



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

## EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE SIMVASTATINA EN CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

**WENDY ESTEFANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

DIRECTORA:

**DIRECTORA: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**

JURADO DE EXAMEN

**ASESORA: DRA. LINDA VERÓNICA CAMPOS FERNÁNDEZ**

**ASESORA: DRA. JESSICA EDITH RODRIGUEZ RODRÍGUEZ**

**SINODAL: MTRA. MARIA TERESA GRISELDA FUENTES LARA**

**SINODAL: MTRA. ANA ISABEL BARCO GONZÁLEZ**



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

---

*El presente trabajo es dedicado a mis amados padres y mi hermano, quienes han estado conmigo a lo largo de este camino, brindándome su amor, cariño y apoyo incondicional. Ustedes son el motivo más grande para superarme como persona y como profesional. Gracias por hacerme creer que puedo lograr todo lo que me proponga. Los amo con todo el corazón.*

*A mis primas Reyna y Edith, mi primo Enrique, mis padrinos Dante y Zenaida, María Balderas y Lalita por brindarme todo su apoyo, calidez y ánimos a lo largo de todo de este camino, además de ser mi segunda familia. Los quiero.*

*A mis amados amigos de la Facultad, Cristian Cedillo y Maribel Arguello, gracias a ustedes esta etapa fue maravillosa y nunca faltaron los ánimos aún en los semestres más difíciles. Son las mejores personas que he conocido y no dudo que son los mejores profesionales que puede haber. Gracias por los grandes momentos que hemos vividos y que aún nos faltan por vivir.*

*Por último, también dedico este trabajo a la Dra. Monserrat Llaguno Munive, por brindarme su tiempo y paciencia, pero sobre todo por enseñarme a mejorar cada día como profesional y como persona. Pocas son las personas que inspiran y usted es una de ellas. Gracias a usted amé la investigación y encontré mi vocación.*

## AGRADECIMIENTOS

---

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de la máxima casa de estudios del país.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme los insumos e instalaciones para mi educación y formación como QFB.

Al Instituto Nacional de Cancerología por recibirme como estudiante en la Subdirección de Investigación Básica y Clínica.

A la Dra. Patricia García López por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de Farmacología y por brindarme los insumos necesarios para la realización de este proyecto, además de dedicarme tiempo y por todos los conocimientos brindados durante toda mi estancia.

A la Dra. Monserrat Llaguno Munive y al laboratorio de Física Médica por permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones y por el material y apoyo brindados.

Al Dr. Omar Muñoz por los consejos dados para la realización de este proyecto.

Al Biólogo Rafael Jurado por ser una guía y por los consejos dados.

A mis amigos del Instituto: Hugo Garduño, Jessica Salas, Alexis Mendoza, Erika Solano, Ariel Díaz, Diego González, Zaira Berenice por apoyarme en todo mi proyecto y sobre todo por hacer mi estancia más amena.

A las Dras. Jessica Rodríguez y Verónica Campos por su tiempo dedicado para la realización de este trabajo.

## ÍNDICE

---

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Marco teórico</b> .....	<b>10</b>
3.1 Cáncer y estadísticas .....	10
3.2 Clasificación del cáncer de mama.....	10
3.3 Cáncer de mama triple negativo (CMTN).....	12
3.4 Metástasis .....	12
3.5 Tratamiento .....	15
3.5.1 Simvastatina .....	16
3.6 Reposicionamiento de fármacos .....	18
3.6.1 Simvastatina .....	19
<b>4. Planteamiento del problema</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Objetivos</b> .....	<b>23</b>
6.1 Objetivo principal.....	23
6.2 Objetivos específicos .....	24
<b>7. Diseño del estudio</b> .....	<b>24</b>
<b>8. Metodología</b> .....	<b>26</b>
8.1 In vitro .....	26
8.1.1 Viabilidad celular .....	26
8.1.2 Ensayo de migración.....	28
8.2 in vivo .....	28
8.2.1 Preparación del inóculo.....	29
8.2.2 Modelo ortotópico.....	29
8.2.3 Seguimiento del volumen tumoral .....	29
8.2.4 Evaluación del crecimiento tumoral por imagen molecular .....	31
8.2.5 Evaluación de metástasis pulmonar.....	31
8.3 Análisis estadístico.....	31
<b>9. Resultados</b> .....	<b>32</b>
1. Ensayos de viabilidad de simvastatina y doxorubicina individuales.....	32

3. Cálculo de índice de combinación.....	37
4. Ensayo de migración por cierre de herida.....	38
5. Seguimiento tumoral .....	40
6. Seguimiento tumoral por imagen molecular .....	41
6. Toxicidad sistémica.....	44
7. Seguimiento de metástasis en pulmón por medio de PET/CT e NIR.....	45
<b>10. Discusión de resultados .....</b>	<b>47</b>
<b>11. Conclusión .....</b>	<b>53</b>
<b>12. Referencias .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>CMTN</b>	Cáncer de Mama Triple Negativo
<b>CI50</b>	Concentración Inhibitoria 50
<b>NOD SCID</b>	Ratón Diabético no Obeso (NOD) Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)
<b>PET</b>	Tomografía de Emisión de Positrones
<b>CT</b>	Tomografía Computarizada
<b>HMG-CoA</b>	Hidroxi Metil Glutaril Coenzima A
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baja Densidad
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de Muy Baja Densidad
<b>RE</b>	Receptor de Estrógenos
<b>RP</b>	Receptor de Progesterona
<b>HER2</b>	Factor 2 de Crecimiento Epidérmico Humano
<b>TEM</b>	Transición Epitelio Mesénquima
<b>TME</b>	Transición Mesenquimal Epitelial
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>IC</b>	Índice de Combinación
<b>FDG</b>	18F-Fludesoxiglucosa
<b>RGD</b>	Glicina-Arginina-Aspartato
<b>IF</b>	Intensidad de Fluorescencia
<b>Dox</b>	Doxorrubicina
<b>Sim</b>	Simvastatina
<b>FPP</b>	Farnesil Pirofosfato
<b>GGPP</b>	Geranil Geranil Pirofosfato
<b>HIF-1</b>	Factor Inducible de Hipóxia 1 alfa
<b>DCAF13</b>	Factor 13 asociado a DDB1 y CUL4

## 1. RESUMEN

---

El cáncer de mama es una neoplasia maligna que ocupa el primer lugar de incidencias por cáncer a nivel mundial y nacional en la población femenina, afectando primordialmente a mujeres mayores de 40 años.

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es el subtipo molecular más agresivo; no expresa receptores hormonales como el receptor a estrógenos (RE) o a progesterona (RP) por lo que las terapias dirigidas a estos blancos moleculares no tienen efecto, generando, una resistencia farmacológica; además, el CMTN de que tiene mayor probabilidad de generar metástasis a pulmón y cerebro, por lo que las pacientes diagnosticadas con este subtipo molecular tienen una esperanza de vida no mayor a 5 años y aún no se ha desarrollado una terapia farmacológica específica para este subtipo molecular de cáncer.

En el presente trabajo se propuso el uso de simvastatina como fármaco de *reposicionamiento* en combinación con el antineoplásico doxorubicina como alternativa farmacológica para el tratamiento de CMTN; Los efectos farmacológicos se evaluaron sobre la viabilidad celular en la línea MDA MB 231 realizando curvas dosis-respuesta y calculando la Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>). Además, se estableció un análisis de isoblograma para calcular las concentraciones de las combinaciones que resultan en un efecto sinérgico, las cuales fueron 1.32  $\mu$ M y 0.30  $\mu$ M para simvastatina y doxorubicina, respectivamente. Estas concentraciones fueron utilizadas para evaluar la migración celular, utilizando el ensayo por cierre de herida, observando que la combinación de simvastatina y doxorubicina tuvo un efecto mayor sobre la migración celular en comparación con los tratamientos individuales.

Para evaluar el efecto de la combinación de simvastatina y doxorubicina *in vivo*, se utilizaron ratones NOD-SCID hembras de 6 semanas, a las que se les practicó una cirugía ortotópica en la segunda mama del lado derecho depositando  $4 \times 10^6$  células. Se realizó el seguimiento del tamaño del tumor, y cuando alcanzaron un volumen de 80-100 mm<sup>3</sup>, se aleatorizaron en 4 grupos (control, simvastatina, doxorubicina, y la combinación). Se administraron, 10 mg/kg de simvastatina vía oral y 2 mg/kg de

doxorrubicina, vía intravenosa (2 veces/sem x 3 semanas). Se tomaron imágenes moleculares del tumor primario y pulmones, utilizando un PET y CT antes y después del tratamiento. Un segundo grupo de ratones fueron tratados con simvastatina a una dosis de 20 mg/kg, evaluando de la misma manera el volumen tumoral y la inhibición de metástasis.

Una semana después de finalizar el tratamiento de los fármacos, se extrajo el tumor primario y a la semana siguiente se evaluaron la formación de metástasis en pulmones por Imagen Cercana al Infrarrojo. Los ratones se sacrificaron y los pulmones se extrajeron para tomar imagen *ex vivo*, los tejidos se conservaron en formaldehído al 10% en PBS.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que simvastatina tiene efecto sinérgico con doxorrubicina, disminuyendo la viabilidad celular e inhibiendo la migración de la línea MDA MB 231, además de disminuir las metástasis a pulmón en un modelo preclínico ortotópico de cáncer de mama.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

El cáncer de mama representa el primer lugar de incidencias por cáncer en la población femenina, tanto a nivel mundial como nacional, afectando primordialmente a mujeres mayores de 40 años.

Este tipo de cáncer presenta una proliferación descontrolada de las células que conforman el tejido mamario. El subtipo molecular conocido como cáncer de mama triple negativo (CMTN), es el más agresivo debido a la nula expresión de receptores moleculares además de que este tipo de células tienen la capacidad de migrar e invadir tejidos, por lo cual se le atribuye una alta capacidad de generar metástasis; primordialmente a pulmón, seguido de vísceras, hueso y cerebro.

Las alternativas farmacológicas que existen para el CMTN son limitadas y se utilizan tratamientos convencionales como doxorrubicina combinada con taxanos o derivados del platino, teniendo respuesta favorable durante las primeras semanas de tratamiento; sin embargo, a largo plazo se desarrolla resistencia farmacológica.

Por otro lado, debido a la dificultad que presenta el desarrollo y aprobación de nuevos antineoplásicos, se ha optado por el reposicionamiento de fármacos, que es el uso de un fármaco ya existente para tratar una enfermedad diferente a la que originalmente fue desarrollado. De esta manera, en el presente proyecto se propone utilizar a la simvastatina como fármaco de reposicionamiento para el tratamiento de cáncer metastásico.

Simvastatina es un fármaco perteneciente al grupo de las estatinas usado para disminuir los niveles de colesterol debido a la inhibición de la enzima Hidroxi Metil Glutaril Coenzima A (HMG-CoA reductasa) y estimulando la expresión de receptores de Lipoproteína de Muy Baja Densidad (VLDL). En los últimos años se ha estudiado su efecto antineoplásico debido a la capacidad que tiene para disminuir la proliferación de las células cancerosas, así como la inducción de apoptosis y la inhibición de la migración e invasión celular.

Debido a que simvastatina tiene gran potencial como antineoplásico se propone que al combinarla con el ya conocido antineoplásico doxorubicina tengan un efecto sinérgico, además de mostrar un efecto anti metastásico. En este trabajo se evaluaron los efectos de la simvastatina y la doxorubicina, de manera individual y combinada, en la línea celular MDA MB 231 y en un modelo preclínico de cáncer de mama con metástasis a pulmón.

### **3. MARCO TEÓRICO**

---

#### **3.1 CÁNCER Y ESTADÍSTICAS**

Las células humanas se multiplican durante la división celular y cuando envejecen o sufren algún daño entran en apoptosis, un proceso ordenado y altamente regulado; sin embargo, existen células que sufren daño en los genes que regulan el ciclo celular y comienzan a proliferar de manera descontrolada invadiendo los tejidos que se encuentran a su alrededor, a esto se le conoce como cáncer<sup>1</sup>.

Los tipos de cáncer hacen referencia al tejido donde se originó, siendo los carcinomas los más comunes, ya que el daño ocurre en las células epiteliales que recubren los tejidos. Los carcinomas tendrán un nombre distinto, de acuerdo con tipo de célula epitelial afectada; entre ellos, se encuentran los adenocarcinomas, que son aquellos que conforman el tejido glandular<sup>1</sup>.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de mama es el tipo más común, ya que en 2020 se reportaron más de 2.2 millones de casos, además de ser una de las principales causas de muerte en mujeres mayores de 40 años<sup>2</sup>. En México es el segundo tipo más común en toda la población, pero en la población femenina ocupa el primer lugar, con el 25% de incidencias por cáncer y se reportan 1.52 defunciones por cada 10,000 habitantes, en mujeres de 39-59 años<sup>2,3</sup>.

#### **3.2 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA**

El cáncer de mama es una neoplasia maligna que afecta al tejido mamario, y de acuerdo con su origen, puede ser lobulillar (daño en las glándulas productoras de leche) y ductal (conductos por donde se desplaza la leche para llegar al pezón)<sup>3</sup>.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y para poder clasificarlo se han designado diferentes parámetros. Desde 1959, el American Joint Committee on Cancer (AJCC) propuso la clasificación TNM (tumor primario, nódulos linfáticos y metástasis)

para determinar el estado de la enfermedad y el tiempo de diagnóstico<sup>4</sup>; sin embargo, en el año 2013 se propuso una nueva clasificación en la que se tomó en cuenta la biología molecular y la inmunohistoquímica, surgiendo así la clasificación molecular<sup>5</sup>.

La clasificación molecular se basa en la expresión de los receptores hormonales de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2) considerados marcadores de pronóstico y predictores de terapia. De acuerdo con la diferencia de expresión de estos genes surgen 4 subtipos: luminal A, luminal B, HER2+ y triple negativo, cada uno con incidencia y pronósticos diferentes<sup>6</sup> los cuales se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Subtipos moleculares de cáncer de mama<sup>6,7</sup>.

Subtipo	IHQ (fenotipo)			Subtipo histológico	% incidencia	Pronóstico	Riesgo de metástasis
	RP	RE	HER2				
Luminal A	>20 %	+	-	CDI	40-50	Bueno	Hueso
Luminal B	<20 %	+	+	CDI, CLI	10-20	Malo	Vísceras
HER2+	-	-	+	CDI, CLI	15-30	Intermedio	Hueso, vísceras, cerebro
Triple negativo	-	-	-	CDI	10-15	Malo +++	Pulmón, hígado, hueso, cerebro

**RP** receptor de progesterona, **RE** receptor de estrógenos, **HER2** receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano, **IHQ** inmunohistoquímica, **CDI** carcinoma ductal infiltrante, **CLI** carcinoma lobular infiltrante.

