



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**EFFECTO DE DOXORRUBICINA Y
SIMVASTATINA EN UN MODELO 2D
Y 3D DE LA LÍNEA CELULAR DE
CÁNCER DE MAMA MDA- MB- 231**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ERIKA ALDANELI SOLANO IBAÑEZ

DIRECTORA:

DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

JURADO DE EXAMEN:

ASESORA: MTRA. MARÍA TERESA GRISELDA FUENTES LARA

ASESORA: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

SINODAL: DRA. JESSICA EDITH RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

SINODAL: DRA. LINDA VERÓNICA CAMPOS FERNÁNDEZ



CIUDAD DE MÉXICO

ABRIL, 2025



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

A mis papás, porque gracias a ustedes soy todo lo que soy y cada uno de mis logros les pertenecen a ustedes. Gracias por la maravillosa que me han dado, llena de paz, tranquilidad y sobre todo mucho amor. Gracias por sostenerme tan fuerte cada vez que lo he necesitado, por apoyarme en cada una de mis decisiones aún cuando no las entendieran. Gracias por permitirme cometer errores. Gracias por siempre ser la luz en mi camino.

A mis hermanos, por ser los mejores compañeros de vida que me pudieron haber tocado, por seguirme protegiendo y guiando como cuando éramos niños, por siempre estar para mí, en mis buenos y sobre todo en mis malos momentos, por escucharme, comprenderme y amarme incondicionalmente. Siempre serán mi inspiración y mis mejores amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios del país, además por formarme académica, profesional y personalmente.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por varios años ser mi segunda casa, y brindarme todo lo necesario para mi formación como QFB.

Al Instituto Nacional de Cancerología por recibirme como estudiante y enseñarme el fascinante mundo de la investigación.

A la Dra. Patricia García López por abrirme las puertas de su laboratorio, en donde descubrí mi vocación. Gracias por confiar en mí y en mi trabajo, por el tiempo, la paciencia, los consejos, los conocimientos brindados, por ser una gran guía y sobre todo una gran persona.

Al Biólogo Rafael Jurado por la asesoría técnica y los consejos brindados.

A cada uno de los integrantes del Laboratorio de Farmacología, por las enseñanzas, consejos y experiencias compartidas.

A la Dra. Monserrat Llaguno Munive, por acogerme como una más de sus estudiantes, por animarme, aconsejarme y escucharme siempre.

A mi adorada amiga Wendy Hernández por ser mi aliada desde el día uno, por siempre estar dispuesta a enseñarme y ayudarme. Gracias por todos nuestros desayunos, comidas, pláticas y cafés de la mañana. Espero que la vida nos mantenga siempre unidas para seguir creciendo juntas.

A los miembros del jurado: Mtra. Griselda Fuentes Lara, Dra. María Isabel Soto, Dra. Jessica Rodríguez y Dra. Verónica Campos, por el tiempo dedicado a la revisión de este proyecto.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1 DATOS Y CIFRAS	12
3.2 SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO	13
3.3 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA	13
3.4 CLASIFICACIÓN MOLECULAR	14
3.5 CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO	15
3.6 FACTORES DE RIESGO	15
3.7 TRATAMIENTO: OPCIONES DISPONIBLES.....	16
3.8 DOXORRUBICINA.....	17
3.9 REPOSICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO	20
3.10 SIMVASTATINA	21
3.11 ESFEROIDES	24
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	27
6.1 OBJETIVO GENERAL	27
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
7.1 MODELO 2D (MONOCAPA).....	28
7.2 MODELO 3D (ESFEROIDES).....	29
7.3 MÉTODO	29
8. METODOLOGÍA	30
8.1 LÍNEA CELULAR	30
8.2 CULTIVO CELULAR 2D.....	30
8.2.1 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR	31
8.2.1.1 ENSAYO XTT	31

8.3 CULTIVO CELULAR 3D.....	31
8.3.1 TINCIÓN LIVE/DEAD	33
9. RESULTADOS.....	33
9.1 Cultivo Celular 2D.....	33
9.1.1 Ensayo de Viabilidad Celular de Doxorrubicina y Simvastatina (Ind.).....	33
9.1.2 Viabilidad Celular de la combinación de Doxorrubicina y Simvastatina	36
9.1.3 Morfología celular después de los tratamientos	37
9.1.4 Índice de Combinación	38
9.2 CULTIVO CELULAR 3D.....	40
9.2.1 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO 3D.....	40
9.2.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EN ESFEROIDES TRATADOS CON LA COMBINACIÓN DE DOXORRUBICINA Y SIMVASTATINA	48
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
11. CONCLUSIÓN.....	59
12. PERSPECTIVAS	59
13. REFERENCIAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
RP	Receptor de Progesterona
RE	Receptor de Estrógenos
HER2	Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2
TNBC	Cáncer de Mama Triple Negativo
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
SIM	Simvastatina
BRCA1	Gen supresor de tumores humano 1
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
HMGR	Hidroxi Metil Glutaril Coenzima A Reductasa
HMGR-CoA	Hidroxi Metil Glutaril Coenzima A
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
μM	Micromolar
CI50	Concentración Inhibitoria 50
PBS-EDTA	Solución Salina Tamponada con Fosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrometros
IC	Índice de combinación
mg	Miligramos
mL	Mililitros

1. RESUMEN

El cáncer de mama representa una de las principales causas de muertes en mujeres a nivel mundial y nacional con 666,103 muertes en el mundo y 8,195 muertes en México en 2022.

Existen distintas formas de clasificar al cáncer de mama, la más común se basa en la expresión receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2); así es como se reconocen cuatro subtipos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y triple negativo.

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) se caracteriza por no expresar receptores hormonales (RE, RP) ni receptores HER2 por lo que las opciones de tratamiento para este tipo de cáncer se ven limitadas. Así el tratamiento principal para el TNBC es la quimioterapia, la cual se basa en taxanos y antraciclinas como Doxorrubicina.

Doxorrubicina es un fármaco que ha demostrado su gran potencial terapéutico, sin embargo, al no ser selectivo para las células cancerosas, su uso provoca una gran toxicidad, especialmente en el corazón, así la cardiotoxicidad tiende a ser el principal factor limitante para su uso.

De esta manera surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas farmacológicas que además de mostrar una respuesta terapéutica favorable, garanticen la reducción de los efectos adversos que produce el tratamiento convencional con fármacos citotóxicos.

Una de las alternativas es el reposicionamiento farmacológico, el cual consiste en dar a un fármaco un nuevo uso terapéutico, diferente para el que fue aprobado. Este trabajo evaluó el efecto de Simvastatina, un fármaco utilizado para reducir los niveles de colesterol en sangre, en combinación con Doxorrubicina sobre la viabilidad celular en cultivos 2D (líneas celulares) y 3D (esferoides) de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

Primero, se evaluó la viabilidad celular de Doxorrubicina y Simvastatina aplicados individualmente y combinados, en células cultivadas en monocapa, fue así como se

obtuvo la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para cada fármaco individual y en combinación, obteniendo una CI_{50} de 0.28 μM para Doxorubicina y una CI_{50} de 1.51 μM para Simvastatina, mientras que para la combinación de DOX+SIM 1.0 μM la CI_{50} fue de 0.17 μM , para la combinación de DOX+SIM 2.5 μM la CI_{50} fue $<0.05 \mu\text{M}$ y en la combinación DOX+SIM 5.0 μM la CI_{50} fue $<0.05 \mu\text{M}$. Después, para distinguir el tipo de interacción farmacológica que se presentó al combinar los fármacos, se calculó el Índice de Combinación (IC), resultando en que las concentraciones: DOX 0.25 μM + SIM 2.5 μM , DOX 0.25 μM + SIM 5.0 μM y DOX 0.5 μM + SIM 5.0 μM , presentaron una interacción sinérgica; posteriormente el efecto de estas combinaciones se evaluó sobre un modelo 3D (esferoides) de la línea celular MDA-MB-231.

Para la obtención de esferoides, las condiciones de sembrado fueron: 4000 células/pozo en una placa de ultra baja adherencia de fondo redondo, someter a la placa de cultivo a dos ciclos de centrifugación de 3 minutos; el primero el día de sembrado y el segundo 24 horas después de la siembra, después de adicionar colágeno tipo I a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ E8, mantener la placa en incubación durante 2 días para la formación de los esferoides y exponerlos durante 5 días a los fármacos Doxorubicina y Simvastatina (solos y combinados).

Posteriormente se determinó el efecto de la combinación de los fármacos sobre la viabilidad celular; para esto se utilizaron los ensayos Live&Dead y CellTiter-Glo. De esta manera se obtuvo una viabilidad celular del 100% para el grupo Control, 28.51% para DOX 0.25 μM , 57.96% para SIM 2.0 μM y 0% para el grupo de la combinación (DOX 0.25 μM +SIM 2.0 μM).

Al finalizar el estudio se concluyó que tanto en el modelo de cultivo celular 2D como en el 3D de la línea celular MDA-MB-231, al combinar los fármacos Doxorubicina y Simvastatina se obtiene una mayor muerte celular en comparación a los tratamientos individuales.

2. INTRODUCCIÓN

El término “cáncer” se utiliza para referirse a un conjunto de enfermedades las cuales se pueden originar en casi cualquier parte del cuerpo, ya sea en un órgano o tejido. Esta enfermedad se caracteriza por presentar un crecimiento descontrolado de células anormales, las cuales sobrepasan los límites de donde se originaron y además tienen la capacidad de propagarse hacia otros órganos¹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala al cáncer como una de las principales causas de muerte a nivel mundial ya que, durante 2022 se detectaron cerca de 20 millones de casos, mientras que en el mismo año casi 10 millones de defunciones fueron atribuidas a esta enfermedad².

Los tipos de cáncer más frecuentes en hombres son: pulmonar, prostático, colorrectal, estomacal y hepático; en cuanto a mujeres, los tipos con mayor incidencia son: pulmonar, colorrectal, cervical, tiroideo y **mamario**¹.

El cáncer de mama representa una de las principales causas de muerte en mujeres. Este padecimiento es considerado multifactorial, ya que elementos como el género, edad, peso, factores hormonales, factores reproductivos, estilo de vida, factores ambientales, entre otros pueden influir en la manifestación de la enfermedad. La manifestación clínica más frecuente del cáncer de mama es la aparición de una masa indolora a nivel local³.

Durante 2022, a nivel mundial 2.3 millones de mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama, mientras que 666,103 muertes fueron registradas a causa de esta enfermedad. En México en el mismo año, el cáncer de mama fue la primera causa de muerte en mujeres, con un estimado de 8,195 muertes y 31,043 nuevos casos^{4,5}.

De entre las distintas formas que existen para clasificar al cáncer las más relevantes son la clasificación histológica y la molecular. En la histológica se encuentra el carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar in situ y carcinoma lobulillar infiltrante. En cuanto a la clasificación molecular se encuentran el Luminal A, Luminal B, HER 2 y **Triple Negativo (TNBC)**.

El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por no presentar receptores de estrógenos (RE-), receptores de progesterona (RP-) y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-). Este subtipo se distingue por su agresividad, recaída temprana y mayor tendencia a presentarse en estadios avanzados. Presenta una alta tasa de proliferación, alteración en los genes de reparación del ADN y aumento de la inestabilidad genómica. La población afectada suele ser mujeres menores a 40 años. Constituye aproximadamente el 15%-20% de todos los cánceres de mama⁶.

Debido a que no presenta ninguno de los receptores hormonales ni receptores de HER2, el tratamiento de este tipo de cáncer resulta especialmente desafiante ya que tanto la terapia hormonal como la terapia dirigida (antiHER2) no son opciones, de esta manera las opciones terapéuticas se ven limitadas.

A pesar de dichas complicaciones el pilar para el tratamiento del TNBC sigue siendo la quimioterapia, la cual ha demostrado buenos resultados en el entorno neoadyuvante, adyuvante y metastásico. Es así como los taxanos y las **antraciclinas** permanecen como fármacos importantes para el tratamiento del TNBC⁷.

Dentro de las antraciclinas se encuentran la Epirubicina, Daunorrubicina y Doxorrubicina. La **Doxorrubicina** es en la actualidad el fármaco más utilizado para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama **Triple Negativo**. No obstante, la tasa de respuesta del tratamiento con Doxorrubicina va del 40-70% debido a la resistencia a este fármaco. La resistencia surge cuando un organismo se expone por un periodo prolongado a agentes quimioterapéuticos, lo cual genera una respuesta celular adaptativa y como resultado la adquisición de resistencia a los fármacos^{8,9}.

A causa de los inconvenientes que se manifiestan en el tratamiento del TNBC surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento; las cuales, además de mostrar una respuesta terapéutica favorable, garanticen la reducción de los efectos adversos que produce el tratamiento convencional.

Es así como, en los últimos años surge el reposicionamiento farmacológico. Esta alternativa consiste en proporcionarle a un fármaco un uso terapéutico nuevo, diferente para el que fue aprobado¹⁰. Un ejemplo son las estatinas, estas se desarrollaron originalmente para reducir los niveles de colesterol; sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que también muestran actividades antitumorales. Especialmente la **Simvastatina**, la cual puede influir en la proliferación, migración y supervivencia de células cancerosas¹¹.

De esta manera el presente proyecto consistió en evaluar el efecto sobre la viabilidad celular después de un tratamiento combinado de Doxorubicina y Simvastatina en modelos de cultivo celular 2D y 3D de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 DATOS Y CIFRAS

A nivel mundial el cáncer de mama se sitúa como el más común entre las mujeres. En cuanto al número de casos nuevos y tasa de mortalidad en las mujeres ocupa el primer lugar. De acuerdo con datos del GLOBOCAN durante 2022, 2,296,840 casos fueron diagnosticados a nivel mundial, lo cual representa el 23.8% de todos los casos^{8,12}(Fig. 1).

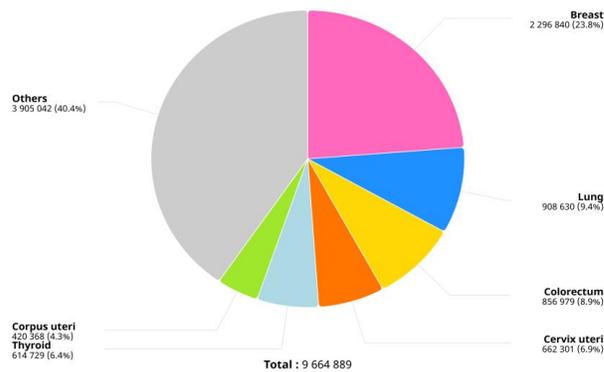


Figura 1. Número estimado en incidencia de casos en mujeres a nivel mundial en 2022, tomado de GLOBOCAN 2024.

En cuanto a México durante 2022, 31,043 nuevos casos fueron detectados, además de que se registraron 8,931 muertes a causa de esta enfermedad¹²(Fig. 2).

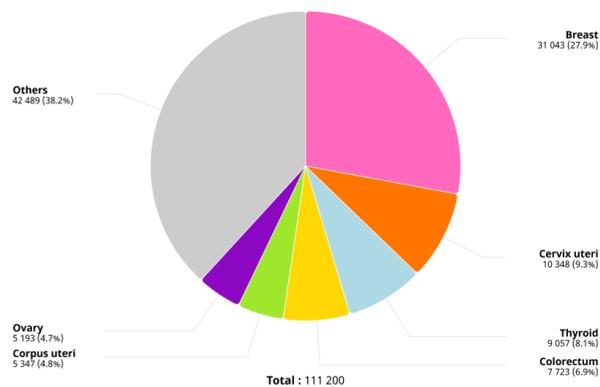


Figura 2. Número estimado en incidencia de casos en mujeres en México durante 2022, tomado de GLOBOCAN 2024.

3.2 SÍNTOMAS Y DIAGNÓSTICO

Las señales de advertencia del cáncer de mama pueden variar de una persona a otra, por ejemplo, algunas personas suelen no presentar ningún tipo de signos o síntomas. Sin embargo, los signos de alerta más frecuentes son:

- Aparición de una masa indolora en la mama o debajo de la axila
- Engrosamiento o hinchazón en alguna zona de la mama
- Irritación o hundimientos en la piel de la mama
- Enrojecimiento o descamación del pezón o de alguna zona de la mama
- Hundimiento del pezón o dolor en la zona
- Secreción del pezón que no sea leche, incluso puede ser sangre
- Cambio en la forma o tamaño de la mama¹³.

Para que el cáncer de mama pueda ser tratado eficientemente y además tenga el mejor pronóstico posible es de suma importancia contar con un diagnóstico temprano y adecuado. Un diagnóstico eficaz se basa en tres pilares: valoración clínica, pruebas de imagen y biopsia³.

3.3 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

Existen diversas formas para clasificar al cáncer de mama, una de estas clasificaciones depende del tipo de células de la mama que se vuelvan cancerosas, de esta manera se pueden dividir en:

Carcinoma Ductal “in situ”: Se origina en las células que revisten los conductos encargados de transportar la leche hacia el pezón (conductos galactóforos), pero no tiene la capacidad de propagarse hacia otras partes fuera de la mama¹⁴.

Carcinoma Ductal invasivo o infiltrante: Se origina en las células que revisten los conductos galactóforos; sin embargo, este tipo de carcinoma sí tiene la capacidad de extenderse fuera de la mama, por ejemplo; hacia ganglios linfáticos y distintos órganos del cuerpo¹⁴.

