadas por 24 y 48 horas con 5 μ M de simvastatina, que es la concentración más baja que induce apoptosis (Torres *et al.*, 2015), en presencia o no de un inhibidor de autofagia y de un inhibidor de pancaspasas.

El inhibidor de autofagia (3 MA) e inhibidor de la apoptosis (Q-VD-OPh) se adicionaron 30 minutos antes de la adición de simvastatina. De esta manera, se determinó si la muerte celular inducida por la estatina corresponde a un proceso de apoptosis y/o autofagia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.1.1. Biológicos

- Línea celular de carcinoma mamario canino CF41.Mg (ATCC, CRL-6732)
- Células epiteliales renales caninas MDCK (ATCC, CCL-34).

6.1.2. Físicos

- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) Hyclone®.
- MEM (Minimal esencial medium) Hyclone®
- Suero fetal bovino (SFB) Hyclone®.
- Glutamina Hyclone®.
- Solución Antibiótica-antifúngica (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) 100X Hyclone®.
- Tripsina 0,25%/EDTA Hyclone®.
- DPBS (buffer fosfato de Dulbecco a pH 7,4) Gibco®.
- Tinción de Azul tripán 0,4% Gibco®.
- Etanol absoluto para análisis EMSURE®.
- Simvastatina SIGMA-ALDRICH®.
- Agua bidestilada Apiroflex ®.
- Agarosa ultra pura UltraPure®, Invitrogen®.
- Parafina de 56-58°C de punto de fusión Histosec® de Merck.

- Glioxal Shandon Glyo-Fixx® concentrado de Merck®.
- Análogo de Xilol Neo-Clear® de Merck®.
- Medio de Montaje Neo-Mount® de Merck®.
- Cassettes histológicos Mega-cassette®, sakura®.
- Botellas de cultivo celular de 25 cm² marca NUNC®.
- Placas de cultivo 24 pocillos marca NUNC®.
- Cámara de Neubauer para Hemocitometría.
- Centrífuga MPW®, MPW-223c.
- Incubador de CO₂ MERMET®.
- Campana de flujo laminar LabTech.
- Microscopio invertido Motic®, AE31, con cámara Moticom Pro 282A, Motic®.
- Centrífuga CAPP ®, cr68x.
- Citómetro de flujo, Becton Dickinson®-FACScalibur.
- Microscopio Motic® BA310E, con cámara Moticom 580 Motic®.
- Micrótopo Leica, modelo RM2125 RT.
- Centro de inclusión, con un dispensador de parafina EG1120 y una platina fría modelo EG1150C, marca Leica.
- Baño de flotación, marca Lab-line, Lo-Boy 26103.
- Naranja de acridina SIGMA-ALDRICH.
- Anticuerpo anti-LC3 SIGMA-ALDRICH.
- Anticuerpo Beclin-1 Abcam.

6.2. Métodos

6.2.1. Cultivo celular

La línea celular CF41.Mg (ATCC® CRL-6232™) fue cultivada en medio de cultivo DMEM alto en glucosa (4.5 g/L) suplementado con 10% de SFB, 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B. Por otro lado, células MDCK (ATCC® CCL-34™) fueron cultivadas en MEM con 10% SFB. Se mantuvo una atmósfera humidificada a 37°C con 5% CO₂. Se realizaron cambios del medio de cultivo cada 48 horas con previo lavado de las células con DPBS. Para la desagregación de las células, una vez alcanzado un 70-80% de confluencia, estas fueron lavadas con DPBS, para luego ser incubadas con Tripsina 0,25%/EDTA 0.2g/L por 10 minutos a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Posteriormente, se adicionó DMEM alto en glucosa más 10% SFB para luego ser centrifugadas a 388 g por 10 minutos a 4°C. La concentración de células fue estimada a través del método de exclusión con azul tripán y su recuento se realizó en una cámara de Newbauer.

6.2.2. Cuantificación de niveles de autofagia por citometria de flujo.

La determinación y cuantificación de autofagia se realizó mediante un análisis de citometría de flujo utilizando la tinción naranja de acridina. Brevemente, 2×10^5 células CF41.Mg fueron cultivadas en botellas de cultivo celular de 25 cm² (x4) correspondiente a los grupos experimentales control negativo (solo vehículo), control positivo (rapamicina 400 nM), y simvastatina a concentraciones de 1 y 5 µM. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 388 g por 5 minutos, para obtener un pellet celular. Luego, las células fueron lavadas con DPBS, recolectadas y resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo libre de rojo fenol. Posteriormente, se realizó una incubación con naranja de acridina a una

concentración de 1 µg/ml a 35°C y luego las células fueron llevadas directamente al citómetro de flujo para su lectura.

El análisis de citometría de flujo se realizó con emisiones de luz de fluorescencia roja (650 nm) en un equipo FACSCalibur utilizando el software CellQuest. El citómetro de flujo detectó la proporción de células con fluorescencia a naranja de acridina. El índice de actividad autofágica se construyó dividiendo la proporción de células fluorescentes por los valores obtenidos en el control negativo.

6.2.3. Evaluación de autofagia por inmunocitoquímica.

6.2.3.1 Bloque celular

Se sembraron 250.000 células CF41.Mg en botellas de 25 cm² (x 6) hasta alcanzar una confluencia de 70-80% (concentración aproximada de 1 x 10⁶ células por botella). Posteriormente, las células fueron tratadas por 24 horas de acuerdo a los siguientes grupos:

- i) Control negativo (vehículo).
- ii) Simvastatina 1 µM.
- iii) Simvastatina 5 µM.
- iv) Control positivo rapamicina 400 nM.
- v) Inhibidor de autofagia 3-metiladenina (3 MA) 5 mM más 1 µM simvastatina.

Posteriormente, las células de cada grupo fueron recuperadas, centrifugadas, y fijadas con Glyo-Fixx® alcohólico por 4 horas a temperatura ambiente para luego ser centrifugadas y lavadas 3 veces con etanol al 50% en DPBS. Posteriormente, se resuspendieron en 200 µl de agarosa ultra pura al 2% en DPBS en un microtubo de 0,6 ml; una vez gelificada la agarosa a temperatura ambiente, se desprendieron del microtubo para ser colocadas dentro de un cassette histológico para su posterior deshidratación e inclusión en parafina utilizando un procesador de tejidos automático

mediante el siguiente protocolo: alcohol 50° por 30 minutos, alcohol 70° por 30 minutos, 2 veces en alcohol 100° por 30 minutos, 3 veces en alcohol 100°/Neo-Clear® por 15 minutos, 3 veces en Neo-Clear® por 15 minutos, 2 veces en parafina Histosec® por 40 minutos.

Una vez finalizado este procesamiento, se obtuvo el bloque celular, el cual se incluyó en un bloque de parafina para la realización de cortes de 3 µm. Estos cortes fueron secados a temperatura ambiente por 12 horas y rehidratados en batería de desparafinación mediante el siguiente protocolo: 2 veces Neo-Clear® por 5 minutos, 2 veces alcohol 100° por 3 minutos, 2 veces alcohol 95° por 3 minutos, alcohol 80° por 3 minutos, alcohol 70° por 3 minutos y 2 veces en agua destilada por 3 minutos con el fin de realizar tinción con hematoxilina-eosina para verificar el correcto procesamiento.

6.2.3.2 Tinción hematoxilina-eosina

Luego de la rehidratación de las muestras, las láminas fueron teñidas en una batería de tinción siguiendo el siguiente protocolo: 5 minutos en agua destilada, 1 a 2 minutos en hematoxilina de Harris, 30 segundos en agua corriente, 1-2 segundos en alcohol ácido, 30 segundos en agua corriente, 2 segundos en agua amoniacal, 5 minutos en agua destilada, 30 segundos en eosina, 30 segundos en agua corriente, 1 segundo en alcohol 95° por 3 veces, 5 minutos en alcohol 100° por 3 veces, 5 minutos en Neo-clear® y 10 minutos en Neo-clear®. Al finalizar, las muestras fueron montadas con Neo-Mount®, dejándolas secar a temperatura ambiente por 12 horas.