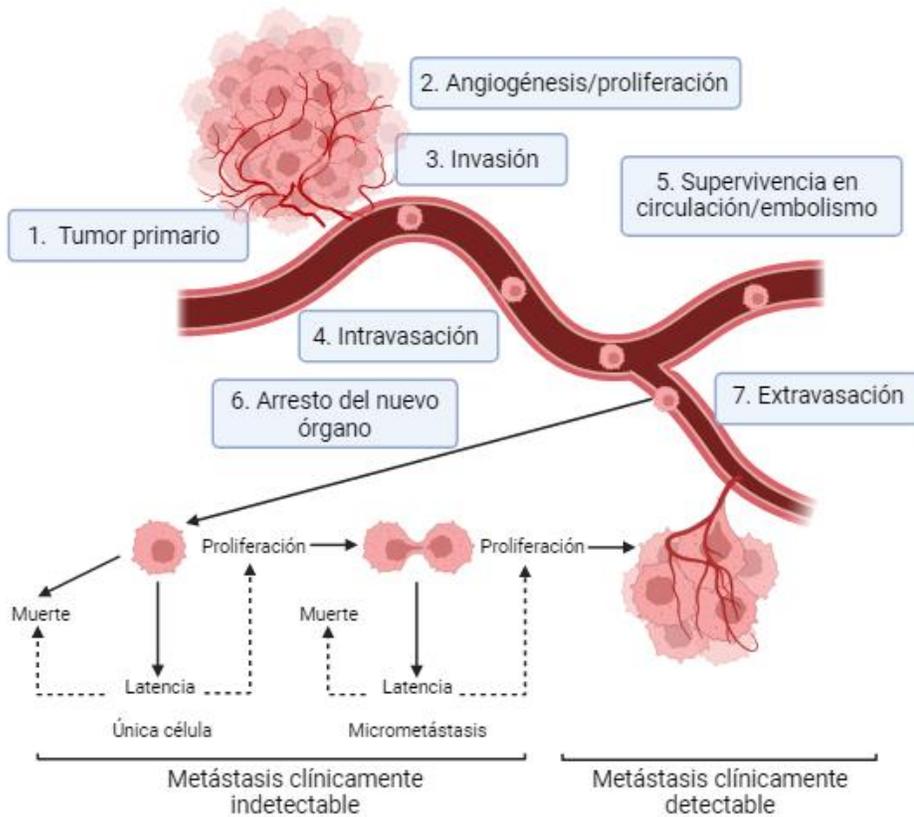
### **3.3 CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO (CMTN)**

El cáncer de mama, en general, se diagnostica mediante mastografía y cuando se encuentra alguna anomalía en el tejido mamario se procede a la obtención del tejido enfermo mediante aspiración con aguja fina, biopsia central o escisión quirúrgica para realizar pruebas moleculares e inmunohistoquímicas (IHC); en esta última, se evalúa el estado de los receptores hormonales: RE, RP y HER2. Cuando la IHC es negativa a los tres receptores se clasifica como cáncer de mama triple negativo (CMTN)<sup>8</sup>.

El CMTN es el subtipo molecular que carece de la expresión de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y HER2, se caracteriza por ser altamente invasivo, tener alto potencial metastásico, propensión a la recaída y mal pronóstico<sup>8</sup>. A diferencia de los otros subtipos moleculares, éste afecta a pacientes jóvenes de entre 20-39 años; una vez diagnosticado este subtipo molecular la tasa de mortalidad después de 5 años es de un 40% y debido a que es altamente invasivo la probabilidad de generar metástasis es de un 46% después del tercer año de su diagnóstico<sup>9,10</sup>.

### **3.4 METÁSTASIS**

Se conoce como metástasis a los tumores secundarios generados en una parte diferente del cuerpo a donde se originó el tumor primario. La metástasis es un proceso que sigue los pasos de: migración e invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización<sup>11</sup>. Durante este proceso las células cancerosas se modifican fenotípicamente para adquirir características mesenquimales que le permiten migrar e invadir<sup>12</sup>.



**Figura 1.** Proceso de la formación de metástasis en cáncer de mama, tomado de *Al-Mahmood S, 2018.*

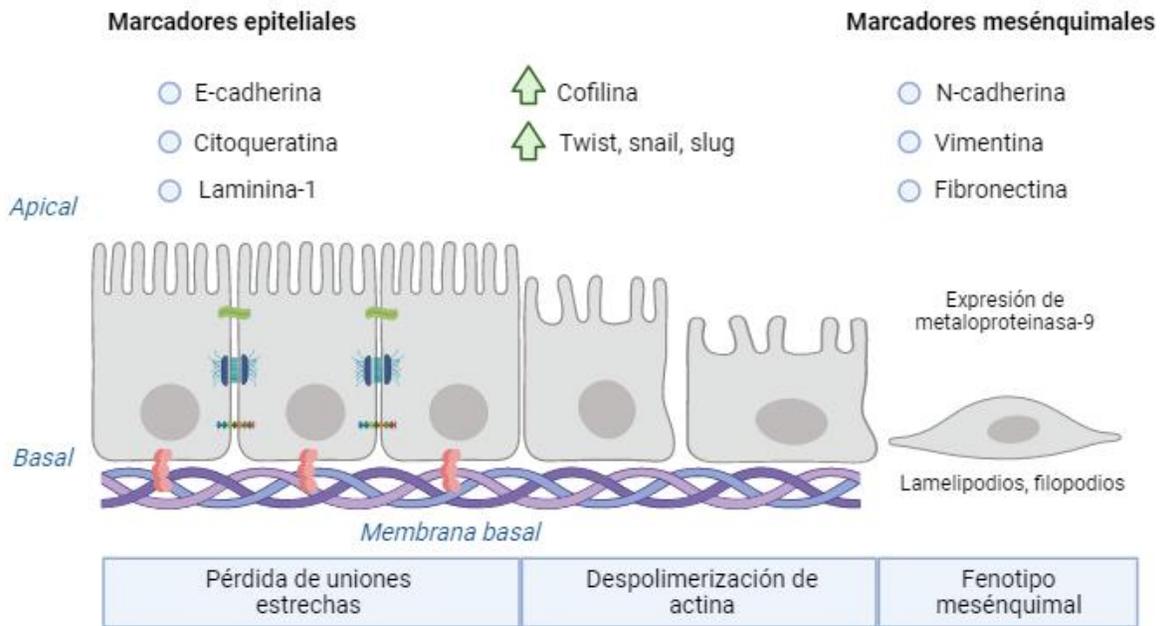
La transición epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) es el proceso mediante el cual las células epiteliales se transdiferencian en células mesenquimales móviles. Durante este proceso las células pierden su polaridad y reorganizan su citoesqueleto para aumentar su motilidad y desarrollar un fenotipo invasivo<sup>13</sup>. Originalmente las células se mantienen unidas por moléculas de adhesión como E-cadherina y mantienen una polaridad apical-basal a través de hemidesmosomas. Cuando inicia la EMT se pierden estas uniones<sup>14</sup>.

Los eventos celulares durante EMT son los siguientes:

1. Pérdida de uniones estrechas, comunicantes, adherentes y desmosomas, así como la pérdida de expresión de E-cadherina. En consecuencia, hay pérdida de

2. Comienza la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina, fibronectina,  $\alpha$ -actina y N-cadherina)
3. La polimerización de actina lleva a un arreglo del citoesqueleto que permite el alargamiento celular y la motilidad direccional. Se forman proyecciones del citoesqueleto conocidas como lamelipodios, filopodios e invadopodios que expresan metaloproteinasas de matriz<sup>14</sup>.

Las células sometidas a EMT pueden realizar el proceso inverso: transición mesenquimal-epitelial (TME), en el cual las células vuelven a su estado epitelial permitiendo la progresión de cáncer por la formación de tumores secundarios<sup>12</sup>.



**Figura 2.** Eventos celulares durante la transición epitelio mesénquima, tomado de *Lamouille S, 2014*

Se ha reportado que el CMTN es altamente metastásico debido a que el tumor primario secreta exosomas que contienen factores extracelulares que inducen la remodelación de la matriz extracelular (MEC), promotores de migración e invasión celular (microARN) y factores que inducen la inmunosupresión, formando el nicho premetastásico<sup>15</sup>. Los exosomas secretados por el tumor primario de CMTN tienen tropismo hacia el pulmón,

y los microARN secretados hacen que las células epiteliales del pulmón secreten quimiocinas que ayuden al reclutamiento y adhesión de las células cancerosas<sup>16</sup>. Además de pulmón, otros sitios donde el CMTN hace metástasis es en vísceras y hueso, las cuales pueden ocurrir de manera simultánea, y menos frecuente, metástasis en cerebro<sup>17</sup>.

### 3.5 TRATAMIENTO

Debido a la falta de expresión de los receptores RE y RP en CMTN no es sensible a la terapia hormonal, así como a la terapia dirigida a HER2, limitando las opciones de tratamiento sin mencionar que aún no se cuenta con protocolos de esquemas de tratamientos establecidos.

El tratamiento mayormente utilizado en CMTN es la quimioterapia, que en etapas tempranas ha demostrado alta eficacia; por otra parte, la quimioterapia neoadyuvante es utilizada en pacientes con tumores mayores a 2 cm<sup>18</sup>, y pacientes con cáncer localmente avanzado o inoperable<sup>19</sup>. Sin embargo, menos del 30% de los pacientes con CMTN logran una respuesta patológica completa además de que las tasas de recurrencia y mortalidad siguen siendo más altas que otros subtipos de cáncer de mama<sup>20</sup>.

El esquema de tratamiento incluye la combinación de taxanos, antraciclinas, ciclofosfamida, cisplatino y fluorouracilo. En estados metastásicos se ha optado por regímenes basados en taxanos, antraciclinas y derivados del platino<sup>21</sup>; sin embargo, la respuesta al tratamiento tiene corta duración y se observa una rápida recaída en las pacientes, seguido de la aparición de metástasis viscerales y cerebrales<sup>22</sup>. Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la deficiencia del tratamiento se debe a la resistencia farmacológica (desarrollada en más del 50% de las pacientes) o que es intrínsecamente menos susceptible<sup>23</sup>.

A continuación, se mencionan las generalidades del antineoplásico doxorubicina, fármaco con el que se realizaron las investigaciones del presente proyecto.

### 3.5.1 DOXORRUBICINA

Doxorrubicina (adriamicina) es una antraciclina obtenida del hongo *Streptomyces peucetius var caesius*, usada como antineoplásico debido a su amplia actividad antitumoral. Dado que es uno de los antineoplásicos más potentes se puede prescribir solo o en combinación con otros fármacos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como: leucemia, sarcoma, cáncer de mama, hígado, ovario, estómago, próstata, linfoma de Hodgkin y no-Hodgkin<sup>24</sup>.

**Tabla 1.** Farmacocinética de doxorubicina<sup>24</sup>

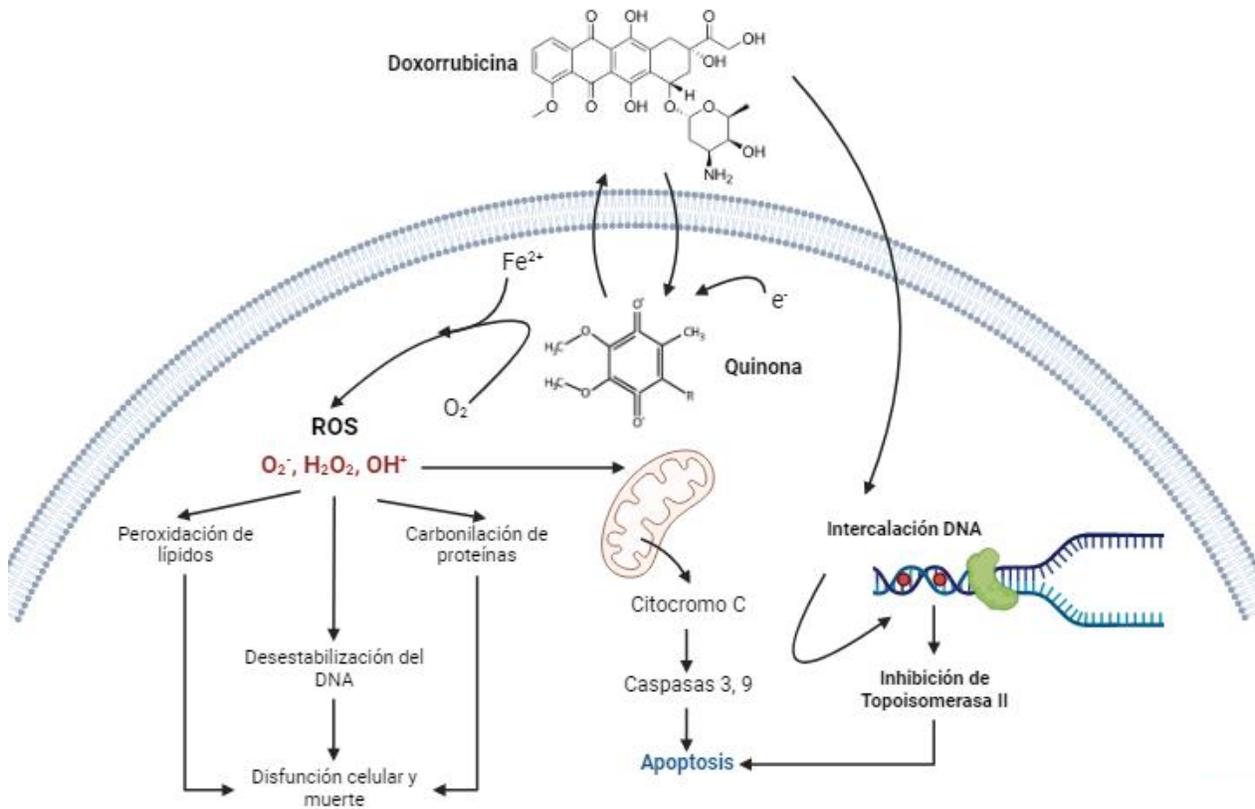
Unión a proteínas	Vol. distribución	Metabolismo	Eliminación
50-85%	1400-3000L	Hígado	Bilis

La doxorubicina ejerce su acción citotóxica a través de tres mecanismos principales: 1). Inhibición de la Topoisomerasa II; 2) generación de radicales libres de semiquinona y oxígeno; 3) intercalación en el ADN.

**Inhibición de la Topoisomerasa II.** La Topoisomerasa II es una enzima que mantiene o conserva la estructura normal del ADN, disminuyendo la deformación torsional producida cuando las cadenas de ADN se desenrollan durante la replicación o transcripción, este proceso se consigue cuando la Topoisomerasa II rompe y vuelve a sellar el ADN bicatenario. Cuando doxorubicina inhibe este proceso, la topoisomerasa causa una rotura permanente en la cadena de ADN, lo cual impide la replicación y culmina en la muerte celular<sup>25</sup>.

**Generación de radicales libres.** Después de que la doxorubicina se metaboliza en hígado por el citocromo P450, se reduce a radicales libres de semiquinona, los cuales al interactuar con el ADN causan su escisión o degradación. Además de semiquinona, el oxígeno también participa en la formación de radicales libres, produciendo superóxidos e hidroxilos que de igual manera dañan al ADN<sup>26</sup>.

**Intercalación en el ADN.** La doxorrubicina se intercala entre los pares de bases del ADN, inhibiendo la actividad de la DNA-polimerasa.



**Figura 3.** Mecanismos de acción que ejerce doxorrubicina.

A pesar de que doxorrubicina tiene múltiples mecanismos de acción, estos no son específicos para las células cancerosas, además de que su principal inconveniente es la cardiotoxicidad. El efecto cardiotóxico puede ser transitorio o permanente dependiendo de la dosis acumulada y se manifiesta poco tiempo después de la primera administración con arritmias, hipotensión y alteraciones electrocardiográficas. Además del corazón, otros órganos como el hígado y riñón también se ven afectados debido a la producción de radicales libres de oxígeno y hierro<sup>23</sup>.

Dado que doxorrubicina no puede ser administrada por periodos largos de tiempo, en las pacientes con CMTN su efectividad es limitada; además, en los últimos años se ha reportado su rápido desarrollo de la resistencia farmacológica, la cual promueve el

proceso metastásico. Por esta razón, actualmente se están estudiando nuevas alternativas farmacológicas, como lo es el reposicionamiento de fármacos.

### 3.6 REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

El desarrollo de nuevos fármacos para la terapia del cáncer presenta varios desafíos, entre ellos el tiempo de desarrollo, la gran inversión económica y la posibilidad de no salir al mercado debido a que la molécula no cumpla los perfiles de seguridad, es por ello que desde hace algunos años se ha optado por el *reposicionamiento de fármacos* como estrategia para implementar nuevos esquemas de tratamiento.

