



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

**EFECTO DE LOVASTATINA SOBRE CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMARIO CANINO (*Canis lupus familiaris*)
CF41.Mg.**

SOFÍA BELÉN GUZMÁN BERNAL

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: CRISTIAN GABRIEL TORRES MENDOZA
UNIVERSIDAD DE CHILE

PROYECTO FONDECYT 11110148

SANTIAGO, CHILE
2018



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

**EFFECTO DE LOVASTATINA SOBRE CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMARIO CANINO (*Canis lupus familiaris*)
CF41.Mg**

SOFÍA BELÉN GUZMÁN BERNAL

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CRISTIAN TORRES
PROFESOR CONSEJERO: JOSE IGNACIO ARIAS
PROFESOR CONSEJERO: LORENA AGUILAR

SANTIAGO, CHILE

2018

MEMORIA DE TÍTULO

**“EFECTO DE LOVASTATINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO
CANINO (*Canis lupus familiaris*) CF41.Mg”**

**“EFFECT OF LOVASTATIN ON CANINE MAMMARY CARCINOMA CELLS (*Canis
lupus familiaris*) CF41.Mg”.**

Sofía Belén Guzmán Bernal *

*Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,
Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto Fondecyt 11110148.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Julio y Gloria, quienes me han apoyado en todo momento en este proceso, el más largo y difícil de toda la carrera, por su cariño y comprensión, pero sobre todo por su paciencia, porque muchas veces dudé del camino que quería seguir, me entendieron, me motivaron y me dieron las herramientas para continuar y nunca rendirme.

A mi hermano, Vicente, por su apoyo y motivación a seguir adelante y abrir mis horizontes en la carrera.

A mi pareja, Rodolfo, quien llegó a mi vida en el momento preciso, gracias por todo el apoyo incondicional, por acompañarme al laboratorio incluso en días feriados, por el amor y la paciencia, ese abrazo reconfortante tras un día difícil junto a una palabra de ánimo, para que nunca bajara los brazos.

A mi prima, Daniela, quien me ayudó en los momentos más críticos, gracias por la paciencia y la gran disposición a enseñar, porque sin su ayuda esta tesis no sería lo que es, y sin duda al Laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos (ICBM), quienes me acogieron por varios meses y compartimos buenos momentos.

A mis amistades de la universidad, que siempre estuvieron ahí para alentarme en los momentos más complicados, porque todos pasamos por lo mismo y nos entendemos unos a otros.

A mis amigos que no están vinculados al mundo veterinario, gracias por su apoyo, por las charlas y motivación, sin entender nada de lo que les hablaba, supieron comprenderme y alentarme.

A mis amigos, compañeros y profesores del Laboratorio de Biomedicina y Medicina Regenerativa (BiMRe) y al Laboratorio de Inmunología, por su orientación y amabilidad para ayudarme y enseñarme, en especial a Pamela, quien fue mi mentora en mis inicios y me ayudó a dar los primeros pasos en el mundo del laboratorio.

RESUMEN

El cáncer mamario es la neoplasia que se presenta con mayor frecuencia en la hembra canina reproductivamente entera. Diversos investigadores han demostrado que lovastatina exhibe un efecto antitumoral *in vitro* sobre diversas líneas celulares neoplásicas humanas, sin embargo, su potencial efecto aún no ha sido evaluado sobre células de carcinoma mamario canino. Lovastatina inhibe a la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, bloqueando la biosíntesis de colesterol y de sus isoprenoides farnesil pirofosfato (FPP) y geranil-geranil pirofosfato (GGPP), importantes mediadores de algunas vías de transducción de señales asociadas a supervivencia celular. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de lovastatina sobre la proliferación, invasión y apoptosis de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg. Se cultivaron células CF41.Mg y se trataron con lovastatina (0-20 μ M) por diferentes tiempos. Luego, se evaluó viabilidad celular (método de reducción de MTS), invasión celular (método Transwell) y apoptosis (ensayo de Anexina V/Yoduro de Propidio). Lovastatina indujo una disminución significativa en la viabilidad celular ($p \leq 0.05$), efecto que fue dependiente de su concentración y el tiempo. La invasión celular fue inhibida en respuesta a concentraciones no citotóxicas de lovastatina ($p \leq 0.05$). Además, esta droga ejerció un efecto pro-apoptótico dependiente del tiempo ($p \leq 0.05$). Estos resultados demuestran que lovastatina cumpliría un importante papel sobre la proliferación y capacidad invasiva de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, lo cual sustenta futuros estudios clínicos con esta droga.

Palabras claves: carcinoma mamario canino, células CF41.Mg, lovastatina, HMG-CoA reductasa.

ABSTRACT

Mammary cancer is the tumor that occurs most frequently in the reproductively intact female dog. Several researchers have shown that lovastatin exhibits an *in vitro* antitumor effect on various human neoplastic cell lines, however, its potential effect has not yet been evaluated in canine mammary carcinoma cells. Lovastatin inhibits HMG-CoA reductase, blocking the biosynthesis of cholesterol and its isoprenoids FPP and GGPP, important mediators of some signal transduction pathways associated with cell survival. The aims of this study were to determine the effects of lovastatin on the proliferation, invasion and apoptosis of canine mammary carcinoma cells CF41.Mg. CF41.Mg cells were cultured and treated with lovastatin (0-20 μ M) for different times. Then, cell viability (MTS reduction method), cell invasion (Transwell method) and apoptosis (Annexin V/Propidium Iodide assay) were evaluated. Lovastatin induced a significant decrease in cell viability ($p \leq 0.05$), an effect that was dependent on its concentration and time. Cell invasion was inhibited in response to non-cytotoxic concentrations of lovastatin ($p \leq 0.05$). In addition, lovastatin exerted a pro-apoptotic effect dependent on time ($p \leq 0.05$). These results demonstrate that lovastatin would play an important role in the proliferation and invasive capacity of canine mammary carcinoma cells CF41.Mg, which supports future clinical studies with this drug.

Key words: canine mammary carcinoma, CF41.Mg cells, lovastatin, HMG-CoA reductase.

INTRODUCCIÓN

Los tumores de glándula mamaria han sido descritos en diferentes especies, con una alta incidencia en caninos. Muchas de las características presentes en perros se asemejan al cáncer mamario humano, por lo cual se considera un buen modelo animal de estudio para esta neoplasia en la mujer (Queiroga *et al.*, 2011).

Dentro de los tratamientos actualmente difundidos para esta enfermedad se encuentra la cirugía (mastectomía) como método de elección, salvo que se haya producido metástasis o sea un carcinoma inflamatorio (Souza *et al.*, 2009). El uso de quimioterápicos sólo se aplica en pacientes con un alto riesgo de metástasis. El inconveniente de estos es que puede inducir inmunosupresión y toxicidad gastrointestinal; además, algunos tumores pueden desarrollar recurrencia y quimioresistencia (Sleeckx *et al.*, 2011, Torres *et al.*, 2015), por lo tanto, es relevante buscar nuevas estrategias terapéuticas, sobre todo en medicina veterinaria que es donde menos registro existe.