Carcinoma Lobulillar invasivo o infiltrante: Se origina a partir de las células que conforman los lobulillos (glándulas encargadas de la producción de leche) y es capaz de invadir otras partes del cuerpo¹⁴.

3.4 CLASIFICACIÓN MOLECULAR

Otra clasificación común y ampliamente aceptada para el cáncer de mama se basa en la expresión de diversos receptores, los cuales pueden ser: receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). De esta manera se reconocen cuatro subtipos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y Triple Negativo. La utilidad de esta clasificación molecular es categorizar a las pacientes, con el objetivo de que reciban un tratamiento específico, ya sea terapia hormonal o terapia antiHER2¹⁵.

Luminal A: Representan el 50% de los casos; se caracterizan por ser positivos a RE y/o a RP y negativos a HER2, presentan una baja expresión del marcador de proliferación celular Ki67 (menor al 20%); son de bajo grado, de crecimiento lento, tienen un buen pronóstico, con una incidencia de recaída baja y mayor tasa de supervivencia. Presentan una tasa alta de respuesta a la terapia hormonal¹⁵.

Luminal B: Representan el 15% de los casos, son positivos a receptores de RE y pueden ser negativos a RP, presentan una expresión alta del marcador Ki67 (mayor al 20%). Por lo general son de grado intermedio/alto, tienen peor pronóstico si se compara con los Luminal A; sin embargo, pueden beneficiarse de la terapia hormonal¹⁵.

HER2: Representan el 20% de los casos, se caracterizan por una expresión alta de HER2, son negativos a RE y RP. Este subtipo es más agresivo y de crecimiento rápido. Comparados con los tumores luminales tienen peor pronóstico y requieren fármacos específicos dirigidos contra la proteína HER2¹⁵.

Triple Negativo (TNBC): Representan el 15% de los casos, se distinguen por ser negativos a RE, RP y HER2. Se presenta principalmente en mujeres menores de 40 años, además se caracterizan por su agresividad, recaída temprana y mayor tendencia a presentarse en estadios avanzados. Asimismo, presentan una tasa alta de proliferación, alteración en los genes de reparación del ADN y aumento de la inestabilidad genómica¹⁵.

De esta manera los subtipos moleculares de cáncer de mama se resumen en la siguiente tabla:

Subtipo	Receptores			Incidencia	Terapia
	RE	RP	HER2		
Luminal A	+	+	-	50%	Hormonal
Luminal B	+	+/-	-	15%	Hormonal/Quimioterapia
HER2+	-	-	+	20%	Hormonal/Quimioterapia/ Dirigida
Triple Negativo	-	-	-	15%	Quimioterapia

Tabla 1. Subtipos moleculares y sus principales características. Modificado de Orrantia-Borunda,2022.

3.5 CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

El cáncer de mama Triple Negativo se distingue por tener una baja o nula expresión de RE, RP y HER2, como consecuencia ninguna de las terapias existentes dirigidas a estos receptores ha mostrado un efecto favorable sobre este tipo de tumores¹⁶.

Este subtipo posee un comportamiento agresivo con un grado alto de invasividad y metástasis hacia cerebro, pulmones, hígado y huesos; con un tiempo promedio de supervivencia de 18 meses. Estudios poblacionales demuestran que la población afectada suele ser mujeres jóvenes premenopáusicas menores a 40 años, afroamericanas e hispanas de niveles socioeconómicos bajos¹⁶.

Comparado con los otros subtipos moleculares, las pacientes con TNBC tienen un tiempo de supervivencia más corto; además, la tasa de mortalidad durante los primeros 5 años después del diagnóstico es del 40%. Al ser altamente invasivo, se estima que el 46% de las pacientes desarrollarán metástasis; a su vez la media de supervivencia después de la metástasis es de tan sólo 13.3 meses¹⁷.

3.6 FACTORES DE RIESGO

Edad: Mujeres jóvenes premenopáusicas menores a los 40 años tienen un mayor riesgo de padecer TNBC¹⁸.

Mutaciones genéticas: Se ha encontrado que mutaciones en genes como los genes supresores de tumores 1 y 2 (*BRCA1* y *BRCA2*) están fuertemente asociadas con el riesgo de padecer TNBC. Cerca del 70% de los casos diagnosticados, con una mutación en *BRCA1* son triple negativo. De igual forma las personas con una variante dañina en cualquiera de estos genes tienden a presentar cáncer a una edad más temprana^{6,18,19}.

Etnia: A través de distintos estudios poblacionales, se ha comprobado que el TNBC presenta una mayor incidencia en mujeres hispanas y afroamericanas. Sin embargo, la tasa de mortalidad es significativamente mayor en mujeres afroamericanas^{6,16}.

3.7 TRATAMIENTO: OPCIONES DISPONIBLES

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial en la que agentes tan diversos entre sí como edad, peso, factores hormonales y reproductivos, exposición a ciertos fármacos, condiciones ambientales, consumo de alcohol, tabaquismo, etc. influyen en el desarrollo y pronóstico de la enfermedad. Es por eso que el establecer un régimen de tratamiento resulta tan complejo; aunado a esto el TNBC al no presentar receptores hormonales (RE, RP), o receptores HER2, tanto la terapia hormonal como la antiHER2 se ven descartadas, lo cual limita las opciones terapéuticas y hace que el tratamiento del TNBC sea especialmente desafiante.

De esta manera las opciones de tratamiento disponibles son:

Cirugía: Tomando en cuenta las características y condiciones clínicas de la paciente la cirugía sola o en combinación con quimioterapia es una alternativa; si el tumor es lo suficientemente pequeño se puede realizar una lumpectomía (extirpación del tumor y una pequeña cantidad de tejido circundante) o una mastectomía (extirpación completa de la mama)^{16,20}.

Inmunoterapia: Esta alternativa implica el uso de distintos agentes con la finalidad de mejorar la respuesta del sistema inmunológico o también para bloquear las vías de escape inmunológico de las células tumorales. Un ejemplo de estos agentes es el Pembrolizumab, puede utilizarse en combinación con quimioterapia antes de

realizar cirugía y después de esta puede seguir administrándose solo; este como opción para el tratamiento del TNBC en etapa temprana con un alto riesgo de recurrencia^{21,22}.

Quimioterapia: Esta sigue siendo la piedra angular para el tratamiento del TNBC, y datos de estudios realizados en las últimas dos décadas muestran un beneficio significativo de la quimioterapia en los entornos neoadyuvante, adyuvante y metastásico. Pese a que las pacientes con este tipo de cáncer presentan un mal pronóstico general, manifiestan una mayor respuesta a la quimioterapia que aquellas con otro subtipo molecular. De esta manera los taxanos y las **antraciclinas** siguen siendo agentes importantes para el tratamiento del TNBC⁷.

Entre el 30-40% de las pacientes con TNBC en etapa temprana tratadas con regímenes neoadyuvantes, a base de taxanos y **antraciclinas** logran una respuesta patológica completa después del tratamiento⁷.

3.8 DOXORRUBICINA

Las **antraciclinas** son una clase de fármacos quimioterapéuticos sistémicos que se derivan de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, estos fármacos son de suma importancia ya que son utilizadas para el tratamiento de varios tipos de cáncer como la leucemia, el cáncer de útero, de ovario, de pulmón y cáncer de mama. Diversos estudios clínicos han establecido los esquemas de dosificación óptimos para las antraciclinas contra el cáncer de mama, la cual es de **60-75mg/m²**, en 4 ciclos de 21 días¹⁷.

De acuerdo con datos clínicos existentes, tras 6 meses de quimioterapia con antraciclinas, la tasa de mortalidad en pacientes menores de 50 años en el momento del diagnóstico, disminuyó aproximadamente en un 38%¹⁷.

De entre las distintas antraciclinas existentes, la **Doxorrubicina** es una de las más utilizadas ya que ha demostrado ser de gran potencial terapéutico y es considerada como uno de los fármacos quimioterapéuticos más potentes aprobados por la FDA. Durante décadas ha sido reconocida por su capacidad de combatir a las células de rápida división, además de ralentizar la progresión de la enfermedad²³.

Existen diferentes mecanismos propuestos mediante los cuales Doxorubicina actúa en las células cancerosas, entre estos se encuentran 1) Intercalación en el ADN, 2) Inhibición de la Topoisomerasa II y 3) Producción de radicales libres.

1) Intercalación en el ADN: Doxorubicina se intercala entre las bases del ADN, esta posición se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno; el complejo formado provoca un superenrollamiento de las cadenas de ADN, lo que provoca un aumento del estrés y a su vez la ruptura de la doble cadena de ADN, lo que resulta en la inducción de apoptosis^{24,25}.

2) Inhibición de la Topoisomerasa II: Durante los procesos de replicación y transcripción las hebras de ADN se desenrollan, lo cual produce una tensión torsional, la Topoisomerasa II se encarga de romper ambas hebras del ADN y volverlas a sellar, lo cual da como resultado la liberación de la tensión de torsión formada, y a su vez el mantenimiento de la estructura normal del ADN. La Doxorubicina inhibe la acción de la Topoisomerasa II, lo que resulta en rupturas permanentes, no se puede continuar con el proceso de replicación y se produce la muerte celular^{25,26}.

3) Producción de radicales libres: Mediante enzimas como la oxidorreductasa, NADH deshidrogenasa, óxido nítrico sintasa y la xantina oxidasa, la Doxorubicina se reduce a su forma de semiquinona inestable; esta semiquinona inestable se convierte nuevamente en Doxorubicina, en un proceso que libera especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS pueden provocar peroxidación lipídica, daño a la membrana, daño al ADN, estrés oxidativo y desencadenar vías apoptóticas^{27,28}.

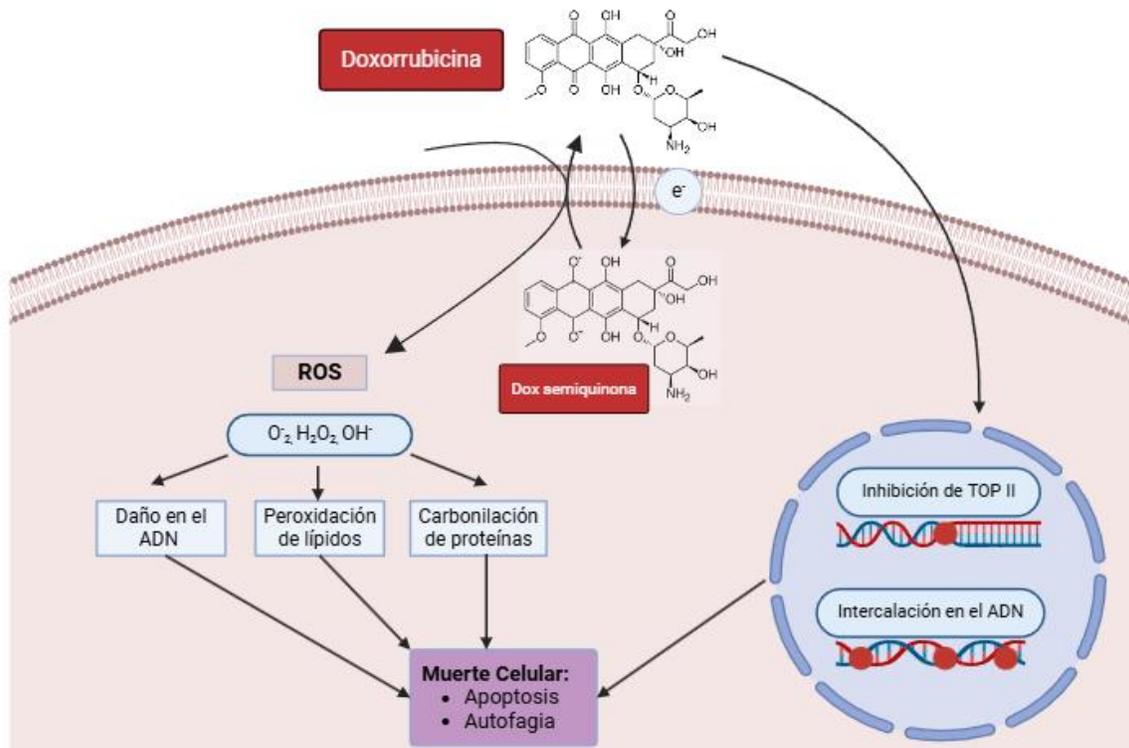


Figura 3. Mecanismo de acción de Doxorrubicina. Modificado de Sritharan S,2021.

El tratamiento principal para el TNBC consiste en quimioterapia sistémica citotóxica convencional con Doxorrubicina, esta es sumamente eficaz; sin embargo, al no ser selectiva para células cancerosas, su uso está significativamente limitado debido a su toxicidad. Dicha toxicidad a menudo afecta el hígado, riñones, cerebro y **corazón**^{9,25}.

La cardiotoxicidad tiende a ser el principal factor limitante para el uso de Doxorrubicina. Una enfermedad que se presenta con frecuencia en pacientes que reciben Doxorrubicina es la miocardiopatía crónica y es potencialmente mortal, ya que puede progresar rápidamente a insuficiencia cardíaca congestiva, la cual tiene una tasa de mortalidad a un año cercana al 50%; la cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina depende de la dosis y es acumulativa²⁹.

Otro inconveniente que surge a raíz del tratamiento con Doxorrubicina es la resistencia farmacológica, esta es el resultado de una exposición prolongada a agentes quimioterapéuticos lo cual genera una respuesta celular adaptativa y a su vez la adquisición de resistencia a los fármacos. El TNBC suele adquirir resistencia

a la Doxorubicina, una vez adquirida esta resistencia las células cancerosas desarrollan fenotipos resistentes a múltiples fármacos⁹.

La resistencia de las células cancerosas durante la quimioterapia puede asociarse con una variedad de mecanismos, incluido un mayor flujo de salida de los fármacos, factores genéticos, mayor capacidad de reparación del ADN y metabolismo elevado de los xenobióticos. Cada uno de estos mecanismos conduce a una reducción de la eficacia terapéutica de los fármacos administrados, provocando una mayor dificultad en el tratamiento del tumor⁹.

El TNBC es intrínsecamente sensible a la quimioterapia, pero desafortunadamente es igualmente propenso a recaída y resistencia, lo que se conoce como la paradoja del Triple Negativo.

Debido a los problemas que surgen a partir del uso de fármacos quimioterapéuticos, como la resistencia farmacológica y cardiotoxicidad en el caso de Doxorubicina, en los últimos años se han buscado alternativas para mejorar la respuesta al tratamiento y a la vez disminuir los efectos adversos que producen este tipo de fármacos. Una de estas alternativas es el reposicionamiento farmacológico.

3.9 REPOSICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO

El reposicionamiento de fármacos consiste en dar un nuevo uso terapéutico a un fármaco existente en cual ha sido previamente aprobado para una indicación terapéutica distinta. Esta opción ha sido ampliamente utilizada en los últimos años como alternativa al desarrollo de fármacos de *novo*¹⁰.

El desarrollo de fármacos de *novo* resulta cada vez más complicado dado que aproximadamente el 90% de los medicamentos no logran superar los ensayos clínicos de fase I, sin mencionar que se requiere una alta inversión económica además de largos periodos de investigación. De esta manera el reposicionamiento exhibe diversas ventajas respecto al desarrollo tradicional de los fármacos, por ejemplo, ofrece la posibilidad de reducir los riesgos, costos de inversión y tiempos de investigación. Se calcula que el costo de llevar un medicamento nuevo al mercado ronda entre 1 y 2 billones de dólares; además, el tiempo requerido, desde

el descubrimiento del fármaco hasta su lanzamiento al mercado, es de 12 a 16 años, mientras que para un fármaco reposicionado solo se requieren 300 millones de dólares y un aproximado de 3 a 6 años; además de que ya están aprobados para su uso en humanos, por lo que ya se cuenta con estudios preclínicos, clínicos y de farmacovigilancia¹⁰.

En el caso específico del desarrollo de medicamentos para la terapia del cáncer más de 10,000 ensayos clínicos se encuentran en curso para probar el efecto de distintos fármacos sobre el cáncer; sin embargo, sólo un número limitado de fármacos candidatos avanzan a la siguiente fase en los ensayos clínicos, además la tasa de aprobación de fármacos contra el cáncer es de tan sólo 5%³⁰.

Un ejemplo de esta estrategia de reposicionamiento son las estatinas. Estas se desarrollaron originalmente para reducir los niveles de colesterol; sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que también exhiben propiedades antitumorales, especialmente **Simvastatina**, la cual ha demostrado su influencia en la proliferación, migración y supervivencia de células cancerosas¹¹.

3.10 SIMVASTATINA

El desarrollo y uso de las estatinas como fármacos hipolipemiantes comenzó a mediados de los años 1970. La Simvastatina es un derivado que se obtiene a partir de un producto de fermentación de *Aspergillus terreus*. Desde su aprobación ha sido utilizada para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular y también para controlar los niveles lipídicos altos, a través de la inhibición de la producción endógena del colesterol^{31,32}.

El mecanismo de acción mediante el cual Simvastatina reduce los lípidos circulantes, específicamente el colesterol en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL), es a través de la inhibición competitiva con la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR); esta es una enzima limitante en la síntesis del colesterol. Las estatinas tienen una afinidad por la HMGCR miles de veces mayor que la del sustrato natural (acetil-CoA), lo que resulta en la inhibición de la transformación de HMG-CoA a mevalonato, esto a su vez provoca una disminución en la concentración del colesterol intracelular. Como consecuencia de esta

disminución, la expresión de receptores de LDL en la membrana celular de los hepatocitos aumenta, lo que da como resultado la extracción de LDL-C de la sangre y la reducción de los niveles circulantes de LDL-C^{11,33}.