El reposicionamiento de fármacos es el uso de un fármaco en una indicación distinta a la que originalmente fue diseñado (también se le conoce como reutilización de medicamentos, reperfilado o redirección).<sup>27</sup> Inicialmente el concepto involucraba solo a moléculas en el mercado, pero actualmente se incluyen a aquellas que fracasaron en la fase clínica debido a su toxicidad o eficacia insuficiente y a los medicamentos retirados del mercado por cuestiones de seguridad.<sup>29</sup>

Entre las múltiples ventajas que ofrece el reposicionamiento de fármacos se encuentra el ahorro significativo de tiempo de desarrollo ya que reposicionar un fármaco lleva de 3-12 años mientras que el desarrollo de un nuevo fármaco es de 12 -17 años además de que su costo se reduce en un 50-60%.<sup>28</sup> Otro punto importante es que ya se conoce su farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad.<sup>29</sup>

En los últimos años se han implementado nuevas tecnologías que han permitido el mejor estudio y la comprensión de la fisiopatología y patogénesis del cáncer.<sup>30</sup> A pesar de todo el conocimiento que se tiene sobre la biología del cáncer el desarrollo de fármacos oncológicos se encuentra estancado debido a los altos costos de producción y desarrollo además de que ~5% de las moléculas nuevas llegan a ensayos clínicos<sup>28,30</sup>. Como solución se ha implementado el reposicionamiento de fármacos, apoyado de estudios *in silico*, y a la fecha se tiene registro de más de 200 medicamentos con actividad antineoplásica.<sup>29</sup>

Entre los fármacos de reposicionamiento para el cáncer se encuentran las estatinas, específicamente simvastatina. Se ha demostrado que estos fármacos pueden disminuir la recurrencia del cáncer y tienen efecto sobre la proliferación y supervivencia de las células cancerosas.<sup>31</sup>

### 3.6.1 SIMVASTATINA

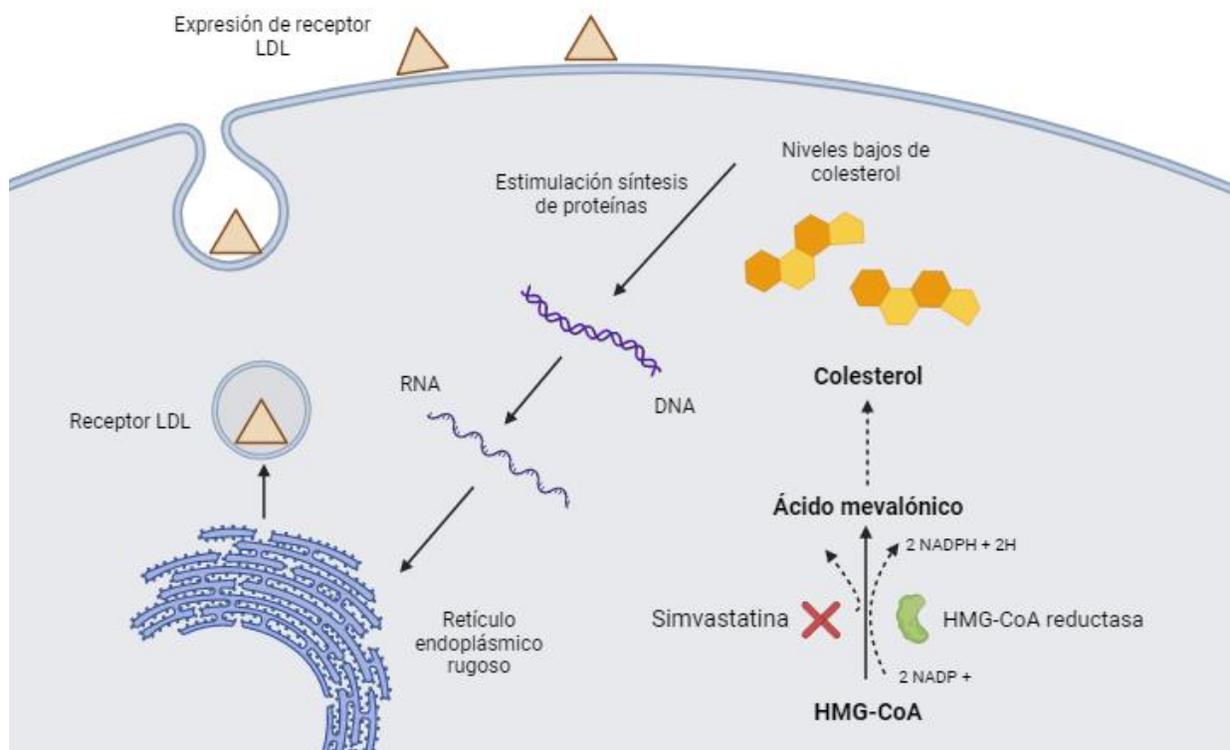
Uno de los fármacos de reposicionamiento que ha demostrado tener una gran actividad antitumoral es la simvastatina. Este fármaco pertenece al grupo de las estatinas, que originalmente han sido utilizadas para disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol.

Las estatinas fueron descubiertas por el microbiólogo japonés Akira Endo en 1976, quien aisló la primera estatina del hongo *Penicillium citrinum* y descubrió que este compuesto era capaz de inhibir la actividad de la enzima 3-hidroxi 3-metil glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA). Posteriormente, el laboratorio Merck descubrió otro inhibidor de la HMG-CoA aislado de *Aspergillus terreus* conocido como Lovastatina, esta fue la primera estatina aprobada por la FDA y a partir de ella se desarrollaron el resto de las estatinas, incluida la simvastatina<sup>32</sup>.

El mecanismo de acción de simvastatina consiste en la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa impidiendo la transformación del HMG-CoA en mevalonato, inhibiendo la síntesis del colesterol y disminuyendo sus concentraciones hepáticas. La falta de síntesis de colesterol estimula a las células hepáticas para la producción de receptores LDL (Lipoproteínas de Baja Densidad) a nivel de membrana y así poder disminuir los niveles de colesterol LDL en el plasma<sup>33</sup>.

**Tabla 2.** Farmacocinética de simvastatina

Unión a proteínas	Vol. distribución	Metabolismo	Eliminación
94%	7.6 L	Hígado	Bilis y orina



**Figura 4.** Mecanismo de acción de simvastatina como agente antilipomiente. Tomado de Clark, 2012

El uso de simvastatina como antineoplásico ha sido estudiado desde 1990 cuando se descubrió su actividad antitumoral, demostrando una disminución en la proliferación, migración, invasión y supervivencia de las células cancerosas. Además de su uso como antineoplásico, se ha reportado que tiene baja hepatotoxicidad, pocos efectos adversos y aumenta la esperanza de vida de las pacientes<sup>34</sup>.

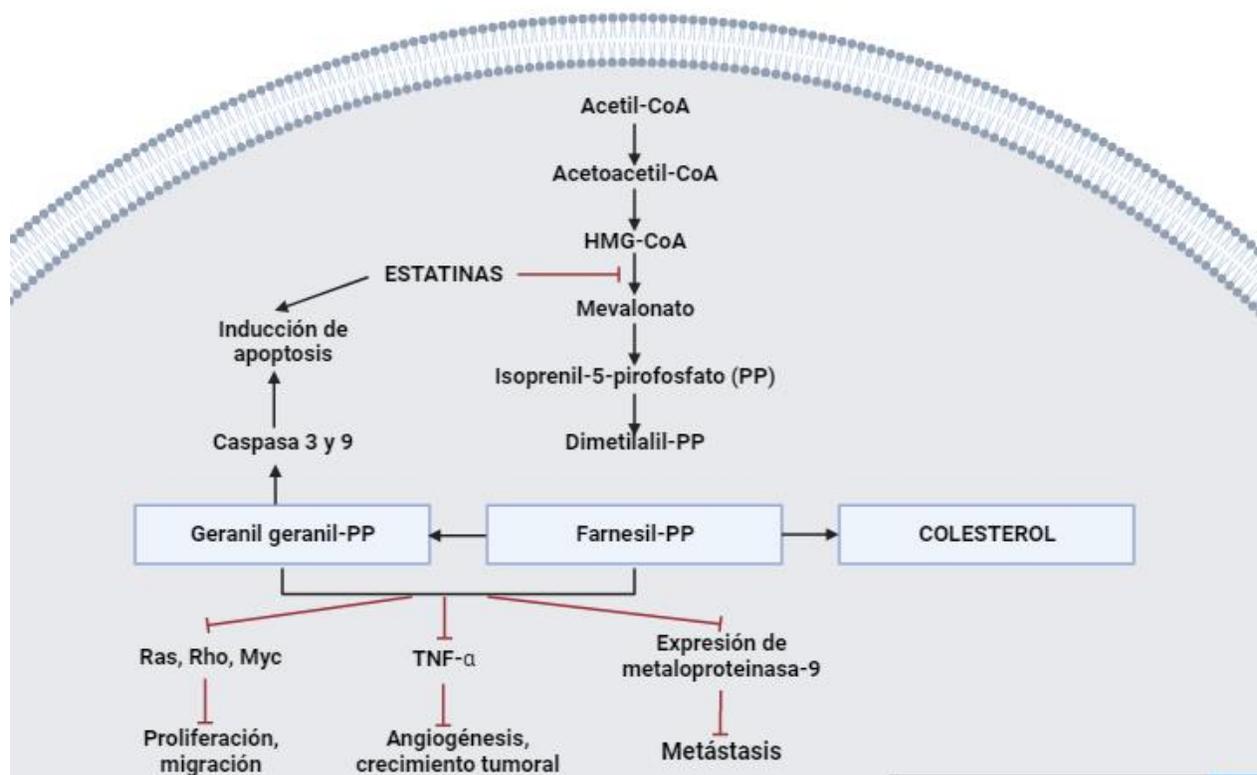
Se ha propuesto que el mecanismo de acción de simvastatina como antineoplásico radica en la inhibición de los precursores del colesterol, debido a que son mediadores para la expresión de proteínas que ayudan a la progresión tumoral, así como aquellas que se relacionan con los procesos de invasión y migración, culminando en metástasis<sup>35,36</sup>.

Respecto al crecimiento y proliferación de las células cancerosas, se ha observado que la proliferación celular se inhibe a través de los siguientes factores: la falta de colesterol

para la síntesis de membrana, la supresión de FPP (farnesil pirofosfato) y GGPP (pirofosfato de geranilgeranilo) disminuyendo la expresión de pequeñas GTPasas como Ras, Rho, Rac, c-Myc y la inhibición de las DNA metiltransferasas<sup>34</sup>.

También se ha comprobado que la simvastatina promueve la inducción de la apoptosis, disminuyendo los niveles de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL, y activando moléculas pro-apoptóticas como Bax, Bad, Caspasa 3, 8 y 9, así como la inducción de apoptosis mediada por calcio y por la producción de especies reactivas de oxígeno y de hierro<sup>37,38,39,40</sup>.

En estudios recientes se ha sugerido que la simvastatina tiene efectos sobre la migración celular, induciendo un arresto de las células cancerosas en la fase G1 del ciclo celular; además, disminuye la invasión celular por una baja expresión de metaloproteinasas<sup>40</sup>.



**Figura 5.** Mecanismo de acción de simvastatina propuesto como antineoplásico.

Tomado de *Duarte JA, 2021*

Por todas estas cualidades se ha propuesto a simvastatina como un fármaco de reposicionamiento para el tratamiento del cáncer, en combinación con fármacos que son utilizados como base en las quimioterapias, como es el caso de la doxorubicina, con la finalidad de tener un efecto sinérgico y que a su vez inhiba la migración celular y el proceso metastásico.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

---

El cáncer de mama es la principal neoplasia maligna que afecta a la población femenina en México, siendo el CMTN el más agresivo y con una alta probabilidad de generar metástasis, La falta de tratamientos específicos y la resistencia farmacológica hacen que las pacientes tengan una baja sobrevida global. El desarrollo de un nuevo fármaco implicaría varios años de investigación y costos elevados; además no todos los fármacos nuevos son aprobados; es por ello que se ha optado por el reposicionamiento farmacológico para tener tratamientos con mejores resultados.

#### **5. HIPÓTESIS**

---

---

La combinación de simvastatina y doxorubicina inhibirá la proliferación, migración de la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231, así como las metástasis a pulmón en un modelo ortotópico de cáncer de mama.

#### **6. OBJETIVOS**

---

---

##### **6.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Evaluar el efecto de la simvastatina en combinación con la doxorubicina sobre la proliferación y la inhibición de la migración celular, y en un modelo ortotópico preclínico de cáncer de mama metastásico.

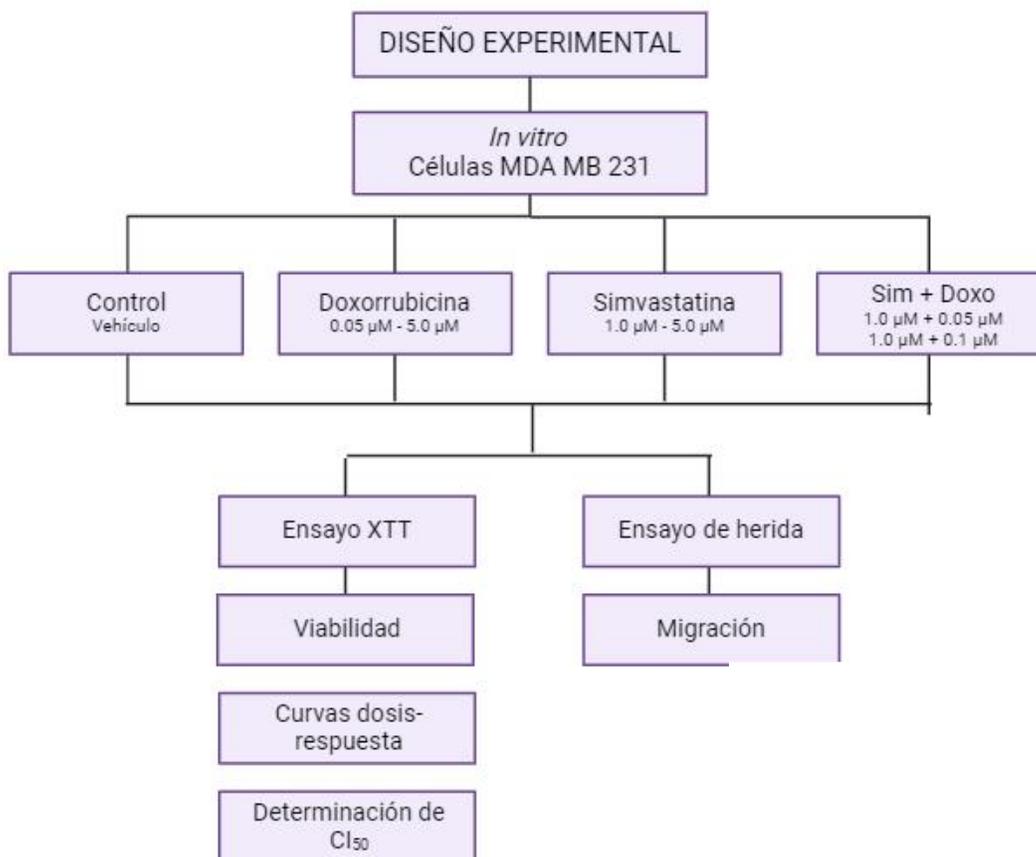
## 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto sobre la viabilidad de la simvastatina en combinación con doxorubicina en la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231.
- Evaluar el efecto sobre la migración celular de simvastatina en combinación con doxorubicina en la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231.
- Evaluar el efecto de simvastatina en combinación con doxorubicina sobre la inhibición de las metástasis a pulmón, en un modelo ortotópico preclínico de cáncer de mama.

