UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto de la Simvastatina sobre las vías de señalización PI3K, MAPK y Rho GTPasa en osteosarcoma

FELIPE ANDRES GAITAN ALBARRACIN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2014

Efecto de la Simvastatina sobre las vías de señalización PI3K, MAPK y Rho GTPasa en osteosarcoma

FELIPE ANDRES GAITAN ALBARRACIN

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Bioquímica

Directora:
Yadi Adriana Umaña Pérez
MSc. Doctor en Ciencias

Línea de Investigación:

Factores de crecimiento, diferenciación y cáncer

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en Hormonas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2014

Dedico este trabajo a mis padres y mi hermano por su apoyo incondicional y paciencia a lo largo de la consecución de este proyecto.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigación sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia (Proyectos DIB 12243,14233).

Al Grupo de Investigación en Hormonas, en especial a Adriana Umaña Pérez por dirigir este trabajo de grado y a Myriam Sánchez de Gómez, directora del Grupo de Investigación en Hormonas

Resumen

Las estatinas son una familia de medicamentos usados actualmente en el control de enfermedades asociadas con problemas de colesterol, aunque se les han asociados diferentes efectos pleiotropicos dentro de los cuales toma relevancia su efecto anti-tumoral. Se evidenció un efecto diferencial dosis dependiente de la simvastatina sobre la viabilidad, migración, adhesión e invasión celular entre el modelo de osteosarcoma y una línea no tumoral de osteoblastos, la cual presentó una mayor tolerancia al medicamento sugiriendo su potencial uso terapéutico en el control del cáncer.

Palabras clave: Osteoblastos, Osteosarcoma, Simvastatina, Pleiotropico.

Abstract

Statins are a family of medications currently used on the control of diseases associated with cholesterol problems, although they have been associated different pleiotropic effects within which takes relevance its effect anti-tumor. A differential dose-dependent effect in cell viability, migration, adhesion and invasion was observed in response to simvastatin in osteosarcoma cells compared to non tumoral osteoblasts. On the other hand, non-tumor cell line taking a greater tolerance to the drug indicating their use in the beneficial of cancer control.

Keywords: Osteoblasts, Osteosarcoma, Simvastatin, Pleiotropic.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XV**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XVI**

Introducción **1**

1. Marco Teórico **3**
1.1 Osteosarcoma 3
1.1.1 Tumorogénesis del OS 4
1.1.2 Tratamiento del osteosarcoma 6
1.2 Estatinas 7
1.2.1 Vías de señalización asociadas a estatinas 9

2. Objetivos **15**
2.1 Objetivo General 15
2.2 Objetivo Específicos 15

3. Materiales y Métodos **17**
3.1 Modelos biológicos 17
3.1.1 Línea celular derivada de Osteosarcoma de rata 17
3.1.2 Línea celular no tumoral de Osteoblastos de rata 17
3.2 Tratamientos 19
3.2.1 IGFs 19
3.2.2 Simvastatina 19
3.3 Determinación del efecto de simvastatina en la viabilidad celular 19
3.4 Determinación del efecto de simvastatina sobre migración, adhesión e invasión celular 20
3.4.1 Ensayo de migración celular por curación de herida (Wound Healing) 20
3.4.2 Ensayo de adhesión celular 20
3.4.3 Determinación de la actividad de MMPs 21
3.5 Determinación de cambios en la expresión génica de UMR-106 en respuesta a simvastatina 21
3.5.1 Extracción de RNA 21
3.5.2 Transcripción reversa (RT-PCR) 21

3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR) 22
3.6 Determinación de cambios en la expresión proteica de UMR-106 en respuesta a simvastatina 23
3.6.1 Obtención de extractos celulares 23
3.6.2 Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida ... 23
3.6.3 Western Blotting 23
3.6.4 Separación de proteínas en electroforesis bidimensional (2DE) 25
3.6.5 Tinción de geles 25
3.7 Ensayo de fraccionamiento de DNA (DNA Ladder) 26
3.8 Análisis estadístico 26
3.9 Consideraciones éticas 27

4. Resultados 29
4.1 Obtención y caracterización de una línea de osteoblastos de rata 29
4.2 Efecto de la simvastatina en la viabilidad celular de rOB-GIH 34
4.3 Efecto de la simvastatina en la migración celular 37
4.4 Efecto de la simvastatina en la capacidad de adhesión celular 42
4.5 Efecto de la simvastatina en el remodelamiento de la matriz extracelular e invasión celular 43
4.6 Efecto de la simvastatina en la expresión génica de MMPs 47
4.7 Efecto de la simvastatina en la inducción de apoptosis en la línea UMR-106 47
4.8 Efecto de simvastatina en la señalización por Rho, PI3K/Akt y MAPK/ERK en UMR-106 49
4.8.1 Efecto de la simvastatina sobre RhoA 50
4.8.2 Efecto de la simvastatina sobre PI3K/ Akt y Erk 50
4.9 Aproximación al proteoma de UMR 106 54