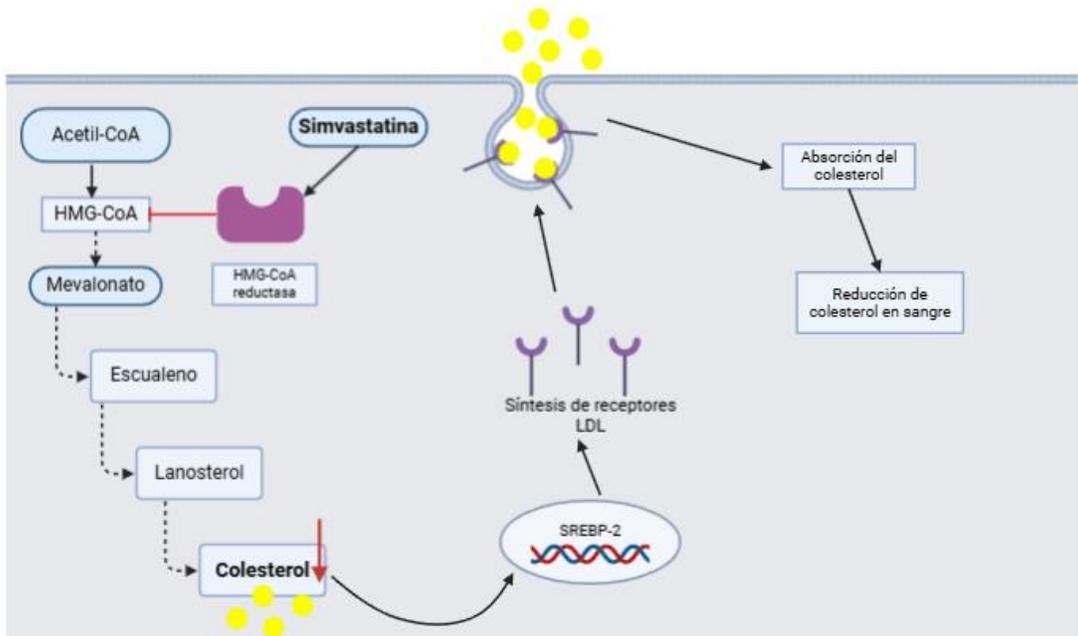


Figura 4. Mecanismo de acción de Simvastatina. Modificado de Tripathi S,2024 y Vuu YM,2023.

Independientes a sus propiedades hipolipemiantes, en las últimas décadas se ha descubierto que Simvastatina también ejerce efectos sobre una gran variedad de enfermedades, entre las que se encuentran la diabetes, artritis reumatoide, osteoporosis, enfermedades neurológicas, enfermedades coronarias, y **cáncer**. Es así como Simvastatina ha atraído la atención por exhibir propiedades antitumorales y actualmente se continúa investigando por su potencial para ser utilizada como fármaco de reposicionamiento para el tratamiento del cáncer³⁴.

En estudios preclínicos realizados en diversas líneas celulares y modelos animales, se ha observado que Simvastatina ejerce efectos sobre la proliferación, migración y supervivencia celular, eventos que se encuentran aumentados en los procesos carcinogénicos. Del mismo modo, se ha demostrado que las estatinas, incluida Simvastatina, disminuyen la proliferación de células de cáncer de mama, al mismo tiempo que aumentan la apoptosis, además de que actúan sinérgicamente con quimioterapias existentes, especialmente en el TNBC³⁵.

El mecanismo mediante el cual Simvastatina exhibe sus efectos antiproliferativos aún no se encuentra completamente dilucidado; sin embargo, se han propuesto diferentes mecanismos para explicarlo. La vía del mevalonato transforma la acetil-CoA en colesterol y también en algunos isoprenoides que desempeñan funciones sobre el crecimiento y la supervivencia celular. La Simvastatina reduce la síntesis de mevalonato y como consecuencia disminuyen la farnesilación y la geranilgeranilación, lo cual resulta en: 1) La disminución de la expresión de las proteínas Ras, Rho y c-Myc, lo que disminuye la proliferación y migración de células tumorales, 2) La reducción de la metaloproteínasa-9, proteína relacionada con la metástasis, 3) La inhibición de angiogénesis al aumentar el efecto inhibitorio de TNF- α y 4) La activación de caspasas 3 y 9, lo que provoca la apoptosis celular¹¹.

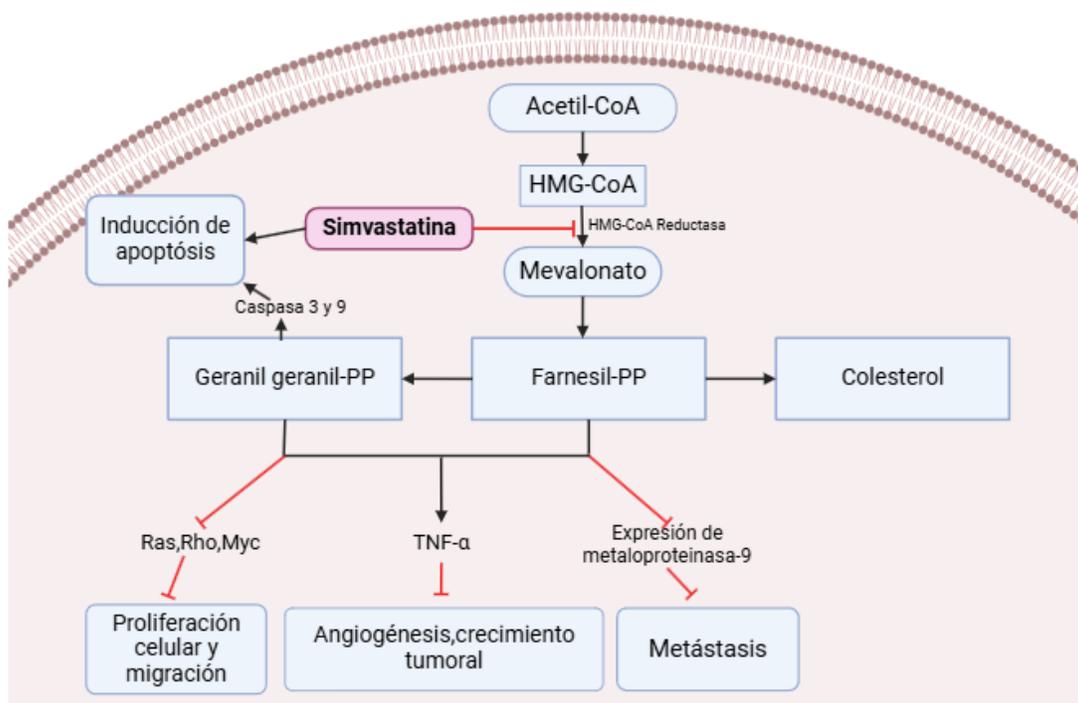


Figura 5. Mecanismo de acción propuesto de Simvastatina como antineoplásico. Tomado de Duarte JA, 2021

Aunado a lo anteriormente mencionado, Simvastatina al tener perfiles de seguridad y dosificación bien establecidos, toxicidad limitada, bajo costo y facilidad de uso, la convierte en un fármaco ideal para ser reposicionado para el tratamiento del TNBC³⁶.

En el estudio del cáncer una herramienta que permite evaluar la eficacia de moléculas o fármacos (incluida la Simvastatina) es el cultivo celular. Se considera que el cultivo celular en monocapa (cultivo celular 2D), es la herramienta que ha permitido a través de los años entender una gran variedad de procesos y fenómenos, entre los que se encuentran la comprensión de la biología celular, la morfología de los tejidos, los mecanismos de las enfermedades y la acción de los fármacos³⁷. Sin embargo, este tipo de modelos presentan varias limitaciones en cuanto a la capacidad de simular lo que sucede *in vivo*. La principal limitante es que las células se adhieren a las placas que las contienen y crecen en forma de monocapa; este tipo de crecimiento presenta una cinética de crecimiento y uniones celulares, que no son comunes en un tumor y, por lo tanto, el microambiente natural de las células no está completamente representado³⁷.

Una opción para superar estas limitaciones son los cultivos en los cuales las células crecen en tres dimensiones (3D).

3.11 ESFEROIDES

Estos sistemas en 3D proporcionan información valiosa sobre las características de los tumores y las interacciones célula-célula en comparación a los cultivos 2D. Además, diversos estudios han demostrado que la respuesta celular a diversos tratamientos farmacológicos en cultivos tridimensionales es más parecida a lo que ocurre *in vivo* en comparación con los cultivos 2D, sin mencionar que se ha demostrado que las células en modelos 3D muestran mayor resistencia a los fármacos antineoplásicos que las provenientes de cultivos 2D³⁷.

Un ejemplo del cultivo celular en 3D son los esferoides. Los esferoides son agregados celulares densos y compactos, los cuales exhiben una amplia adhesión celular; por lo general estas células conservan la matriz extracelular endógena y presentan propiedades que asemejan estrechamente a sus homólogas de un tejido *in vivo*³⁸.

Los esferoides son estructuras con una composición heterogénea, la cual consiste en una zona externa de células altamente proliferativas, esta alta tasa de proliferación se atribuye a que dichas células debido a su posición se encuentran

constantemente expuestas al oxígeno y a los nutrientes presentes en el medio de cultivo. Una vez que la difusión de nutrientes y oxígeno comienza a disminuir la tasa de crecimiento también lo hace, lo que provoca que las células permanezcan en un estado de quiescencia, creando así una zona media de células quiescentes. Por su parte las células más internas debido al agotamiento de oxígeno y nutrientes se vuelven hipóxicas, lo que, en última instancia, conduce a la formación de una zona necrótica. Es importante mencionar que el tamaño de cada una de estas zonas depende de la línea celular utilizada, de la compactación de la estructura y de la dimensión del esferoide^{39,40}.

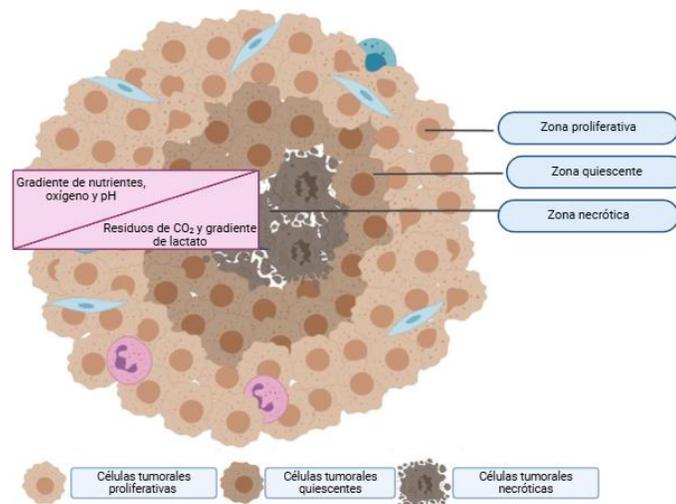


Figura 6. Estructura de un esferoide. Tomado de Pinto B,2020.

Los métodos para la obtención de esferoides son variados, entre estos se encuentran:

- **Hanging drop:** Se coloca una gota de suspensión celular con una densidad celular definida en una caja Petri o placa de cultivo y posteriormente se invierte la caja; debido a la tensión superficial la gota se mantendrá en contacto con la placa, mientras que la gravedad forzará a las células a permanecer en el fondo de la gota, lo cual permitirá que las células se agreguen en forma de esferoide³⁸.

- Cultivo de pellets: Las células en suspensión se centrifugan, quedando unidas entre sí en forma de pellet; posteriormente se elimina el sobrenadante y al pellet formado se le adiciona medio de cultivo apropiado para la formación de esferoides. Después el pellet junto con el medio de cultivo se transfiere a una placa de cultivo de 96 pozos de baja adherencia^{38,41}.
- Biorreactores: Una suspensión celular se coloca en un biorreactor con agitación constante; el tamaño del esferoide resultante depende del tamaño del biorreactor. Se ha propuesto este método de cultivo giratorio en biorreactores de gran tamaño como medio para producir esferoides en masa³⁸.
- Liquid overlay: En este método cada uno de los pozos de cultivo se encuentran recubiertos con un material no adherente, para así inhibir la adhesión de las células; es así como se coloca una capa de medio de cultivo y sobre esta se adicionan las células en suspensión; las células al no estar adheridas al fondo de la placa se agregan espontáneamente lo que impulsa la formación de los esferoides³⁸.
- Biomateriales: Para promover la agregación células también se pueden utilizar biomateriales como alginato, ácido hialurónico, colágeno, etc. Se ha demostrado que este tipo de materiales mejoran la viabilidad y las propiedades biológicas de los esferoides³⁸.

Debido a todas las características que presentan los esferoides resultan ser herramientas muy útiles en la investigación del cáncer, desde el estudio de las características de las células que inician el cáncer, la invasión, los procesos metastásicos, así como para estudiar la respuesta celular ante distintos fármacos⁴².

Es por ello que en este trabajo de investigación se evaluó el efecto farmacológico de Doxorubicina y Simvastatina en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 en un modelo celular 2D (monocapa) y 3D (esferoides).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al cáncer de mama como el tipo de cáncer más común en el mundo, con 2.3 millones de casos en 2022. En México, datos del INEGI indican que, durante 2023, 23,873 nuevos casos fueron detectados entre la población de 20 años y más. Durante el mismo año se registraron 8,034 muertes a causa de esta enfermedad.

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) al no presentar receptores hormonales, o receptores HER2, la terapia hormonal y la terapia dirigida antiHER2 no son opciones de tratamiento, por lo que la única opción se ve reducida a la quimioterapia. El fármaco más utilizado para el tratamiento del TNBC es la Doxorrubicina.

Aunque al principio de las terapias las pacientes responden favorablemente a los esquemas con Doxorrubicina, después de un tiempo de exposición prolongado a este fármaco, los tumores desarrollan mecanismos de resistencia, esto aunado a la cardiotoxicidad asociada a Doxorrubicina hace que el tratamiento del TNBC se vuelva particularmente complicado. Por ello surge la necesidad de investigar en el laboratorio nuevas opciones de tratamiento para el cáncer de mama y en un futuro ofrecer a las pacientes con este padecimiento, mejores resultados terapéuticos y en consecuencia una mejor calidad de vida.

5. HIPÓTESIS

La adición de Simvastatina al tratamiento de Doxorrubicina mostrará una mayor muerte celular en células de cáncer de mama Triple Negativo.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto sobre la viabilidad celular después de un tratamiento combinado de Doxorrubicina y Simvastatina en una línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, en cultivos 2D (células) y 3D (esferoides).

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la viabilidad de la combinación de Doxorrubicina y Simvastatina en un modelo 2D (monocapa) de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.
- Establecer las condiciones experimentales para un cultivo celular en 3D (esferoides) de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.
- Determinar el efecto farmacológico de la combinación de Doxorrubicina y Simvastatina en un modelo 3D (esferoides) de la línea celular MDA-MB-231.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 MODELO 2D (MONOCAPA)

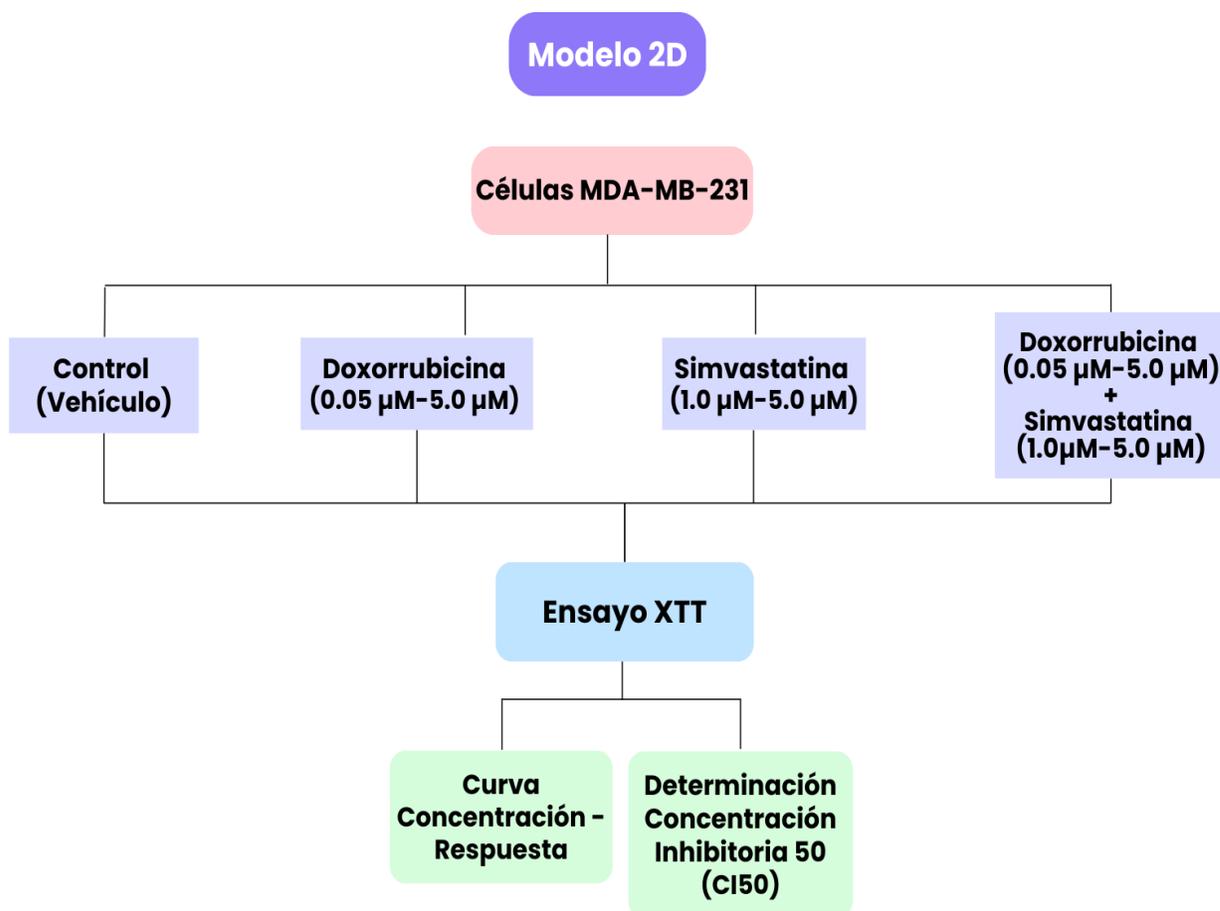


Figura 7. Diseño experimental del modelo de cultivo en 2D de la línea celular MDA-MB-231.