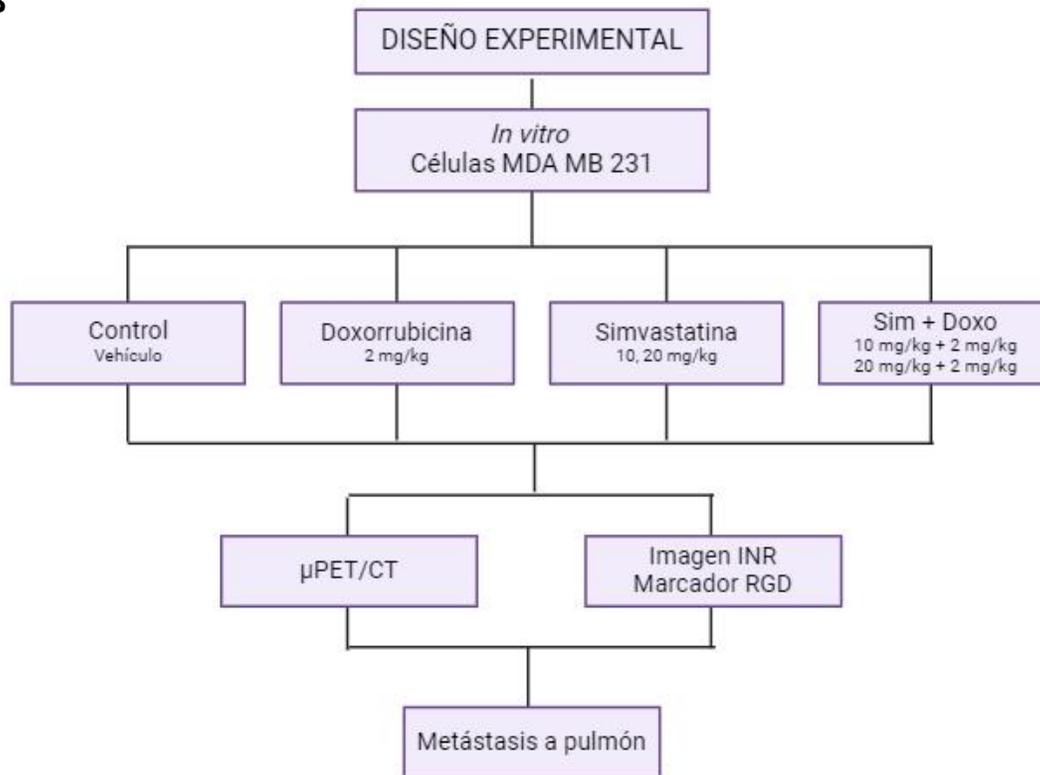
## 7. DISEÑO DEL ESTUDIO

---

A



**B**



**Figura 6.** Diseño experimental. **A** *In vitro*, utilización de células MDA MB 231. **B** *In vivo*, utilización de ratones hembra NOD SCID.

## 8. METODOLOGÍA

---

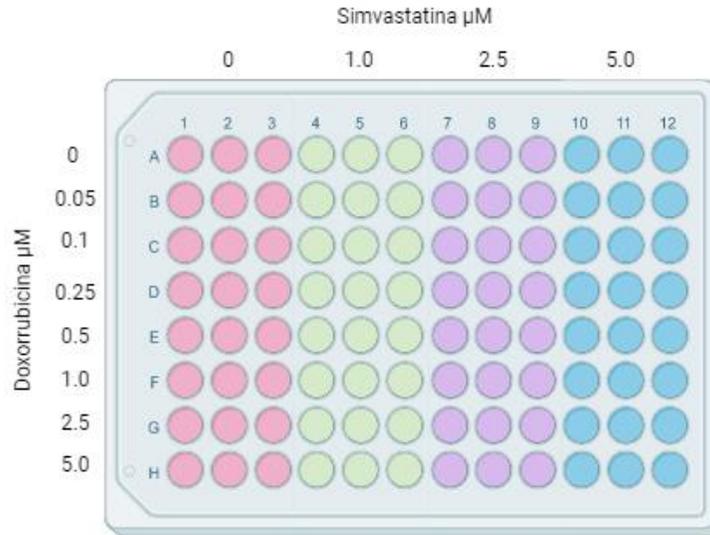
### 8.1 IN VITRO

#### CÉLULAS MDA MB 231

La línea celular MDA MB 231 fue obtenida de American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, U.S.A). Las células se cultivaron en condiciones de esterilidad en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, y a una confluencia de 80-90%.

##### 8.1.1 VIABILIDAD CELULAR

Las células se proliferaron en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, hasta alcanzar una confluencia entre 80-90% y se tripsinizaron para la obtención del concentrado celular. Las células se contaron y sembraron en una placa estéril de 96 pozos (9000 cel/pozo) en un volumen de 100 µL de medio RPMI. Las células sembradas se incubaron durante 24 hrs, posteriormente se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS y se expusieron a diferentes concentraciones de los fármacos individuales: para simvastatina (Silvera Ciencias e Ingeniería S.A. de C.V. no. de cat: ENZ-CHM142-0010) se emplearon las concentraciones de 0 µM, 0.05 µM, 1.0 µM, 1.5 µM, 2.5 µM y 5 µM. Para doxorubicina (Sigma-Aldrich No. de cat: 038K1349) 0 µM, 0.05 µM, 0.1 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 2.5 µM y 5 µM. Para la combinación de fármacos se emplearon las concentraciones en el orden presentado en la figura 7.



**Figura 7.** Organización de la placa de 96 pozos para la combinación de los fármacos simvastatina y doxorubicina.

Las células se expusieron a los fármacos por 72 horas, posteriormente se realizó el ensayo de XTT (Cell Proliferation Kit II XTT No. Catálogo 11465015001) para cuantificar la viabilidad celular midiendo la conversión de una sal de formazán. Se midió la conversión del sustrato con un lector de placas a 490 y 590 nm.

Con los resultados obtenidos, se elaboraron las curvas dosis-respuesta en el programa GraphPad Prism 6, tomando como 100% de viabilidad a las células que no fueron expuestas a fármaco.

Una vez elaboradas las curvas, se realizó el cálculo de las  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria 50) de cada fármaco y las respectivas combinaciones. Posteriormente, se utilizó la siguiente ecuación para determinar la interacción farmacológica entre simvastatina y doxorubicina:

$$CIx = \frac{D1}{Dx2} + \frac{D2}{Dx2} + \alpha \frac{(D1)(D2)}{(Dx1)(Dx2)} \quad (41)$$

Donde:

$CIx$  = índice de combinación.

$D1, D2$  = Concentración de los fármacos combinados.

$Dx1, Dx2$  = Concentraciones individuales de los fármacos.

$\alpha = 1$  (fármacos con diferente mecanismo de acción).

Se seleccionaron las concentraciones, que, de acuerdo con el índice de combinación, fueron menores a 1, ya que es el valor establecido para sinergismo farmacológico.

### **8.1.2 ENSAYO DE MIGRACIÓN**

Las células se sembraron en insertos de silicona (Ibidi No. cat 81176) en medio RPMI suplementado con 2% de SBF para promover la migración celular y se utilizó Mitomicina C (20 µg/µL) (Sigma-Aldrich No. Cat M4287-2MG) como un inhibidor de la proliferación celular. Las células se expusieron a los fármacos (simvastatina y doxorubicina individuales y combinados) utilizando las concentraciones calculadas de los índices de combinación. Se calcularon los porcentajes de cierre de herida con ayuda del seguimiento fotográfico a las 0, 8, y 24 hrs. Para el cálculo del cierre de herida se usó programa ImageJ (versión 1.8.0)

## **8.2 IN VIVO**

### **Ratones NOD/SCID**

Se utilizaron ratones NOD/SCID hembra de 6 semanas de edad proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, mantenidas en condiciones libres de patógenos, con agua y alimento *ad libitum*, fotoperiodo día/noche de 12-12 horas, temperatura de 27°C y humedad adecuada. El manejo y el sacrificio de los ratones se realizó de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

El protocolo fue aprobado por los comités de ética, investigación y CICUAL con el No. (023/032/IBI)(CEI/036/23).

### 8.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se cultivaron células MDA MB 231 en cajas de 150 cm<sup>2</sup> con medio RPMI suplementado con 10% de SBF y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> a una confluencia de 80-90%.

El día de la cirugía, se retiró el medio y las células se lavaron y tripsinizaron. El concentrado celular se recolectó en un tubo Falcón de 15 mL y se lavaron 3 veces con PBS 1X, posteriormente se resuspendió el botón celular en medio RPMI sin indicador rojo de fenol y matrigel (50/50) y se cargaron jeringas con 4x10<sup>6</sup> células/100 µL

### 8.2.2 MODELO ORTOTÓPICO

Un día previo a la cirugía se registró el peso de los ratones NOD/SCID y se rasuraron con crema depilatoria ultrasensible (Nair sensible™) en la zona de la segunda mama derecha y su alrededor.

Para realizar la cirugía, los ratones se anestesiaron con una atmósfera de 2.5% de isoflurano, se limpió el área de la segunda mama con solución aséptica y se realizó un corte entre la primera y segunda mama para exponer el tejido mamario. Una vez localizada la mama, se inocularon las células (con 4x10<sup>6</sup> células/100 µL) en el panículo adiposo mamario y se cerró la herida con pegamento 3M vetmond™.

### 8.2.3 SEGUIMIENTO DEL VOLUMEN TUMORAL

Dos semanas posteriores a la cirugía, se dio seguimiento al crecimiento tumoral tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$VT = D \times d^2 \times \frac{\pi}{6} \quad (42)$$

VT. Volumen Tumoral (mm<sup>3</sup>)

D: Diámetro mayor (mm)

d: Diámetro menor (mm)

Posteriormente, una vez que los tumores alcanzaron un volumen tumoral entre 80-100 mm<sup>3</sup>, los animales se aleatorizaron en 4 grupos y se inició con el tratamiento de acuerdo con el siguiente esquema:

**Tabla 3.** Esquema de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Dosis</b>	<b>Vía de administración</b>
<b>1</b>	Solución salina	2 veces por semana / 3 semanas 100 µL	Oral
<b>2</b>	Simvastatina	10 mg/kg 2 veces por semana / 3 semanas	Oral
<b>3</b>	Simvastatina	20 mg/kg 2 veces por semana / 3 semanas	Oral
<b>4</b>	Doxorrubicina	2 mg/kg 2 veces por semana / 3 semanas	Intravenosa
<b>5</b>	Simvastatina + doxorrubicina	Sim 10 mg/kg Doxo 2 mg/kg 2 veces por semana / 3 semanas	Oral Intravenosa
<b>6</b>	Simvastatina + doxorrubicina	Sim 20 mg/kg Doxo 2 mg/kg 2 veces por semana / 3 semanas	Oral Intravenosa

Una vez iniciados los tratamientos se continuó con el seguimiento del volumen tumoral y del peso corporal durante 4 semanas. Una semana posterior al término de los tratamientos, los tumores se retiraron y se conservaron a -80 °C.

#### **8.2.4 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL POR IMAGEN MOLECULAR**

Al inicio y término de los tratamientos se adquirieron imágenes con el equipo microPET-CT (Albira, España), para ello se administró 200 uCi del radiofarmaco 18-FDG (18F-fludesoxiglucosa) por vía intravenosa. Las imágenes se adquirieron después de 1 hora de la biodistribución del radiofármaco. Durante el estudio los animales permanecieron anestesiados con el sistema isoflurano/oxígeno mencionado anteriormente. El análisis de las imágenes se realizó con el software Osirix MD.

#### **8.2.5 EVALUACIÓN DE METÁSTASIS PULMONAR**

La evaluación de la metástasis se evaluó por Imagen Cercana al Infrarrojo con el marcador IRDye 800CW-RGD (Arg-Gly-Asp) (No. De catálogo 926-09889). Las metástasis a pulmón se evaluaron adquiriendo las imágenes *ex vivo* de los pulmones, para ello una semana posterior al final de los tratamientos se administraron 100 µL del marcador RGD (1 nmol), el cual se une a los receptores de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  que son reconocidos por un tripéptido, estos receptores se encuentran sobre expresados en células cancerosas. Posterior a las 48 horas de biodistribución los animales fueron eutanizados y se extrajeron los pulmones para su análisis con el equipo Odyssey® DLx Imaging System a 700 nm (LI-COR).

La determinación de la intensidad de fluorescencia se realizó estableciendo una región de interés (ROI) en los pulmones y se les restó la señal de fondo.

#### **8.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism versión 8.0.1

Para los datos de las curvas dosis-respuesta de la combinación de fármacos se utilizó una prueba de ANOVA de medias repetidas seguido de una prueba de Tukey.

Los datos del ensayo de migración se analizaron con la prueba de Tukey para la comparación entre todos los grupos. Se reportó el promedio  $\pm$  DE y un valor de  $p < 0.05$  para indicar diferencia significativa entre los grupos.

Para los datos del seguimiento tumoral se utilizó una prueba de ANOVA de medias repetidas seguido de una prueba de Tukey. Se reportó el promedio  $\pm$  Error estándar y un valor de  $p < 0.05$  para indicar diferencia significativa entre los grupos.

## 9. RESULTADOS

---

### 1. Ensayos de viabilidad de simvastatina y doxorubicina individuales

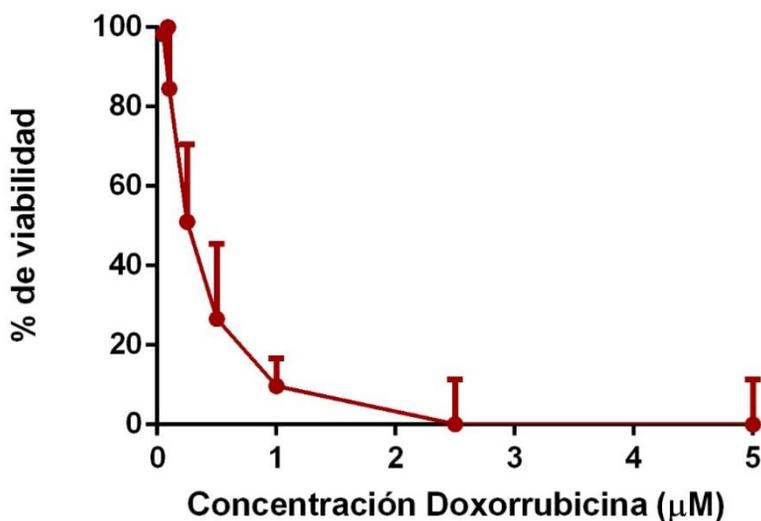
Para determinar la  $CI_{50}$  de simvastatina y doxorubicina de manera individual se graficaron los resultados del ensayo de viabilidad con XTT de cada fármaco (realizados por triplicado). Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 XML para elaborar las curvas presentadas en la figura 1. El gráfico 1A corresponde a la curva de dosis-respuesta de doxorubicina, y el gráfico 1B corresponde a la curva dosis-respuesta de simvastatina. Los datos se normalizaron tomando en cuenta como 100% de viabilidad las células a las cuales no se les aplicó fármaco. Tanto para doxorubicina como para simvastatina se observó una disminución en la viabilidad celular de manera dosis-dependiente, obteniéndose una  $CI_{50}$  de 1.320  $\mu$ M para simvastatina y una  $CI_{50}$  de 0.279  $\mu$ M para doxorubicina obteniendo una relación 1:4 entre los fármacos (Tabla 3).