6.2.3.3 Inmunocitoquímica

Para la detección de las proteínas LC3 y beclina-1, se utilizaron los cortes obtenidos de los bloques celulares anteriormente descritos. Estos debieron pasar por una batería de alcoholes grados descendentes para su rehidratación. A continuación, las muestras fueron colocadas en una solución de Citrato 1X, para realizar el desenmascaramiento antigénico, proceso realizado en un microondas por 10 minutos

a baja potencia. Tras enfriarse, las muestras fueron lavadas en un buffer TBS, para posteriormente realizar el bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena por 60 minutos (Peroxido de hidrógeno 10%) y el bloqueo de proteínas con albúmina sérica bovina 5% por 60 minutos. A continuación, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios anti-LC3 por 30 minutos a temperatura ambiente en una concentración de 1:1000 y anti beclina-1 dilución 1:400 a 4 °C por 16 horas. Luego de realizar tres lavados con TBS, se realizó la incubación con anticuerpos secundarios por 30 minutos a temperatura ambiente, utilizando un kit comercial (ImmPress Reagent kit Universal antibody, Vector). Las muestras fueron reveladas con DAB y contrastadas con hematoxilina de Meyer. Finalmente, las muestras fueron montadas previa deshidratación.

6.2.3.4 Cuantificación

El análisis de las muestras fue llevado a cabo mediante la utilización del software Gimp versión 2.8.18, el cual determina el área (cantidad de pixeles) correspondientes a una marca positiva (color café) de manera relativa como se muestra en la siguiente

$$\text{Área positiva relativa} = \frac{\text{Pixeles positivos}}{\text{Pixeles de células totales}}$$

fórmula:

6.2.4. Viabilidad celular en respuesta a simvastatina en presencia de un inhibidor de autofagia e inhibidor de pan-caspasas.

Para los ensayos de proliferación y viabilidad celular, se generaron 5 condiciones experimentales en triplicado en una placa de cultivo de 24 pocillos, sembrando 3.000 células CF41.Mg/MDCK por pocillo. Los grupos fueron organizados de la siguiente manera:

- i) Control negativo (sólo vehículo).
- ii) Simvastatina 5 μ M,
- iii) Rapamicina 400 nM.
- iv) 3 Metiladenina (3MA) 5 mM, más 5 μ M de simvastatina.
- v) Inhibidor de pan-caspasas Q-VD-OPh 5 μ M, más 5 μ M de simvastatina.

Luego de tratar las células por 24 y 48 horas, se evaluó viabilidad celular mediante el método de exclusión de azul tripan. Para tal caso, el medio de cultivo fue recuperado y las células adherentes fueron desprendidas con tripsina por 10 minutos. Luego las células fueron resuspendidas en 200 μ l de DPBS y se obtuvo una alícuota de 30 μ l, a la cual se le agregaron 30 μ l de azul tripan. Finalmente, se realizó el conteo de células vivas (excluyen azul tripan) y muertas (no excluyen azul tripan) en una cámara de hemocitometría.

Adicionalmente, se evaluó proliferación celular en células MDCK en respuesta a 5 μ M de simvastatina de manera de estimar si la estatina afecta a células inmortalizadas no neoplásicas. Para esto, células MDCK se sembraron en triplicado en una placa de 24 pocillos, a una densidad de 3.000 células por pocillo. Luego de tratar las células por 24 y 48 horas, se evaluó viabilidad celular mediante el método de exclusión de azul tripan.

6.2.5. Análisis Estadístico

Se realizó una descripción de los resultados mediante medias y desviaciones estándar. Posteriormente se determinó la distribución de los datos mediante el test de Normalidad de Shapiro-Wilk. Para la determinación de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales con células neoplásicas, se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) con pruebas post hoc. En el caso de células MDCK, se realizó una prueba de t. Se consideró significancia estadística con un $p < 0,05$.

7. RESULTADOS.

7.1 Objetivo 1.

7.1.1 Simvastatina incrementó la actividad autofágica en células derivadas de carcinoma mamario canino CF41.Mg

En el análisis por citometría de flujo para determinar y cuantificar organelos vesiculares ácidos (OVAs) positivos a la tinción con naranja de acridina (NA), simvastatina (1 y 5 μ M) demostró generar un incremento de estas estructuras, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo no tratado (control negativo) (Figura 1 y 2). Tal efecto no fue dependiente de la concentración pues ambas concentraciones de simvastatina no difirieron estadísticamente entre sí, ni del grupo tratado con rapamicina 400 nM (control positivo).

La media de intensidad de fluorescencia de NA refleja que la cantidad de vacuolas ácidas (autofagolisosomas) para las condiciones tratadas son iguales entre sí, sin presentar diferencias significativas, tal como se muestra en la Figura 3.

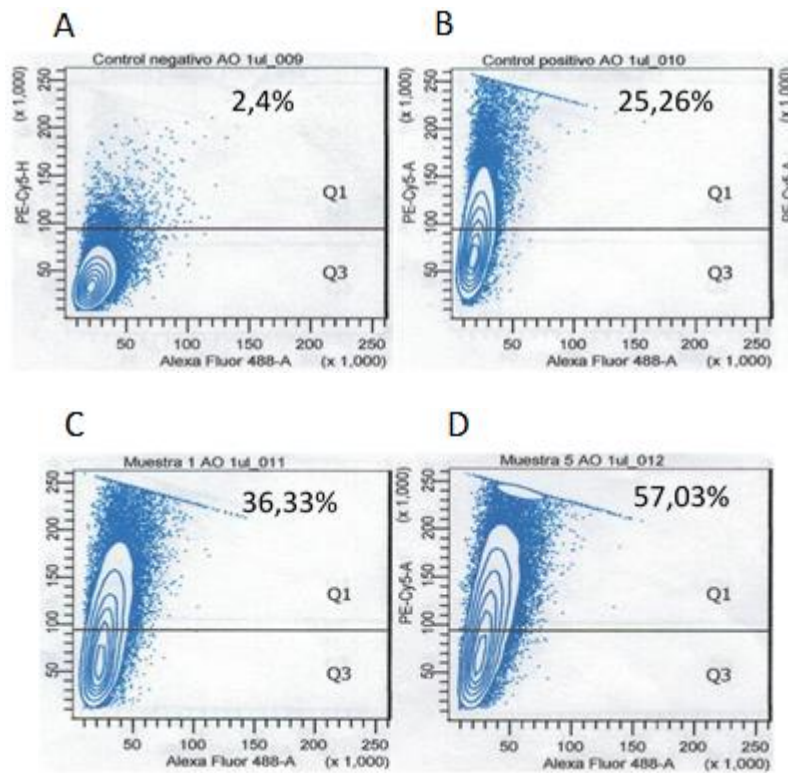


Figura 1. Detección y cuantificación de organelos vesiculares ácidos (OVAs) en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina. Plots representativos exhibiendo la proporción de células fluorescentes a naranja de acridina en las distintas condiciones experimentales estudiadas; control negativo (A), control positivo (B), simvastatina 1 y 5 μ M (C y D respectivamente). Datos corresponden a valores promedios de 3 experimentos independientes.