5. Discusión 59
5.1 La simvastatina tiene un efecto bimodal en la viabilidad celular de osteoblastos no tumorales 60
5.2 La simvastatina disminuye la migración y adhesión celular en osteoblastos y osteosarcoma 61
5.3 La simvastatina disminuye la invasión celular en UMR-106 63
5.4 La simvastatina modula la expresión de Rho A, ERK y Akt 64

6. Conclusiones 69

7. Bibliografía 71

Lista de figuras

		Pág.
Figura 1-1	Representación de la biosíntesis del colesterol	8
Figura 4-1	Micrografía del producto de digestión con tripsina de bóveda craneal	30
Figura 4-2	Micrografía de suspensión celular producto de digestión con colágenasa	30
Figura 4-3	Micrografía de la suspensión celular no diferenciada	31
Figura 4-4	Micrografía de cultivo primario de osteoblastos de rata rOB-GIH	32
Figura 4-5	Parámetros de caracterización de la línea rOB-GIH	33
Figura 4-6	Micrografía de cultivo rOB-GIH en presencia de MTT	34
Figura 4-7	Efecto de simvastatina en la viabilidad celular de rOB-GIH a dosis inferiores a 1 µM	35
Figura 4-8	Efecto de simvastatina en la viabilidad celular de rOB-GIH a dosis superiores a 3 µM	36
Figura 4-9	Efecto citotóxico de la simvastatina en rOB-GIH	36
Figura 4-10	Micrografías de ensayo curación de herida en la línea rOB-GIH	37
Figura 4-11	Efecto de simvastatina en la migración celular de rOB-GIH	38
Figura 4-12	Micrografías de ensayo curación de herida en la línea UMR-106	39
Figura 4-13	Efecto de simvastatina en la migración celular de la línea UMR-106	40
Figura 4-14	Efecto de la simvastatina en la adhesión celular de la línea UMR-106	42
Figura 4-15	Efecto de la simvastatina en la actividad gelatinasa de MMPs en rOB-GIH	43
Figura 4-16	Efecto de la simvastatina sobre la actividad gelatinasa de MMPs en rOBGIH en presencia de SFB	44

Figura 4-17 Efecto de la simvastatina en la actividad gelatinasa de MMPs en UMR-106 45

Figura 4-18 Efecto de la simvastatina en la expresión génica de MMP 9 en UMR-106 47

Figura 4-19 Efecto de la simvastatina sobre la apoptosis de UMR-106 48

Figura 4-20 Efecto de la simvastatina en la expresión génica de Rho A en UMR 106 50

Figura 4-21 Efecto de la simvastatina en la expresión del receptor tirosina quinasa para IGF-I en la línea UMR-106 51

Figura 4-22 Efecto de la simvastatina en Erk 1/2 en la línea UMR-106 52

Figura 4-24 Efecto de la simvastatina en la expresión de Akt en la línea UMR-106 53

Figura 4-24 Perfil electroforético en dos dimensiones de la línea UMR-106 54

Figura 4-25 Spots representativos de cambio en tratamiento de UMR 106 con simvastatina 55

Figura 4-26 Análisis de factores de geles bidimensionales de la línea UMR 106 57

Lista de tablas

		Pág.
Tabla 1-1	Clasificación del osteosarcoma	4
Tabla 3-1	Información de genes cuantificados en qPCR	22
Tabla 3-2	Condiciones de análisis de proteínas en Western Blotting	24
Tabla 3-3	Programa de isoelectroenfoque	25
Tabla 4-1	Aspectos generales del cultivo primario de osteoblastos	33

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ACN	Acetonitrilo
Akt/PKB	Proteina quinasa B
ALP	Fosfatasa Alcalina
ATCC	American Type Culture Collection
ATA	Ácido Tricloroacético
BCA	Ácido bicinconínico
BCR	Dominio de homología (Break Point-Cluster)
BSA	Albumina de suero bovino
CTGF	Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo
cDNA	Ácido Deoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido Deoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DPI	Puntos por pulgada
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético
ERK	Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares
Fos	FBJ Murine Osteosarcoma
GAPs	Proteínas activadoras GTPasa
GEFs	Factores intercambiadores de nucleótidos Guanina
GDIs	Inhibidores de disociación a GDP
GDP	Guanosindifosfato
GTP	Guanosintrifosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa
IAA	Iodoacetamida
IEF	Enfoque Isoeléctrico
IGF	Factores de Crecimiento Similares a Insulina
IGF-R	Receptor de Factores de Crecimiento Similares a Insulina
ILK	Quinasas Ligadas a Integrinas
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
JNK	c-Jun N-terminal Quinasa
LDH	Lactato Deshidrogenasa