Neoplasia mamaria canina

Los tumores mamarios son la neoplasia más frecuente en hembras caninas (Arenas *et al.*, 2016), de las cuales cerca del 50% del total corresponden a neoplasias malignas y, de estas, la mitad ya presenta metástasis al momento del diagnóstico (Iturriaga *et al.*, 2017). En perros, la clásica presentación es en individuos de edad avanzada, de cualquier raza, que conservan sus órganos reproductivos o que fueron esterilizados tardíamente (Sorenmo *et al.*, 2011). Existen diversos factores que contribuyen a la carcinogénesis de la glándula mamaria, entre ellos se encuentran la edad, exposición a hormonas sexuales como estradiol y progesterona, expresión de ciclooxygenasa-2, raza, tipo de alimentación y obesidad que influyen el microambiente de las células en el tejido mamario (Sleeckx *et al.*, 2011; Sorenmo *et al.*, 2013).

En general, la exposición constante de la glándula mamaria a hormonas ováricas es importante en el desarrollo de tumores en esta localización anatómica. Tanto estradiol como progesterona son hormonas necesarias para el normal desarrollo de la glándula mamaria y su posterior maduración. Ambas ejercen un efecto mitogénico sobre el epitelio mamario, participando en los procesos de promoción carcinogénica, y en el caso del estradiol,

probablemente también en la iniciación carcinogénica. Lo expuesto anteriormente, junto con factores de crecimiento entre otros, promoverán el crecimiento y progresión tumoral (Sorenmo *et al.*, 2013).

Dado que la enfermedad tiene una base hormonal, se ha estudiado la terapia endocrina con tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estradiol tipo α , que ejerce un efecto anti-estrogénico potente sobre la glándula mamaria. No obstante, aquellas perras tratadas presentan complicaciones como piometra, descarga vaginal purulenta, edema vulvar entre otras, por lo que no se recomienda su uso clínico (Tavares *et al.*, 2010). En medicina humana, se ha estudiado en el último tiempo una potencial terapia con el uso de inhibidores de la ruta biosintética del colesterol, llamadas estatinas, destacando la acción antitumoral exhibida por lovastatina en cánceres ginecológicos como ovario y mama (Kato *et al.*, 2010; Siddiqui *et al.*, 2014).

Estatinas

Las estatinas son un grupo de fármacos que inhiben de manera competitiva y reversible la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima limitante de la síntesis endógena de colesterol. Esta enzima cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato, metabolito clave en la síntesis de colesterol (Bardou *et al.*, 2010). Por esta razón, se utilizan en pacientes humanos con trastornos metabólicos del colesterol (hipercolesterolemia) y para prevenir el desarrollo de trastornos cardiovasculares (aterosclerosis). Además, estudios *in vitro* y en animales demuestran que las estatinas tienen efectos pleiotrópicos, independientes de la síntesis de colesterol (Cuello *et al.*, 2013). Las estatinas que existen en Chile son pravastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina y lovastatina. Esta última está relacionada con estudios de cáncer mamario en mujeres (Mennickent *et al.*, 2008).

Lovastatina es una lactona farmacológicamente inactiva que, al ser hidrolizada en el hígado, forma el β -hidroxiácido de lovastatina, forma lipofílica que tiene real actividad en el organismo y que es un potente inhibidor de la HMG-CoA reductasa (Pérez-Vizcaíno y Tamargo, 2008).

Respecto al papel de las estatinas en el cáncer, recientes investigaciones demuestran que interfieren en la proliferación de una gran variedad de células neoplásicas. Los mecanismos de acción exactos referentes a su citotoxicidad son poco claros, pero se postula que la inhibición de la HMG-CoA reductasa no sólo reduce los metabolitos del ácido mevalónico, sino que también limita la disponibilidad de isoprenoides derivados del mevalonato, como farnesil pirofosfato y geranylgeranyl pirofosfato, moléculas críticas en la modificación postraduccional de proteínas celulares como Ras, Rho A, Rac1, que tienen diversas funciones fisiológicas implicadas en carcinogénesis (Bardou *et al.*, 2010). La prenilación de estas proteínas es necesaria para el control de funciones celulares cruciales como son el transporte de membrana, la organización del citoesqueleto, la expresión de ciertos genes, y también procesos como la proliferación, diferenciación, muerte, adhesión y migración celular. Además, las estatinas pueden suprimir la inflamación, previniendo la formación de un entorno propicio para la carcinogénesis con una alta concentración de factores de crecimiento y citoquinas. Lo anteriormente mencionado puede determinar el desarrollo y progresión de un tumor (Ahern *et al.*, 2014; Siddiqui *et al.*, 2014; Murakami *et al.*, 2016).

La mayoría de los efectos antitumorales inducidos por estatinas se asocian a aquellas de naturaleza química lipofílica, como simvastatina, fluvastatina y lovastatina. Respecto a simvastatina, se ha descrito que inhibe la actividad transcripcional de NF-kappa- β , reduciendo la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-XL y aumentando la transcripción de la proteína supresora de tumores PTEN, la cual reprime la ruta oncogénica de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). Además, PTEN se une a la proteína p53, favoreciendo su estabilidad, manteniéndola activa para inhibir la proliferación celular y promover los procesos de reparación o apoptosis (Gosh-Choudhury *et al.*, 2010). También se ha observado que la administración oral de simvastatina disminuye el crecimiento de xenoinjertos de tumor de mama humano en ratones, por aumento de la expresión de PTEN e inducción de apoptosis (Ahern *et al.*, 2014). Sobre lovastatina, un estudio de rhabdomyosarcoma humano describe que esta droga induce apoptosis mediante la liberación al citosol de citocromo C, lo cual activa a procaspasa-3, una proteasa pro-apoptótica (Liu *et al.*, 2014).

Respecto a la invasión celular, se ha demostrado que lovastatina inhibe la metástasis en modelos de tumor mamario en murinos, bloqueando la migración de líneas celulares

altamente invasivas (Vinayak y Kurian, 2009). Dicho efecto, al igual que en el glioblastoma y en células de cáncer mamario humano, estaría dado por una inhibición de la farnesilación de la proteína Ras, lo cual gatillaría una disminución en la proliferación, migración e invasión celular (Siddiqui *et al.*, 2014).