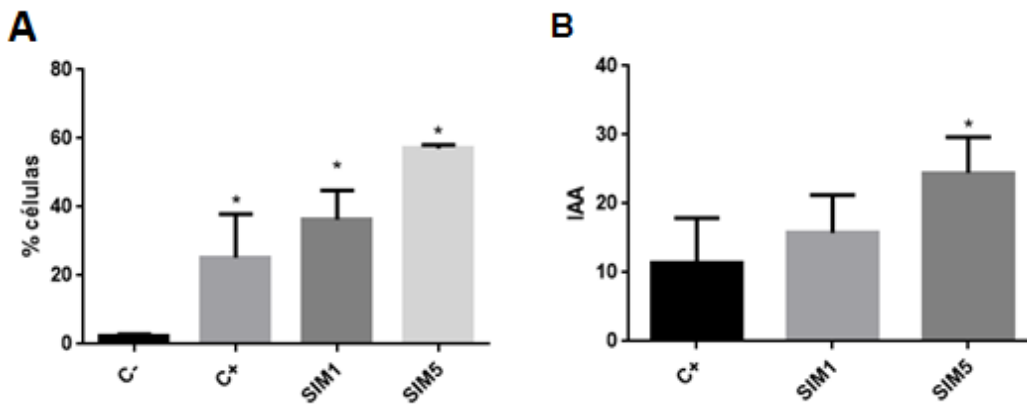


Figura 2. Cuantificación de organelos vesiculares ácidos (OVAs) en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina. (A) Proporción de células fluorescentes a naranja de acridina en las distintas condiciones experimentales (control, simvastatina 1 y 5 μ M); (B) Índice de actividad autofágica de cada condición experimental en relación al control negativo. Medias \pm DE de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$.

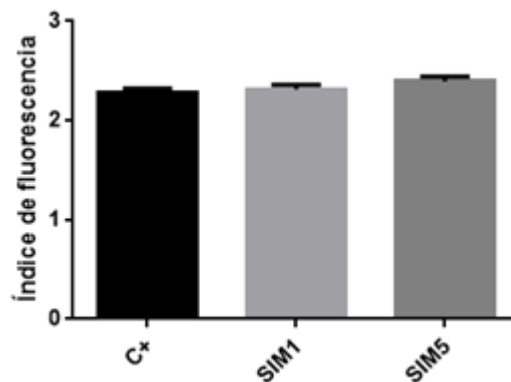


Figura 3. Fluorescencia media correspondiente a la presencia de de organelos vesiculares ácidos (OVAs) en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina 1 y 5 μ M. Índice de fluorescencia relativa en las condiciones estudiadas en relación al control negativo. Medias \pm DE de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$.

7.1.2 Simvastatina incrementó la expresión de beclina-1 y LC3 en células derivadas de carcinoma mamario canino CF41.Mg

Simvastatina generó un incremento significativo en la expresión tanto de beclina-1 como de LC3 ($p < 0.05$) determinado mediante inmunocitoquímica (marca de color café, de localización citoplasmática), comparable a lo inducido por rapamicina, un conocido inductor de autofagia. Este aumento de expresión de ambos biomarcadores se vio revertido mediante la utilización del inhibidor de autofagia 3-metiladenina (3MA) (Figura 4-6), el cual inhibe a VPS34 (PI3K- clase III) en la etapa de nucleación de la autofagia. Esto demuestra que la marca de estas proteínas es específica y refuerza los resultados expuestos en el punto anterior.

Como ya se describió, al utilizar el inhibidor 3MA en células tratadas con simvastatina, se observó una disminución en la marca correspondiente a beclina-1. Sin embargo, en algunas células se evidenció una clara marca en la membrana plasmática (Figura 4), lo cual no fue observado para la proteína LC3.

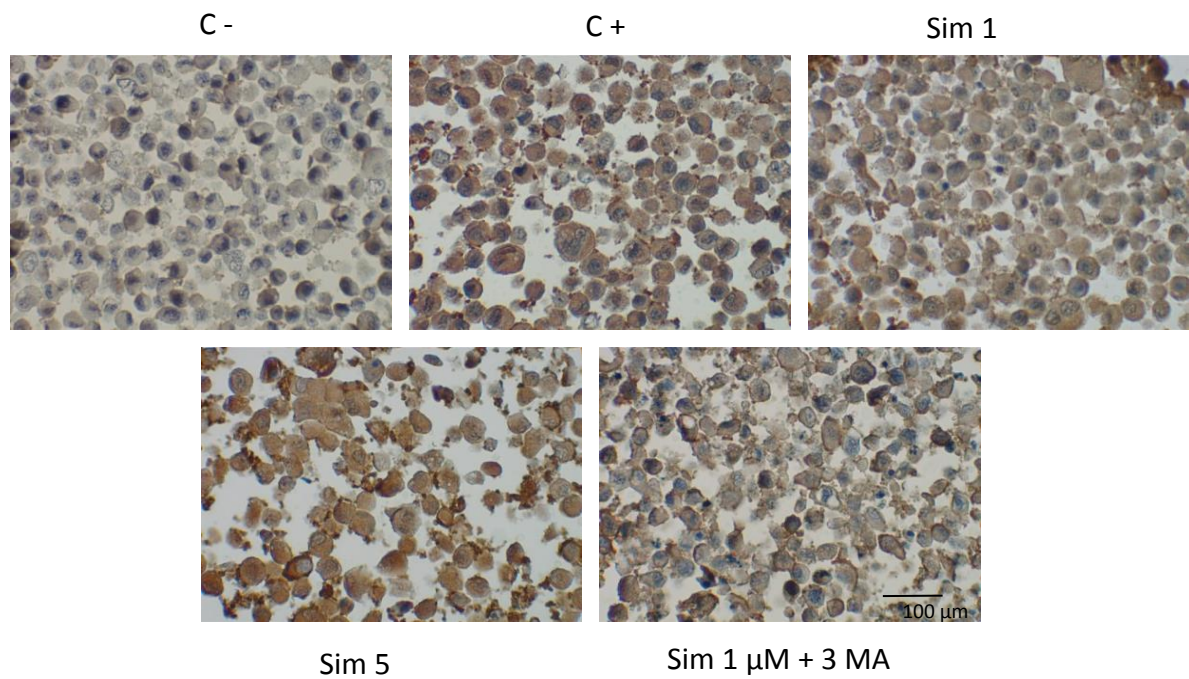


Figura 4. Imágenes representativas de inmunexpresión de beclina-1 en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina y 3MA. Las condiciones experimentales estudiadas fueron vehículo, rapamicina 400 nM, simvastatina 1 y 5 μ M, simvastatina 1 μ M más 3MA 5mM.

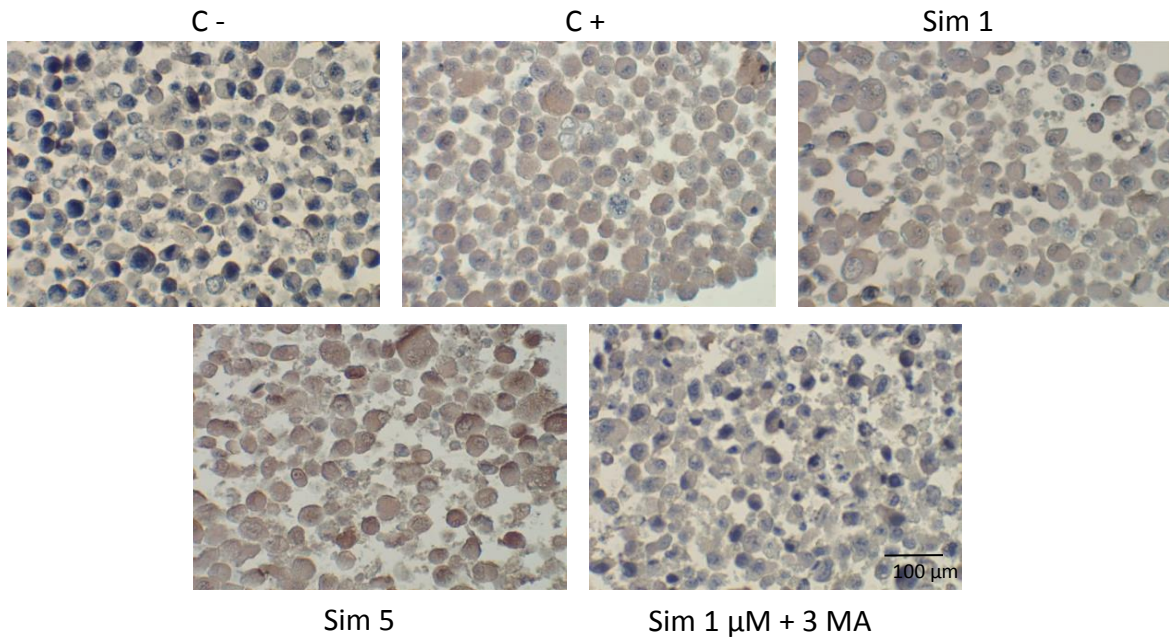


Figura 5. Imágenes representativas de inmunexpresión de LC3 en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina y 3MA. Las condiciones experimentales estudiadas fueron vehículo, rapamicina 400 nM, simvastatina 1 y 5 μ M, simvastatina 1 μ M más 3MA 5mM.