MAPK	Proteína Quinasa activada por mitogenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MALDI	Desorción/ionización con láser asistida por matriz
MEK /MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mDia / Drf1	Diaphanous-related formin-1
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTP-PE	Tripeptido Muramil-fosfatidiletanolamina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OS	Osteosarcoma
osDMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium Osteogenico
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Quinasa
PIP3 / PI(3,4,5)P3	Fosfatidilinositol 3,4,5-Trifosfato
PI(3,4)P_2	Fosfatidilinositol 3,4,5-Bifosfato
PDK	Quinasas Dependientes de Fosfoinositidos
PH	Pleckstrin Homology Domain
PKC	Proteínas Quinasas C
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
Ras	Sarcoma de rata (Rat sarcome)
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Rb	Retinoblastoma
RBD	Dominio de Unión a Ras
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
Rho	Ras homologa
RNA	Ácido Ribonucleico
ROCK	Quinasa de Rho
RPTK	Receptores con Actividad Tirosina Quinasa
SFB	Suero Fetal Bovino
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TBS	Solución salina amortiguada por Tris
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	Ácido Ribonucleico de tranferencia
TOF	Detector de tiempo de vuelo
2DE-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

Introducción

El osteosarcoma es el más común de los tumores malignos de hueso. Ocurre predominantemente entre la primera y segunda década de la vida, aunque se han descrito comportamientos bimodales de ocurrencia afectando población de adultos mayores. A pesar de un control efectivo del tumor primario, el 30% de los pacientes desarrolla metástasis a los pulmones en un periodo inferior a los 5 años de tratamiento [1]. Pacientes que presentan enfermedad metastásica o desarrollan recurrencia, son aquellos con peor pronóstico [2]. Los intentos por mejorar la supervivencia en estos pacientes usando aumento o intensificación de la quimioterapia han sido infructuosos. Esto ha generado la necesidad de optar y buscar nuevas aproximaciones en el tratamiento [2, 3].

En este sentido, el uso de las estatinas como una estrategia quimioterapéutica en el tratamiento del cáncer se ha considerado muy promisoria desde hace ya varios años. Las estatinas son medicamentos indicados para tratar enfermedades cardiovasculares asociadas a hipercolesterolemia debido a su carácter inhibidor de la 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), enzima involucrada en la síntesis de colesterol. No obstante, su repercusión en intermediarios como el farnesil pirofosfato y el geranilgeranil pirofosfato, importantes en la modificación postraduccional de proteínas cuyas vías de señalización han sido vinculadas a proliferación, crecimiento, migración, invasión, y motilidad celular, las hizo merecedoras de estudio en prevención del cáncer. Diversos estudios reconocen a las estatinas como inductoras de apoptosis e inhibidoras de la proliferación celular.

A la fecha el mecanismo mediante el cual las estatinas ejercen sus acciones anticancerígenas no se ha esclarecido. Aunque estos efectos se han atribuido de forma casi exclusiva a la inhibición de la formación de intermediarios metabólicos asociados a proteínas Rho GTPasa, ensayos en modelos celulares en proceso de diferenciación en presencia de estatinas a bajas concentraciones han perfilado la posibilidad de mecanismos independientes de la acción sobre la HMG-CoA reductasa [4].

Como antecedente a este trabajo, Sandoval y cols en el grupo de investigación establecieron que el osteosarcoma es sensible a la acción de la simvastatina, estatina lipofilica altamente tolerada por el ser humano [5, 6]. Particularmente, en el modelo celular de osteosarcoma UMR-106 la simvastatina en altas concentraciones indujo apoptosis y disminución de la proliferación de células tumorales de una forma dosis y tiempo dependiente. Igualmente se observó alteración de los procesos de migración celular en dosis de 10 µM. En otros modelos in vitro, los efectos anti-carcinogénicos de algunas estatinas han sido asociados a suministro de dosis supra fisiológicas.

Teniendo en cuenta que la simvastatina absorbida por el cuerpo humano requiere de activación en el hígado antes de ejercer su acción, es probable que la concentración en circulación sea inferior a la ingerida. De acuerdo con ello, este trabajo se planteó con el objetivo de esclarecer si la simvastatina en dosis bajas mantiene sus efectos pleiotropicos sobre eventos propios de células tumorales. Adicionalmente, indagar en el papel que desempeña esta estatina sobre proteínas de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK, blancos posibles de modulación terapéutica por su participación en proliferación y eventos con carácter anti-apoptótico.