7.2 MODELO 3D (ESFEROIDES)

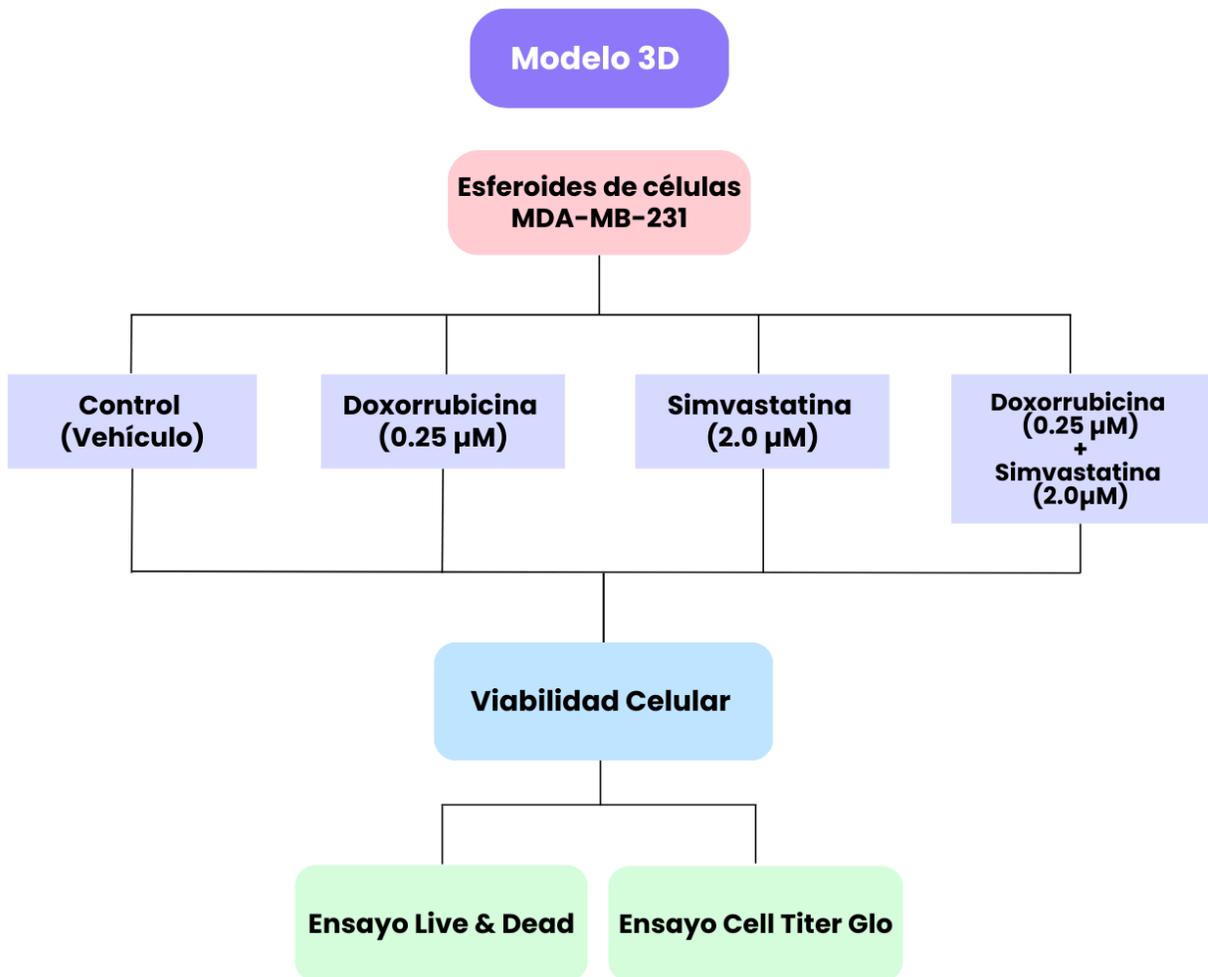


Figura 8. Diseño experimental del modelo de cultivo en 3D de la línea celular MDA-MB-231.

7.3 MÉTODO

Universo de estudio:

- Línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 obtenida del American Type Culture Collection (ATCC).
- Esferoides obtenidos a partir de la línea celular MDA-MB-231.

Criterios de inclusión:

- Células con morfología propia de la línea MDA-MB-231, con al menos 3 pases antes de realizarse los experimentos.
- Esferoides compactos, íntegros, con un diámetro de entre 200-400 µm.

Criterios de exclusión:

- Células que se encuentren a una confluencia menor del 80% o mayor al 100%.
- Esferoides que no muestren una morfología esférica.
- Esferoides disgregados.

Criterios de eliminación:

- Células contaminadas con bacterias.
- Esferoides contaminados con bacterias.

Variables

- Independientes: Cantidad de células sembradas por pozo, concentración de los fármacos administrados por grupo.
- Dependientes: Viabilidad celular.

Diseño de estudio

- Experimental, Prospectivo, Longitudinal y Comparativo.

8. METODOLOGÍA

8.1 LÍNEA CELULAR

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama metastásico MDA-MB 231, la cual fue obtenida de American Type Culture Collection, ATCC (Virginia, U.S.A.). Estas células se mantuvieron en cajas de 75 cm² en condiciones de esterilidad en medio Roswell Park Memorial Institute, RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, U.S.A.) suplementado con el 10% de suero fetal bovino e incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

8.2 CULTIVO CELULAR 2D

Una vez que las células MDA-MB-231 alcanzaron una confluencia del 80-90%, éstas se despegaron con una solución de PBS-EDTA y después fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 8 min, se realizó el conteo celular mediante una cámara de Neubauer; posteriormente se sembraron en medio RPMI 1640 en una placa estéril de 96 pozos (Corning Incorporated, NY, U.S.A.) a una concentración de 9,000 células/pozo; las células se mantuvieron en incubación por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas las células fueron expuestas por 72 horas a distintas concentraciones de los fármacos solos y combinados; Doxorubicina (0µM-5.0 µM) y Simvastatina (1.0 µM-5.0 µM), como se muestran en la figura 4.

Para Doxorubicina (Sigma-Aldrich No. de cat: 038K1349) se utilizó una solución stock de 2 mg/mL a partir de la cual se preparó una solución de trabajo de 10 μ M. En el caso de Simvastatina (Silvera Ciencias e Ingeniería S.A. de C.V. no. de cat: ENZ-CHM142-0010) se utilizó una solución stock de 30 mg/mL, y a partir de esta se preparó una solución de trabajo de 100 μ M.

8.2.1 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

8.2.1.1 ENSAYO XTT

Este ensayo se basa en que el reactivo XTT el cual es una sal de tetrazolio amarilla al ser reducida por células metabólicamente activas se convierte en una sal de formazán de color naranja, la cual es cuantificada mediante un lector de microplacas a una longitud de onda de 492nm y 690nm; de esta manera a mayor coloración naranja, mayor actividad metabólica lo que significa mayor número de células vivas.

Después de 72 horas de exposición a los tratamientos, se retiró el medio de cultivo contenido en la placa y se adicionó medio de cultivo sin rojo fenol; este contenía el reactivo XTT (Roche Diagnostics, Germany) y el reactivo de acoplamiento de electrones (Roche Diagnostics, Germany); se adicionaron 100 μ L de esta mezcla a cada pozo y posteriormente la placa fue incubada durante 2 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Posterior a las 2 horas de incubación, la viabilidad celular fue detectada mediante un lector de microplacas (VARIOSKAN LUX, Thermo Fisher Scientific Inc.) a una longitud de onda de 492nm y 690nm. Con los resultados obtenidos de este ensayo se elaboraron las curvas Dosis-Respuesta y a partir de estas se obtuvieron las CI₅₀ de cada uno de los fármacos.

8.3 CULTIVO CELULAR 3D

Una vez que las células MDA-MB-321 alcanzaron una confluencia del 80-90% fueron despegadas con una solución de PBS-EDTA, posteriormente fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI y contadas en una cámara de Neubauer.

Por otro lado, en una placa de 96 pozos de ultra baja adherencia (Nunclon Sphera, Thermo Scientific, Denmark) se adicionaron 100 μ L de medio de cultivo Essential 8

Basal Medium (E8) (Gibco by Thermo Fisher Scientific) por pozo y enseguida se adicionó el volumen necesario de suspensión celular para obtener una concentración de 4,000 células/pozo; la placa se centrifugó (Centry 101 Plate Centrifuge, Gilson, U.S.A.) durante 3 minutos, para después ser conservada en incubación durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Transcurridas las 24 horas se preparó una solución de medio de cultivo E8 con colágeno tipo I (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, U.S.A.) a una concentración de 3 µg de colágeno/mL de medio E8., para posteriormente adicionar 100 µL de esta solución a cada uno de los pozos. La placa se centrifugó nuevamente por 3 minutos y se conservó en incubación durante 2 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para observar la formación de los esferoides se utilizó un microscopio invertido (OLYMPUS IX51) y se utilizó el software CellSens Entry (Olympus, Japan) para medir el diámetro de cada uno de los esferoides, posteriormente fueron expuestos a los tratamientos de Doxorubicina y Simvastatina solos y en combinación. Los esferoides se dividieron en 4 grupos y se expusieron a los fármacos durante 5 días.

Para Doxorubicina se utilizó una solución stock de 2 mg/mL, a partir de la cual se prepara una solución de trabajo de 10 µM. En cuanto a Simvastatina se utilizó una solución stock de 30 mg/mL, y a partir de esta se prepara una solución de trabajo de 100 µM.

Grupos	Concentración DOX (µM)	Concentración SIM (µM)
Control	-	-
DOX	0.25	-
SIM	-	2.0
DOX+SIM	0.25	2.0

Tabla 2. Esquema de administración de los fármacos Doxorubicina y Simvastatina en esferoides

Posterior a los 5 días de tratamiento se midieron nuevamente los diámetros de cada uno de los esferoides para posteriormente realizar las pruebas de viabilidad utilizando los kits de Live&Dead y CellTiter-Glo.

8.3.1 TINCIÓN LIVE/DEAD

Al finalizar los 5 días de tratamiento, se tomó un esferoide individual de cada grupo y se transfirieron a tubos de 0.6 mL, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados, cada uno con 100 μ L de PBS, después se adicionaron 100 μ L de la solución de trabajo de la tinción Live&Dead (calceína 2 μ M+ homodímero de etidio 4 μ M), las muestras se colocaron en una placa de ultra baja adherencia (protegiéndolas de la luz) y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, para posteriormente ser observadas al microscopio acoplado a una lámpara de fluorescencia y mediante el software CellSens Entry se tomaron 2 imágenes de cada uno de los esferoides utilizando 2 filtros: filtro 1 para calceína (rango de excitación de 460-490 nm) y filtro 3 para homodímero (rango de excitación de 510-550 nm), (microscopio OLYMPUS IX51); posteriormente con el software ImageJ se realizó la fusión de ambas imágenes.

8.3.2 PRUEBA DE VIABILIDAD CELLTITER-GLO

Finalizados los 5 días de tratamiento se tomó un esferoide de cada grupo y en 50 μ L de medio se transfirieron a una placa para luminiscencia de 96 pozos (Corning Incorporated, NY, U.S.A); una vez que las muestras se encontraron en la placa se adicionaron 50 μ L del reactivo (CellTiter-Glo) por pozo, posteriormente la placa se agitó vigorosamente (400 rpm) durante 10 minutos utilizando un Thermomixer. Posteriormente la placa se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos; finalmente la viabilidad celular fue detectada mediante un lector de microplacas (VARIOSKAN LUX, Thermo Fisher Scientific Inc.). A partir de estos datos se realizaron las gráficas de viabilidad por grupo.

9. RESULTADOS

9.1 Cultivo Celular 2D

9.1.1 Ensayo de Viabilidad Celular de Doxorrubicina y Simvastatina (Individuales)

Se realizaron 2 ensayos de viabilidad celular: uno para Doxorrubicina individual y otro para Simvastatina individual. Después de la exposición al tratamiento, se realizó en ensayo XTT. A partir de estos datos se realizaron las curvas Dosis-Respuesta; para que los datos fueran comparables entre sí se realizó una normalización,

tomando como 100% la viabilidad de las células que no fueron expuestas a ninguno de los fármacos.

En la figura 6A se presenta la curva Concentración-Respuesta de Doxorrubicina y la figura 6B corresponde a la curva Concentración-Respuesta de Simvastatina. Se observa, que, al aumentar la concentración de los fármacos, la viabilidad celular disminuye de forma concentración-dependiente, lo que indica que al aumentar la concentración de los fármacos también aumenta el efecto de muerte celular.

A partir de estas figuras se obtuvo la CI_{50} , la cual fue de **0.28 μM** para Doxorrubicina y de **1.51 μM** para Simvastatina.

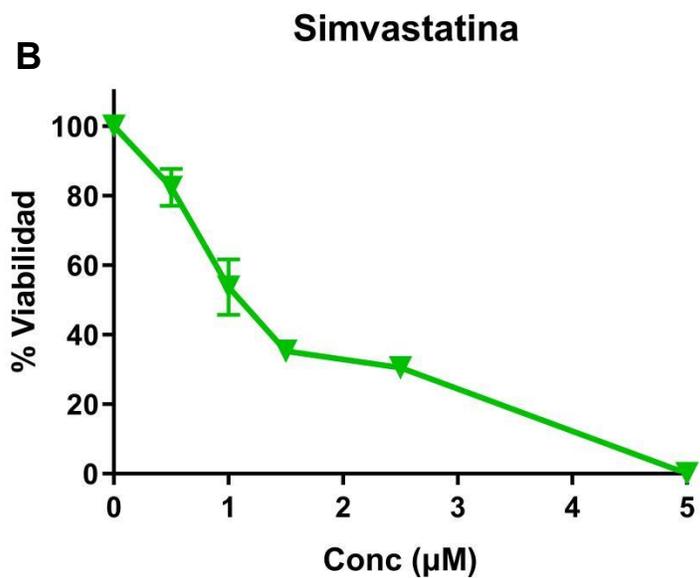
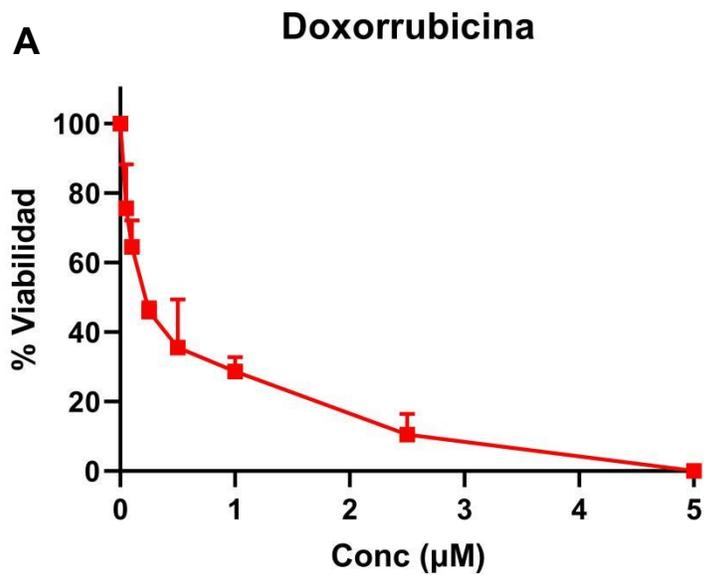


Figura 9. Curva Concentración-Respuesta de Doxorubicina (figura 5A) utilizando las concentraciones de 0 µM, 0.05 µM, 0.1 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 2.5 µM y 5.0 µM, y Curva Concentración-Respuesta de Simvastatina (figura 5B) utilizando las concentraciones de 0 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 1.5 µM, 2.5 µM y 5.0 µM. Para Doxorubicina cada punto representa n=2 ±DE, en dos experimentos independientes. Para Simvastatina cada punto representa una n=6 ±DE, en tres experimentos independientes.

Fármaco	CI ₅₀ (μ M)
DOX	0.28 ± 0.002
SIM	1.51 ± 0.585

Tabla 3. CI₅₀ de Doxorubicina y Simvastatina n=2 ±DE.