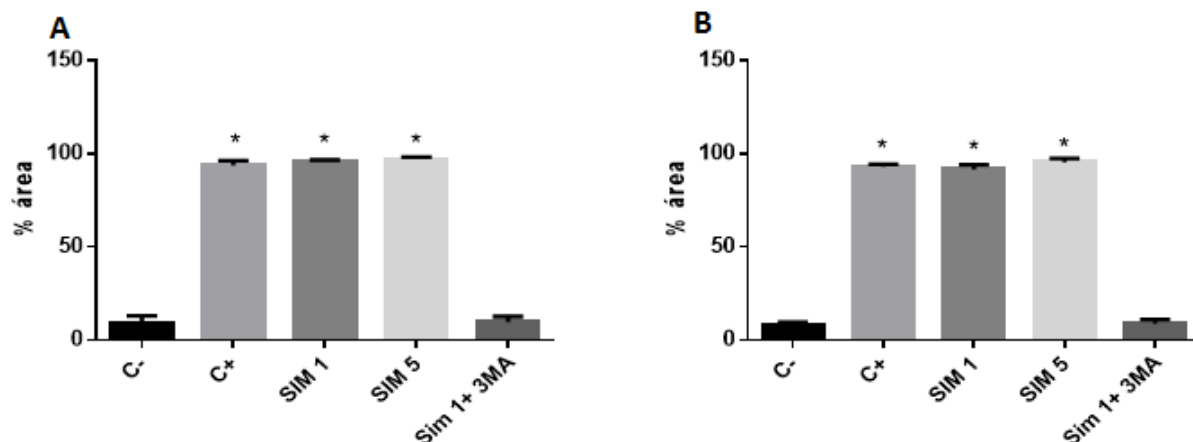


Figura 6. Semicuantificación de la inmunexpresión de beclina-1 (A) y LC3 (B) en células CF41.Mg en respuesta a simvastatina y 3-MA. Área inumarcada en relación a área total. *p<0.05

7.2 Objetivo 2.

7.2.1 La autofagia inducida por simvastatina no incrementó la viabilidad de células derivadas de carcinoma mamario canino CF41.Mg

Simvastatina 5 μ M generó una disminución en la cantidad de células vivas y un aumento de células muertas durante las primeras 24 horas de estudio, presentando diferencias significativas respecto al control negativo ($p < 0.05$). Este efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico se vio revertido mediante la utilización de un inhibidor de pancaspasas (Q-VD-OPh), pero no así en la condición tratada con 3MA (Figura 7).

A las 48 horas de estudio, se observó una dinámica similar, donde se mantuvo el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico respecto al control negativo ($p < 0.05$).

Nuevamente, dicho efecto se revertió mediante la utilización del inhibidor de pancaspasas, pero no así con 3MA (Figura 8).

Adicionalmente, a las 48 horas experimentales, se observó un efecto antiproliferativo en células tratadas con rapamicina 400 nM, presentando diferencia significativa respecto al control negativo ($p < 0,05$) en células vivas, sin generar un incremento en células muertas (Figura 8).

Complementariamente, se analizó la viabilidad celular de células MDCK (células inmortalizadas no neoplásicas derivadas de epitelio tubular renal canino), en respuesta a 5 μ M de simvastatina por 24 y 48 horas. Simvastatina indujo un efecto antiproliferativo significativo a las 48 horas experimentales, no obstante no indujo citotoxicidad en ninguno de los tiempos estudiados, ya que no se observaron células muertas teñidas con azul tripan (Figura 9).

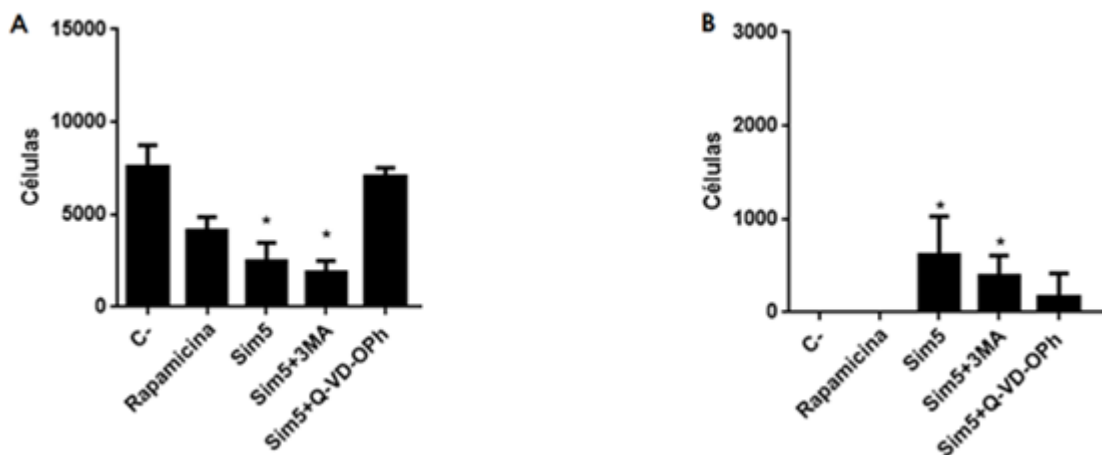


Figura 7. Viabilidad de células CF41.Mg en respuesta a simvastatina en presencia de un inhibidor de pan-caspasas y 3MA. Recuento de células vivas (A) y de células muertas (B), a las 24 horas de estímulo. * $p < 0.05$

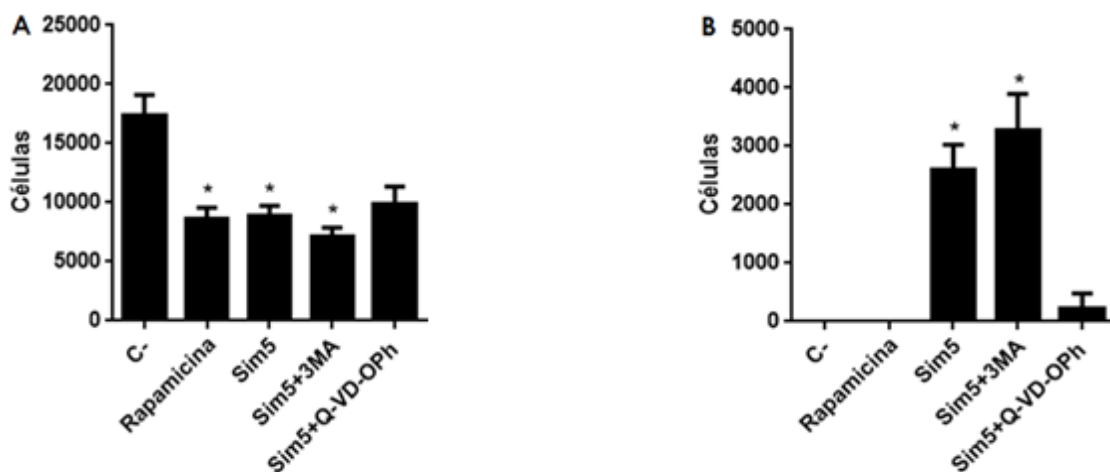


Figura 8. Viabilidad de células CF41.Mg en respuesta a simvastatina en presencia de un inhibidor de pan-caspasas y 3MA. Recuento de células vivas (A) y de células muertas (B), a las 48 horas de estímulo. * $p < 0.05$

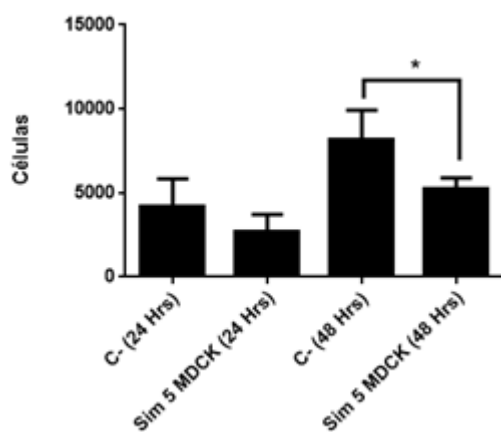


Figura 9. Viabilidad de células MDCK en respuesta a simvastatina. Recuento de células vivas a las 24 y 48 horas de estímulo. * $p < 0.05$

8. Discusión.

Una de las patologías de mayor importancia en animales de compañía son las enfermedades neoplásicas, las cuales se presentan cada vez con mayor frecuencia. Este tipo de enfermedades son complejas de tratar y son consideradas como una de las principales causas de muerte en animales gerontes (Dobson *et al.*, 2002).