Los resultados de este trabajo refuerzan el efecto dosis-dependiente de la simvastatina en osteosarcoma de rata. Se observó modulación de la viabilidad celular y de los procesos de adhesión, migración, e invasión celular a dosis inferiores a la IC50 de simvastatina en osteosarcoma. Interesantemente, se determinó que existe una mayor sensibilidad al medicamento en las células tumorales en comparación con osteoblastos no tumorales obtenidos en el desarrollo de este trabajo. Los cambios funcionales pueden atribuirse parcialmente a disminución en la cantidad y actividad de ERK1/2 como alteración en la proteína Akt en forma dosis dependiente de la simvastatina. En este orden de ideas, la activación de receptores tirosina quinasa o sus sustratos puede ser un punto clave en el mecanismo de acción de la simvastatina.

1. Marco Teórico

1.1 Osteosarcoma

El Osteosarcoma (OS) es un tumor maligno primario del sistema óseo, caracterizado por la formación de tejido osteoide o hueso inmaduro; de origen mesenquimal. Este tipo de cáncer, afecta a la población con un patrón de distribución bimodal, con un primer y más relevante pico que afecta principalmente a niños, adolescentes y adultos jóvenes, y un segundo pico que afecta a adultos mayores [1, 2]. El OS afecta independientemente del sexo con una leve predominancia masculina, en razas afro-descendientes e hispánicas y en una menor proporción a caucásicas [2, 3]. Dentro de estos grupos poblacionales, el 75% de los casos reportados se dan entre los 15 y 25 años de edad, sugiriendo que el OS se desarrolla principalmente en huesos en etapas de crecimiento como las experimentadas durante la pubertad y etapas finales del desarrollo [3]. Teniendo en cuenta que dentro del OS se encuentran diferentes tipos de sarcomas en hueso, la Organización Mundial para la Salud (OMS) propuso una división histo-morfológica del OS según el subtipo celular en Osteoblástico (Osteosarcoma), Condroblástico (Condrosarcoma) y Fibroblástico (Sarcoma de Ewing). El subtipo celular predominante es el osteoblástico, frecuentemente asociado con procesos de malignización (Tabla 1) [7, 8].

Se ha identificado que en este tipo de cáncer, cerca del 80 al 90% de los casos se desarrollan en huesos largos como el fémur o la tibia y principalmente se origina en la metáfisis del hueso y muy raramente en la epífisis [2, 9]. Adicionalmente en un porcentaje bajo, cercano al 1%, el OS afecta estructuras del esqueleto axial.

El diagnóstico de la existencia de OS se realiza por pruebas de laboratorio que incluyen conteos completos de sangre, electrolitos en suero, calcio y magnesio, entre otros. Otros parámetros comunes a identificar son los niveles incrementados de fosfatasa alcalina (ALP) y de lactato deshidrogenasa (LDH). Estas enzimas se encuentran elevadas en un rango de 30 a 40%, y permiten indicar el estado de la carga tumoral [2, 7].

Tabla 1-1: Clasificación del osteosarcoma según el sub-tipo celular, posición en el sistema óseo y rareza con relación a su ocurrencia en la población [7].

Osteosarcoma convencional
-Osteoblástico (Osteosarcoma)
-Condroblástico (Condrosarcoma)
-Fibroblástico (Sarcoma de Ewing)
Variantes raras de Osteosarcoma de alto grado
.-Telangiactatico
-Osteosarcoma de pequeñas células
-Osteosarcoma epitelioide
-Osteosarcoma rico en células gigantes
Osteosarcoma del hueso cráneo-facial
Osteosarcoma intramedular bien diferenciado
Osteosarcoma Parostial
Osteosarcoma Peristial
Osteosarcoma superficial de alto grado
Osteosarcoma secundario

En algunos centros médicos este tipo de pruebas se han desestimado por su poca utilidad y bajo valor pronóstico [7, 10]; dando paso a herramientas basadas en rayos X o resonancia magnética nuclear seguida por una biopsia del área afectada [7, 11]. Lamentablemente, el factor prognóstico más consistente en OS es el cáncer en una etapa metastática [10-12]. Este tipo de tumores, frecuentemente de fenotipo agresivo, presenta metástasis a pulmón, u otros sitios adyacentes en el mismo hueso en cerca del 20% de los pacientes [9, 10].

1.1.1 Tumorogénesis del OS

La tumorogénesis del OS se ve influenciada por múltiples factores físicos, químicos y biológicos. Uno de estos factores físicos directamente relacionados con el desarrollo de OS es la exposición a radiación ultravioleta o ionizante, responsable del 2% de los casos reportados, adicionalmente se reconoce que el uso de radioterapia en tumores sólidos en niños son los causantes del 5.4% de los casos de neoplasias secundarias en el mismo tejido o tejidos adyacentes [3, 13]. De igual forma se asocian agentes químicos como inductores de OS tales como las sales de metilcolantreno y cromo, óxidos y silicatos de berilio, asbesto y anilina, entre otros [13].