En otro estudio, se probó el efecto de lovastatina y simvastatina sobre la línea celular MCF10A H-Ras, una línea celular de cáncer mamario humano altamente agresivo. Estas estatinas indujeron la inhibición de la actividad de GTPasa H-Ras, la que se encuentra mutada con frecuencia en células de carcinoma mamario humano. En la literatura se menciona que elevados niveles de expresión de esta proteína Ras se asocian positivamente con la agresividad del tumor mamario, incluyendo el grado de invasión al tejido graso y la infiltración a vasos linfáticos. Lo anterior estaría dado por la mutación de un aminoácido de H-Ras, que induce fenotipos invasivos y migratorios de las células neoplásicas. Como estas proteínas deben ser preniladas para anclarse a la membrana y ser funcionales, el efecto inhibitorio tanto de simvastatina como de lovastatina sobre el potencial invasivo de las células MCF10A H-Ras está relacionado con la inhibición de la biosíntesis de intermediarios isoprenoides (Kang *et al.*, 2009).

En relación a la asociación de estatinas con terapias actualmente usadas en cáncer, existen estudios en medicina humana que apoyan su uso en conjunto a algunas quimioterapias, ya que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa ejercen interacciones aditivas y sinérgicas con agentes quimioterápicos como 5-fluorouracilo, cisplatino y doxorubicina, entre otros (Cuello *et al.*, 2013; Siddiqui *et al.*, 2014); e inmunoterapias como trastuzumab o gefitinib, mejorando la respuesta terapéutica de algunos cánceres como el cáncer mamario humano (Cuello *et al.*, 2013).

La mayoría de los estudios sobre estatinas y su relación con el cáncer de mama se han llevado a cabo en humanos, por lo que es necesaria la realización de estos mismos estudios en animales, específicamente en perras, ya que la incidencia de cáncer mamario canino es alta y se requiere mayor investigación en este campo.

El objetivo de esta memoria de título fue estudiar el efecto *in vitro* de lovastatina sobre algunas características funcionales de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg como

proliferación, invasión y apoptosis, de manera de robustecer investigaciones previas que describen un efecto antitumoral para esta droga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular de carcinoma mamario canino CF41.Mg (CRL-6232; ATCC®, Manassas, VA, USA) se cultivó en medio DMEM alto en glucosa (Hyclone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone; GE Healthcare Life Sciences), 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B. Las células se mantuvieron a 37° C en una atmósfera humidificada con 5 % CO₂ y el medio de cultivo se cambió cada 48 horas previo lavado de las células con buffer DPBS.

Para la desagregación de células, una vez alcanzado un 80-90 % de confluencia, estas fueron lavadas con DPBS para luego ser incubadas con tripsina 2,5 % / EDTA 0,2 g/L por 10 minutos. La reacción fue detenida con DMEM más 10 % de SFB; luego las células fueron centrifugadas a 200 g por 10 minutos a 4° C para finalmente recuperar las células del pellet obtenido y ser sembradas. La concentración de células vivas fue evaluada a través del método de exclusión con azul de tripán y hemocitometría.

Fármaco

Lovastatina (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) fue preparada y disuelta en etanol absoluto para análisis, a una concentración stock de 5 mM (2,023 mg/ml).

Ensayo de viabilidad celular

Para este ensayo se utilizaron células CF41.Mg adherentes sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de 2×10^3 células/pocillo en triplicado. Se dejó un blanco en triplicado que contenía sólo medio de cultivo más lovastatina. Luego, a las 24 horas de incubación se les aplicó lovastatina en distintas concentraciones (0, 1, 5, 10 y 20 µM). A las 48 y 72 horas de incubación se estimó la viabilidad celular a través del método de reducción de MTS o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (CellTiter 96 Aqueous One Solution) donde se aplicaron 20 µl de CellTiter 96® cada 100 µl de medio de cultivo y se dejó incubando por tres horas a 37° C en una atmósfera humidificada con 5 % CO₂. El MTS es reducido a formazán por las células viables,

un compuesto colorimétrico cuya densidad óptica (D.O) resultante se midió en un lector de placas a 490 nm previa agitación lenta por un minuto. La viabilidad se calculó como un valor relativo, donde el promedio de D.O. del grupo control que contiene el vehículo (etanol) corresponde al 100 %.

Ensayo de invasión celular

Para este ensayo se utilizaron placas tipo transwell de 24 pocillos, las cuales poseen canastillos con una membrana de policarbonato con microporos de 8 μm . Se realizaron 3 experimentos independientes en duplicado. Primero se activó la membrana con 100 μl de DMEM 10 % SFB, se dejó por 30 segundos, se retiró y se añadió a cada canastillo 100 μl de matrigel (concentración de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BD-Biosciences), dejando la placa a 37° C en una atmósfera humidificada con 5 % CO_2 por 2 horas. Al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante del matrigel y se sembraron 2×10^4 células/transwell en 300 μL de DMEM sin SFB. En cada pocillo se añadieron 500 μL de DMEM 5 % SFB como agente quimioatrayente. Las células fueron estimuladas con concentraciones no citotóxicas (0,1 y 1 μM) de lovastatina, considerando un volumen total de 800 μL y se incubaron por 48 horas. Al finalizar este tiempo, se retiró el medio de cada canastillo, se lavó dos veces con DPBS, se fijó y permeabilizó la membrana con metanol a -20° C por 20 minutos para luego teñir las células con Giemsa 1 %. Luego, con un hisopo estéril se removieron las células que quedaron sobre la membrana del transwell; de esta forma se conservan solo las células que atravesaron la membrana, en consecuencia, las que tienen capacidad invasiva. Después, con ayuda de un bisturí, se removió la membrana de policarbonato para montarla sobre un portaobjetos. A continuación, se seleccionaron al azar 6 campos de 10x, los cuales fueron fotografiados para realizar un recuento de células invasivas con el software Image J utilizando la herramienta “cell counter”.

Ensayo de apoptosis celular

Para este ensayo se utilizó el Kit de apoptosis celular Anexina V - Alexa Flúor ® 488 y Yoduro de Propidio (PI) (Thermo Fisher Scientific, Inc), el cual permite identificar la proporción de células en apoptosis, y específicamente si éstas se encuentran en un proceso apoptótico temprano o tardío. Se sembraron 2×10^5 células CF41.Mg en placas de 35 mm en

las condiciones estándar ya señaladas. Al cabo de 24 horas se lavaron con DPBS, se cambió el medio para luego estimular con lovastatina en la concentración de 10 y 20 μM y ser incubadas por 24, 48 y 72 horas. Al cabo de este tiempo las células fueron desprendidas y centrifugadas a 1800 g por 10 minutos, para luego resuspender el pellet celular en solución buffer de unión a Anexina 1X. Posteriormente, se añadió 0,5 μl de Anexina V conjugado con Alexa Flúor® 488 más 1 μl de PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) cada 100 μl de suspensión celular. Se incubaron por 15 minutos en oscuridad y luego se añadieron 200 μl de buffer de tinción para citometría de flujo (eBioscience™, ThermoFisher), conservándolas en hielo para su análisis en el citómetro de flujo. Se consideraron controles de células sin adición de medicamento ni fluoróforos para definir autofluorescencia basal, controles de PI, Alexa Flúor® 488 más PI, vehículo (etanol) y control positivo que fueron células expuestas a Staurosporina (Calbiochem®) más Alexa Flúor® 488. Luego, las suspensiones celulares se analizaron en un citómetro de flujo multiparamétrico Fortessa X-20 (BD Biosciences). El análisis final se realizó en el software Weasel v3.0.2.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias \pm DE de tres experimentos independientes. El análisis se realizó con el software Graph Pad Prism 6.0 utilizando el análisis ANOVA de una vía junto a un post test de Bonferroni, y en otros casos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró como nivel de significancia $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Objetivo 1