En el caso de la hembra canina, la neoplasia mamaria es aquella que presenta la mayor incidencia dentro de las enfermedades neoplásicas (Dolka *et al.*, 2013; Sleenckx *et al.*, 2014). Usualmente, esta patología es de naturaleza maligna, lo cual se traducirá en una probable reducción en la esperanza de vida (Klopffleisch *et al.*, 2011), razón por la cual, es de gran interés de estudio.

Actualmente, no existe una terapia efectiva para el tumor mamario canino, ya que las células tumorales pueden adquirir resistencia a los tratamientos usualmente utilizados como la quimioterapia y la radioterapia (Cocola *et al.*, 2009; Michishita *et al.*, 2011). Adicionalmente, estos tratamientos poseen un margen de seguridad muy estrecho. Si bien el tratamiento de elección para esta enfermedad es la cirugía, esta no es curativa en casos de malignidad (Queiroga *et al.*, 2011; Sleenckx *et al.*, 2014). Todos estos factores conllevan a la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas.

El estudio de las estatinas en enfermedades neoplásicas ha tomado un gran interés en las últimas décadas, ya que estas han demostrado tener efectos antineoplásicos en diversos modelos de estudio (Mandal *et al.*, 2011; Demierre *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014; Falcone *et al.*, 2013; Guterres *et al.*, 2013). Simvastatina es una estatina que exhibe un efecto antineoplásico *in vitro*, explicado por su capacidad de inhibir la biosíntesis de mevalonato y consecuentemente la síntesis de isoprenoides, bloqueando vías intracelulares relacionadas a apoptosis y proliferación celular. Estos efectos antineoplásicos ya han sido comprobados en células de carcinoma mamario canino CF41.Mg (Torres *et al.*, 2015).

El estudio de la autofagia ha tomado mucho interés en las últimas décadas, por su rol biológico en cáncer, donde la evidencia científica actual indica que cumple un rol dual tanto como supresor y como promotor de tumores (Dalby *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2007). Dentro de esta dualidad, aparentemente el rol supresor tumoral de la autofagia tendría mayor relevancia, lo cual explicaría el potencial efecto citoprotectivo de este proceso biológico en el contexto de la terapéutica oncológica (Jin *et al.*, 2007; White, 2015).

Dado que la autofagia es capaz de inducir sobrevida celular en respuesta a diferentes tipos de stress, una de las respuestas biológicas observadas es una disminución en la proliferación celular, efecto que per se disminuye la sensibilidad celular a drogas con potencial citotóxico (Hanhan *et al.*, 2011). De este modo, una célula neoplásica podría sobrevivir de mejor manera al microambiente tumoral, el cual es altamente ácido, hipóxico y deprivado de nutrientes (Dalby *et al.*, 2010; Gozuacik *et al.*, 2004). Complementariamente, cuando se bloquea este proceso en presencia de alguna droga antitumoral, la citotoxicidad tiende a aumentar previos (Vilmanovich *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2014; Misirkic *et al.*, 2012). Este proceso celular puede ser considerado por lo tanto como un objetivo terapéutico de enfermedades neoplásicas, como el tumor mamario canino.

Simvastatina ha demostrado inducir autofagia sobre diferentes líneas celulares neoplásicas derivadas de cáncer de pulmón (A549-NSCLC) (Hwang *et al.*, 2015), diversos tipos de leucemia (cultivo primario y líneas celulares REH, JVM2, JVM13, K562 y HL-60) (Vilmanovich *et al.*, 2015), y carcinoma mamario humano (MCF-7) (Wang *et al.*, 2015), entre otros.

En el presente estudio hemos demostrado por primera vez que simvastatina es capaz de inducir autofagia sobre células CF41. Mg, utilizando la tinción de naranja de acridina. Dicho componente tiene afinidad por los compartimentos ácidos celulares como son los autofagolisosomas, estructuras funcionales de la autofagia. Estos resultados son concordantes con lo descrito anteriormente y con lo observado

por Kanzawa *et al.*, 2003, quienes comprobaron mediante el mismo método, la inducción de autofagia inducida por trióxido de arsénico en células de glioma (U87-MG, A172, T98G y U373-MG) y por Akar *et al.*, 2008 en células MCF-7 de carcinoma mamario humano al inhibir la expresión de Bcl-2 (inhibidor de la autofagia).

Complementariamente, estos resultados son respaldados por la expresión proteica de LC3 y beclina1 en respuesta a simvastatina, efectos que no fueron dependientes de la concentración. Células CF41.Mg tratadas con la estatina incrementaron la expresión citoplasmática de ambos biomarcadores, lo cual coincide con lo descrito por Hwang *et al*, 2015 y Vilimanovich *et al*, 2015, quienes analizaron las mismas proteínas, pero a través de western blot. La expresión de ambas proteínas disminuyó al utilizar 3MA (inhibidor de la autofagia en la etapa de nucleación), comprobando la especificidad de estos resultados.

Es interesante consignar que 3MA junto con disminuir significativamente la expresión de beclina1 inducida por la estatina, relocalizó la marca en algunas células a nivel de la membrana plasmática, lo cual no se ve explicado por ninguna función autofágica específica. Actualmente, la información publicada sobre las funciones no-autofágicas de beclina-1 en la membrana celular es escasa. Se ha descrito que esta proteína cumpliría un rol importante en los procesos celulares de endocitosis y fagocitosis a través de su interacción con PI3K clase III (VSP34) (Wirawan *et al.*, 2012), lo que permitiría la formación y maduración de estructuras como fagosomas y endosomas, explicando su localización en la membrana celular. No obstante, son necesarios más estudios para dilucidar el rol que cumpliría beclina1 en dicha localización subcelular.

Frente a la dualidad expuesta sobre el rol de la autofagia en la viabilidad celular, actualmente existe mayor evidencia que sustenta el rol citoprotectivo de este proceso, por sobre su potencial función como inductor de muerte celular. Estudios realizados por Vilmanovich *et al* 2015 y Kang *et al* 2014, demostraron que la autofagia inducida por simvastatina y atorvastatia, cumplen un rol citoprotectivo

frente a los efectos pro-apoptóticos de estos fármacos. Dichos investigadores observaron que al inhibir el proceso de autofagia inducido por estatinas en células derivadas de cáncer de vejiga y de diferentes tipos de leucemia, disminuían significativamente la viabilidad celular, incrementando apoptosis.

En el presente estudio, se ha demostrado que la autofagia inducida por simvastatina no cumple un rol en la supervivencia como tampoco en la muerte de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg estudiadas a las 24 y 48 hrs de incubación con la droga, lo cual es discordante con lo descrito en estudios previos (Vilmanovich *et al*, 2015; Kang *et al*, 2014; Misirkic *et al*, 2012). Lo anterior podría ser explicado por los tiempos estudiados (24-48 horas), ya que fueron menores a los evaluados por Vilmanovich *et al*, 2015, quienes hicieron sus análisis a las 72 hrs de incubación, sugiriendo que estos efectos serían dependientes del tiempo de exposición a las estatinas. En otro estudio, estos análisis los hicieron evaluando apoptosis con tinción de yoduro de propidio y anexina-V, lo cual es una técnica más sensible y específica (Avelar-Freitas *et al.*, 2014).