9.1.2 Viabilidad Celular de la combinación de Doxorubicina y Simvastatina

En la Figura 6 se observa que cuando Doxorubicina se combina con Simvastatina se presenta una mayor muerte celular, en comparación a Doxorubicina aplicada de manera individual. De esta manera la viabilidad celular se vio reducida conforme Doxorubicina se combinaba con concentraciones crecientes de Simvastatina (1.0 μ M, 2.5 μ M y 5.0 μ M), mostrando un comportamiento Concentración-Dependiente, lo que indica la potenciación de los fármacos ya que cuando se combinaron se requirió de una menor dosis para alcanzar el 50% de muerte celular. A partir de estos datos se calculó la CI₅₀ para cada combinación, las cuales se muestran en la Tabla 4.

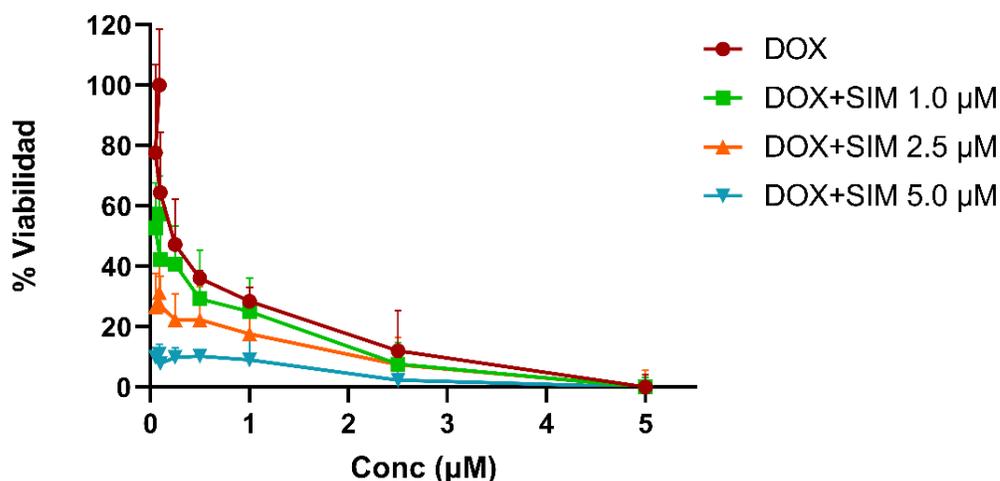


Figura 10. Curva Concentración-Respuesta de Doxorubicina en combinación con Simvastatina. Para Doxorubicina se utilizaron concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 μ M, mientras que para Simvastatina se utilizaron 0, 1.0, 2.5 y 5.0 μ M. n=2 en experimentos independientes por duplicado.

Combinación	CI ₅₀ (μ M)
DOX	0.2821
DOX + SIM 1.0 μ M	0.1701
DOX + SIM 2.5 μ M	< 0.05
DOX + SIM 5.0 μ M	< 0.05

Tabla 4. CI₅₀ de Doxorubicina combinada con Simvastatina.

9.1.3 Morfología celular después de los tratamientos

Al finalizar los 3 días de tratamiento, se tomaron imágenes microscópicas representativas de cada uno de los grupos tratados a distintas concentraciones de los fármacos, para observar la morfología y la viabilidad celular. En la Figura 11 se muestran las imágenes representativas de las células MDA-MB-231, al aumentar la concentración de los fármacos la densidad celular disminuyó. La morfología celular, la cual se caracteriza como células alargadas y delgadas, cambia a una forma redondeada lo cual eventualmente resulta en la muerte celular.

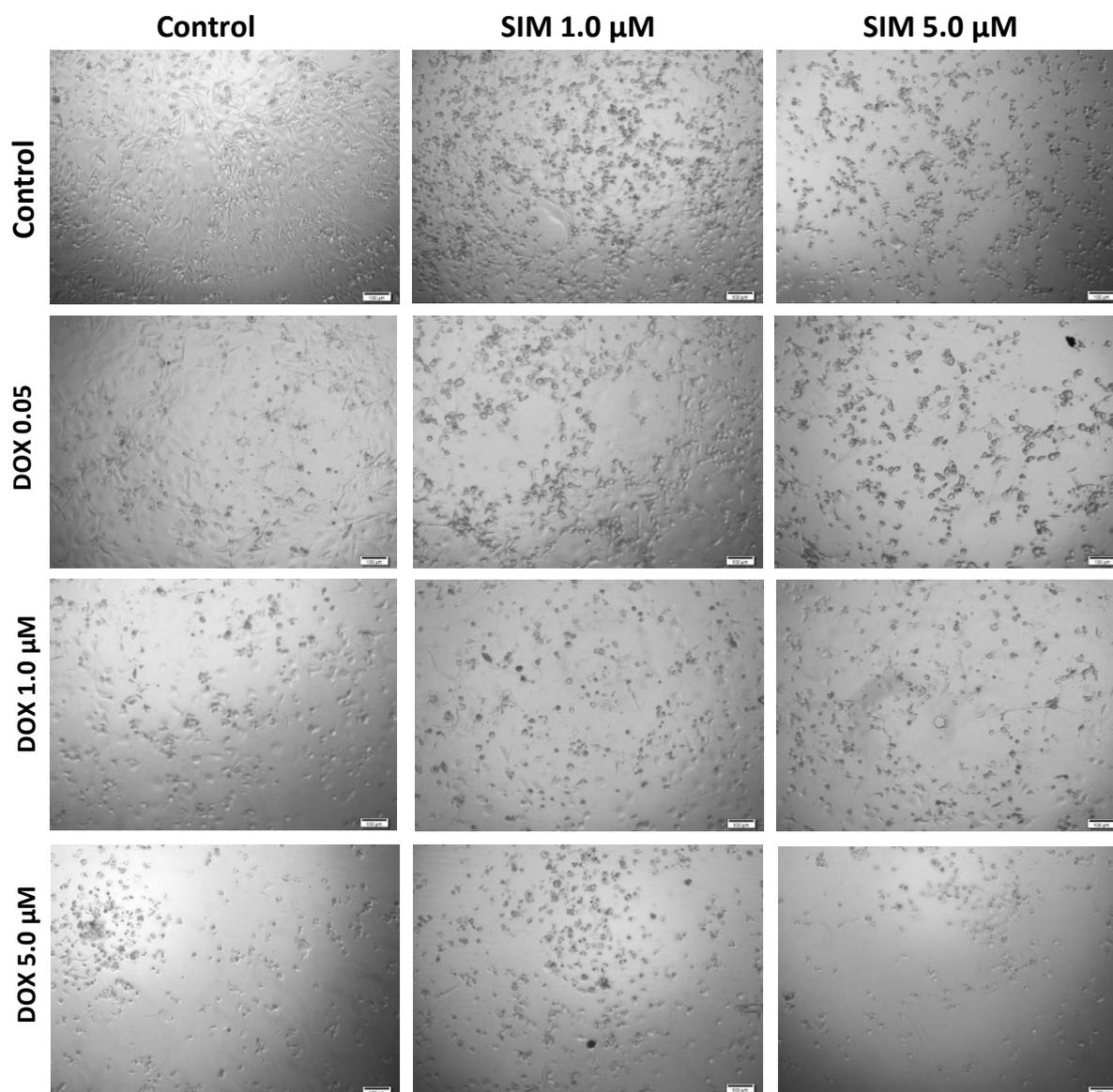


Figura 11. Imágenes representativas de las células MDA-MB-231 después de 3 días de tratamiento con Doxorrubicina y Simvastatina (solas y combinadas) a distintas concentraciones.

9.1.4 Índice de Combinación

Para distinguir el tipo de interacción farmacológica que se presenta al combinar Doxorubicina y Simvastatina se calculó el Índice de Combinación (IC), el cual relaciona el efecto de los fármacos individuales y combinados, así como las concentraciones utilizadas y el porcentaje de viabilidad celular, utilizando la ecuación:

$$IC = \frac{D1}{Dx1} + \frac{D2}{Dx2} + \alpha \frac{(D1)(D2)}{(Dx1)(Dx2)}$$

Donde:

IC= Índice de Combinación

D1,D2= Concentración de los fármacos combinados

Dx1,Dx2= Concentraciones individuales de los fármacos

α = 1 (fármacos con diferente mecanismo de acción)

De esta manera se obtiene el IC, el cual puede resultar en un sinergismo (IC<1), aditividad (IC=1) o antagonismo (IC>1).

Combinación de fármacos (μM)		Fármacos individuales (μM)		% de crecimiento	Índice de combinación	Interacción
DOX D1	SIM D2	DOX Dx1	SIM Dx2			
0.05	1	0.2879	1.333	52.692	1.05	-
0.05	2.5	1.017	3.405	26.667	0.82	Sinergismo
0.05	5	3.943	9.328	9.843	0.56	Sinergismo
0.1	1	0.4612	1.892	42.308	0.86	Sinergismo
0.1	2.5	0.9938	3.348	27.059	0.92	Sinergismo
0.1	5	5.201	11.45	7.874	0.46	Sinergismo
0.25	1	0.4953	1.995	40.769	1.26	-
0.25	2.5	1.322	4.141	22.353	0.91	Sinergismo
0.25	5	3.943	9.328	9.843	0.63	Sinergismo
0.5	1	0.8805	3.06	29.231	1.08	-
0.5	2.5	1.322	4.141	22.353	1.21	-
0.5	5	3.755	8.994	10.236	0.76	Sinergismo
1	1	1.121	3.662	25	1.41	-
1	2.5	1.845	5.303	17.647	1.27	-
1	5	4.374	10.08	9.055	0.84	Sinergismo
2.5	1	5.345	11.7	7.692	0.59	Sinergismo
2.5	2.5	5.564	12.04	7.451	0.75	Sinergismo
2.5	5	-	-	2.362	-	-
5	1	-	-	0	-	-
5	2.5	-	-	0	-	-
5	5	-	-	0	-	-

Tabla 5. Cálculo de Índices de Combinación

Como se presenta en la tabla 5, varias concentraciones de la combinación de los fármacos resultan en una interacción sinérgica. A partir de este resultado se consideró las combinaciones siguientes: DOX 0.25 μ M+SIM 2.5 μ M, DOX 0.25 μ M+SIM 5.0 μ M y DOX 0.5 μ M+SIM 5.0 μ M, para evaluar su efecto sobre el modelo 3D (esferoides).

9.2 CULTIVO CELULAR 3D

9.2.1 ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO 3D

Previo a evaluar el efecto de Doxorrubicina y Simvastatina en el modelo de cultivo 3D, fue necesario establecer las condiciones experimentales para obtener esferoides compactos, íntegros, homogéneos y con un diámetro de entre 200-400 μ m.

De esta forma se realizaron experimentos utilizando diferentes variables como: el número de células sembradas, los días de formación del esferoide, los días de tratamiento, la concentración de colágeno, el tipo de placa de cultivo, y el tiempo de centrifugación, para obtener las condiciones ideales de formación de esferoides de la línea celular MDA-MB-231.

EXPERIMENTO 1

Para el **Experimento 1**, se evaluaron las siguientes condiciones: 10,000 células/pozo, 3µg de colágeno tipo I/mL de medio E8 adicionado el mismo día de sembrado, placa de ultra baja adherencia de fondo plano (Costar, Corning, USA), 2.5 horas de agitación a 240 rpm, 4 días de formación y 5 días de tratamiento.

Se observa que las células se agruparon formando un esferoide; sin embargo, la forma y el tamaño de los esferoides no fue homogéneo; además, el diámetro promedio fue mayor de >400 µm.

Al finalizar los 5 días de tratamiento se observó que los esferoides se disgregaron; impidiendo realizar cualquier tipo de prueba de viabilidad celular; por lo tanto, no fue posible comparar el efecto entre los diferentes tratamientos.

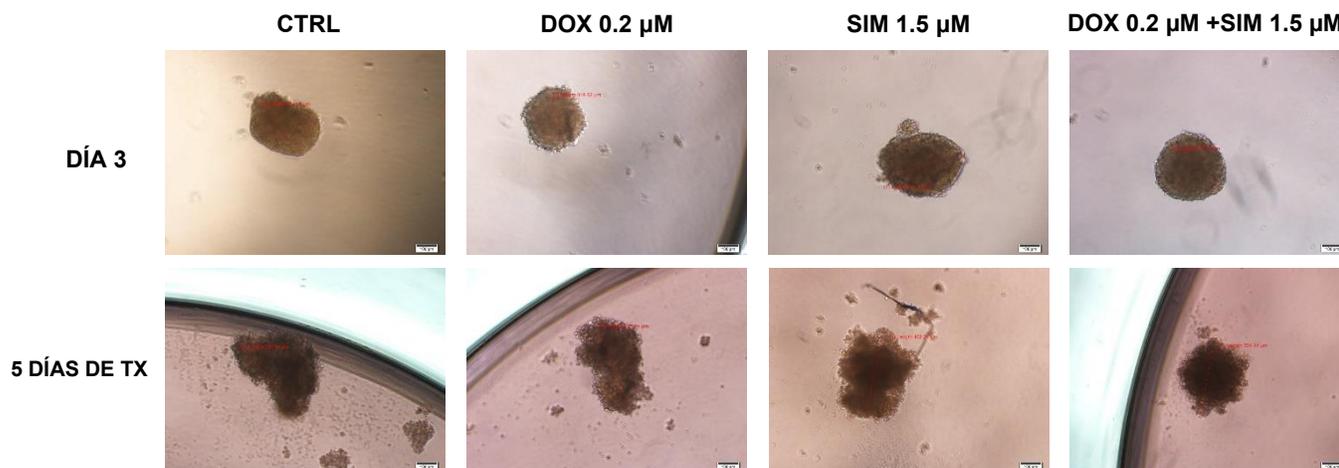


Figura 12. Imágenes representativas de esferoides sembrados bajo las condiciones: 10,000 células/pozo, 3µg de colágeno tipo I/mL de medio E8 adicionado el mismo día de sembrado, placa de ultra baja adherencia de fondo plano (Costar, Corning, USA), 2.5 horas de agitación a 240 rpm, 4 días de formación y 5 días de tratamiento. Tamaño promedio del esferoide: 432.33 µm, n= 12.

EXPERIMENTO 2

Para el Experimento 2 (**Figura 13**) se modificaron dos condiciones, las cuales fueron un incremento de la concentración del colágeno, de 3µg/mL de medio E8 a 10µg/mL en medio E8, además, se modificaron los días de formación del esferoide de 4 a 6 días, esto con el objetivo de obtener esferoides más compactos y redondeados, y para mantener su morfología durante todo el experimento.

Los resultados mostraron que la compactación y morfología de los esferoides mejoró; sin embargo, el diámetro promedio obtenido fue mayor de >400 µm, además, al final del tratamiento, se observa que algunas células se comienzan a disgregar del esferoide, especialmente en el grupo control.

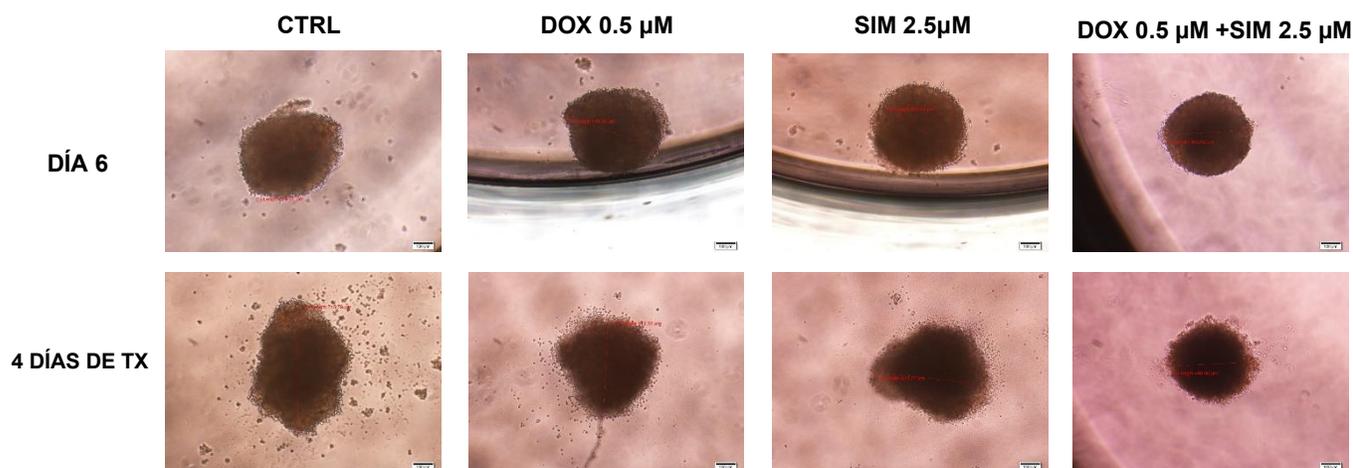


Figura 13. Esferoides sembrados bajo las siguientes condiciones: 10,000 células/pozo, 10 µg de colágeno tipo I/mL de medio E8 adicionado el mismo día de sembrado, placa de ultra baja adherencia de fondo plano (Costar, Corning, USA), 2.5 horas de agitación a 240 rpm, 6 días de formación y 4 días de tratamiento. Tamaño promedio del esferoide: 524.30 µm, con una n= 12.