Lovastatina disminuye la viabilidad de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg

Para determinar si lovastatina disminuye la viabilidad celular se realizaron ensayos de MTS, para lo cual las células se cultivaron en presencia de lovastatina a concentraciones de 0 a 20 μM durante 48 y 72 horas.

En la **Figura 1** se muestra que lovastatina induce una disminución significativa ($p \leq 0.01$) en la viabilidad de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, a las 48 y 72 horas de incubación. Este efecto fue dependiente del tiempo y de la concentración pues estas dos variables influyeron en la proporción de células vivas. Esta disminución de la viabilidad celular ocurrió bajo las concentraciones 10 y 20 μM .

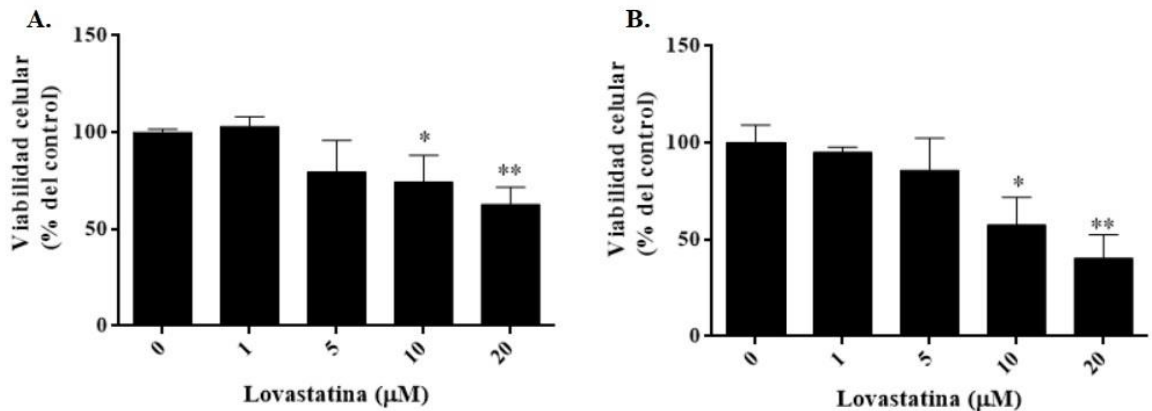


Figura 1: Lovastatina disminuye la viabilidad de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg, a las 48 (A) y 72 (B) horas de exposición. Las células fueron incubadas en DMEM con 10 % de SFB. Luego fueron expuestas a concentraciones crecientes (0 a 20 μM) de lovastatina. El efecto sobre la viabilidad celular se estimó mediante el ensayo de MTS. Los resultados son expresados como promedios \pm DE, N = 3. * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$ con respecto al control. El control corresponde a células incubadas con medio estándar y vehículo (etanol) (Test ANOVA y post test de Bonferroni).

Objetivo 2

Lovastatina reduce la invasión de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg.

Para el ensayo de invasión celular se usó el modelo de insertos tipo transwell, utilizando concentraciones no citotóxicas (0,1 y 1 μM) de lovastatina (**Figura 1**). De las concentraciones mencionadas, 1 μM exhibió una disminución significativa ($p \leq 0.01$) en la capacidad invasiva de las células CF41.Mg a las 48 horas de incubación (**Figura 2-A y 2-B**).

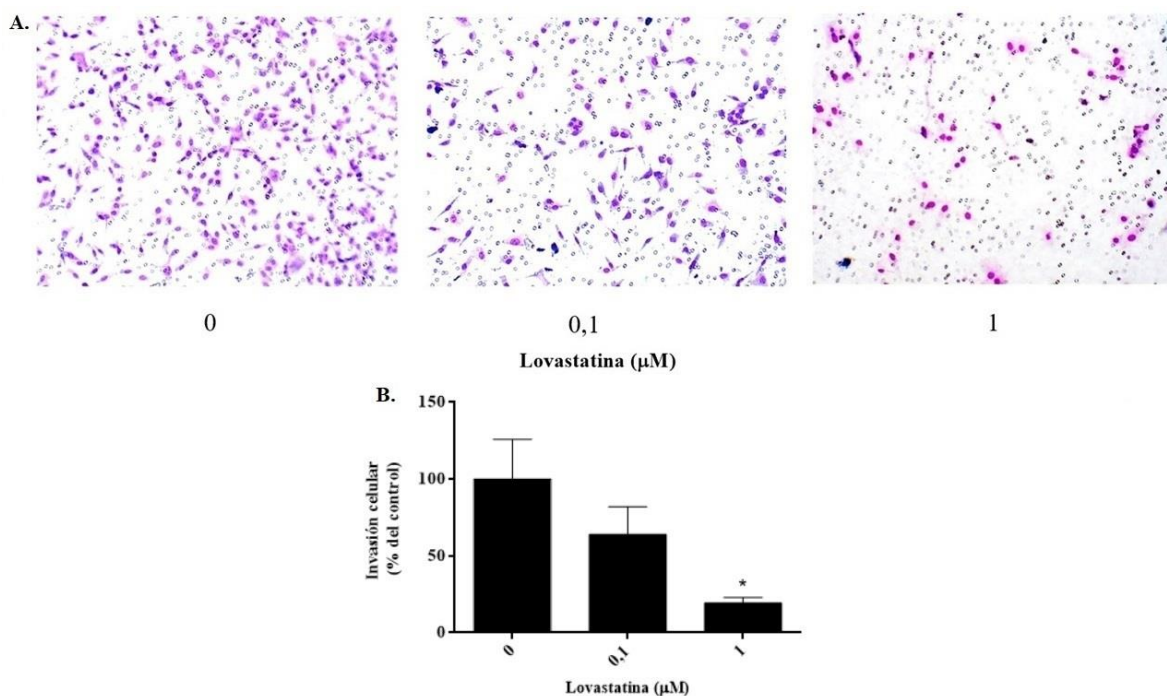


Figura 2: Lovastatina disminuye la invasión de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg. (A) Microfotografías representativas de invasión de células CF41.Mg tratadas con 0; 0,1 y 1 μM de lovastatina por 48 horas. Aumento 10X. (B) Porcentaje de invasión celular a las 48 horas. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones (0; 0,1 y 1 μM) de lovastatina, por 48 horas. El efecto sobre la invasión celular se determinó realizando el método Transwell. Los resultados son expresados como medias \pm DE, N = 3. * = $p \leq 0.05$ con respecto al control. El control corresponde a células CF41.Mg incubadas con medio estándar y vehículo (Test Kruskal Wallis y post test de Dunn).