Una tercera causa que explique esta discrepancia en los resultados obtenidos, son las diferentes líneas celulares utilizadas. CF41.Mg corresponde a una línea celular de carcinoma mamario canino de alta malignidad (Saito *et al.*, 2013), en la cual, su viabilidad celular en respuesta a simvastatina no se ve mayormente afectada por el proceso de autofagia, pues, la inhibición de ésta mediante la utilización de 3MA, no generó un incremento en la cantidad de células muertas de manera significativa. Sugiriendo que este proceso celular no cumple función alguna en la citoprotección, discrepando con los resultados obtenidos por Vilmanovich *et al*, 2015; Kang *et al*, 2014; Misirkic *et al*, 2012, quienes al inhibir farmacológicamente la autofagia, obtuvieron un efecto citotóxico significativamente superior en respuesta al tratamiento con estatinas.

Adicionalmente el inhibidor de caspasas (Q-VD-OPh), fue capaz de revertir significativamente el efecto citotóxico de simvastatina, no así, la utilización de 3MA lo

que sugiere que la muerte celular observada se debe principalmente al proceso de apoptosis y no al proceso de autofagia. Más aún, la autofagia inducida por rapamicina, no demostró incrementar la cantidad de células muertas, concluyendo de esta manera, que la autofagia inducida por simvastatina no cumple un rol citoprotectivo, como tampoco uno citotóxico en células CF41.Mg.

Por otra parte, si bien rapamicina no exhibió citotoxicidad, si ejerce un efecto antiproliferativo a las 48 horas experimentales, explicado posiblemente por la inhibición de mTOR, quien se relaciona y promueve vías de señalización intracelular asociadas a la proliferación celular (Shinojima *et al.*, 2007). Mientras que el efecto antiproliferativo de simvastatina no fue revertido mediante la inhibición de la autofagia, sugiriendo que este efecto es debido a la inhibición de la biosíntesis de isoprenoides inducida por simvastatina, y no al proceso de autofagia.

A pesar de lo señalado anteriormente, el presente estudio muestra una tendencia, la cual aludiría al rol protector de la autofagia, ya que la inhibición de la autofagia incrementa el efecto citotóxico de simvastatina (24 horas versus 48 horas experimentales), sin presentar diferencias estadísticamente significativas, pero si un incremento en valores absolutos. Para comprobar este punto se necesitarán futuros estudios incrementando el tiempo experimental.

En el presente estudio, se observó adicionalmente que el efecto citotóxico afecta principalmente a células neoplásicas y no a células inmortalizadas no neoplásicas como las MDCK, las cuales pese a proliferar menos en respuesta a 5 μ M de simvastatina, no desarrollaron muerte celular. Esto sugiere que esta estatina exhibe selectividad celular.

Como ya se ha mencionado, las enfermedades neoplásicas como el carcinoma mamario canino son complejas de tratar debido a la capacidad de generar resistencia a quimioterápicos, la baja selectividad y estrecho margen de seguridad de los mismos, y baja eficiencia en casos de diseminación (Sorenmo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015). Esto conlleva a la necesidad de buscar nuevas alternativas

terapéuticas, donde se podría considerar a la simvastatina (Torres *et al.*, 2015). Por otra parte, buscar fármacos que tengan como objetivo disminuir la actividad de autofagia y con ello disminuir la sobrevivencia de células neoplásicas, con la finalidad de llevar a cabo una terapia conjunta ha sido el objetivo de diversos estudios. Bajo el contexto del tumor mamario canino, el presente estudio forma parte de una primera aproximación a este objetivo. Para ello, una serie de estudios futuros deben realizarse, evaluando tiempos *in vitro* más extensos y realizar estudios en modelos *in vivo* que permitan dar cuenta de la eficacia de una terapia adyuvante con simvastatina y un inhibidor de autofagia.

9. Conclusiones.

1.- Simvastatina induce autofagia en células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, incrementando la expresión de LC3 y beclina1, proteínas claves de dicho proceso.

2.- Simvastatina exhibe un efecto antiproliferativo y citotóxico sobre células CF41.Mg. Dicho efecto citotóxico es mediado por apoptosis.

3.- La autofagia inducida por 5 μ M de simvastatina no cumple un rol sobre la viabilidad de células CF41.Mg en los tiempos estudiados.

4.- Simvastatina induce un efecto antiproliferativo y no uno citotóxico en células MDCK en los tiempos estudiados, lo cual sugiere que esta droga exhibe selectividad celular.

10. Bibliografía.

AHMED, T.; HAYSLIP, J.; LEGGAS, M. (2013). Pharmacokinetics of high-dose simvastatin in refractory and relapsed chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 72 (6): 1369–1374.

AKAR, U.; CHAVEZ-REYEZ, A.; BARRIA, M.; TARIA, A.; SANGUINO, A.; KONDO, Y.; KONDO, S.; ARUN, B.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; OZPALAT, B. (2008). Silencing of Bcl-2 expression by siRNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*. 44 (2): 669–679.

AL-HUSEIN, B.; GOC, A.; SOMANATH, P. (2013) Suppression of interactions between prostate tumor cell-surface integrin and endothelial ICAM-1 by simvastatin inhibits micrometastasis. *J Cell Physiol*. 228 (11): 2139-2148.

AVELAR-FREITAS, B.; ALMEIDA, V.; PINTO, M.; MOURAO, F.; MASSENSINI, R.; MARTINS-FILHO, O.; ROCHA-VEIRA, E.; BRITO-MELO, G. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 47(4): 307–315.

BJARNADOTTIR, O.; ROMERO, Q.; BENDAHL, P.; JIRSTRÖM, K.; RYDÉN, L.; LOMAN, N.; UHLÉN, M.; ROSE, C.; GRABAU, D.; BORGQUIST, S. (2013). Targeting HMG-CoA reductase with statins in a window-of-opportunity breast cancer trial. *Breast Cancer Res Treat*. 138 (2): 499-508.

BLASCO, M. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6 (8): 611–622.

BORGQUIST, S.; DJERBI, S.; PONT, F.; ANAGNOSTAKI, L.; GOLDMAN, M.; GABER, A.; MANJER, J.; LANDBERG, G.; JIRSTRÖM, K. (2008) “HMG-CoA

reductase expression in breast cancer is associated with a less aggressive phenotype and influenced by anthropometric factors. *Int. J. Cancer*. 123 (5): 1146–1153.

CASSALI, G.; LEVALLE, G.; DE NARDI, A.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. (2011). Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz J Vet Pathol*. 4 (2): 153-180.

COCOLA, C.; ANASTASI, P.; ASTIGIANO, S.; PISCITELLI, E.; PELUCCHI, P.; VILARDO, L.; BERTOLI, G.; BECCAGLIA, M.; VERONESI, MC.; SANZONE, S.; BARBIERI, O.; REINBOLD, RA.; LUVONI, G.; ZUCCHI, I. (2009). Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential. *Reprod Domest Anim*. 44 (2): 214-217.

DALBY, K.; TEKEDERELI, I.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; OZPALAT, B. (2010). Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*. 6 (3): 322–329.

DEMIERRE, M.; HIGGINS, P.; GRUBER, S.; HAWK, E.; LIPPMAN, S. (2005). Statins and cancer prevention. *Nature*. 5: 930-942.

DOBOSON, J.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *The Journal of Small Animal Practice*. 43 (6): 240–246.

DOLKA, I.; SAPIERZYNSKI, R.; KRÓL, M. (2013). Retrospective study and immunohistochemical analysis of canine mammary sarcomas. *BMC Veterinary Research*. 9 (1): 248-264.