EXPERIMENTO 3

De acuerdo con los resultados anteriores se decidió modificar las siguientes variables: la concentración de colágeno se redujo a **5 µg de colágeno tipo I/mL de E8**; además, con la finalidad de que el esferoide se mantuviera lo más íntegro posible y la mayor cantidad de células permanecieran agregadas, se redujo el tiempo de tratamiento a 3 días. Con estas variables se obtuvieron esferoides compactos y esféricos; sin embargo, el tamaño continuó siendo >400 µm.

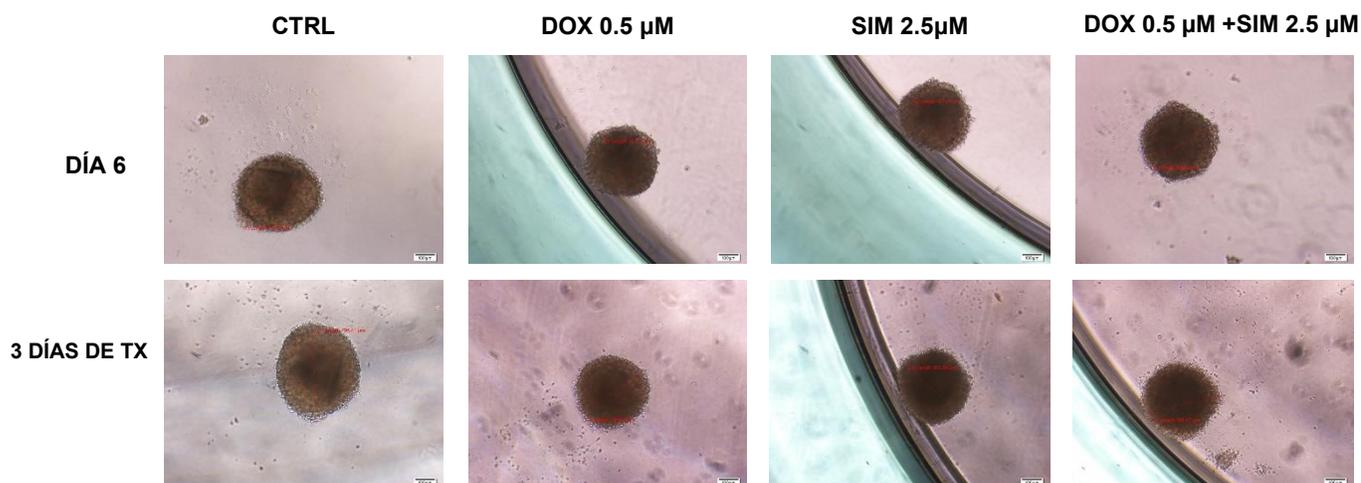


Figura 14. Esferoides sembrados bajo las siguientes condiciones: 10,000 células/pozo, **5 µg de colágeno tipo I/mL** de medio E8 adicionado el mismo día de sembrado, placa de ultra baja adherencia de fondo plano (Costar, Corning, USA), 2.5 horas de agitación a 240 rpm, 6 días de formación y **3 días de tratamiento**. Tamaño promedio del esferoide: 420.20 µm, con una n=12.

EXPERIMENTO 4

Las placas de cultivo utilizadas tanto para los experimentos previos como para este cuentan con un recubrimiento de material no adherente, lo cual impide que las células se adhieran al fondo de la placa y de esta manera se promueve la agregación celular y por lo tanto la formación de los esferoides, para el Experimento 4 (**Figura 15**) se modificó el tipo de placa de cultivo no adherente, de fondo plano a placas de cultivo no adherente de fondo redondo, lo cual promueve mejor la interacción entre las células.

Además, el número de células se disminuyó de 10,000 a **6,000 células/pozo**, y la concentración de colágeno se mantuvo en **3 µg/mL E8**, los días de formación

fueron 3 días, y los días de tratamiento fueron 5 días. Con estas variables finales y con los 5 días de tratamiento fue posible determinar la viabilidad de los esferoides, utilizando el ensayo Live&Dead el cual determina simultáneamente las células vivas y las muertas. Las células teñidas de verde son aquellas que representan las células vivas y las teñidas de rojo a las muertas. En la Fig. 12B se observa en el grupo control una mayor cantidad de células vivas, mientras que en el grupo con SIM 2.5 μM muestra una mayor cantidad de células muertas; sin embargo, en el grupo de DOX 0.5 μM prácticamente todas las células que conforman el esferoide se observan muertas; por su parte en el grupo de la combinación DOX 0.5 μM + SIM 2.5 μM se observa la misma cantidad de células vivas y de células muertas.

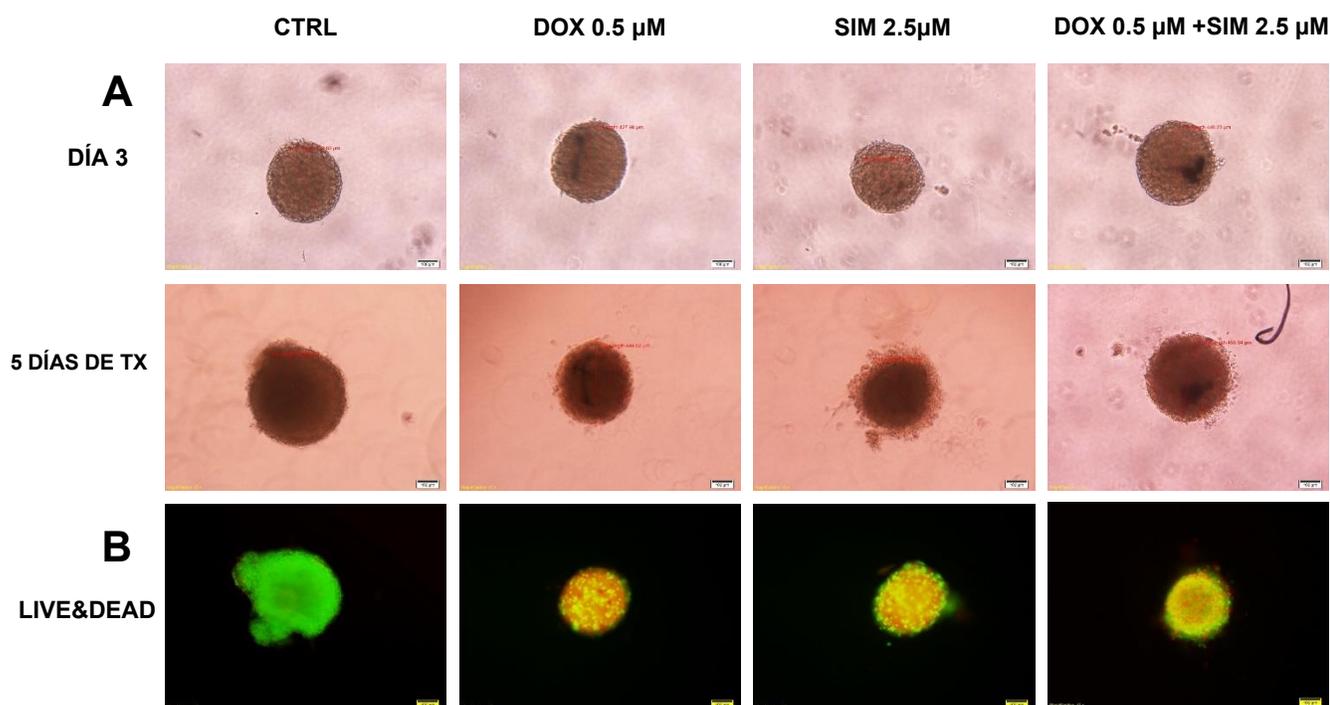


Figura 15. A) Esferoides sembrados bajo las siguientes condiciones: **6,000 células/pozo, 3 μg de colágeno tipo I/mL** de medio E8 adicionado el mismo día de sembrado, **placa de ultra baja adherencia de fondo redondo (Costar, Corning, USA)**, 2.5 horas de agitación a 240 rpm, **3 días de formación y 5 días de tratamiento**. Tamaño promedio del esferoide: 402.99 μm , con una $n= 12$. **B)** Para evaluar el efecto de los fármacos una vez transcurridos los 5 días de tratamiento se realizó el ensayo Live&Dead el cual distingue las células vivas de las muertas. Las células teñidas de verde representan las células vivas y las teñidas de rojo representan las muertas.

EXPERIMENTO 5

En el Experimento 5 (**Figura 16**) se muestran los esferoides formados utilizando un menor número de células (**4,000 células/pozo**), igualmente se modificó la forma de adición del colágeno, el cual se adicionó **24 horas después** de haber sembrado a las células, además ya no fue necesario agitar la placa por 2.5 horas, sino simplemente se realizaron dos centrifugaciones de **3 minutos**: el día de la siembra y 24 horas después.

Mediante estas modificaciones se obtuvieron esferoides con las características y el tamaño adecuado para los tratamientos, las cuales fueron, un agregado celular compacto, íntegro, redondeado y uniforme, además de contar con un diámetro menor a los 400 μm .

Posteriormente se realizó el ensayo Live&Dead con el que se comprobó que el grupo control presentó una mayor cantidad de células vivas, mientras que el grupo de SIM 7.5 μM presentó una mayor cantidad de células muertas, incluso mayor muerte que el grupo de DOX 0.5 μM ; sin embargo en el grupo de la combinación DOX 0.5 μM + SIM 7.5 μM la muerte celular fue aún mayor que los tratamientos individuales y solo unas cuantas células se encuentran vivas, comprobando lo observado en el modelo 2D; la combinación de los fármacos produce una mayor muerte celular que los fármacos utilizados por sí solos.

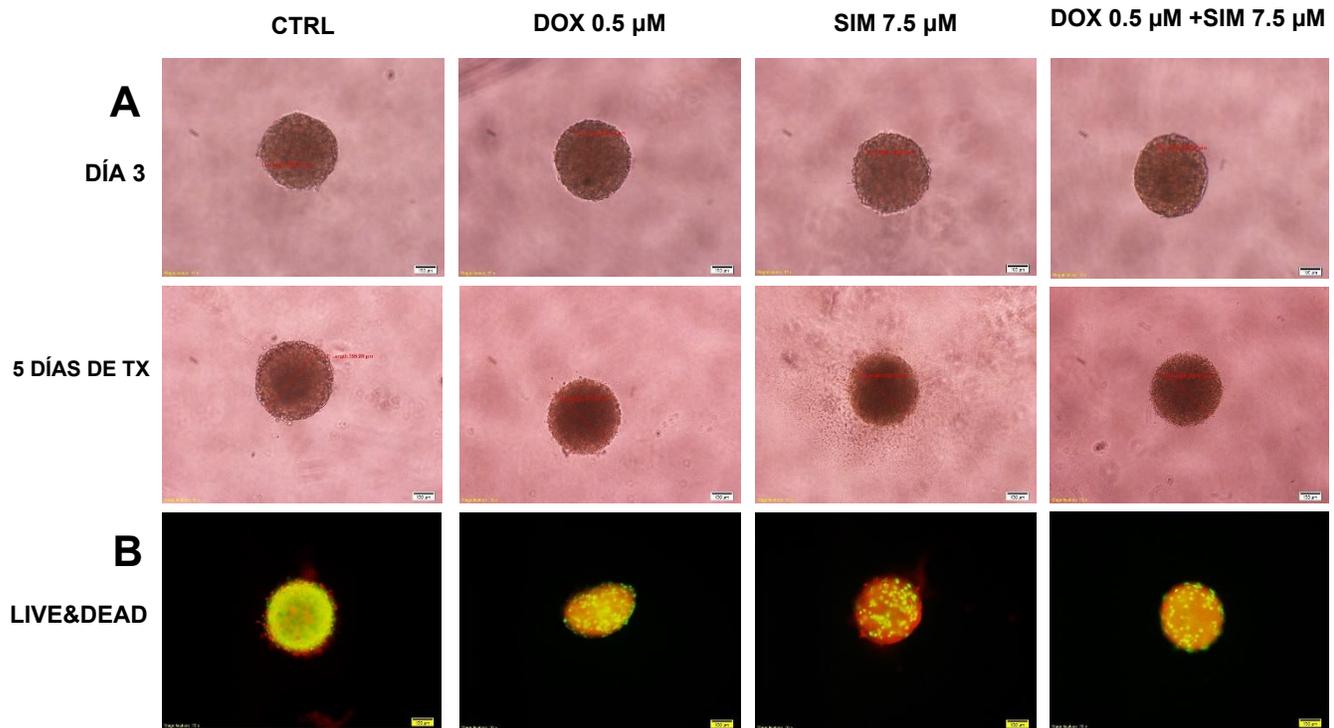


Figura 16. A) Esferoides sembrados bajo las siguientes condiciones: **4,000 células/pozo, 3 μ g de colágeno tipo I/mL de medio E8 adicionado 24 horas después de sembrado**, placa de ultra baja adherencia de fondo redondo (Costar, Corning, USA), **3 minutos de centrifugación**, 3 días de formación y 5 días de tratamiento. Tamaño promedio del esferoide: 389.97 μ m, con una n=12. **B)** Para evaluar el efecto de los fármacos, una vez transcurridos los 5 días de tratamiento se realizó el ensayo Live&Dead el cual distingue las células vivas de las muertas. Las células teñidas de verde representan las células vivas y las teñidas de rojo representan las muertas.

EXPERIMENTO 6

Con la finalidad de optimizar el proceso de formación y la homogeneidad de los esferoides, las condiciones finales del experimento anterior se repitieron (Figura 17), utilizando una placa de cultivo con un recubrimiento de ultra baja adherencia y pozos con fondo redondo, pero de una marca diferente (**Nunclon Sphera, Thermo Scientific**), sin observar ninguna modificación de las condiciones establecidas. Es así como las condiciones de este experimento se eligieron para la obtención de esferoides compactos, íntegros y homogéneos de la línea celular MDA-MB-231.

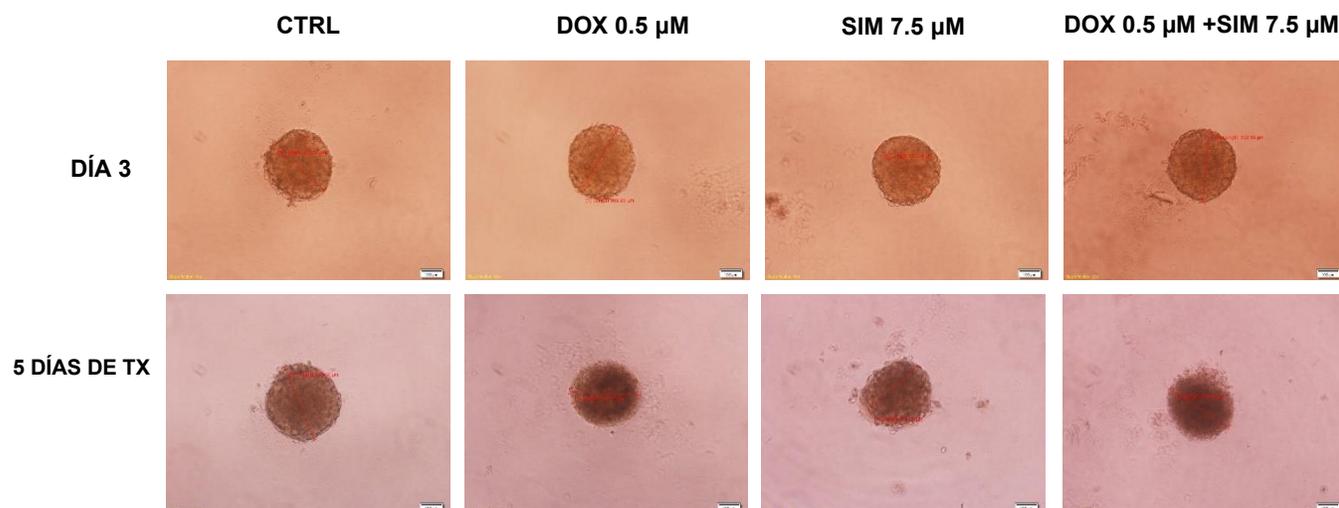


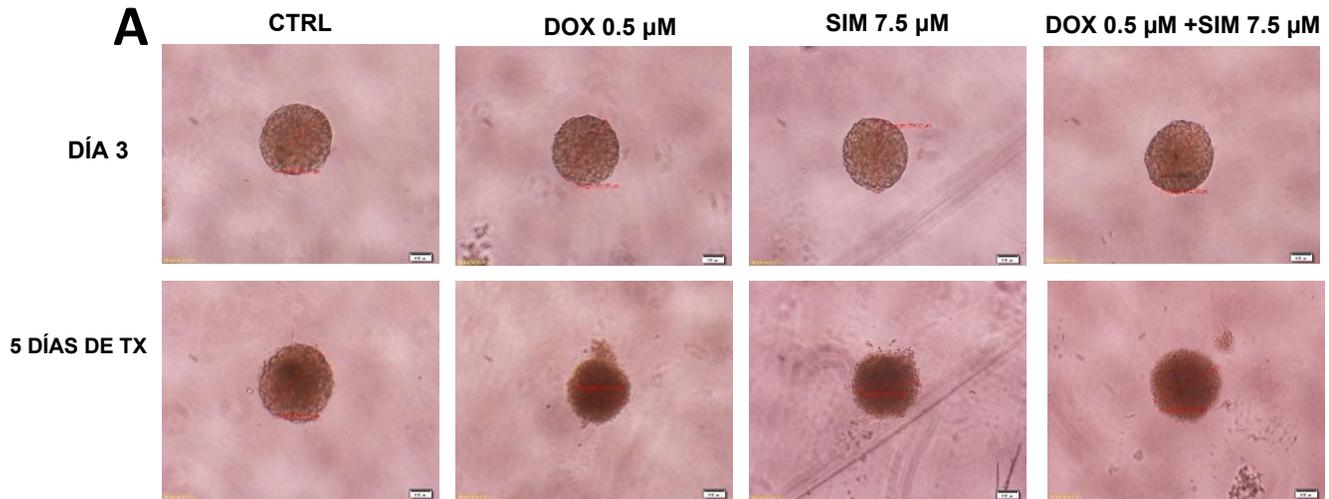
Figura 17. Esferoides sembrados bajo las siguientes condiciones: 4,000 células/pozo, 3 μg de colágeno tipo I/mL de medio E8 adicionado 24 horas después de sembrado, **placa de ultra baja adherencia de fondo redondo (Nunclon Sphera, Thermo Scientific)**, 3 minutos de centrifugación, 3 días de formación y 5 días de tratamiento. Tamaño promedio del esferoide: 348.23 μm, con una n= 25.