Objetivo 3

Lovastatina induce apoptosis sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg

El ensayo de Anexina V/PI es un método que detecta la expresión de fosfatidilserina, fosfolípido que se expresa en la cara extracelular de la membrana plasmática como evento temprano en la activación de apoptosis. Además, esta técnica permite diferenciar a las células viables de aquellas muertas, gracias a la adición de Yoduro de Propidio (PI) el cual se une a los ácidos nucleicos de las células muertas.

En los ensayos de apoptosis (**Figura 3-6**) se utilizaron las concentraciones de lovastatina que gatillaron una reducción en la viabilidad celular (10 y 20 μM). Así, se observó que la proporción de células apoptóticas aumentó significativamente en respuesta a la concentración de 20 μM , en los tres tiempos de medición (24, 48 y 72 horas) ($p \leq 0.05$).

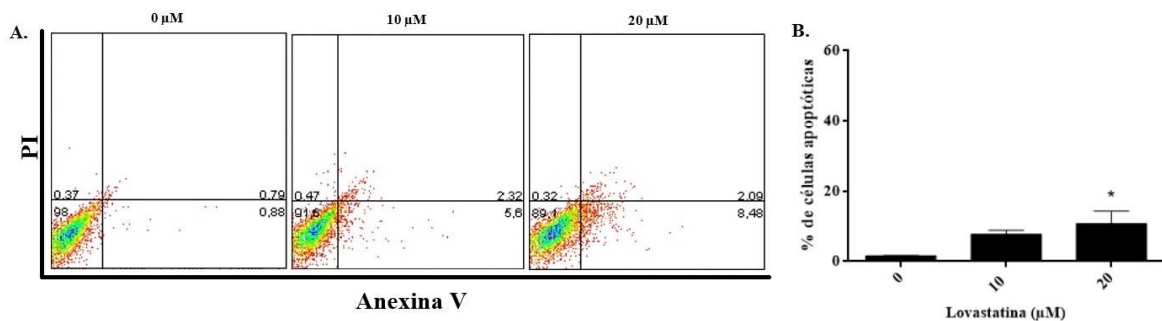


Figura 3: Lovastatina induce apoptosis sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg. a las 24 horas de exposición. (A) Plot representativo. (B) Porcentaje de células apoptóticas. Las células CF41.Mg fueron expuestas a dos concentraciones de lovastatina (10 y 20 μM). Los resultados son expresados como promedios \pm DE, N = 3. * $p \leq 0.05$, respecto al control negativo. El control negativo corresponde a células incubadas con etanol, utilizado como vehículo (Test Kruskal Wallis y post test de Dunn).

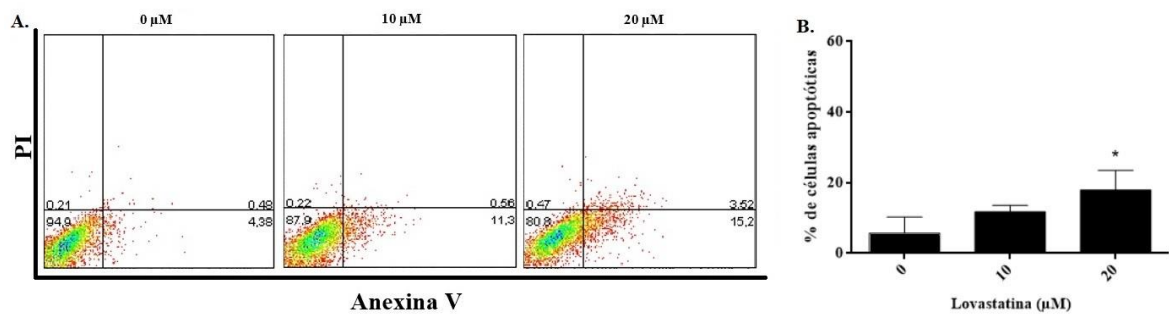


Figura 4: Lovastatina induce apoptosis sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg. a las 48 horas de exposición. (A) Plot representativo. (B) Porcentaje de células apoptóticas. Las células CF41.Mg fueron expuestas a dos concentraciones de lovastatina (10 y 20 μM). Los resultados son expresados como promedios ± DE, N = 3. * $p \leq 0.05$, respecto al control negativo. El control negativo corresponde a células incubadas con etanol, utilizado como vehículo (Test Kruskal Wallis y post test de Dunn).

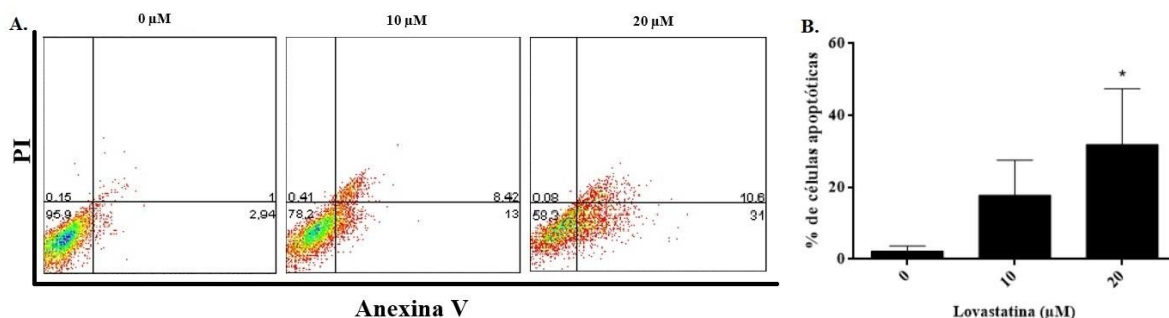


Figura 5: Lovastatina induce apoptosis sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg. a las 72 horas de exposición. (A) Plot representativo. (B) Porcentaje de células apoptóticas. Las células CF41.Mg fueron expuestas a dos concentraciones de lovastatina (10 y 20 μM). Los resultados son expresados como promedios ± DE, N = 3. * $p \leq 0.05$, respecto al control negativo. El control negativo corresponde a células incubadas con etanol, utilizado como vehículo (Test Kruskal Wallis y post test de Dunn).