**Tabla 4.**  $CI_{50}$  de doxorubicina y simvastatina

Fármaco	$CI_{50}$ $\mu$ M	Desviación estándar
Doxorubicina	0.279	0.002
Simvastatina	1.320	0.037

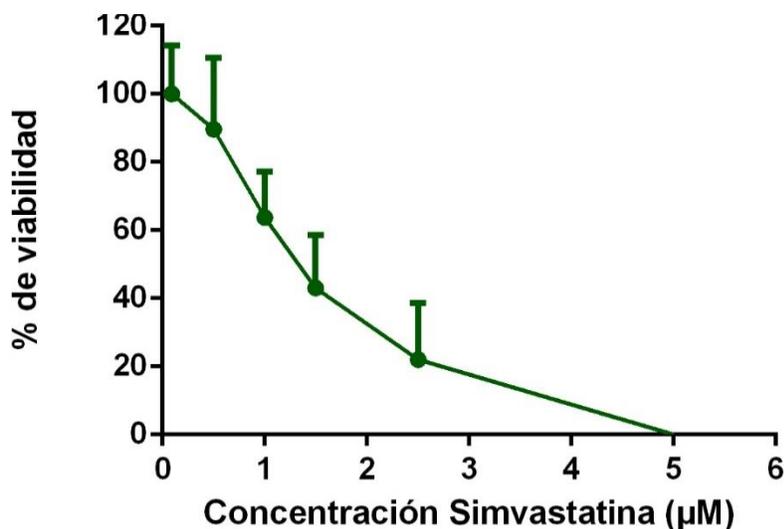
**Gráfica 8A. Curva dosis-respuesta de simvastatina**

**A**



**B**

**Gráfica 8B. Curva dosis-respuesta de doxorubicina**

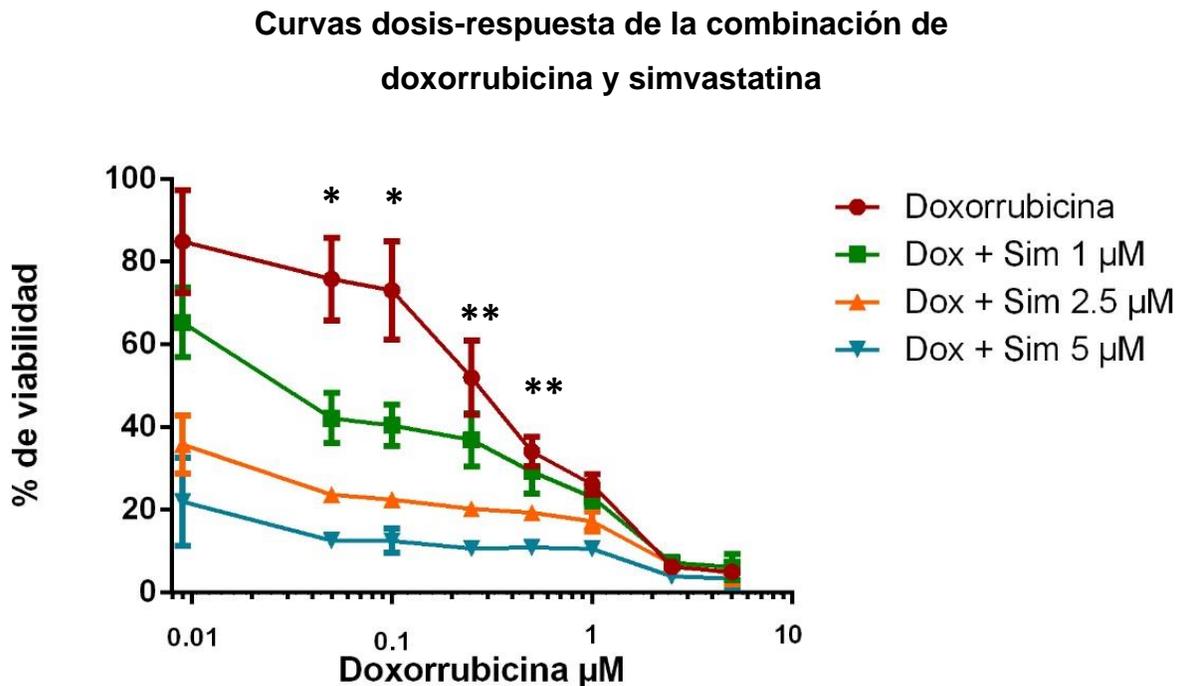


**Figura 8.** (A) Curva dosis-respuesta de doxorubicina. Se utilizaron las concentraciones de 0 µM, 0.05 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 2.5 µM y 5 µM de doxorubicina. Cada punto representa un ensayo por triplicado. Se utilizaron las concentraciones de. (B) Curvas dosis-respuesta de simvastatina. 0 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 1.5 µM, 2.5 µM y 5 µM de simvastatina. Cada punto representa un ensayo por triplicado de la media ± DE.

## 2. Ensayo de viabilidad de la combinación de doxorrubicina y simvastatina

Los resultados obtenidos de la combinación de simvastatina y doxorrubicina se muestran en la figura 10, se observa un mayor efecto sobre la inhibición de la viabilidad celular con doxorrubicina más simvastatina mostrando un efecto dependiente de la dosis; El efecto de doxorrubicina fue mayor cuando se combina con simvastatina 1, 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ .

Las  $\text{CI}_{50}$  de las combinaciones calculadas se presentan en la tabla 5. Se observa que al incrementar la concentración de simvastatina hay una disminución en la  $\text{CI}_{50}$  indicando la potencialización de los fármacos doxorrubicina y simvastatina cuando se exponen en conjunto, ya que las concentraciones requeridas para alcanzar el efecto de 50% de muerte son menores a las empleadas por cada fármaco individual.



**Figura 9.** Curvas dosis-respuesta de la combinación de los fármacos simvastatina y doxorrubicina. Las concentraciones empleadas de doxorrubicina fueron 0  $\mu\text{M}$ , 0.05  $\mu\text{M}$ ,

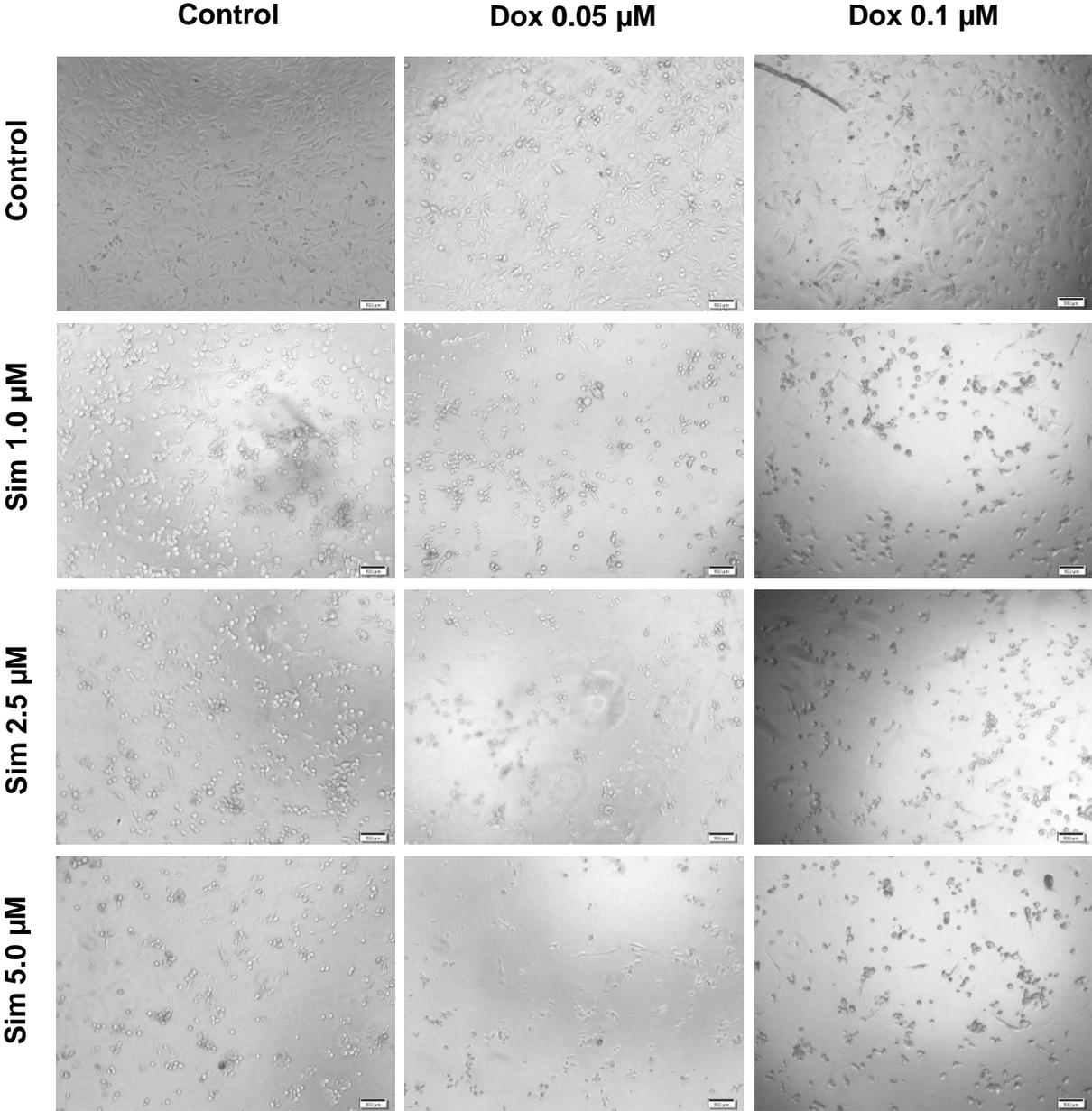
0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M y las concentraciones de simvastatina fueron 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M. Cada punto de la muestra representa el promedio del ensayo por triplicado  $\pm$ DE. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre doxorubicina y las combinaciones (Dox + Sim 1  $\mu$ M, dox + sim 2.5  $\mu$ M, dox + sim 5  $\mu$ M). \*\*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre doxorubicina y las combinaciones (Dox + sim 2.5  $\mu$ M, dox + sim 5  $\mu$ M).

**Tabla 5.**  $CI_{50}$  de doxorubicina en combinación con simvastatina.

Combinación	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)
Doxorrubicina solo	0.241
Dox + Sim 1 $\mu$ M	0.040
Dox + Sim 2.5 $\mu$ M	< 0.040
Dox + Sim 5 $\mu$ M	< 0.040

Además de medir la viabilidad celular por medio del ensayo de XTT, también se realizó el seguimiento fotográfico después de las 72 hrs de la exposición de los fármacos. Los resultados se muestran en la figura 10, observando que doxorubicina y simvastatina individuales tienen un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad celular, al incrementar la concentración de los fármacos se aprecia mayor cambio en la morfología celular, que va de forma alargada a redonda (indicando el desprendimiento de la célula y su posterior muerte). Por otra parte, al combinar los fármacos el efecto de la muerte celular es mayor.

**Ensayo de viabilidad de simvastatina y doxorrubicina en la línea celular MDA-MB-231**



**Figura 10.** Imágenes representativas de los ensayos de viabilidad de los fármacos simvastatina y doxorrubicina, individuales y combinados tras 72 hrs de exposición.

### 3. Cálculo de Índice de combinación

Para determinar las combinaciones con efecto sinérgico, se calculó el índice de combinación (IC). Para ello se emplearon las curvas dosis-respuesta individuales de simvastatina y doxorubicina así como las concentraciones utilizadas de las combinaciones ( $\mu\text{M}$ ). De acuerdo con los resultados obtenidos del IC se determinó el tipo de interacción farmacológica.

$$\text{IC} = 1 = \text{Aditividad} \quad \text{IC} < 1 = \text{Sinergismo} \quad \text{IC} > 1 = \text{Antagonismo}$$

Como se observa en la tabla 6, las combinaciones que resultaron tener un sinergismo farmacológico son doxorubicina  $0.05 \mu\text{M}$  + simvastatina  $1 \mu\text{M}$  y doxorubicina  $0.1 \mu\text{M}$  + simvastatina  $1 \mu\text{M}$ .

**Tabla 6.** Cálculo de índices de combinación.

Combinación de fármacos [ $\mu\text{M}$ ]		Fármacos individuales [ $\mu\text{M}$ ]		% de crecimiento	índice de combinación	Interacción
Dox D1	Sim D2	Dox Dx1	Sim Dx2			
0.05	1	0.3641	1.52	42.17	0.89	Sinergismo
0.05	2.5	0.5772	2.228	23.68	1.31	-
0.05	5	0.8716	3.138	12.62	1.74	-
0.1	1	0.3785	1.57	40.43	1.07	Sinergismo
0.1	2.5	0.5973	2.293	22.55	1.44	-
0.1	5	0.8742	3.145	12.56	1.89	-
0.25	1	0.4098	1.677	36.93	1.57	-
0.25	2.5	0.643	2.438	20.25	1.81	-
0.25	5	0.9661	3.418	10.66	2.10	-
0.5	1	0.4939	1.958	29.29	2.04	-
0.5	2.5	0.6632	2.501	19.34	2.51	-
0.5	5	0.9511	3.374	10.94	2.79	-
1	1	0.5871	2.26	23.11	2.90	-
1	2.5	0.7149	2.662	17.26	3.65	-
1	5	0.9694	3.427	10.6	4.00	-
2.5	1	1.21	4.119	7.29	2.81	-
2.5	2.5	1.24	4.203	6.99	3.81	-
2.5	5	1.711	5.493	3.97	3.70	-
5	1	1.332	4.462	6.17	4.82	-
5	2.5	1.573	5.122	4.61	5.22	-
5	5	1.848	5.855	3.46	5.87	-

Dado que la combinación de Dox 0.1  $\mu\text{M}$  + Sim 1  $\mu\text{M}$  tuvo un índice de combinación aproximado al valor calculado para sinergismo ( $< 1$ ) se decidió probar, de manera simultánea esta combinación en los posteriores experimentos.

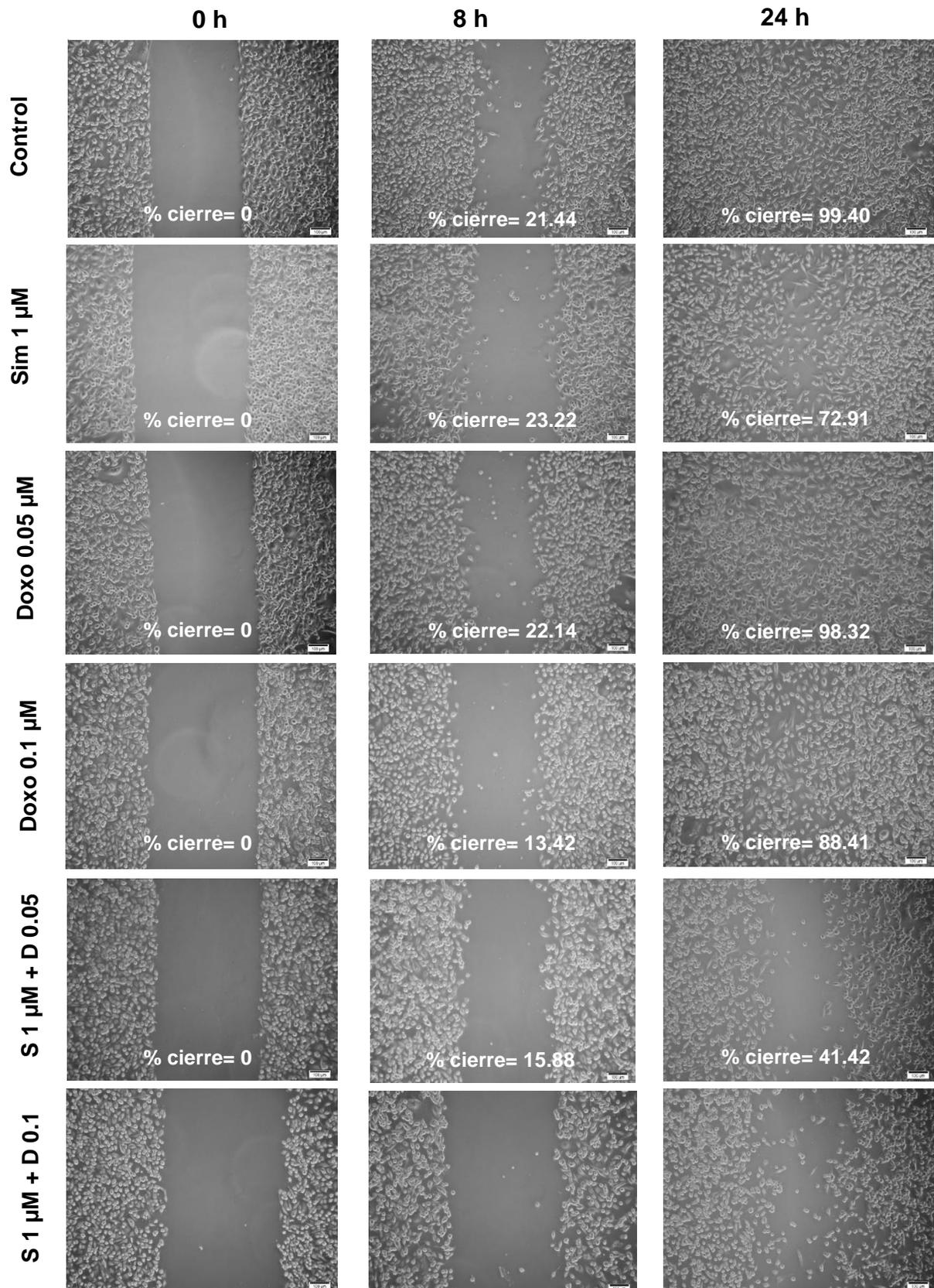
#### **4. Ensayo de migración por cierre de herida**

Para evaluar el efecto sobre la migración celular de simvastatina y doxorubicina de manera individual y combinada las células se expusieron durante 24 horas con los fármacos (doxorubicina 0.05  $\mu\text{M}$  + simvastatina 1  $\mu\text{M}$  y doxorubicina 0.1  $\mu\text{M}$  + simvastatina 1  $\mu\text{M}$ ). Después de la exposición a los fármacos se tomaron fotografías a las 0 hrs, 8 hrs y 24 hrs. Se calculó el cierre de herida a partir del área cubierta por las células sembradas en los laterales de la brecha.