9.2.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EN ESFEROIDES TRATADOS CON LA COMBINACIÓN DE DOXORRUBICINA Y SIMVASTATINA

Una vez estandarizadas las condiciones, para la obtención de esferoides con las características establecidas, los esferoides fueron expuestos a los tratamientos de Doxorubicina y Simvastatina solos o combinados, para después mediante los ensayos de Live&Dead y CellTiter-Glo, evaluar el efecto de la viabilidad celular de los esferoides tratados.

EXPERIMENTO 1

En la **Figura 18**, se presentan los resultados cuando se utilizó una concentración de Doxorubicina 0.5 μM , Simvastatina 7.5 μM y la combinación de estas; después de 5 días post-tratamiento se realizó el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo; este se basa en la cuantificación de ATP que se genera como un indicador de células metabólicamente activas. Después de adicionar el reactivo, las células son lisadas, para después generar una señal luminiscente, la cual es proporcional a la cantidad de ATP presente en las muestras. El ensayo se realizó al final del periodo de tratamiento, los valores de luminiscencia fueron normalizados, tomando como 100%, la viabilidad celular del grupo control, el cual no fue expuesto a ninguno de los fármacos. Para el grupo de Doxorubicina 0.5 μM se obtuvo una viabilidad promedio de 7.49%, mientras que para Simvastatina 7.5 μM fue de 19.51%; mientras que el grupo de la combinación DOX 0.5 μM + SIM 7.5 μM la señal de luminiscencia fue tan baja debido a la mínima de cantidad de células vivas, siendo la viabilidad del 0%.



B

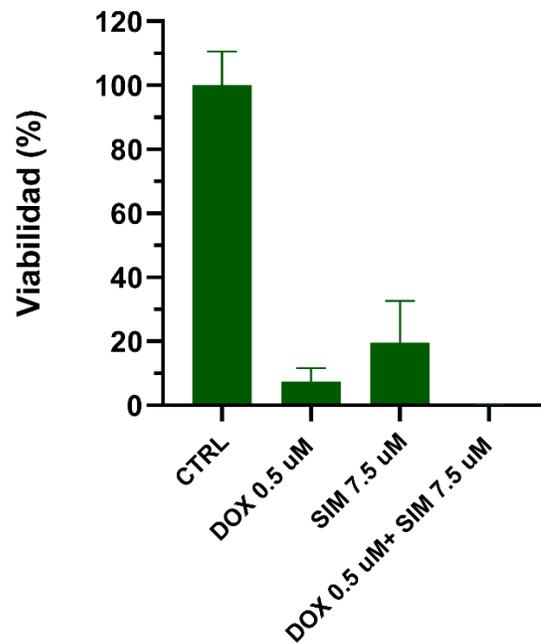
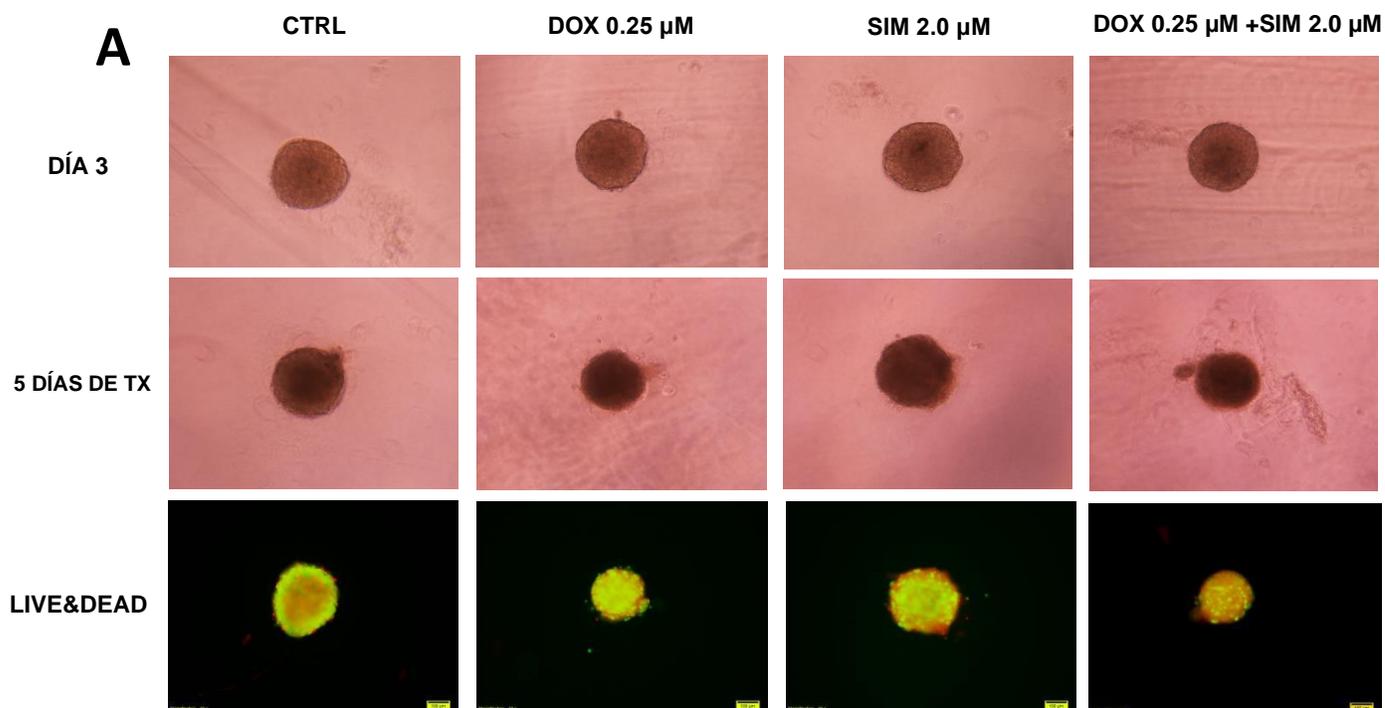


Figura 18. (A) Imágenes representativas de esferoides de MDA-MB-231 expuestos a Doxorubicina (0.5 μ M), Simvastatina (7.5 μ M) y Doxorubicina 0.5 μ M combinada con Simvastatina 7.5 μ M después de 5 días de tratamiento; cada esferoide es representativo de cada uno de los grupos con una n=7-11. (B) Evaluación de la Viabilidad Celular después de 5 días de tratamiento, mediante el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo; n= 5-8 \pm DE.

EXPERIMENTO 2

Debido a que los resultados anteriores ambos fármacos Doxorubicina y Simvastatina aplicados individualmente mostraron un efecto mayor en la viabilidad celular, en este segundo ensayo (**Figura 19**) se optó por reducir la concentración de ambas (Doxorubicina 0.25 μM y Simvastatina 2.0 μM). Es así como al finalizar el tratamiento, se realizaron simultáneamente los ensayos de Live&Dead y CellTiter-Glo; como se aprecia, en ambos ensayos la tendencia es la misma. Al realizar la prueba Live&Dead, en el grupo Control se observó la mayor cantidad de células vivas (color verde), y por el contrario en el grupo de la combinación se encontró la mayor cantidad de células muertas ya que se observó prácticamente todo el esferoide teñido de rojo. En el caso del ensayo CellTiter-Glo, en el grupo de Doxorubicina 0.25 μM la viabilidad celular fue de 28.51%, mientras que en el grupo de Simvastatina 2.0 μM la viabilidad fue de 57.69%, y en el grupo de la de la combinación DOX 0.25 μM + SIM 2.0 μM se presentó un efecto total sobre la viabilidad celular, no encontrando células vivas a estas concentraciones.



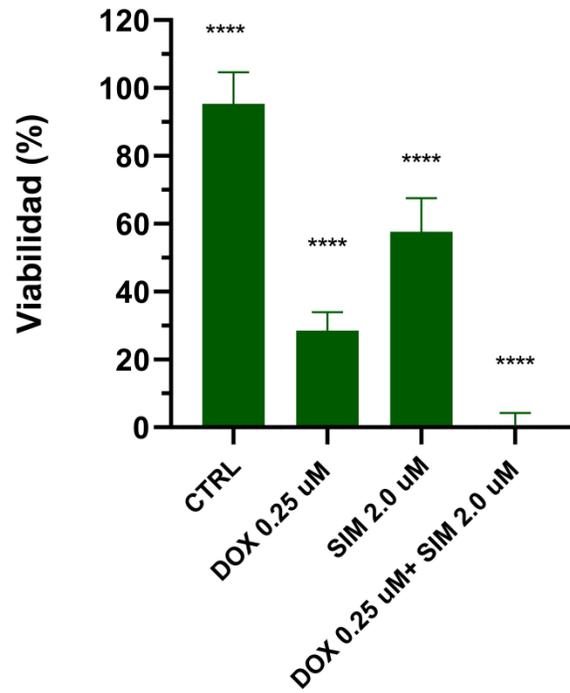
B

Figura 19. (A) Imágenes representativas de esferoides de MDA-MB-231 expuestos a Doxorubicina (0.25 μ M), Simvastatina (2.0 μ M) y Doxorubicina 0.25 μ M combinada con Simvastatina 2.0 μ M después de 5 días de tratamiento; cada esferoide representa a cada uno de los grupos con una n=8-10. Una vez transcurridos los 5 días de tratamiento se realizó el ensayo Live&Dead, el cual distingue las células vivas de las muertas. Las células teñidas de verde representan las células vivas y las teñidas de rojo representan las células muertas. **(B)** Evaluación de la Viabilidad Celular después de 5 días de tratamiento, mediante el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo; n= 6-8 \pm DE. ****Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre Control, DOX 0.25 μ M, SIM 2.0 μ M y DOX 0.25 μ M + SIM 2.0 μ M.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El **cáncer** prevalece como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, durante 2022 se registraron 9.7 millones de muertes a causa de esta enfermedad. En el caso específico del cáncer de mama, representa una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial y nacional. Durante 2022 en el mundo se registraron 2.3 millones de nuevos casos y 666,103 muertes, mientras que en México durante el mismo año se registraron 31,043 casos nuevos de cáncer de mama y 8,195 muertes a causa de este¹².

Entre los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama, sin duda el cáncer de mama **Triple Negativo (TNBC)** es el más agresivo y con un pronóstico desfavorable, generalmente se manifiesta en una etapa avanzada, además presenta una tendencia a generar metástasis tempranas hacia órganos distantes como pulmones, hígado, cerebro y huesos, lo que contribuye a un peor pronóstico si se compara con los demás subtipos moleculares⁴³.

Además, no presenta ninguno de los receptores hormonales (RE-, RP-) ni tampoco receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-), por lo que la terapia hormonal o la terapia dirigida (antiHER2) no son opciones de tratamiento para este tipo de cáncer. Al no existir un tratamiento específico la única opción disponible es la quimioterapia, el tratamiento estándar consiste en la combinación de taxanos y **antraciclinas**⁷.

La **Doxorrubicina**, al ser una de las antraciclinas más utilizadas para la terapia de distintos tipos de cáncer continúa siendo la piedra angular en el tratamiento del TNBC; sin embargo, la tasa de respuesta del tratamiento con este fármaco es de solo 40%-70% debido a los mecanismos de resistencia farmacológica. La resistencia farmacológica representa uno de los retos más grandes en el tratamiento del cáncer ya que permite que las células cancerosas sobrevivan y proliferen aún a dosis clínicas de Doxorrubicina, lo cual resulta en un mal pronóstico y progresión de la enfermedad⁸. Además de las dificultades que conlleva la resistencia, la cardiotoxicidad provocada por Doxorrubicina limita aún más su potencial

terapéutico, ya que se presenta una cardiotoxicidad dosis-dependiente si se utiliza por encima del rango de **400 mg/m²-700 mg/ m²**^{8,44}.

Es así como surge la necesidad de mejorar los tratamientos actuales, con el fin de obtener una respuesta favorable al tratamiento, y al mismo tiempo aminorar los efectos adversos del uso de Doxorubicina.

Pensar en el desarrollo y aprobación de un fármaco de *novo* que solucione los problemas presentes en el tratamiento del TNBC resulta inviable, ya que en promedio solo el 5% de los fármacos antineoplásicos son aprobados, sin mencionar la inmensa inversión económica y el tiempo de investigación requerido.³⁰ De esta manera una de las alternativas más factibles para mejorar la respuesta en el tratamiento del TNBC es el **reposicionamiento farmacológico**.

El reposicionamiento farmacológico consiste en dar un nuevo uso terapéutico a un fármaco existente previamente aprobado para una indicación terapéutica distinta¹⁰. Fue así como en el presente proyecto se utilizó **Simvastatina**, un fármaco indicado para disminuir los niveles de colesterol en sangre, en conjunto con Doxorubicina, para evaluar el efecto de esta combinación sobre la viabilidad celular en una línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

La primera parte de este proyecto consistió en evaluar el efecto de Simvastatina sola y en combinación con Doxorubicina, sobre la viabilidad celular en un **modelo 2D** de la línea celular de cáncer de mama metastásico triple negativo **MDA-MB-231**.

Se observó que conforme aumentó la concentración de Simvastatina también aumentó la muerte celular, mostrando un comportamiento concentración-dependiente, dicho comportamiento también se observó con Doxorubicina. A partir de estos experimentos se calcularon las CI_{50} , las cuales fueron de **1.51 μM** para Simvastatina y **0.28 μM** para Doxorubicina. Por otro lado, cuando los fármacos se combinaron la CI_{50} de Doxorubicina disminuyó de **0.28 μM** a **0.17 μM** , lo cual indicó la potenciación de Doxorubicina, ya que para obtener el mismo porcentaje de muerte celular (50%) se requirió de una concentración menor que cuando se utilizó sola.

Posteriormente para distinguir el tipo de interacción farmacológica entre Simvastatina y Doxorubicina se calculó en Índice de Combinación, utilizando la ecuación matemática de Chou-Talalay. Varias concentraciones de la combinación de los fármacos resultaron en una interacción sinérgica, sin embargo, solo las concentraciones de: DOX 0.2 μ M + SIM 1.5 μ M, DOX 0.25 μ M + SIM 2.5 μ M, DOX 0.25 μ M + SIM 5.0 μ M, DOX 0.5 μ M + SIM 5.0 μ M o cercanas a estas se utilizaron en la segunda parte del proyecto.

El modelo de cultivo en 2D permitió determinar el efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular, además permitió calcular las CI_{50} para cada uno de los fármacos solos y combinados; sin embargo, estos cultivos en 2D presentan algunas limitaciones; principalmente que las células al estar organizadas en forma de monocapa no presentan las interacciones celulares propias de un tejido o tumor, además que al ser expuestas a los fármacos muestran mayor sensibilidad, lo cual podría diferir de lo que ocurre *in vivo*.

De esta manera resulta importante evaluar el efecto de los fármacos en un modelo que se asemeje más a la estructura de un tejido tumoral, y fue así como se estandarizó un **modelo de cultivo en 3D (esferoides)** utilizando la línea celular MDA-MB-231. Los esferoides son un modelo que exhibe una mayor relevancia fisiológica, lo que incluye una mejor morfología, proliferación, diferenciación, actividad metabólica, migración, angiogénesis y expresión genética³⁸. También se ha demostrado que la respuesta celular a tratamientos antineoplásicos en cultivos 3D es más parecida a lo que ocurre en un contexto clínico.

Para el establecimiento del modelo de cultivo en 3D fue necesario obtener esferoides visiblemente redondos, homogéneos, íntegros, compactos, y con un diámetro de entre 200-400 μ m, ya que estas características influyen en la sensibilidad a los fármacos. La razón por la cual se buscó obtener esferoides íntegros y compactos es que la adhesión intercelular es crucial para la supervivencia de las células; además una adhesión débil entre las células que forman el esferoide permite que los fármacos permeen fácilmente, lo que no ocurre en un tejido tumoral.

Con respecto a la morfología, se ha demostrado que los esferoides notablemente redondeados expresan proteínas de uniones estrechas como las ocludinas, las cuales aumentan la resistencia a los fármacos al suprimir la acumulación de estos⁴⁶.

Con respecto al diámetro, es importante que los esferoides tengan un tamaño aproximado entre 200-400 μm , ya que de acuerdo con Singh y colaboradores, los esferoides con un diámetro superior a 400 μm no son apropiados para evaluar la toxicidad de fármacos, ya que presentan una zona necrótica mayor, lo que significa una mayor cantidad de células muertas, lo que a su vez provoca que la captación de los fármacos sea limitada y por tanto la medición de la viabilidad y/o muerte celular después del tratamiento puede no ser representativa del efecto de los fármacos y los resultados obtenidos a través de estos esferoides serían poco confiables⁴⁷.