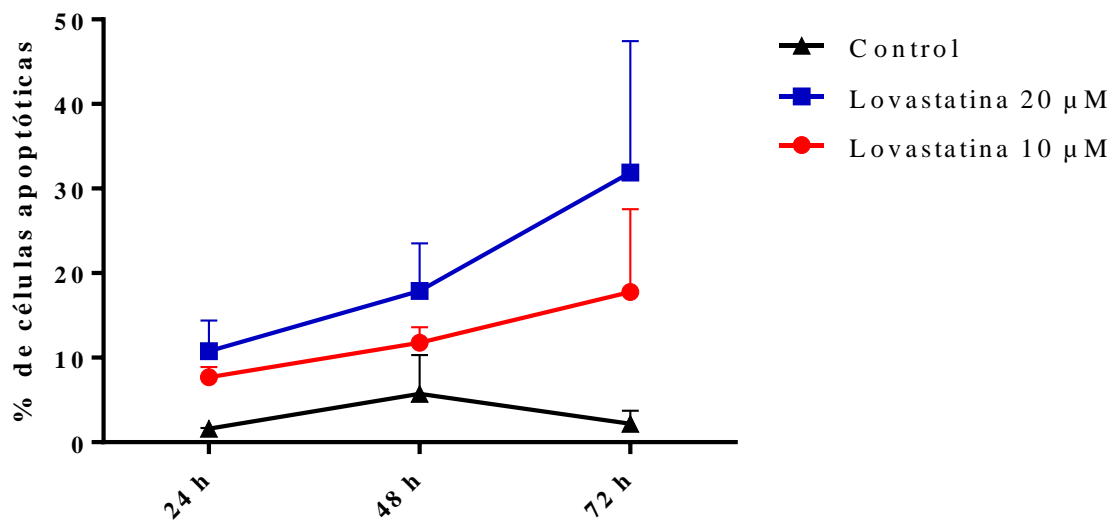


Figura 6: Evolución temporal del efecto de lovastatina (10 y 20 μ M), sobre la apoptosis de células de carcinoma mamario canino CF41.Mg. Resumen demostrativo del efecto de lovastatina sobre el porcentaje de células apoptóticas, evaluadas en tres tiempos y con dos concentraciones de lovastatina (10 y 20 μ M). Los resultados son expresados como promedios \pm DE, N = 3. $p = ns$. El análisis estadístico se realizó para cada concentración (Test Kruskal Wallis y post test de Dunn).

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, el estudio de las estatinas y sus efectos antineoplásicos ha sido de gran interés en la investigación de distintos tipos de cáncer, sin embargo, en medicina veterinaria existe poca información sobre el efecto tanto *in vitro* como *in vivo* que pueden inducir este tipo de drogas sobre el carcinoma mamario canino, motivo por el cual se realizó este estudio.

En la actualidad, lo que más se ha demostrado es el efecto de simvastatina, otra estatina de similares características que lovastatina, sobre células de cáncer mamario humano (MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7) y canino (CF41.Mg). Por ser de la misma familia de drogas, es posible comparar los resultados obtenidos en este estudio con lo descrito acerca de simvastatina.

Los resultados del ensayo de viabilidad celular demostraron que lovastatina ejerce un efecto antiproliferativo sobre células CF41.Mg, el cual fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, similar a lo observado en un estudio previo, pero con simvastatina (Torres *et al.*, 2015). Siddiqui *et al.* (2014) realizaron un estudio con distintas líneas celulares de cáncer de mama humano (receptor de estradiol alfa (RE) positivas y negativas) expuestas a lovastatina, y observaron que ésta disminuye la viabilidad celular a partir de la concentración de 10 μ M, independiente de la expresión del RE. Es importante considerar que las células CF41.Mg expresan el RE, sin embargo, dado los datos recién expuestos, la acción de lovastatina no dependería de vías de señalización intracelular asociadas a la activación del RE.

Los mecanismos que median el efecto antiproliferativo de lovastatina aún no están totalmente esclarecidos, no obstante, lo más descrito es su efecto inhibitorio sobre las enzimas HMG-CoA reductasa y pirotransferasas como farnesil transferasa (Mahmoud *et al.*, 2016). Esta última enzima cataliza la prenilación de GTPasas dado por farnesil pirofosfato (FPP), importante intermediario de la señalización intracelular, que media proliferación y supervivencia celular (Wong *et al.*, 2002). También se ha demostrado que lovastatina y otras estatinas promueven la expresión de especies reactivas de oxígeno (ROS), y aumentan los niveles de

óxido nítrico (NO), moléculas citotóxicas que inhiben la proliferación celular y que inducen apoptosis (Ott *et al.*, 2007; Buranrat *et al.*, 2016; Mahmoud *et al.*, 2016).

Este trabajo demostró que lovastatina ejerce un efecto antiinvasivo a la concentración de 1 μM , la cual no indujo efectos citotóxicos en los experimentos previos, siendo concordante con el efecto generado por simvastatina sobre la invasividad de esta misma línea celular (Torres *et al.*, 2015). Este efecto es dependiente de la prenilación de proteínas bloqueadas por estas drogas, ya que se ha demostrado que al agregar FPP a células tratadas con estatinas, se revierte el efecto (Kang *et al.*, 2009). FPP prenila GTPasas de la familia Rho, permitiendo que estas se unan a la membrana plasmática e inicien señales intracelulares que modulan la remodelación del citoesqueleto, dando forma a la célula y permitiendo su motilidad (Jaffe and Hall, 2005; Menna *et al.*, 2010).

Otra vía por la cual lovastatina estaría interviniendo sobre la capacidad invasiva de estas células se relacionaría con un bloqueo sobre la síntesis de metaloproteinasas de matriz (MMP). Las MMP son un conjunto de proteasas dependientes de calcio y zinc que participan en la remodelación de la matriz extracelular (MEC) y en diversas condiciones patológicas como la inflamación y la metástasis tumoral. Dentro de sus funciones, la más estudiada ha sido la degradación de moléculas de la MEC, por ejemplo, colágeno (Coronato *et al.*, 2012). La invasión tumoral está asociada directamente a un aumento en la expresión y actividad de MMPs, específicamente MMP-2 y MMP-9. Existe evidencia que indica que lovastatina y simvastatina ejercen una marcada inhibición sobre la expresión de estas proteínas, sobre todo de MMP-9, y en menor medida de MMP-2, sugiriendo que estas drogas provocan una disminución dosis-dependiente de la síntesis de MMP-9 y MMP-2. Estas metaloproteinasas tienen un rol crítico en la migración, invasión y formación de focos metastásicos (Kang *et al.*, 2009).