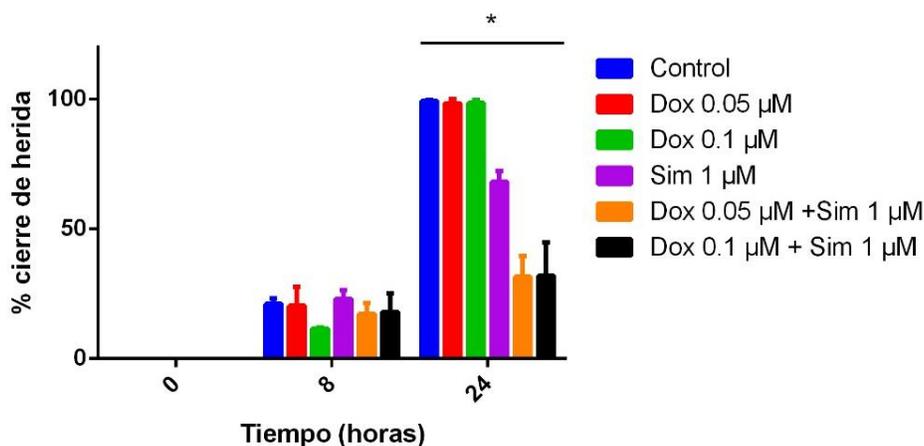
En la figura 11 se observa que simvastatina 1  $\mu\text{M}$ , Doxo 0.05  $\mu\text{M}$  y Doxo 0.1  $\mu\text{M}$  obtuvieron un cierre de herida del 72.91%, 98.32 y 88.41% a las 24 hrs respectivamente. Por otro lado, se observó una mayor inhibición en la migración celular al combinar los fármacos. Cuando las células se expusieron a doxorubicina 0.05  $\mu\text{M}$  + simvastatina 1  $\mu\text{M}$  se observó un cierre de herida del 41.42%, mientras que la combinación de doxorubicina 0.1  $\mu\text{M}$  + simvastatina 1  $\mu\text{M}$  fue de 33.11%.

Los porcentajes de cierre de herida se graficaron y se presentan en la figura 11B, se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con los fármacos individuales y los grupos con la combinación tras 24 hrs de exposición.

**A. Inhibición de la migración celular de los fármacos simvastatina y doxorubicina en la línea celular MDA-MB-231**



## B. Ensayo de migración de las células MDA-MB-231



**Figura 11. (A)** Imágenes representativas de los ensayos de migración realizados con los diferentes tratamientos, se muestran los porcentajes promedio de 3 ensayos individuales. **(B)** Porcentajes de cierre de herida con respecto al tiempo comparados con el control y los fármacos Simvastatina y Doxorubicina individuales  $n=3\pm\text{DE}$ .  $*p < 0.05$

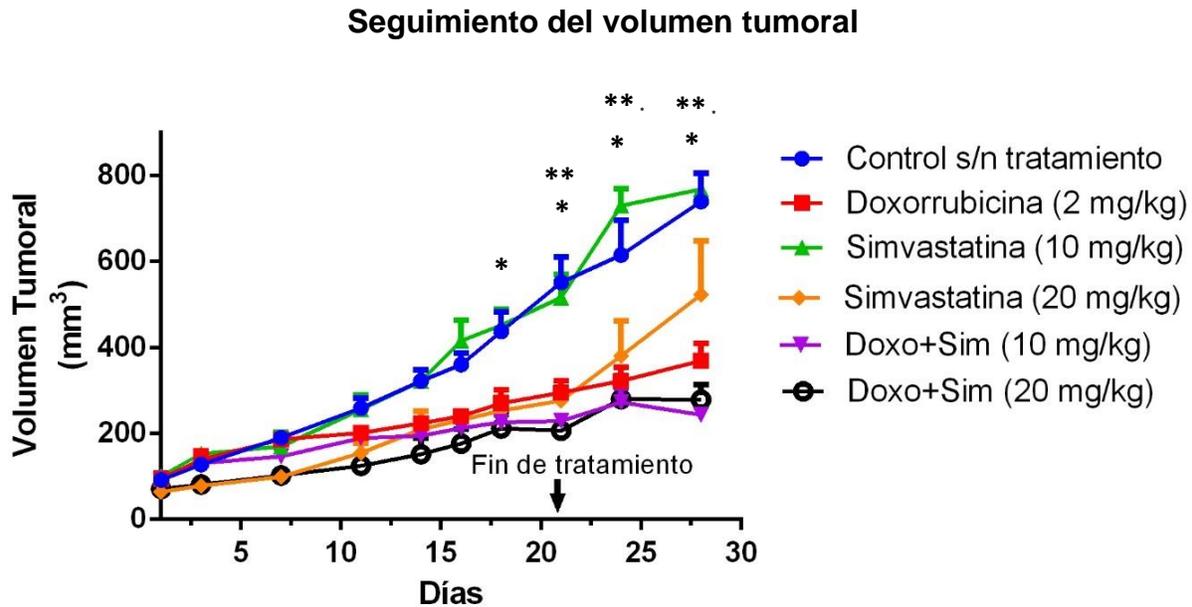
## Modelo ortotópico con metástasis a pulmón

### 5. Seguimiento tumoral

La evaluación del efecto antitumoral de los fármacos simvastatina y doxorubicina individuales y combinados se evaluaron en un modelo ortotópico de cáncer de mama (Figura 12).

En la figura 12 podemos observar que simvastatina, a una dosis de 10 mg/kg, mantiene una misma tasa de velocidad de crecimiento tumoral que el grupo control; sin embargo, al aumentar la dosis a 20 mg/kg la tasa de crecimiento tumoral fue menor comparada con el grupo control. Por otra parte, el grupo de doxorubicina mostró un menor crecimiento tumoral en comparación con el control y simvastatina, alcanzando

volúmenes finales cercanos a 400 mm<sup>3</sup>; mientras que, los grupos con la combinación de doxorubicina y simvastatina muestran volúmenes tumorales menores en comparación con los tratamientos individuales, mostrando una diferencia significativa con respecto al grupo control.



**Figura 12.** Seguimiento del volumen tumoral de los diferentes tratamientos. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre el control, doxorubicina, simvastatina 20 mg/kg, dox + sim (10 mg/kg), dox + sim (20 mg/kg), \*\* Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre Sim 10 mg/kg y Sim 20 mg/kg. Los datos representan la media  $\pm$ Error estándar,  $n=3$ .

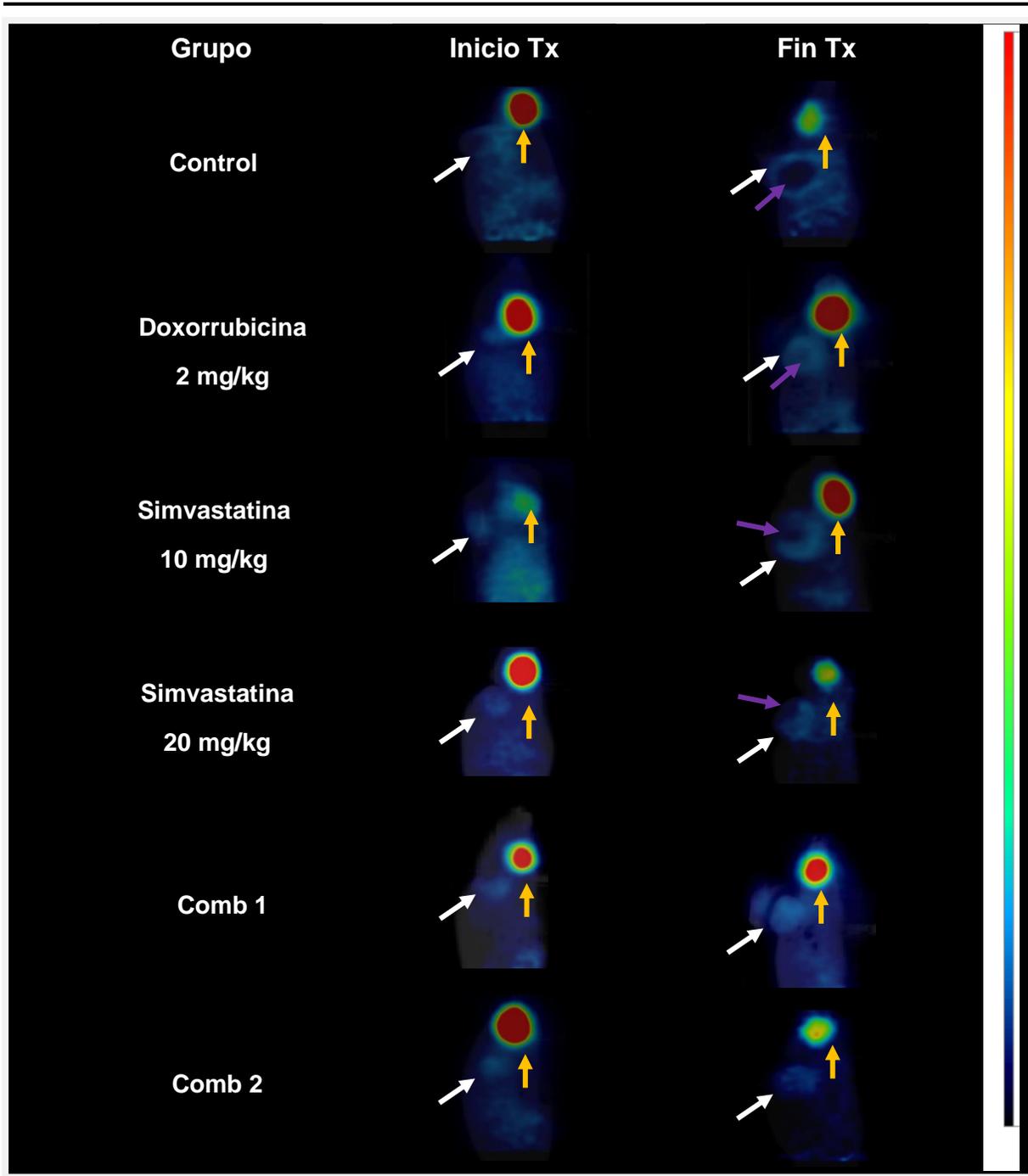
## 6. Seguimiento tumoral por imagen molecular

Otra técnica que se usó para la evaluación del efecto de los fármacos sobre el tumor primario fue por imagen molecular usando un microPET/CT. Para ello se adquirieron imágenes de los diferentes grupos al inicio y al final del tratamiento (figura 13). En cada una de las imágenes se aprecian diferentes intensidades de color, que representa la captación del radiofármaco 18-FDG, una mayor intensidad se muestra en color rojo y en negro cuando no hay captación del 18-FDG. La captación del radiofármaco nos indica

la actividad metabólica del tumor. Como se observa en las imágenes hay una gran captación en la vejiga de los animales esto se debe a que el radiofármaco se elimina por la orina (flecha amarilla).

En la figura 13 se puede observar que la captación del radiofármaco en el tumor (flecha blanca) al inicio del tratamiento fue similar en todos los grupos, esto nos indica una actividad metabólica similar; al término del tratamiento se observó un incremento en la actividad metabólica del tumor de cada uno de los grupos con respecto al inicial y entre cada grupo. En el caso del grupo control, a pesar de tener un mayor volumen tumoral tuvo una menor captación del radiofármaco dentro del tumor debido a la necrosis que se generó. En el caso de los grupos tratados con simvastatina y doxorrubicina también se observó un área de necrosis, pero en menor grado comparada con el grupo control. Por otra parte, en las combinaciones de doxorrubicina con simvastatina 10 y 20 mg/kg de peso no se aprecia un área necrótica observándose una menor captación del radiofármaco en la combinación 2, lo que nos indica una disminución en la actividad metabólica del tumor.

## Ratones NOD-SCID

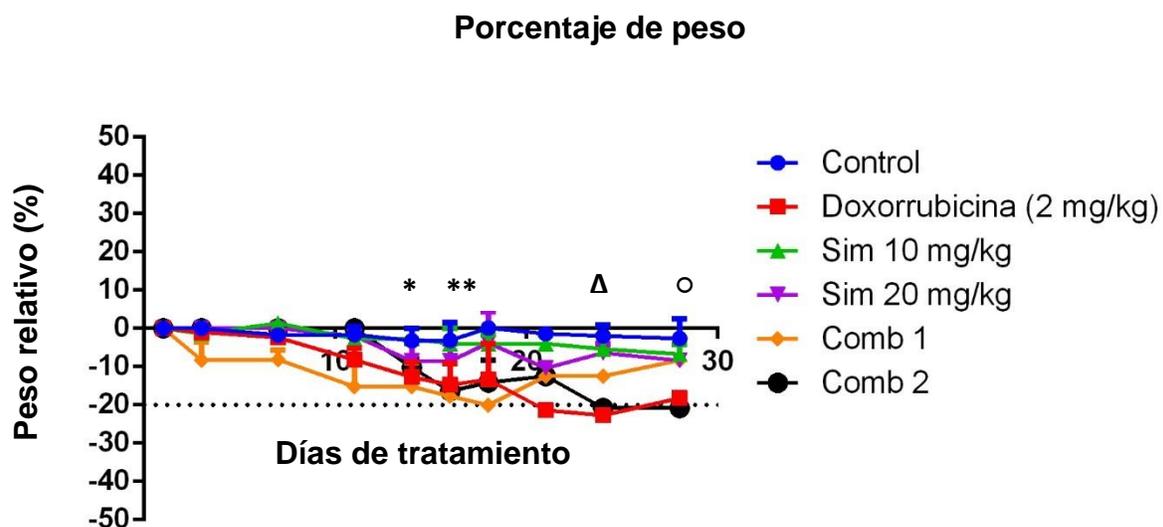


**Figura 13.** Imágenes moleculares adquiridas con el microPET/ al inicio y termino del tratamiento de los diferentes grupos, Control (sin tratamiento), doxorubicina (2 mg/kg), simvastatina (10 y 20 mg/kg), Comb 1 (Doxo 2 mg/kg + Sim 10mg /kg) y la comb 2 (Doxo 2 mg/kg + Sim 20mg /kg). Las imágenes fueron adquiridas 1 hora posterior a la

administración del radiofarmaco 18-FDG. Fecha blanca = tumor, flecha amarilla = vejiga y flecha morada = áreas del tumor con necrosis.

## 6. Toxicidad sistémica

Para evaluar la toxicidad sistémica se dio seguimiento del peso corporal y se graficó el peso relativo de los ratones tomando en cuenta que los ratones se descartarían del estudio si la pérdida de peso superaba el 20%. Se observó que el grupo tratado con doxorrubicina presentó pérdida constante de peso durante todo el tratamiento hasta llegar al 20% a diferencia del grupo control que durante el tratamiento mantuvo un peso constante. Por otra parte, la administración de simvastatina tuvo menor efecto sobre la pérdida de peso en comparación con la doxorrubicina, incluso cuando se aumentó la concentración de este, indicando que el fármaco produce menor toxicidad sistémica. Respecto a la combinación de simvastatina y doxorrubicina se observó que en la combinación 1 (Dox 2 mg/kg + Sim 10 mg/kg) los primeros 18 días de tratamiento tuvieron mayor pérdida de peso; sin embargo, estos lograron recuperarse a diferencia de la combinación 2 (Dox 2 mg/kg + Sim 20 mg/kg), donde al final del tratamiento había pérdida de peso superior al 20%.