Fue así como para obtener esferoides con las características previamente mencionadas se probaron variables distintas como: el número de células sembradas, los días de formación del esferoide, los días de tratamiento, la concentración de colágeno, el tipo de placa de cultivo y el tiempo de centrifugación.

Después de realizar distintos experimentos, finalmente se establecieron las condiciones ideales para obtener esferoides con las características previamente mencionadas, estas fueron: sembrar 4000 células/pozo en una placa de ultra baja adherencia de fondo redondo (Nunclon Sphera, Thermo Scientific) y centrifugar durante 3 minutos, mantener la placa en incubación durante 24 horas para después adicionar colágeno tipo I a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ E8 y centrifugar nuevamente durante 3 minutos, mantener la placa en incubación durante 2 días para la formación de los esferoides y exponerlos durante 5 días a los fármacos Doxorrubicina y Simvastatina (solos y combinados).

Una vez establecidas las condiciones para la formación de los esferoides, se continuó con la siguiente etapa del proyecto, la cual consistió en determinar el efecto de la combinación de los fármacos Doxorrubicina y Simvastatina sobre la viabilidad celular; para esto además de utilizar la tinción Live&Dead también se realizó el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo el cual al cuantificar el ATP generado por las

células metabólicamente activas, nos da información más específica sobre la cantidad de células vivas y muertas en cada uno de los grupos. Después de normalizar los valores de luminiscencia y tomando como 100% la viabilidad celular del grupo control en cada uno de los experimentos, fue posible calcular el porcentaje de células vivas en cada uno de los grupos experimentales.

Así para el **Experimento 1** (Fig. 12) se evaluaron cuatro grupos: Control, DOX 0.5 μM , SIM 7.5 μM y DOX 0.5 μM +SIM 7.5 μM . Después de realizar el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo se obtuvo una viabilidad del 100% para el grupo Control, 7.49% para DOX 0.5 μM , 19.51% para SIM 7.5 μM y 0% para la combinación (DOX 0.5 μM +SIM 7.5 μM).

Para el **Experimento 2** (Fig. 13), de igual forma se evaluaron los 4 grupos, solo que con una modificación en las concentraciones de los fármacos, así los grupos se dividieron en: Control, DOX 0.25 μM , SIM 2.0 μM y DOX 0.25 μM +SIM 2.0 μM ; a pesar del cambio en las concentraciones se observó la misma tendencia que en el Experimento 1 dando como resultado un porcentaje de viabilidad para el grupo Control del 100%, 28.51% para DOX 0.25 μM , 57.96% para SIM 2.0 μM y 0% para el grupo de la combinación (DOX 0.25 μM +SIM 2.0 μM). Al realizar la prueba Live&Dead, en el grupo Control se observó la mayor cantidad de células vivas (color verde), por el contrario, para el grupo de la combinación, la mayor cantidad de células muertas se observó prácticamente en todo el esferoide el cual se observa teñido de rojo.

Como se observa, tanto en el modelo 2D como el en 3D, después de realizar los ensayos Live&Dead y CellTiter-Glo, hay una correlación entre ambos tipos de cultivo con respecto a la viabilidad celular. El grupo Control debido a que no estaba expuesto a ninguno de los fármacos, se observa la mayor cantidad de células vivas, por su parte en el grupo de Doxorubicina al ser un fármaco antineoplásico mostró una reducción notable en la viabilidad de las células, en el grupo de Simvastatina aunque no en la misma proporción que Doxorubicina también redujo el porcentaje de células vivas, por otro lado en el grupo con la combinación (Doxorubicina + Simvastatina) la cantidad de células vivas que se encontró fue mínima, incluso

menor a la que se observó cuando Doxorubicina se utilizó de forma individual, esto debido a la interacción sinérgica que existe entre los fármacos.

Este efecto sinérgico se puede explicar a partir de los mecanismos independientes de los fármacos, mientras Doxorubicina exhibe su actividad antineoplásica, Simvastatina actúa sobre las células tumorales a través de diferentes mecanismos como: inhibición de la angiogénesis, inhibición de metástasis, inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis.

La angiogénesis es un proceso que juega un papel fundamental en la progresión del cáncer ya que los tumores malignos no serían capaces de crecer más allá de unos pocos milímetros sin la formación de nueva vasculatura. Este proceso es cuidadosamente regulado por una serie de inhibidores y promotores. Uno de los promotores críticos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual su vez se encuentra regulado por la proteína **Rac1**^{48,49,50,51}.

Rac1 es una proteína de unión a GTP de peso molecular pequeño, la cual pertenece a la subfamilia Rac de la familia de las Rho GTPasas, promueve la **angiogénesis** tumoral a través de VEGF, regula la adhesión celular y la motilidad celular, además se encuentra altamente expresada en distintos tipos de tumores. Es una proteína clave en la regulación de la migración celular, ya que participa en la transducción de señales hacia el citoesqueleto, lo cual promueve el establecimiento de la polaridad celular, aspecto fundamental en la **metástasis**. Ya que Rac1 desempeña un papel fundamental en los procesos de angiogénesis y metástasis, diversos estudios demuestran que Rac1 es un objetivo importante en la terapia antitumoral⁴⁹. Se ha reportado que el tratamiento con Doxorubicina o Simvastatina utilizados por sí solos, disminuyen notablemente los niveles de Rac1, mientras que al combinar los fármacos se produce una disminución aún más significativa; a su vez el impacto en la disminución y/o inhibición de esta proteína se explica en otro estudio, en el cual al silenciar Rac1 se inhibió la formación de vasos sanguíneos, la migración celular, la invasión y la proliferación celular^{50,52}. La relación que existe entre Simvastatina y la disminución en los niveles de la proteína Rac1 es uno de los mecanismos que

podría explicar por qué este fármaco es capaz de inhibir los procesos de angiogénesis y metástasis.

También se ha comprobado la influencia de Simvastatina en la **apoptosis celular**, a través de la inducción de la activación de las caspasas 3 y 9, además del citocromo c. Se ha demostrado que la combinación de Doxorrubicina y Simvastatina aumenta los niveles de dichos mediadores en comparación a la aplicación de los fármacos de manera individual^{52,53}.

Además, Simvastatina participa en la inhibición de la proliferación celular. Diversos estudios han demostrado que las estatinas tienen un efecto supresor en el ciclo celular, Simvastatina produce una disminución en los niveles de la **ciclina D1**, la cual está involucrada en la transición G1/S, lo que produce a su vez una inhibición en la progresión del ciclo celular. Aunado a esto, Doxorrubicina combinada con Simvastatina induce significativamente la expresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina **p21**, factor importante en la regulación e inhibición del ciclo celular^{52,54}.

Simvastatina al inhibir la vía del mevalonato no solo interfiere en la síntesis de colesterol, sino también en la disminución de diversos intermediarios isoprenoides como el farnesil pirofosfato (**FPP**) y geranylgeranyl pirofosfato (**GGPP**), estos intermediarios son necesarios para la modificación postraduccional (prenilación) de las proteínas G, las cuales incluye a **Ras, Rho y Rac**⁵².

Dichas proteínas son las encargadas de la regulación de diferentes mecanismos celulares como **migración, invasión y proliferación celular**; así al verse reducida la síntesis de mevalonato a causa de Simvastatina, también lo harán el FPP y GGPP y en consecuencia también se observará una disminución en la expresión de las proteínas Ras, Rho y Rac, y por lo tanto habrá una disminución en la proliferación y migración de las células tumorales^{11,52}.

11. CONCLUSIONES

- La adición de Simvastatina al tratamiento de Doxorubicina mostró un efecto sinérgico en la viabilidad de las células MDA-MB-231.
- La combinación de Simvastatina y Doxorubicina mostró un mayor efecto citotóxico en esferoides de la línea celular MDA-MB-231.

12. PERSPECTIVAS

Se propone evaluar el efecto de la combinación de los fármacos Doxorubicina y Simvastatina en las diferentes proteínas que están involucradas en el proceso de migración celular y metástasis.

13. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer de mama [Internet]: OMS;2023. [citado 29 de noviembre 2023].
Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
2. Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet]: OMS; 2023. [citado 17 de enero 2024].
Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Fernández JÁ, Ozores PP, López VC, Mosquera AC, López RL. Cáncer de mama. *Medicine* [Internet]. 2021;13(27):1506–17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.med.2021.03.002>
4. Breast cancer [Internet]. Who.int. [citado 5 diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
5. Instituto Mexicano del Seguro Social. Epidemiología del cáncer de mama [Internet]. Gobierno de México [citado 5 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
6. Almansour NM. Triple-negative breast cancer: A brief review about epidemiology, risk factors, signaling pathways, treatment, and role of artificial intelligence. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2022;9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2022.836417>
7. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2016;13(11):674–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>
8. Hsiao C-H, Huang H-L, Chen Y-H, Chen M-L, Lin Y-H. Enhanced antitumor effect of doxorubicin through active-targeted nanoparticles in doxorubicin-resistant triple-negative breast cancer. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2022;77(103845):103845. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103845>
9. Paramanatham A, Jung E, Kim H, Jeong B, Jung J-M, Kim G, et al. Doxorubicin-resistant TNBC cells exhibit rapid growth with cancer stem cell-like properties and EMT phenotype, which can be transferred to parental cells through autocrine signaling. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(22):12438. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212438>
10. Parra HH. Reposicionamiento de fármacos para la Enfermedad de Parkinson y estrategias de nanotecnología farmacéutica para su optimización. Tesis de maestría. México; CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL; 2021. Disponible en: <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/3993/SSIT0019062.pdf?sequence=1>
11. Duarte JA, de Barros ALB, Leite EA. The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;141(111858):111858. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111858>
12. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory [Internet]. iarc.fr. [citado 26 de enero 2024]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
13. CDC español. ¿Cuáles son los síntomas del cáncer de mama? [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2023 [citado 26 de enero 2024]. Available from: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/symptoms.htm
14. Fundación Grupo Español de Investigación en Cáncer de mama. ¿Qué es el cáncer de mama? Tipos de tumores [Internet]. Geicam. [citado 06 de octubre

- 2022]. Disponible en: <https://www.geicam.org/cancer-de-mama/tengo-cancer-de-mama/conoce-mejor-tu-enfermedad/tipos-de-tumores>
15. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. In: Breast Cancer. Exon Publications; 2022. p. 31–42.
 16. Obidiro O, Battogtokh G, Akala EO. Triple negative breast cancer treatment options and limitations: Future outlook. *Pharmaceutics* [Internet]. 2023;15(7). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15071796>
 17. Yin L, Duan J-J, Bian X-W, Yu S-C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2020;22(1):61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
 18. Triple Negative Breast Cancer. [Internet]. Pennmedicine.org. [citado 05 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.pennmedicine.org/cancer/types-of-cancer/breast-cancer/types-of-breast-cancer/triplegenegative-breast-cancer>
 19. Mutaciones en el gen BRCA: el riesgo de cáncer y las pruebas genéticas [Internet]. Instituto Nacional del Cáncer. 2021 [citado 05 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca>
 20. Treatment of triple-negative breast cancer [Internet]. Cancer.org. [citado 07 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/treatment-of-triple-negative.html>
 21. Li L, Zhang F, Liu Z, Fan Z. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: Combination strategies to improve outcome. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2023;15(1):321. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers15010321>
 22. Ferrara N. Understanding triple-negative breast cancer and its treatment [Internet]. Mayo Clinic Comprehensive Cancer Center Blog. 2024 [citado 08 de marzo 2024]. Disponible en: <https://cancerblog.mayoclinic.org/2024/01/03/understanding-triple-negative-breast-cancer-and-its-treatment/>
 23. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems: Doxorubicin cell and molecular biological activity. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2013;65(2):157–70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
 24. Linders, A.N., Dias, I.B., López Fernández, T. *et al.* A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *npj Aging* [Internet]. 2024;10, (9). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00135-7>
 25. Meredith A-M, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2016;68(6):729–41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12539>
 26. Brenner GM, Stevens C. Brenner and Stevens' Pharmacology. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier - Health Sciences Division; 2017.
 27. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* [Internet]. 2011;21(7):440–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/fpc.0b013e32833ffb56>
 28. Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sci* [Internet]. 2021;278(119527):119527. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
 29. Cheong A, McGrath S, Robinson T, Maliki R, Spurling A, Lock P, et al. A switch in mechanism of action prevents doxorubicin-mediated cardiac damage. *Biochem*

- Pharmacol [Internet]. 2021;185(114410):114410. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114410>
30. Sleire L, Førde HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PØ. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res* [Internet]. 2017; 124:74–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.013>
 31. Matuszewicz L, Meissner J, Toporkiewicz M, Sikorski AF. The effect of statins on cancer cells—review. *Tumour Biol* [Internet]. 2015;36(7):4889–904. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3551-7>
 32. PubChem. Simvastatin [Internet]. Nih.gov. [citado 25 de abril 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Simvastatin>
 33. Mohammed K, Maadh Q, Halah A, Adul-Hafeedh, Abdul-Wahab, Zainab A. Hydroxy Methylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors (Statins), Mechanism of Action, Chemistry, Pharmacokinetics and their Relative Efficacy for Improving the Lipid Profile. *J. Adv. Res. Chem. Sci.*, 1 (4): 52-62, 2021.
 34. Jiang W, Hu J-W, He X-R, Jin W-L, He X-Y. Statins: a repurposed drug to fight cancer. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2021;40(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-021-02041-2>
 35. Nowakowska MK, Lei X, Thompson MT, Shaitelman SF, Wehner MR, Woodward WA, et al. Association of statin use with clinical outcomes in patients with triple-negative breast cancer. *Cancer* [Internet]. 2021;127(22):4142–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.33797>
 36. O’Grady S, Crown J, Duffy MJ. Statins inhibit proliferation and induce apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Med Oncol* [Internet]. 2022;39(10). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-022-01733-9>
 37. Saji Joseph J, Tebogo Malindisa S, Ntwasa M. Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culturing in drug discovery. In: *Cell Culture*. IntechOpen; 2019.
 38. Spheroids: properties, image analysis, and culture methods [Internet]. Cytosmart.com. [citado 17 de mayo 2024]. Disponible en: <https://cytosmart.com/resources/resources/spheroids-properties-image-analysis-and-culture-methods>
 39. Khanna S, Chauhan A, Bhatt AN, Dwarakanath BSR. Multicellular tumor spheroids as in vitro models for studying tumor responses to anticancer therapies. In: *Animal Biotechnology*. Elsevier; 2020. p. 251–68.
 40. Spheroids [Internet]. 4Dcell. [citado 18 mayo 2024]. Disponible en: <https://www.4dcell.com/cell-culture-application-notes/spheroids/>
 41. Spheroid culture techniques – [Internet]. faCellitate. 2022 [citado 18 mayo 2024]. Disponible en: <https://facellitate.com/spheroid-culture-techniques/>
 42. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* [Internet]. 2016; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
 43. Xiong N, Wu H, Yu Z. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies. *Front Oncol* [Internet]. 2024; 14:1405491. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2024.1405491>
 44. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;139(111708):111708. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111708>

45. Bartkowiak A, Nazaruk E, Gajda E, Godlewska M, Gawel D, Jablonowska E, et al. Simvastatin coadministration modulates the electrostatically driven incorporation of doxorubicin into model lipid and cell membranes. *ACS Biomater Sci Eng* [Internet]. 2022;8(10):4354–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00724>
46. Muguruma M, Teraoka S, Miyahara K, Ueda A, Asaoka M, Okazaki M, et al. Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020;533(3):268–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.075>
47. Singh SK, Abbas S, Saxena AK, Tiwari S, Sharma LK, Tiwari M. Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome. *Biotechniques* [Internet]. 2020;69(5):333–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2144/btn-2020-0081>
48. Greenberg S, Rugo HS. Triple-negative breast cancer: role of antiangiogenic agents. *Cancer J* [Internet]. 2010;16(1):33–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181d38514>
49. Ma N, Xu E, Luo Q, Song G. Rac1: A regulator of cell migration and a potential target for cancer therapy. *Molecules* [Internet]. 2023;28(7):2976. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28072976>
50. Vader P, van der Meel R, Symons MH, Fens MHAM, Pieters E, Wilschut KJ, et al. Examining the role of Rac1 in tumor angiogenesis and growth: a clinically relevant RNAi-mediated approach. *Angiogenesis* [Internet]. 2011;14(4):457–66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-011-9229-x>
51. Ren W, Liang H, Sun J, Cheng Z, Liu W, Wu Y, et al. TNFAIP2 promotes HIF1 α transcription and breast cancer angiogenesis by activating the Rac1-ERK-AP1 signaling axis. *Cell Death Dis* [Internet]. 2024;15(11):821. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-024-07223-2>
52. Buranrat B, Suwannaloet W, Naowaboot J. Simvastatin potentiates doxorubicin activity against MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Lett* [Internet]. 2017;14(5):6243–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.6783>
53. Sadeghi-Aliabadi H, Minaiyan M, Dabestan A. Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells. *Res Pharm Sci*. 2010;5(2):127–33.
54. Dewidar SA, Hamdy O, Soliman MM, El Gayar AM, El-Mesery M. Enhanced therapeutic efficacy of doxorubicin/cyclophosphamide in combination with pitavastatin or simvastatin against breast cancer cells. *Med Oncol* [Internet]. 2023;41(1):7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-023-02248-7D>