- Tumorogénesis dependiente de alteraciones genéticas y moleculares

En OS se han identificado anormalidades biológicas a nivel genético y molecular. Inicialmente se identificaron inestabilidades cromosomales como poliploidias causadas por errores en la mitosis, aneuploidias, deleciones y translocaciones, inestabilidad en microsatélite e islotes de metilación [14]. Adicionalmente se han asociado con OS algunos síndromes hereditarios como los síndromes de Bloom, Li- Fraumeni, Werner, Rothmund-Thomson, y Retinoblastoma (RB) hereditaria [14]. En la mayoría de los síndromes mencionados se observaron defectos genéticos en la familia RECQ de helicasas, las cuales corresponden a una familia conservada de proteínas responsables de la separación de las hebras de DNA para la replicación (RECQL4 en RothmundThomson, RECQL2 en Werner y RECQL3 en Bloom) [15]. En los síndromes de Li- Fraumeni y RB la alteración genética se basa en la disfunción genética de supresores tumorales de p53 y Rb, los cuales se encuentran asociados a la patogénesis de OS. El gen p53 se encuentra mutado en el 22% de casos de OS [15]. El síndrome de Li- Fraumeni se considera la condición prototipo por presentar una mutación autosomal dominante en el gen supresor tumoral p53, involucrado en la regulación del ciclo celular así como el mantenimiento de la integridad genómica celular [14-16]. De igual forma, en el 70% de los casos los pacientes con mutaciones en el gen RB se ha identificado un aumento en el riesgo de desarrollar OS [16].

Otro factor muy importante en el proceso de la tumorogénesis del OS es la desregulación en la transcripción mediante alteraciones en la expresión o regulación de oncogenes, entre los cuales se han identificado *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *Her-2*, *MET*, *SAS* y *GLI*. Aberraciones en la expresión de *c-myc* se asocian con la resistencia a la quimioterapia en OS, por lo cual este factor se ha propuesto como un blanco terapéutico. Otro protooncogen que se encuentra sobre expresado es *Her-2,* éste codifica para el receptor 2 trans-membranal tirosina quinasa del factor de crecimiento epidermal humano, también asociado a la respuesta quimioterapéutica. Por otro lado es posible encontrar sobreregulada las proteínas *Jun* y *Fos*, las cuales como parte del factor de transcripción AP-1 regulan procesos como proliferación y diferenciación celular desempeñando un papel importante en la diferenciación de osteoclastos y la trasformación de los osteoblastos, al igual que la propensión al desarrollo de metástasis [13, 16]

- Tumorogénesis por efecto de factores de crecimiento

Las células de OS tienen la capacidad de producir y expresar diferentes factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Transformante (*TGF*), Factores de Crecimiento Similares a Insulina (*IGFs*) y Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo (*CTGF*), al igual que los receptores para cada uno de ellos. La sobreexpresión de receptores y actividad constitutiva conduce a una sobre activación de la señal transducida asociada a cada receptor redundando en una proliferación celular acelerada y en inhibición de la apoptosis [14]. En OS los IGFs se encuentran frecuentemente sobre expresados, y la señalización por el receptor IGF-IR ha sido implicada en la inducción de la malignización [15]. La sobreexpresión de CTGF, el cual actúa a través de las vías de señalización asociadas a integrinas y TGF-β, también interfiere con funciones de adhesión, migración, proliferación, angiogénesis, diferenciación y supervivencia celular [13].

1.1.2 Tratamiento del osteosarcoma

En los últimos treinta años la prognosis del OS y así mismo la calidad de vida de los pacientes que lo presentan ha mejorado significativamente. La tasa de supervivencia se ha incrementado de un 10% a un 70%, principalmente en pacientes que emplean más de un tratamiento, mezclando alternativas quirúrgicas con quimioterapia, al igual que diferentes alternativas quimioterapéuticas en simultáneo [17].

En el tratamiento del OS una de las alternativas más ampliamente implementada a través del tiempo, ha sido la extirpación quirúrgica del tumor y de cualquier tejido adyacente potencialmente contaminado o metastático. Aunque las alternativas quirúrgicas son diversas, comúnmente la cirugía se basa en la amputación del hueso donde se localiza el tumor, con el fin de garantizar la eliminación total de cualquier célula o tejido malignizado [10].

La quimioterapia es otra de las alternativas para controlar y eliminar el cáncer. Inicialmente en OS se administrada con base en un único agente quimioterapéutico, pero luego fue evidente que la implementación de protocolos combinados de medicamentos ofrecen resultados más favorables [10]. Muchos protocolos quimioterapéuticos se han desarrollado basados en la combinación de cuatro medicamentos específicos, Metotrexato, Doxorubicina, Cisplatino e Ifosfamida en altas dosis [18]. Gracias a este tratamiento en conjunto y su administración por tiempos largos, la tasa de supervivencia en OS se incrementó en un 65% y en pacientes con cáncer en estado metastático de 3035% [18, 19]. Otros medicamentos como la Bleomicina, Ciclofosfamida y Dactinomicina se han puesto a prueba en OS pero han sido eliminados por su baja eficiencia [19].