**Figura 14.** Seguimiento del peso relativo de los diferentes tratamientos. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre el control, doxorubicina y comb 1 (dox 2 mg/kg + sim 20 mg/kg). \*\*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre doxorubicina y el control.  $\Delta$ Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre el control, doxorubicina y comb 1 dox 2 mg/kg + sim 20 mg/kg).  $\circ$ Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$  entre doxorubicina y sim 10 mg/kg. Los datos representan la media  $\pm$ Error estándar,  $n=3$ .

## 7. Seguimiento de metástasis en pulmón por medio de PET/CT e NIR

La evaluación de la inhibición de metástasis a pulmón se realizó mediante Imagen Cercana a Infrarrojo.

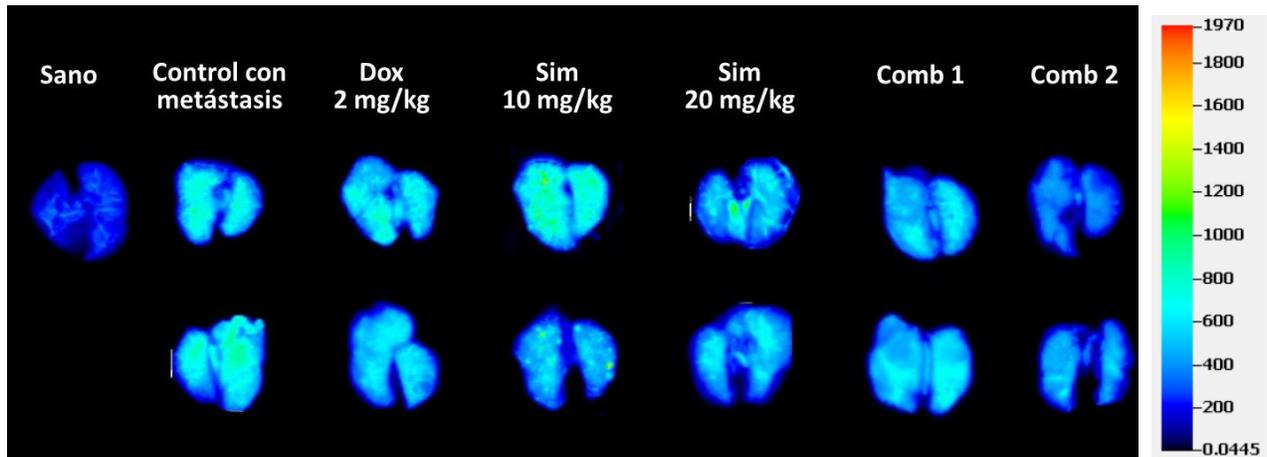
Las imágenes ex vivo de los pulmones con los diferentes tratamientos se presentan en la figura 15A con el marcador IRDye 800CW-RGD después de 48 hrs de su biodistribución.

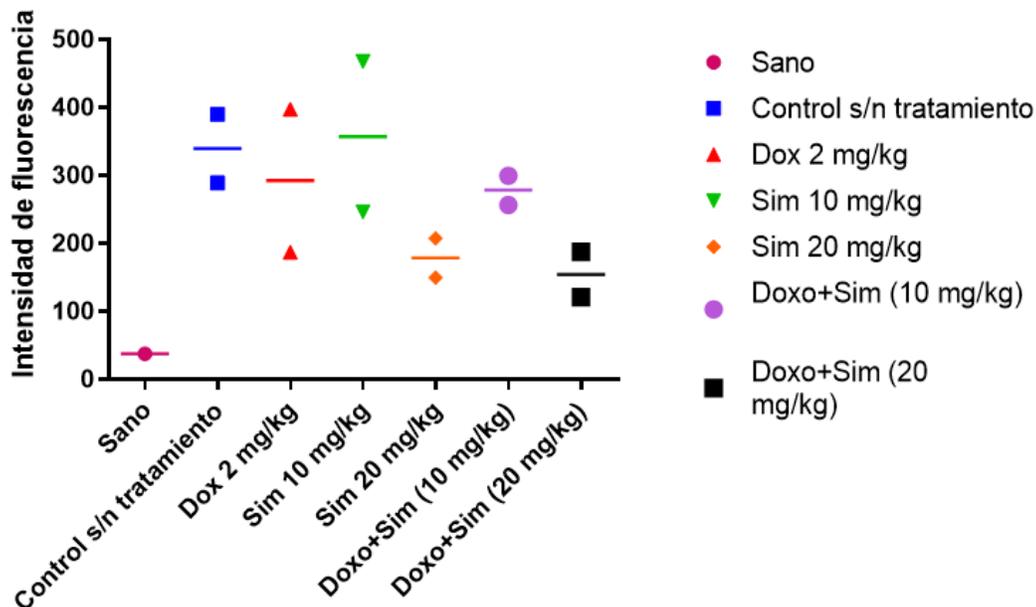
Dado que el marcador tiene afinidad por las integrinas sobre-expresadas en las células malignas, se presenta mayor captación del marcador RGD, observando una intensidad de fluorescencia en los pulmones con lesiones metastásicas. La intensidad de fluorescencia de cada uno de los grupos se cuantificó y se presenta en la figura 15B.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó mayor intensidad de fluorescencia en el grupo control, el cual no recibió ningún tratamiento, superando el rango de 300, en comparación con el grupo sano que emitió fluorescencia en un rango menor a 50, indicando la presencia de células malignas que nos estaría indicando metástasis. Respecto a la evaluación de los fármacos individuales, se observó que el tratamiento con doxorubicina no tiene efecto sobre la inhibición de las metástasis ya que la fluorescencia emitida es  $\approx 300$ , cercana a la del control; en el caso de simvastatina se

observó que el efecto sobre la inhibición de las metástasis está condicionado a la dosis administrada, ya que la dosis de 10 mg/kg no tiene efecto sobre las metástasis, en comparación con el grupo administrado con simvastatina 20 mg/kg, la intensidad de fluorescencia (IF) no superó 200, la relación de IF entre los dos grupos es 2:1, indicando que al aumentar la dosis de simvastatina las lesiones metastásicas disminuyeron un 50%. Por otra parte, la administración conjunta de los fármacos doxorrubicina y simvastatina mejoraron la inhibición de metástasis en pulmón. En la combinación 1 (Dox 2 mg/kg + Sim 10 mg/kg) las imágenes muestran disminución en las metástasis, pero sin diferencia significativa respecto a los grupos con doxorrubicina y simvastatina solos. Mientras que en la combinación 2 (Dox 2 mg/kg + Sim 20 mg/kg) se logró una mayor inhibición de las metástasis, confirmando que se tiene mayor efecto sobre la inhibición de las metástasis al utilizar ambos fármacos siendo estadísticamente significativo.

### Pulmones *ex vivo* con marcador RGD





**Figura 15.** A panel de imágenes de los pulmones *ex vivo* de los gupos con los diferentes tratamientos. Imágenes tomadas con NIR y marcador IRDye 800CW-RGD después de 48 hrs de su biodistribución. B Cuantificación de Intensidad de Fluorescencia de los diferentes tratamientos  $n=2\pm DE$

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor prevalencia en la población femenina a nivel mundial y nacional además es la primera causa de defunciones por cáncer<sup>2</sup>. El subtipo molecular Triple Negativo es el más agresivo de todos debido a la nula expresión de los receptores hormonales de estrógenos, progesterona y de HER2, por lo que presentan una menor respuesta al tratamiento<sup>5</sup>.

Hasta la fecha no se ha establecido un protocolo para el tratamiento del CMTN por lo que se opta por el tratamiento adyuvante y neoadyuvante; sin embargo, se ha reportado resistencia farmacológica y desarrollo de metástasis posterior a los 4 años del diagnóstico<sup>5</sup>. Los tratamientos convencionales incluyen la combinación de taxanos y antraciclinas como lo es la doxorubicina, pero en los últimos años se ha demostrado

que este antineoplásico promueve la migración celular<sup>43</sup>, por lo que es necesario la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la respuesta a los tratamientos actuales del CMTN.

Dado que el desarrollo de nuevos fármacos en el área oncológica tiene varios retos, entre ellos la inversión económica, el tiempo de desarrollo y su aprobación, se ha optado por el reposicionamiento de fármacos como alternativa para la búsqueda de nuevos tratamientos. Con base a ello se ha estudiado el uso potencial de simvastatina como antineoplásico, se ha reportado que la simvastatina tiene efecto sobre sobre la proliferación, migración e invasión en diferentes tipos de cáncer a nivel preclínico.

En el presente trabajo se utilizó a la simvastatina como fármaco de reposicionamiento, en combinación con el antineoplásico doxorubicina, para evaluar sus efectos individuales y combinados sobre la viabilidad y migración en la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231. Además, se evaluó su capacidad para inhibir las metástasis a pulmón en un modelo ortotópico preclínico de cáncer de mama.

El trabajo fue dividido en dos partes: ensayos *in vitro* y en ensayos *in vivo*. En la primera parte se evaluó el efecto de los fármacos solos y en combinación (simvastatina y doxorubicina) sobre la viabilidad celular en un cultivo en monocapa determinando las  $CI_{50}$ .

Se observó que simvastatina tiene efecto sobre la viabilidad celular de manera dosis-dependiente causando mayor muerte celular cuando se exponen las células a mayores concentraciones, la  $CI_{50}$  de simvastatina fue 1.320  $\mu\text{M}$  y la  $CI_{50}$  de doxorubicina fue 0.279  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, al combinar doxorubicina y simvastatina se observó un incremento en la muerte celular con una  $CI_{50}$  de 0.040  $\mu\text{M}$  indicando un aumento de la potencia de doxorubicina cuando se combina con simvastatina. Este efecto es atribuido al sinergismo entre los fármacos producido por sus diferentes mecanismos de acción, se ha reportado que la simvastatina sensibiliza a las células cancerosas inhibiendo la síntesis de precursores que son claves para la proliferación celular e inhibiendo la síntesis de la proteína P-gp, que se encarga de expulsar los fármacos de las células<sup>45</sup>, permitiendo que la doxorubicina pueda ejercer su efecto citotóxico. Por

otra parte, también se ha visto que la simvastatina también inicia el proceso de apoptosis al inducir la actividad de la Caspasa-3 y Caspasa-7<sup>44</sup>.

Posteriormente se evaluó el índice de combinación para determinar qué concentraciones de los fármacos que se probaran mostraban un efecto sinérgico; las concentraciones con efecto sinérgico fueron: Dox. 0.05 uM + Sim 1.0 uM y Dox 0.1 uM + Sim 1 uM, mismas que fueron empleadas en el ensayo de migración. En los resultados obtenidos en el ensayo de migración se observó que los fármacos individuales (simvastatina y doxorubicina), no tienen efecto sobre la migración celular, ya que a las 24 hrs se observa un cierre de herida del 98.32 % con doxorubicina y un cierre de herida del 72.91 % con simvastatina. Cuando se combinaron los fármacos se logró una inhibición mayor sobre la migración celular a las 24 hrs de exposición con un cierre de herida del 41.32% y 33.11% respectivamente. Por lo que la adición de ambos fármacos logró inhibir la migración celular de la línea celular MDA-MB-231. En los últimos años se han reportado varios mecanismos sobre la inhibición en la migración celular al combinar simvastatina y doxorubicina; el primero es la inhibición en la transcripción de genes que participan en este proceso como lo es el caso del gen DCAF13 (promotor de la transición epitelio-mesenquimal)<sup>43</sup>, en segundo lugar se encuentra la desregulación del ión  $Ca^{2+}$  que permite la activación de pequeñas GTPasas como Ras y RhoA, y por último la disminución de sus precursores Geranil geranil pirofosfato y Farnesil pirofosfato (GGPP, FPP) que permiten la síntesis de estas proteínas<sup>39</sup>. Por lo que la combinación de estos mecanismos estaría favoreciendo la inhibición en la migración celular.

El objetivo de la segunda parte de este proyecto consistió en la evaluación del efecto de la combinación de simvastatina y doxorubicina sobre el crecimiento tumoral y la metástasis a pulmón en un modelo *in vivo*. Hasta la fecha no se ha reportado si la administración conjunta de los fármacos es capaz de inhibir las metástasis incluso después del término del tratamiento. Para cumplir con este objetivo se practicó una cirugía ortotópica en ratones hembra NOD-SCID, se siguió el crecimiento del volumen tumoral con un vernier calibrado y por imagen molecular usando el equipo microPET/CT, además, se evaluó la aparición de metástasis mediante Imagen Cercana

a Infrarrojo (INR) utilizando el marcador RGD, el cual se une a las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , las cuales se sobre-expresan en células tumorales.

Los resultados obtenidos con respecto al volumen tumoral mostraron una diferencia en la velocidad de crecimiento tumoral cuando se administró simvastatina o doxorubicina con respecto al grupo control. En el caso de simvastatina se observó un mejor control en la velocidad de crecimiento con la dosis de 20mg/kg en comparación de la dosis de 10 mg/kg. Por otra parte, la combinación de los fármacos (Comb 1 = Dox 2 mg/kg + Sim 10 mg/kg, Comb 2 = Dox 2 mg/kg + Sim 20 mg/kg) mostró una diferencia significativa del tamaño tumoral con respecto al grupo control (sin tratamiento). Por otra parte, doxorubicina logró controlar la velocidad del crecimiento tumoral, pero al finalizar el tratamiento se perdió este efecto a diferencia de la combinación. El siguiente objetivo fue evaluar el efecto de las combinaciones sobre la metástasis pulmonar; para ello se adquirieron imágenes moleculares de los diferentes grupos usando la técnica de fluorescencia cercana al infrarrojo con el marcador RGD. Los resultados mostraron una mayor intensidad de fluorescencia indicando una mayor captación del marcador RGD en el grupo sin tratamiento en comparación con el grupo sano. La Intensidad de fluorescencia fue menor en el grupo al que se le administró doxorubicina en comparación con el grupo control; sin embargo de manera interesante, en el caso de los grupos tratados con simvastatina a la dosis de 10 mg/kg se vio una mayor intensidad de fluorescencia, mostrando lesiones metastásicas similares a la del grupo control, indicando que a esta dosis el fármaco no surte un efecto apreciable sobre la inhibición de las metástasis, caso contrario con el grupo tratado con la dosis de 20 mg/kg, en el cual la intensidad de fluorescencia disminuyó, estos resultados se correlacionan con los datos obtenidos con volumen tumoral, observando un mayor control del tumor primario con la dosis de 20mg/kg. Con los resultados obtenidos del crecimiento tumoral y de la presencia de metástasis en pulmón, se puede sugerir que simvastatina (20mg/kg) tiene efectos sobre la inhibición de la proliferación y migración celular. En el caso de las combinaciones de fármacos se obtuvo una menor intensidad de fluorescencia con la Comb 2 = Dox 2 mg/kg + Sim 20 mg/kg. Aunque el efecto de las dos combinaciones no tuvo diferencia sobre el volumen tumoral al compararlas entre sí, si se observó una diferencia en la inhibición de la metástasis a pulmón.

Como perspectiva de este proyecto se propone evaluar a futuro el efecto de simvastatina a una dosis mayor, ya que Behnaz Karimi, et al., reportaron que a dosis de 40-80 mg/kg se tiene mayor efecto sobre el crecimiento tumoral en un modelo de preclínico de inducción de carcinomas en cáncer de mama<sup>46</sup>.