Otra explicación a la disminución de la migración e invasión de las células tumorales es la alteración de su citoesqueleto. El mecanismo de acción subyacente estaría dado por la inhibición de la isoprenilación postraducciona de proteínas asociadas al citoesqueleto, que son críticas para su organización y estabilidad. Al respecto, se ha descrito el efecto de lovastatina a concentraciones de 5-10 μM (consideradas no citotóxicas por los autores) sobre la línea celular F3II de carcinoma mamario humano, en la cual se observó una disminución

de la localización de membrana de la proteína Rho A, y cambios morfológicos que involucran una alteración en la malla de microtúbulos con la inducción de una forma esferoide con niveles bajos de integrina $\beta 1$ (CD29), la que participa en la adhesión celular, invasión y metástasis tumoral (Farina *et al.*, 2002). En este contexto, la disminución de la migración e invasión celular descrita en este trabajo se podría explicar por la disminución en la síntesis de MMP-2 y MMP-9, y además por la inhibición de la prenilación de GTPasas que participan en la reorganización del citoesqueleto confiriéndole propiedades invasivas a las células tumorales (Kang *et al.*, 2009; Sandoval, 2012). Sin embargo, se requieren más estudios para indagar en estas vías asociadas al carcinoma mamario canino.

Respecto a los resultados obtenidos en el ensayo de apoptosis, este estudio comprobó que lovastatina induce un aumento en la proporción de células apoptóticas, efecto que fue dependiente del tiempo de exposición a la droga, lo que concuerda con resultados observados en otros estudios con la línea celular MDA-MB-231 de cáncer mamario humano. Respecto a estos últimos, Yang *et al.* (2016) demostraron que lovastatina a concentraciones crecientes aumentó el porcentaje de células apoptóticas y necróticas, luego de 48 horas de exposición a la droga, efecto similar observado en otro estudio en el cual se utilizó simvastatina a una concentración determinada por el IC_{50} (7,97 μM) por 72 horas, observando una alta tasa apoptótica y un incremento en la expresión de caspasas, demostrando que las estatinas activan la reacción en cascada de las caspasas y la consecuente apoptosis (Shen *et al.*, 2015). Dentro de los posibles mecanismos a través de los cuales las estatinas inducirían apoptosis sobre células neoplásicas se postula la inducción de la expresión de caspasa 3 activada (Liu *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015). En un estudio de colangiocarcinoma humano (CCA) se observó que simvastatina generó un efecto anti proliferativo y pro-apoptótico mediante la inducción de caspasa 3 activada. En dicho estudio se comprobó que simvastatina regula positivamente la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y negativamente la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Buranrat *et al.*, 2016). Este efecto también se evidenció en células de carcinoma mamario humano MDA-MB-231 que, al ser expuestas a distintas concentraciones de simvastatina y por diferentes tiempos, provocó una disminución en la expresión de Bcl-2 y un aumento en la expresión de la proteína Bax, demostrando que el efecto de simvastatina sobre las células neoplásicas es dependiente tanto del tiempo como de la dosis de la droga (Shen *et al.*, 2015). Para entender

esto, las proteínas de la familia Bcl-2 y Bax son proteínas que comprenden moléculas con actividad pro- y anti-apoptótica, que regulan tanto la apoptosis como la proliferación e invasión de las células tumorales. La mayor proporción de alguna de estas proteínas determina la muerte o la supervivencia de la célula (Adams and Cory, 2007; Chipuk *et al.*, 2010).

Otra vía por la cual lovastatina induciría apoptosis en células de carcinoma mamario canino es la desactivación de la vía PI3K/Akt/mTOR, importante en la señalización intracelular que comúnmente se anula en muchos tipos de cáncer. En un estudio se evidenció que simvastatina induce apoptosis en células de cáncer mamario humano MCF-7 y MDA-MB-231, tras la supresión de la vía PI3/Akt/mTOR ya que aumenta la expresión de la proteína supresora de tumores PTEN, demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang *et al.*, 2015). Es probable que los mecanismos descritos anteriormente expliquen el aumento en el porcentaje de células apoptóticas observadas en este estudio, sin embargo, se requieren análisis más específicos para su comparación.

El estudio de la neoplasia mamaria canina ha tenido mayor relevancia en el último tiempo dada la recurrencia de presentación de este tumor en las hembras caninas. El tratamiento de este cáncer es complejo debido a que los medicamentos quimioterápicos tienen baja selectividad, estrecho margen de seguridad, efectos adversos importantes, y además ha presentado quimioresistencia al tratamiento convencional (Sorenmo *et al.*, 2011). Lo anterior son razones que han motivado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas como el uso de estatinas (Torres *et al.*, 2015). Debido a esto es que surgió la necesidad de investigar el efecto de lovastatina, otra estatina lipofílica de características similares a simvastatina, con el fin de obtener mayor información y recursos para tratar el carcinoma mamario de la perra. Los resultados obtenidos concuerdan en su mayoría con lo expuesto por otros investigadores en líneas celulares de distintos cánceres humanos, razón por la cual se requiere más información e investigación en el campo veterinario, de modo de poder comparar con otras líneas celulares caninas y a la vez, con líneas celulares no neoplásicas de alta capacidad proliferativa para evaluar la potencial selectividad de lovastatina. A su vez, se podrían realizar los mismos experimentos de viabilidad, migración, invasión y apoptosis en conjunto con quimioterápicos como doxorubicina, ya que se ha observado que lovastatina sensibiliza

a las células de carcinoma hepatocelular a la acción de este antineoplásico, mejorando la respuesta al tratamiento. Este efecto también se observó en células CF41.Mg expuestas a simvastatina (Montero *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2015). Además, se requieren estudios que evalúen más tiempos de exposición con más concentraciones del medicamento, y estudios en modelos *in vivo* para demostrar la eficacia del uso de lovastatina como terapia adyuvante a la quimioterapia. En este contexto, este estudio aporta a la investigación de nuevas líneas terapéuticas en medicina veterinaria, demostrando que lovastatina podría ser un potencial agente quimiopreventivo disminuyendo la supervivencia de las células neoplásicas del carcinoma mamario en la hembra canina.

Se concluye de este estudio que lovastatina ejerce efectos antiproliferativos, antiinvasivos y pro apoptóticos sobre células de carcinoma mamario canino CF41.Mg.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, J.M.; CORY, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26(9):1324-1337.

AHERN, T.; LASH, T.; DAMKIER, P.; CHRISTIANSEN, P.; CRONIN-FENTON, D. 2014. Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities. *Lancet Oncol* 15(19):461-468.

ARENAS, C; PEÑA, L.; GRANADOS-SOLER, J.L.; PÉREZ-ALENZA, M.D. 2016. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. *Vet Rec* 179(5):125.

BARDOU, M.; BARKUN, A.; MARTEL, M. 2010. Effect of statin therapy on colorectal cancer. *Gut* 59:1572-1585.