Aunque los agentes quimioterapéuticos actuales resultan ser eficientes, se han reportado que presentan diferentes efectos secundarios, que van desde alopecia y nauseas hasta inducción temprana de la menopausia en mujeres, enfermedades cardiacas, disfunción hepática e incluso la muerte. Uno de los efectos secundarios más relevantes observados por el uso de estos agentes quimioterapéuticos es el aumento en el riesgo de la formación de neoplasias secundarias malignas en las que se incluye la leucemia, cáncer de seno y otros tipos de sarcomas [19].

Por otra parte, un fenómeno aún no muy bien establecido por qué y como ocurre, es la aparición de la resistencia por parte del OS a la quimioterapia. Actualmente se presenta entre un 30-45% de resistencia a la quimioterapia con Metotrexato, Doxorubicina, Cisplatino y la propuesta más acogida respecto a la adquisición de este fenotipo implica perturbaciones en diferentes vías de señalización tales como activación y sobreexpresión de HRR2/neu, MAPK y PI3K. Los efectos a nivel celular que soportan la resistencia se basan en un incremento de la salida del medicamento, incremento en la desintoxicación intracelular, alteraciones de la topoisomerasa II e incremento en la reparación de los daños causados en el DNA entre otros [19, 20].

En este orden de ideas ha surgido la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento del OS [20]. Alternativas terapéuticas diseñadas con el fin de aumentar los índices de supervivencia y atacar de forma más específicas a las células tumorales han empleado agentes inmunomodulatorios como el Tripeptido Muramil-fosfatidiletanolamina (MTP-PE), que estimula la expresión de monocitos y macrófagos, al igual que respuestas pro inflamatorias mediadas por citoquinas, para que de esta forma el ataque a las células malignizadas sea directo y especifico [10, 21]

Otra estrategia terapéutica usada para contrarrestar el OS es el uso de inhibidores de vías de transducción de señales. Como se nombró anteriormente en las células con OS es común observar una serie de aberraciones en diferentes vías de señalización, por lo tanto la mejor estrategia para controlar este fenómeno es evitar o inhibir la activación de estas vías o alguno de su efectores corriente abajo. Las vías de señalización iniciadas por factores de crecimiento son potencialmente tumorogénicas, por ello para su control se ha propuesto el uso de moléculas semi-especificas inhibidoras de la función tirosina quinasa [10, 18]. No obstante, la semi-especificidad puede generar reacciones cruzadas y posiblemente alteraciones no deseadas en otros procesos.

Aunque actualmente las alternativas en el tratamiento del OS son variadas, no ha sido posible encontrar una alternativa ideal, todas ellas ofrecen diferentes beneficios, pero al mismo tiempo presentan riesgos en su uso. Interesantemente, se ha reportado a las estatinas como inductoras de efectos benéficos para el tratamiento del OS, por su reducción de la proliferación, migración e invasión celular al igual que la inducción de apoptosis celular [22].

1.2 Estatinas

Las estatinas son una familia de medicamentos de origen natural (Mevastatina, Lovastatina) descubierta en los años 70, a partir de metabolitos secundarios de ciertos hongos como *Penicillim citrinum o Aspergillus terreus.* Dentro de esta familia encontramos también medicamentos químicamente modificados a partir de los mismos metabolitos (Simvastatina, Pravastatina) o cien por ciento sintéticos (Atorvastatina, Cerivastatina, Fluvastatina, Pitavastatina y Rosuvastatina), todas ellas con la habilidad de regular la biosíntesis del colesterol [23].