DORE, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. (2003). Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*. 40 (2): 207–212.

FALCONE, D.; GALLELLI, L., VIRGILIO, A.; TUCCI, L.; SCARAMUZZINO, M.; TERRACCIANO, R.; PELAIA, G.; SAVINO, R. (2013). Effects of simvastatin and

rosuvastatin on RAS protein, matrix metalloproteinases and NF- κ B in lung cancer and in normal pulmonary tissues. *Cell Prolif.* 46 (2): 172-182

FANG, Z.; TANG, Y.; FANG, J.; ZHOU, Z.; XING, Z.; GUO, Z.; GUO, X.; WANG, W.; JIAO, W.; XU, Z.; LIU, Z. (2013). Simvastatin inhibits renal cancer cell growth and metastasis via AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 pathway. *PLoS One.* 8 (5): 120-132.

FIRAT, E.; WEYERBROCK, A.; GAEDICKE, S.; GROSU, A.; NIEDERMAN, G. (2012). Chloroquine or Chloroquine-PI3K/Akt Pathway Inhibitor Combinations Strongly Promote γ -Irradiation-Induced Cell Death in Primary Stem-Like Glioma Cells. *Plos one.* 7(10): 1–13.

FUNAKOSHI, Y.; NAKAYAMA, H.; UETSUKA, K.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; DOI, K. (2000). Cellular Proliferative and Telomerase Activity in Canine Mammary Gland Tumors. *Vet Pathol.* 37 (2): 177-183.

GAROFALO, C.; KODA, M.; CASCIO, S.; SULKOWSKA, M.; KANCZUGA-KODA, L.; GOLASZEWSKA, J.; RUSSO, A; SULKOUSKI, S; SURMACZ, E. (2006). Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: Possible role of obesity-related stimuli. *Clinical Cancer Research.* 12 (5): 1447–1453.

GARWOOD, E.; KUMAR, A.; BAEHNER, F.; MOORE, D.; HYLTON, N.; FLOWERS, C.; GARBER, J.; LESNIKOSKI, B.; HWANG, E.; OLOPADE, O.; PORT, E.; CAMPBELL, M.; ESSERMAN, L. (2010). Fluvastatin reduces proliferation and increases apoptosis in women with high grade breastcancer”. *Breast Cancer Res Treat.* 119 (1): 137-144.

GHOSH-CHOUDHURY, N.; MANDAL, C.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; GHOSH-CHOUDHURY, G. (2010). Simvastatin induces derepression of PTEN expression via NF κ B to inhibit breast cancer cell growth. *Cellular Signalling.* 22 (5): 749–758.

GONG, C.; BAUVY, C.; TONELLI, G.; YUE, W.; DELOMÉНИЕ, C.; NICOLÁS, V.; ZHU, Y.; DOMERGUE, V.; DELBOS, L; GHAVAMI, S; MEHPOUR, M. (2012). Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*. 32 (18): 2261–2272.

GOPALAN, A.; YU, W.; SANDERS, B.; KLINE, K. (2013a). Eliminating drug resistant breast cancer stem-like cells with combination of simvastatin and gamma-tocotrienol. *Cancer Letters*, 328 (2): 285–296.

GOPALAN, A.; YU, W.; SANDERS, B.; KLINE, K. (2013b). Simvastatin inhibition of mevalonate pathway induces apoptosis in human breast cancer cells via activation of JNK/CHOP/DR5 signaling pathway. *Cancer Lett.* vol. 329 (1): 9-16.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 23 (16): 2891–2906.

GUTERRES, F.; MARTINEZ, G.; ROCHA, M.; WINNISCHOFER, S. (2013). Simvastatin rises reactive oxygen species levels and induces senescence in human melanoma cells by activation of p53/p21 pathway". *Exp Cell Res*. 319 (19): 2977-2988.

HANAHAN, D.; Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5): 646–674.

HONG, J.; NAM, E.; LEE, J.; PARK, J.; LEE, S.; SONG, S.; CHOI, S.; HEO, J.; PARK, S.; LIM, H.; KANG, W.; PARK, Y. (2014) Randomized double-blinded, placebo-controlled phase II trial of simvastatin and gemcitabine in advanced pancreatic cancer patients". *Cancer Chemother Pharmacol*. 73 (1): 125-130.

HUO, Y.; HONG, C.; IIRINA, T.; CHRISTIAN, B.; GUANGHUA, C.; SANDY, P.; NICOLA, B.; SHRIDAR, G.; VASSILIKI, K.; WHITE, E.; BING, X. (2013). Autophagy opposes p53-mediated tumor barrier to facilitate tumorigenesis in a model of PALB2-associated hereditary breast cancer. *Cancer Discov*. 3 (8): 894-907.

HWANG, K.; KIM, Y.; JUNG, J.; KWON, S.; PARK, D. (2015). Inhibition of autophagy potentiates pemetrexed and simvastatin- induced apoptotic cell death in malignant mesothelioma and non- small cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 6 (30): 29482-29496.

IM, K.; KIM, N.; LIM, H.; KIM, H.; SHIN, J.; SUR, J. (2013). Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Vet Pathol*. 51 (3): 549-559.

JARDÉ, T.; CALDEFIE-CHÉZET, F.; GONCALVES-MENDES, N., MISHHELLANY, F.; BUECHLER, C.; PENAUT-LLORCA, F.; VASSON, M. (2009). Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: Clinical and in vitro studies. *Endocrine-Related Cancer*. 16 (4): 1197–1210.

JIN, S.; WHITE, E. (2007). Role of Autophagy in Cancer. *Autophagy*. 3 (1): 28–31.

JIN, S.; WHITE, E. (2008). Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress. *Autophagy*. 4 (5): 563–566.

KANG, M.; JEONG, C.; KU, J.; KWAK, C.; KIM, H. (2014). Inhibition of autophagy potentiates atorvastatin-induced apoptotic cell death in human bladder cancer cells in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*. 15 (5): 8106–8121.

KANG, R.; ZEH, H.; LOTZE, M.; TANG, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 18 (4): 571–580.

KANZAWA, T.; KONDO, Y.; ITO, H.; KONDO, S.; GERMANO, I. (2003). Induction of Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Arsenic Trioxide. *Cancer res*. 63: 2103–2108.

KLIONSKY, D.; CUERVO, A.; SEGLEN, P. (2007). Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human. *Autophagy*. 3 (3): 181–206.

KLOPFLEISCH, R.; VON EULER, H.; SARLI, G.; PINHO, S.; GÄRTNER, F.; GRUBER, A. (2011). Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. *Vet Pathol.* 48 (1): 98-116.

KRISTIANSEN, V.; NODTVEDT, A.; BREEN, A.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M.; JONASDOTTIR, T.; GROTMOL, T.; SORENMO, 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): 935-942.

KRÓL, M.; PAWTOWSKI, K.; MAJCHRZAK, K.; SZYSZKO, K.; MOTYL, T. (2010). Why chemotherapy can fail?. *Pol J Vet Sci.* 13 (2): 399-406.

LEVINE, B. (2007). Q & A Autophagy and cancer. *Nature*, 446 (7137): 745–747.

LIU, J.; CHANG, K.; LO, C.; CHU, P.; LIU, H. (2013). Expression of autophagy-related protein Beclin-1 in malignant canine mammary tumors. *BMC Veterinary Research.* 9 (75): 20-29.

LIU, Y.; LEVINE, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation.* 22 (3): 367–376.

MAIURI, M.; ZALCKVAR, E.; KIMICHI, A.; KROEMER, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 8 (9): 741–752.

MANDAL, C.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; YONEDA, T.; CHOUDHURY, G.; GHOSH-CHOUDHURY, N. (2011). Simvastatin prevents skeletal metastasis of breast cancer by an antagonistic interplay between p53 and CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (13): 11314–11327.

MANU, K.; SHANMUGAM, M.; LI, F.; CHEN, L.; SIVEEN, K.; AHN, K.; KUMAR, A.; SETHI, G. (2014). Simvastatin sensitizes human gastric cancer xenograft in nude

mice to capecitabine by suppressing nuclear factor-kappa B-regulated gene products. *J Mol Med.* 92 (3): 267-276.