BURANRAT, B.; SENGGUNPRAI, L.; PRAWAN, A.; KUKONGVIRIYAPAN, V. 2016. Simvastatin and atorvastatin as inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Life Sciences* 153:41-49.

CHIPUK, J.E.; MOLDOVENEANU, T.; LLAMBI, F.; PARSONS, M.J.; GREEN, D.R. 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37(3):299-310.

CORONATO, S.; LAGUENS, G.; DI GIROLAMO, V. 2012. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina* 72:495-502.

CUELLO, M.; KATO, S.; DÍAZ, D.; OWEN, G. 2013. Efectos de las estatinas en cáncer: ¿potencial rol en terapéutica y prevención?. *Rev Med Chile* 141:227-236.

FARINA, H.G.; BUBLIK, D.R.; ALONSO, D.F.; GOMEZ, D.R. 2002. Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 19: 551-559.

GHOSH-CHOUDHURY, N.; CHARAN MANDAL, C.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; GHOSH-CHOUDHURY, G. 2010. Simvastatin induces depression of PTEN expression via NFkappaB to inhibit breast cancer cell growth. *Cell Signal* 22(5):749-758.

ITURRIAGA, M.P.; PAREDES, R.; ARIAS, J.I.; TORRES, C.G. 2017. Meloxicam decreases the migration and invasion of CF41.Mg canine mammary carcinoma cells. *Oncology Letters* 14(2):2198-2206.

JAFFE, A.; HALL, A. 2005. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-269.

KANG, S.; KIM, E.; MOON, A. 2009. Simvastatin and lovastatin inhibit breast cell invasion induced by H-Ras. *Oncol. Rep.* 21:1317-1322.

KATO, S.; SMALLEY, S.; SADARANGANI, A.; CHEN-LI, K.; OLIVA, B.; BRAÑES, J.; CARVAJAL, J.; GEJMAN, R.; OWEN, G.I.; CUELLO, M. 2010. Lipophilic but not hydrophilic statins selectively induce cell death in gynaecological cancers expressing high levels of HMGCoA reductase. *J Cell Mol Med* 14(5):1180-1193.

LIU, Y.; CHEN, L.; GONG, Z.; SHEN, L.; KAO, C.; HOCK, J.M.; SUN, L.; LI, X. 2014. Lovastatin enhances adenovirus-mediated TRAIL induced apoptosis by depleting cholesterol of lipid rafts and affecting CAR and death receptor expression of prostate cancer cells. *Oncotarget* 6(5):3055-3070.

MAHMOUD, A.; ABDOUL-SOUD, M.; HAN, J.; AL-SHEIK, Y.; AL-ABD, A.; EL-SHEMY, H. 2016. Transcriptional profiling of breast cancer cells in response to mevinolin: Evidence of cell cycle arrest, DNA degradation and apoptosis. *Int J Oncol* 48:1886-1894.

MENNA, P.; CARDAMA, G.; COMIN, M.; ALONSO, D.; GOMEZ, D. 2010. Rho GTPasas como blancos terapéuticos relevantes en cáncer y otras enfermedades humanas. *Medicina.* 70:555-564.

MENNICKENT, S.; BRAVO, M.; CALVO, C.; AVELLO, M. 2008. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. *Rev Med Chile* 136:775-782.

MONTERO, J.; MORALES, A.; LLACUNA, L.; LLUIS, J.M.; TERRONES, O.; BASAÑEZ, G.; ANTONSSON, B.; PRIETO, J.; GARCÍA-RUIZ, C.; COLELL, A.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. 2008. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68(13):5246-5256

MURAKAMI, R.; CHEN, C.; LYU, S.; LIN, C.; TZENG, P.; WANG, T.; CHANG, J.; SHIEH, Y.; CHEN, I.; HUANG, S.; LIN, H. 2016. Lovastatin lowers the risk of breast cancer: a population-based study using logistic regression with a random effects model. SpringerPlus 5:1932.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. Apoptosis 12: 913-922.

PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; TAMARGO, J. 2008. Fármacos Hipolipemiantes. **In:** Velázquez, B. Farmacología Básica y Clínica. 18ª ed. Editorial médica panamericana. Madrid, España. pp. 455-475.

QUEIROGA, F.L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M.I.; 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.

SANDOVAL, M.C. 2012. Mecanismos moleculares de las estatinas sobre el cáncer. Tesis Doctora en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. 148p.

SHEN, Y.; YUAN, Y.; DU, Y.; PAN, Y. 2015. Molecular mechanism underlayin the anticancer effect of simvastatin on MDA-MB-231 human breast cancer cells. Mol Med Rep 12:623-630.

SIDDIQUI, R.A.; HARVEY, K.A.; XU, Z.; NATARAJAN, S.K.; DAVISSON, V.J. 2014. Characterization of lovastatin-docosahexaenoate anticancer properties against breast cancer cells. Bioor Med Chem 22:1899-1908.

SLEECKX, N.; ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E.; VAN GINNEKEN, C.; VANBRANTEGEM, L. 2011. Canine mammary tumours, an overview. Reprod Dom Anim 46:1112-1131.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZAPULLI, V.; GOLDSCHMDT, M.H. 2011. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. Vet Pathol 48(1):85-97.

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHMIDT, M.H. 2013. Tumors of the Mammary Gland. **In:** Withrow, S.J.; Vail, D.M.; Page, R.L. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5th ed. Elsevier Inc. Missouri, USA. pp. 538-556.

SOUZA, C.; TOLEDO-PIZA, E.; AMORIN, R.; BARBOZA, A.; TOBIAS, K. 2009. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J* 50(5):506-510.

TAVARES, W.; LAVALLE, G.; FIGUEIREDO, M.; SOUZA, A.; BERTAGNOLLI, A.; VIANA, F.; PAES, P.; CARNEIRO, R.; CAVALCANTI, G.; MELO, M.; CASSALI, G. 2010. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Vet Scand* 52:67.

TORRES, C.; OLIVARES, A.; STOORE, C. 2015. Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncol Rep* 33:2235-2244.

VINAYAK, S.; KURIAN, A.W. 2009. Statins may reduce breast cancer risk, particularly hormone receptor-negative disease. *Curr Breast Cancer Rep.* 1(3):148-156.

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 signaling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget* 7(3):2532-2544.

WONG, W.; DIMITROULAKOS, J.; MINDEN, M.; PENN, L. 2002. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 16:508-519.

YANG, T.; YAO, H.; HE, G.; SONG, L.; LIU, N.; WANG, Y.; YANG, Y.; KELLER, E.T.; DENG, X. 2016. Effects of Lovastatin on MDA-MB-231 Breast cancer cells: An antibody microarray analysis. *J Cancer.* 7(2):192-199.