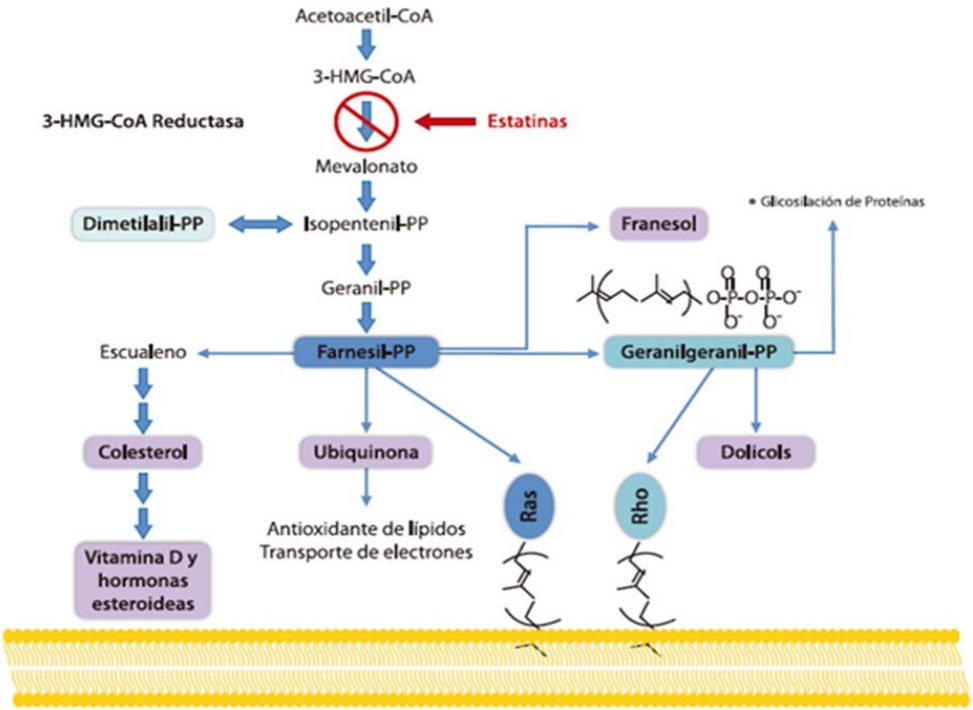
Las estatinas son inhibidores competitivos altamente eficientes de la 3-hidroxi-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima que cataliza la conversión de la HMG-CoA en ácido L- mevalónico y su unión es aproximadamente 1000 veces más efectiva que la unión de la enzima por su sustrato natural [24]. La inhibición de la acción de la HMG-CoA reductasa induce cambios en la producción de esteroides como el colesterol (clave para el mantenimiento de la integridad de la membrana celular), coenzima Q, (involucrada en la cadena transportadora de electrones y respiración celular), dolicol (requerido para la formación de glicoproteínas) e isopentanilamida (esencial para la función de ciertos tRNAs) y la síntesis de proteínas [25, 26].

Uno de los efectos más relevantes es la inhibición en la síntesis de isoprenoides como el farnesil pirofosfato y el geranilgeranil pirofosfato, los cuales son esenciales en la regulación de vías de señalización celular por medio de la activación por prenilación de proteínas intracelulares, principalmente proteínas perteneciente a la familia Ras (Rho GTPasas) (Figura 1). Estas proteínas juegan un papel clave en funciones celulares tales como el mantenimiento de la forma, motilidad, diferenciación y proliferación celular [26 -29].

En la actualidad los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, son usados clínicamente en el tratamiento de la hipercolesterolemia y otras enfermedades asociadas, teniendo en cuenta que disminuyen los niveles séricos y hepáticos del colesterol. Sin embargo, a lo largo del uso terapéutico clínico de las estatinas, se identificó que éstas ejercen otros efectos a nivel biológico, los cuales se caracterizan por ser independientes de la regulación directa del colesterol. Estos efectos pleiotrópicos de las estatinas incluyen efectos anti-inflamatorios, anti-coagulantes, antioxidantes, neuroprotectores, e inmunomodulatorios, y adicionalmente causan una reducción en el rechazo de trasplantes, y modulan el metabolismo óseo [25, 28, 30-34].

Según lo anterior, las estatinas ofrecen una serie de efectos benéficos revolucionarios en el tratamiento de diferentes enfermedades que afectan la salud humana, dentro de las cuales una ventaja que capta en particular la atención de la investigación es su uso promisorio en el tratamiento y prevención del cáncer.

Figura 1-1: Representación de la biosíntesis del colesterol y del punto de acción de las estatinas sobre la síntesis de mevalonato. (Modificado Rodríguez et al, 2011 [29]).



Estudios in vitro e in vivo han mostrado evidencia de las estatinas como agentes antitumorales, resaltando efectos en el control del cáncer por arresto en la progresión del ciclo, inducción de la apoptosis, inhibición de la proliferación celular, supresión de la angiogénesis e inhibición de la migración, invasión y metástasis [34-39]. La actividad antitumoral se ha visto en modelos de cáncer de próstata, ovario, pulmón, mama, páncreas, colorrectal y diferentes tipos de sarcomas entre otros [40].

En este orden de ideas, aunque la relación entre estatinas y cáncer es prometedora, también resulta ser compleja y aún con la necesidad de incrementar la información básica sobre los fenómenos que pueden ser modulados por las estatinas y aún más cómo y cuáles podrían ser los puntos de conexión, a nivel celular, que expliquen las acciones de las estatinas en cáncer.

1.2.1 Vías de señalización asociadas a estatinas

- Vía de señalización Rho GTPasa

Las proteínas G ejercen una variedad de funciones principalmente enfocadas en la regulación de la transducción de señales, la translocación de proteínas a través de la membrana celular, e incluso la regulación de respuestas a estímulos visuales, olfatorios y del gusto. Actúan regulando la expresión génica, proliferación y crecimiento celular, supervivencia, diferenciación y morfogénesis, tráfico vesicular y formación o remodelación del citoesqueleto [41-44].