MAYCOTTE, P.; ARYAL, S.; CUMMINGS, C.; THORBURN, J.; MORGAN, M.; THORBURN, A. (2012). Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy.* 8 (2): 200–212.

MICHISHITA, M.; AKIYOSHI, R.; YOSHIMURA, H.; KATSUMOTO, T.; ICHIWAKA, H.; OHKUSU-TSUKADA, K.; NAKAGAWA, T.; SASAKI, N.; TAKAHASHI, K. (2011). Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. *Research in Veterinary Science.* 91 (2): 254–260.

MISIRKIC, M.; JANJETOVIC, K.; VUCIECIVIC, L.; TOVILOVIC, G.; RISTIC, B.; VILIMANOVICH, U.; HARHAJI, L.; SUMARAC, M.; MICIC, D.; BUMBASIREVIC, V.; TRAJKOVIC, V. (2012). Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effect of simvastatin. *Pharmacological Research.* 65 (1): 111–119.

MUHAMMADNEJAD, A.; KEYHANI, E.; MORTAZAVI, P.; BEHJATI, F.; HAGHDOOST, I. (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.

NOVOSAD, C. (2013). Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clin Tech Small Anim Pract.* 18 (2): 107-109.

OCHOA, L.; OCA, A. (2012). Frecuencia de neoplasias de glándula mamaria en perras con diagnóstico citológico. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia.* 22 (5): 426–431.

ONG, C.; CODONGO, P.; SHEN, H. (2010). Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III. *The journal of biological chemistry.* 285 (14): 10850–10861.

PANG L.; CERVANTES-ARIAS, A.; ELSE, R.; ARGYLE, D. (2011). Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and Chemo-Resistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype. *Cancers*. 3: 1744-1762.

PEDRAZA-ORDÓÑEZ, F.; FERREIRA-DE-LA-CUESTA, G.; MURILLO-MENJURA, S. (2008). Clinical and Pathological Description of 124 cases of canine mammary gland neoplasm in Manizales , Colombia. *Vet zootec*. 2 (2): 21–28.

QUEIROGA, F.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M.; PRADA, J.; PIRES, I. (2011). Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*. 25 (3): 455-465.

SAITO, T.; DAI, T.; ASANO, R. (2013). The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells. *Oncol Lett*. 5 (3): 1068-1074.

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; KHERADMAN, P.; KHERADMAND, D.; BAHRAMI, A.; DAREI, H.; KHADIVAR, F. (2013). Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. *Cancer Cell Int*. 13 (1): 79-92.

SHINOJIMA, N.; YOKOYAMA, T.; KONDO, Y.; KONDO, S. (2007). Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy*. 3 (6): 635–637.

SINGH, S; SINGH, P. (2013). Statin a day keeps cancer at bay. *World J Clin Oncol*. 4 (2): 43-46.

SLEECKX, N.; DE-ROOSTER, H.; VELDHUIS-KROEZE, E.; VAN-GINNEKEN, C.; VAM-BRANTEGEM, L. (2011). Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domest Anim*. 46 (6): 1112-1131.

SLEECKX, N.; VAN-RANTEGEM, L.; VAN-DEN-EYDEN, G.; FRANSEN, E.; CASTELEYN, C.; VAN-CRUCHTEN, S.; VELDHUIS, N.; VAN-GINNEKEN, C. (2014). Lymphangiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. *Journal of Comparative Pathology*. 150 (3): 184–193.

SORENMO, K.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. (2011). Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet Pathol*. 48 (48): 85-97.

SOTELO, J.; BRINCEN, E.; LO, M. (2014). Adding Chloroquine to Conventional Treatment for Glioblastoma Multiforme: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of int Med*. 5 (12): 337–344.

SUI, X.; CHEN, R.; WANG, Z.; HUANG, Z.; KONG, N.; ZHANG, M.; PAN, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*. 4: 838-850.

SUN, W.; CHEN, J.; WANG, Y.; ZHENG, H. (2011). Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy*. 7 (9): 1035–1044.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 36: 2503–2518.

THORBURN, A. (2008). Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*. 13 (1): 1–9.

TORRES, C.; OLIVARES, A.; STOORE, C. (2015). Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncology Reports*. 33 (5): 2235–2244.

TUERDI, G.; ICHINOMIYA, S.; SATO, H.; SIDDIG, S.; SUWA, E.; IWATA, H.; YANO, T.; UENO, K. (2013). Synergistic effect of combined treatment with gamma-tocotrienol and statin on human malignant mesothelioma cells. *Cancer Lett.* 339 (1): 116-127.

UVA, P.; AURISICCHIO, L.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKAMI, A.; CASTLE, J.; PALOMO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA-MONICA, N.; RINALDIS, E. (2009). Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics.* 10 (135): 1-20.

VILIMANOVICH, U.; BOSNJAK, M.; BOGDANOVIC, A.; MARKOVIC, I.; ISAKOVIC, A.; KRAVIC-STEVOVIC, T.; MIRCIC, A.; TRAJKOVIC, V.; BUMBASIREVIC, V. (2015). Statin-mediated inhibition of cholesterol synthesis induces cytoprotective autophagy in human leukemic cells. *European Journal of Pharmacology.* 765: 415–428.

WANG, T.; SEAH, S.; LOH, X.; CHAN, C.; HARTMAN, M.; GOH, B.; LEE, S. (2015). Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget.* 7 (3), 2532–2544.

WANG, Z.; WU, Y.; WANG H.; ZHANG, Y.; MEI, L.; FANG, X.; ZHANG, X.; ZHANG, F.; CHEN, H.; LIU, Y.; JIANG, Y.; SUN, S.; ZHENG, Y.; LI, N.; HUANG, L. (2013). Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility". *Oncotarget.* 111 (1): 89-98.

WEI, Y.; Li, X.; XU, M.; ABAIS, J.; CHEN, Y.; RIEBLING, C.; ZHANG, Y. (2013). Enhancement of autophagy by simvastatin through inhibition of Rac1-mTOR signaling pathway in coronary arterial myocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology.* 31 (6): 925–937.

WHITE, E. (2015). the role for autophagy in cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 125 (1): 42–46.

WIRAWAN, E.; LIPPENS, S.; VANDEN, T.; ROMAGNOLI, A.; FIMIA, G.; PIACENTINI, M.; VANDENABEELE, P. (2012). Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy*. 8 (1): 6–17.

YANG, P.; LIU, Y.; LIN, Y.; SHUN, C.; WU, M.; CHEN, C. (2010). Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of atorvastatin in digestive malignancies. *Cancer Research*. 70 (19): 7699–7709.

YOSUFEI, S.; PEROZZO, R.; SCHMID, I.; ZIEMIECKI, A.; SCHAFFNER, T.; SCAPOZZA, L.; SIMON, H. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*. 8 (10): 1124–1132.

ZAMANI-AHMADMAHMUDI, M.; NASSIRI, S.; RAHBARGHAZI, R. (2013). Serological proteome analysis of dogs with breast cancer unveils common serum biomarkers with human counterparts. *Electrophoresis*. 53 (3): 23-33

ZANFARDINO, M.; SPAMPANATO, C.; DE-CICCO, R.; BUOMMINO, E.; DE-FILIPPIS, A.; BAIANO, S.; BARRA, A.; MORELLI, F. (2013). Simvastatin reduces melanoma progression in a murine model. *Int J Oncol*. 43 (6): 1763-1770.

ZHANG, J.; YANG, Z.; XIE, L.; XU, L.; XU, D.; LIU, X. (2013). Statins, autophagy and cancer metastasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 45 (3): 745–752.

ZHOU, W.; TANG, F.; XU, J.; WU, X.; YANG, S.; FENG, Z.; LIU, Q. (2012). Low expression of Beclin 1, associated with high Bcl-xL, predicts a malignant phenotype and poor prognosis of gastric cancer. *Autophagy*. 8 (3): 389–400.