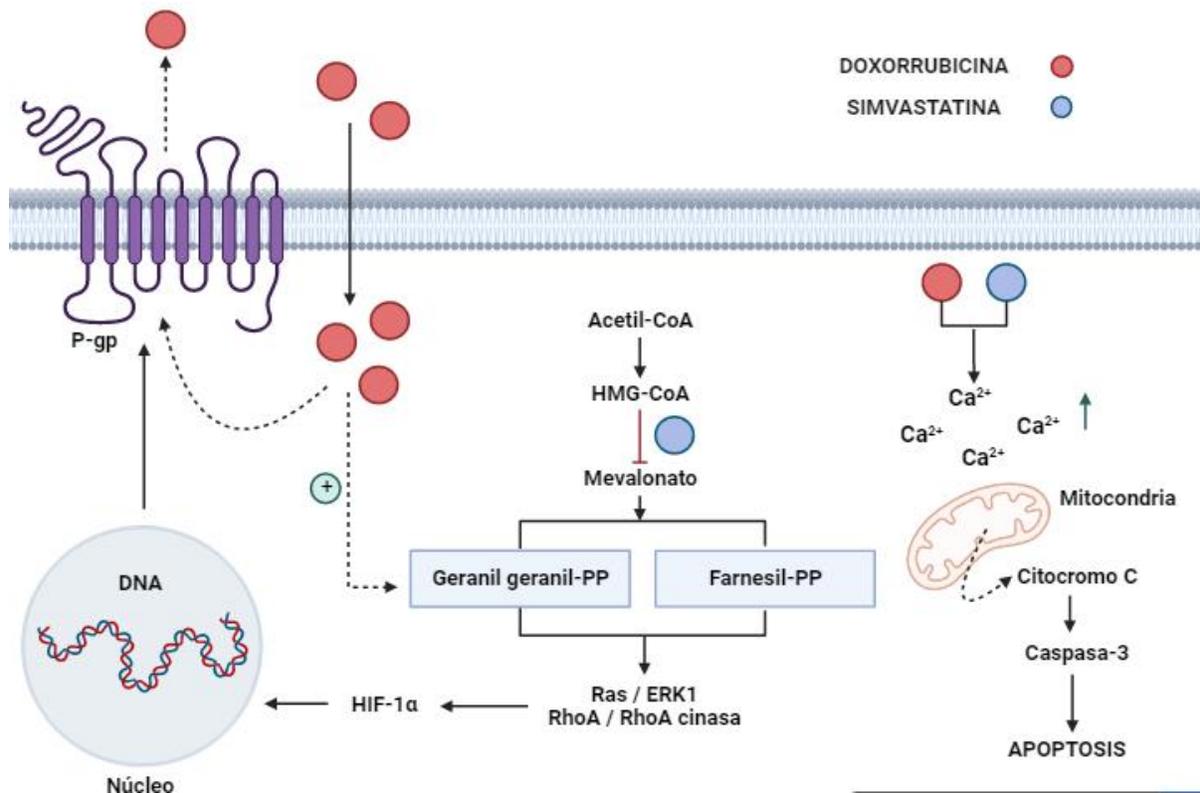
Los eventos que ocurren en las células cancerosas, al administrar de manera conjunta simvastatina y doxorubicina se ilustran en la figura 15, donde se muestra el conjunto de los múltiples mecanismos descritos que sugieren los efectos antiproliferativos así como la inhibición de la migración e invasión celular y la inducción de apoptosis. Se ha reportado que simvastatina sensibiliza a la célula regulando de manera negativa la expresión de la proteína P-gp e inhibe los precursores de las GTPasas y participa de manera conjunta con doxorubicina para iniciar el proceso de apoptosis mediado por  $Ca^{2+}$ , mecanismos que pueden estar involucrados en el control de las metástasis.

Se han reportado otros mecanismos por los cuales simvastatina tiene un efecto citostático sobre diferentes células cancerosas. Uno de los mecanismos consiste en la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, la cual actúa sobre el HMG-CoA para la síntesis de mevalonato; un dato importante es que el HGM-CoA reductasa se encuentra sobre expresada en muchos tipos de cáncer incluyendo el de mama, indicando una alta dependencia de esta vía metabólica, por lo que su inhibición podría favorecer a la disminución de la proliferación celular<sup>44</sup>.

Además, se ha propuesto que los efectos sobre la inhibición de la proliferación, migración e invasión celular, así como la inducción de la apoptosis son el resultado de la falta de los precursores de proteínas involucradas en estas vías de señalización debido a la inhibición de la síntesis de mevalonato. que da paso a la producción de Geranil geranil pirofosfato (GGPP) y Farnesil PP (FPP) que, mediante el proceso de isoprenilación dan origen a la familia de enzimas pertenecientes a la Guanosina trifosfatasa (GTPasa) que actúan como factores transcripcionales de las proteínas involucradas en los procesos de angiogénesis, Transición Epitelio-Mesenquimal y metástasis. Por lo que este es otro mecanismo que podría estar involucrado en la inhibición de la proliferación y migración celular.

Por otro lado, se ha reportado que doxorubicina regula de manera positiva la síntesis de proteínas como Ras/ERK1,2, RhoA, HIF-1 $\alpha$ , que sirven como vías de señalización para la proliferación, migración e invasión celular; y cuando hay una administración conjunta con simvastatina se anulan todas estas vías de señalización<sup>45</sup>.

Por lo que, al utilizar este tratamiento combinado, se podrá inhibir o disminuir la capacidad de doxorubicina de generar metástasis, pues en estudios recientes se ha demostrado que este antineoplásico promueve el proceso de metástasis al estimular la expresión del receptor DCAF13 que a su vez promueve la transición epitelio-mesénquima disminuyendo los niveles de E-cadherina y aumentando las concentraciones de vimentina<sup>43</sup>.



**Figura 16.** Mecanismos de acción propuestos de la combinación de simvastatina y doxorubicina. **A** doxorubicina ingresa a la célula y promueve la síntesis de GTPasas (Ras / ERK 1 / RhoA / RhoA cinasa) por medio de Geranil geranil-PP y Franesil-PP. Estas enzimas estimulan la producción de HIF-1 $\alpha$  que a su vez promueve la síntesis de la proteína P-gp (proteína encargada de expulsar los fármacos al exterior de la célula)

por lo que doxorubicina es expulsada de la célula y no ejerce sus mecanismos de acción, sin embargo, al ingresar simvastatina a la célula, inhibe la síntesis de Mevalonato anulando las vías de señalización producidas por GGPP y FPP impidiendo que doxorubicina estimule la síntesis de P-gp. **B** simvastatina y doxorubicina elevan la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular que causa daño en la mitocondria liberando Citocromo C, el cual aumenta la concentración de Caspasa 3 para iniciar el proceso de apoptosis.

## 11. CONCLUSIÓN

---

La combinación de simvastatina y doxorubicina tienen efecto sinérgico, logrando disminuir la viabilidad celular y la migración de la línea de cáncer de mama triple negativo MDA MB 231. Además, en un modelo ortotópico preclínico de cáncer de mama la combinación de doxorubicina y simvastatina disminuyeron las metástasis a pulmón en comparación con fármacos administrados de manera individual.

## 12. REFERENCIAS

---

1. NIH. ¿Qué es el cáncer? Estados Unidos: Instituto Nacional del Cáncer; 5 mayo 2021. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
2. Martínez YL. Epidemiología del cáncer de mama [internet]. México: IMSS; octubre 2023 [citado Ago 2023]. Disponible en: <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
3. Arceo-Martínez María T., López-Meza Joel E., Ochoa-Zarzosa Alejandra, Palomera-Sanchez Zoraya. Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo. *Gac. mex. oncol.* [revista en la Internet]. 2021 Sep [citado Ago 2023] ; 20( 3 ): 101-110. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2565-005X2021000300101&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2565-005X2021000300101&lng=es). Epub 13-Dic-2021. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.21000134>.
4. Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol.* 2019 Mar 1;49(3):228-231. doi: 10.1093/jjco/hyy182. PMID: 30541035.
5. García M, Pareja A, López N. Cáncer de mama: nueva clasificación molecular. *Rev. De senología y patología mamaria.* 2023 abr; 36(2): doi: 10.1016/j.senol.2021.04.002
6. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020 Jan;27(1):27-35. doi: 10.1097/PAP.000000000000232. PMID: 31045583.
7. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin.* 2018 Jul;13(3):325-338. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.004. Epub 2018 May 7. PMID: 30100073.
8. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med.* 2016 Feb;57 Suppl 1:9S-16S. doi: 10.2967/jnumed.115.157834. PMID: 26834110.
9. Yin, L., Duan, JJ., Bian, XW. *et al.* Subtipificación molecular del cáncer de mama triple negativo y progreso del tratamiento. *Cáncer de mama Res* **22** , 61 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
10. Howard, F. y Olopade, O. (2021). Epidemiología del cáncer de mama triple negativo. *El Diario del Cáncer*, 27 (1), 8-16. doi: 10.1097/PPO.0000000000000500.
11. Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, OB et al. Cáncer de mama metastásico y triple negativo: desafíos y opciones de tratamiento. *Entrega de drogas. y trad. Res.* 8 , 1483-1507 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3>

12. Eloïse M. Grasset et al. La metástasis del cáncer de mama triple negativo implica una compleja dinámica de transición epitelial-mesenquimatososa y requiere vimentina. *Ciencia. Traducir Medicina*. **14** , eabn7571 (2022). DOI: 10.1126/scitranslmed.abn7571
13. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758. PMID: 24556840; PMCID: PMC4240281.
14. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014 Sep 23;7(344):re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189. PMID: 25249658; PMCID: PMC4372086.
15. Fares, J., Fares, MY, Khachfe, HH *et al*. Principios moleculares de la metástasis: una revisión del sello distintivo del cáncer. *Sig Transduct Target Ther* **5** , 28 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
16. Kim, MI (2021). Metástasis del cáncer de mama. En: Noh, DY., Han, W., Toi, M. (eds) Investigación traslacional en cáncer de mama. Avances en medicina y biología experimentales, vol 1187. Springer, Singapur. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6_9)
17. Borri F, Granaglia A. Pathology of triple negative breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2021 Jul;72:136-145. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.06.005. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32544511.
18. Lee JS, Yost SE, Yuan Y. Neoadjuvant Treatment for Triple Negative Breast Cancer: Recent Progresses and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2020 May 29;12(6):1404. doi: 10.3390/cancers12061404. PMID: 32486021; PMCID: PMC7352772.
19. Bergin ART, Loi S. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res*. 2019 Aug 2;8:F1000 Faculty Rev-1342. doi: 10.12688/f1000research.18888.1. PMID: 31448088; PMCID: PMC6681627.
20. Li Y, Zhang H, Merkher Y, Chen L, Liu N, Leonov S, Chen Y. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol*. 2022 Aug 29;15(1):121. doi: 10.1186/s13045-022-01341-0. PMID: 36038913; PMCID: PMC9422136.
21. Nedeljković M, Damjanović A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*. 2019 Aug 22;8(9):957. doi: 10.3390/cells8090957. PMID: 31443516; PMCID: PMC6770896.
22. Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*. 2020 Dec;57(6):1245-1261. doi: 10.3892/ijo.2020.5135. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33174058; PMCID: PMC7646583.

23. Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., & Moreira, P. (2009). *Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect*. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25), 3267–3285. doi:10.2174/092986709788803312
24. Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet*. 1988 Jul;15(1):15-31. doi: 10.2165/00003088-198815010-00002. PMID: 3042244.
25. Brener y stevens
26. Meredith AM, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol*. 2016 Jun;68(6):729-41. doi: 10.1111/jphp.12539. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26989862.
27. Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol*. 2020 Sep;72(9):1145-1151. doi: 10.1111/jphp.13273. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32301512; PMCID: PMC7262062.
28. Armando RG, Mengual Gómez DL, Gomez DE. New drugs are not enough-drug repositioning in oncology: An update. *Int J Oncol*. 2020 Mar;56(3):651-684. doi: 10.3892/ijo.2020.4966. Epub 2020 Jan 20. PMID: 32124955; PMCID: PMC7010222.
29. Hua Y, Dai X, Xu Y, Xing G, Liu H, Lu T, Chen Y, Zhang Y. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *Eur J Med Chem*. 2022 Apr 15;234:114239. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114239. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35290843; PMCID: PMC8883737.
30. Issa NT, Stathias V, Schürer S, Dakshanamurthy S. Machine and deep learning approaches for cancer drug repurposing. *Semin Cancer Biol*. 2021 Jan;68:132-142. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.12.011. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31904426; PMCID: PMC7723306.
31. Singhal S, Maheshwari P, Krishnamurthy PT, Patil VM. Drug Repurposing Strategies for Non-cancer to Cancer Therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem*. 2022 Aug 4;22(15):2726-2756. doi: 10.2174/1871520622666220317140557. PMID: 35301945.
32. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Mammen AL. Statins: pros and cons. *Med Clin (Barc)*. 2018 May 23;150(10):398-402. doi: 10.1016/j.medcli.2017.11.030. Epub 2017 Dec 29. PMID: 29292104; PMCID: PMC6019636.
33. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res*. 2014 Oct;88:3-11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24657242.
34. Jiang, W., Hu, JW., He, XR. *et al*. Statins: a repurposed drug to fight cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **40**, 241 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02041-2>
35. Vallianou NG, Kostantinou A, Kougias M, Kazazis C. Statins and cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014 Jun;14(5):706-12. doi: 10.2174/1871520613666131129105035. PMID: 24295174.

36. Duarte JA, de Barros ALB, Leite EA. The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomed Pharmacother.* 2021 Sep;141:111858. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111858. Epub 2021 Jul 10. PMID: 34323700.
37. Yao, X., Xie, R., Cao, Y. *et al.* Simvastatin induced ferroptosis for triple-negative breast cancer therapy. *J Nanobiotechnol* **19**, 311 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01058-1>
38. Rezano, A., Ridhayanti, F., Rangkuti, A. R., Gunawan, T., Winarno, G. N. A., Wijaya, I. Cytotoxicity of Simvastatin in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2021; 22(S1): 33-42. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.S1.33
39. Abdoul-Azize S, Buquet C, Li H, Picquenot JM, Vannier JP. Integration of Ca<sup>2+</sup> signaling regulates the breast tumor cell response to simvastatin and doxorubicin. *Oncogene.* 2018 Sep;37(36):4979-4993. doi: 10.1038/s41388-018-0329-6. Epub 2018 May 23. PMID: 29795329.
40. Bytautaite M, Petrikaite V. Comparative Study of Lipophilic Statin Activity in 2D and 3D in vitro Models of Human Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-231 and MCF-7. *Onco Targets Ther.* 2020 Dec 24;13:13201-13209. doi: 10.2147/OTT.S283033. PMID: 33380809; PMCID: PMC7769197.
41. García-López P, Rodríguez-Dorantes M, Pérez-Cárdenas E, Cerbón M, Mohar-Betancourt A. Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004 Jun;53(6):533-40. doi: 10.1007/s00280-003-0760-3. Epub 2004 Jan 29. PMID: 15138713.
42. Medina LA, Herrera-Penilla BI, Castro-Morales MA, García-López P, Jurado R, Pérez-Cárdenas E, Chanona-Vilchis J, Brandan ME. Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008 Oct 28;27(1):57. doi: 10.1186/1756-9966-27-57. PMID: 18957119; PMCID: PMC2586013.
43. Sun Z, Zhou D, Yang J, Zhang D. Doxorubicin promotes breast cancer cell migration and invasion via DCAF13. *FEBS Open Bio.* 2022 Jan;12(1):221-230. doi: 10.1002/2211-5463.13330. Epub 2021 Dec 5. PMID: 34775691; PMCID: PMC8727929.
44. Rezano A, Ridhayanti F, Rangkuti AR, Gunawan T, Winarno GNA, Wijaya I. Cytotoxicity of Simvastatin in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021 Feb 1;22(S1):33-42. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.S1.33. PMID: 33576210.
45. Rigoni M, Riganti C, Vitale C, Griggio V, Campia I, Robino M, Foglietta M, Castella B, Sciancalepore P, Buondonno I, Drandi D, Ladetto M, Boccadoro M, Massaia M, Coscia M. Simvastatin and downstream inhibitors circumvent constitutive and stromal cell-induced resistance to doxorubicin in IGHV

- unmutated CLL cells. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):29833-46. doi: 10.18632/oncotarget.4006. PMID: 26284584; PMCID: PMC4745766.
46. Karimi B, Ashrafi M, Shomali T, Yektaseresht A. Therapeutic effect of simvastatin on DMBA-induced breast cancer in mice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2019 Feb;33(1):84-93. doi: 10.1111/fcp.12397. Epub 2018 Jul 25. PMID: 29962034.