La familia de proteínas Rho (Ras homologa) son proteínas G pequeñas y monoméricas con una masa molecular que varían de 20 a 25 kDa, entre cuyos principales miembros se reconoce a Rho A, Rac y Cdc42 [41]. Este grupo de proteínas pertenece a la superfamilia Ras (*Rat sarcome*) de GTPasas, las cuales presentan características estructurales similares como es una secuencia altamente conservada de aminoácidos, Dominio G de aproximadamente 20 kDa [41]. Este dominio G es el responsable de la interacción especifica con GDP (guanosindifosfato) y GTP (guanosintrifosfato), al igual que la actividad enzimática GTPasa en la hidrolisis de GTP. El dominio G está compuesto de cinco elementos conservados y secuenciales, que participan en la unión de fosfatos, magnesio o guanina. Dentro del Dominio G también es posible encontrar dos regiones denominadas *switch* 1 y 2, las cuales se caracterizan por ser regiones ligeramente variables, que cambian en conformación durante el ciclo GDP – GTP, para contribuir con la unión preferente de los diferentes efectores mientras Rho se encuentra en el estado unido a GTP o estado activo necesario para la señalización por Rho [42]. Por otra parte en el extremo C- terminal en los miembros de las proteínas Rho es posible encontrar una región hipervariable con un motivo Cys-AA–X (A=aminoácidos alifáticos X= cualquier aminoácido), punto crucial en las modificaciones post-traduccionales de farnesilación y geranilgeranilación que sufren las proteínas Rho como evento requerido para la ubicación

de la proteína desde el citoplasma hacia la membrana y su consecuente activación [41, 42, 45].

Se ha identificado que la principal función de las proteínas Rho, es la regulación del citoesqueleto de actina [43]. Estas proteínas pueden generar cambios en la organización de la actina, regular la forma y polaridad celular y la interacción entre célula – célula o célula –matriz. Los tres miembros de la familia Rho puede generar cambios en el citoesqueleto; de forma particular, Rac y Cdc42 son proteínas localizadas principalmente en la parte frontal de la célula, y su principal función es inducir una fuerza de protrusión como respuesta a un estímulo de migración, mediante la polimerización de los filamentos de actina para la formación de prolongaciones citoplasmáticas a modo de lamelipodios y filopodios. Los miembros de la familia Rho (Rho A, B o C) inducen también cambios en el citoesqueleto mediante la formación de fibras de estrés (aglomerados de filamentos de actina que atraviesan la célula y que están unidos a la matriz extracelular por puntos de adhesión focal) y adicionalmente regulan la formación de los complejos de adhesión focal en diferentes tipos celulares [4, 43, 46].

Todas estas proteínas con actividad GTPasa presentan un mecanismo conservado de regulación, a través de un ciclo unidireccional por el cual se regula su función GTPasa y de *switch* molecular permitiendo o limitando la transmisión de señales. La actividad GTPasa se correlaciona con la presencia de una actividad intrínseca de hidrólisis de GTP e intercambio de nucleótidos de guanina. Sin embargo esta actividad intrínseca, resulta ser muy débil para permitir que el ciclo de activación e inactivación de estas proteínas se lleve a cabo de una forma rápida y eficiente [47]. Alternativamente se reconoce la existencia de proteínas catalizadoras y reguladoras de estas reacciones dentro de las que se encuentran; Factores intercambiadores de Nucleótidos Guanina (GEFs), Proteínas activadoras GTPasa (GAPs) e Inhibidores de disociación a GDP (GDIs). Estas últimas asociadas exclusivamente a la regulación de las proteínas Rho [48]. Brevemente, las proteínas GEFs, son las proteínas encargadas de catalizar la transición del estado inactivo unido a GDP al estado activo unido a GTP. La mayoría de estas proteínas han sido aisladas como oncogenes ya que en su secuencia presentan un dominio homologo al proto-oncogen *Dbl* [49]. Las proteínas GAP, presentan la función de regular de forma negativa la transmisión de la señal, disminuyendo el tiempo en que Rho se encuentra unida a GTP, dado que la proteína Rho activada unida a GTP puede unirse a efectores y desencadenar señales moleculares. Este proceso se lleva a cabo mediante la aceleración de la hidrólisis de GTP y la unión a GDP [47]. Por último, las proteínas GDIs son reguladoras de la translocación de las Rho entre el citoplasma y la membrana celular. Cuando la proteína Rho se encuentra inactiva en el citoplasma, las proteínas GDIs se unen a Rho GDP y así prevenir la activación espontanea de Rho en el citoplasma, enmascarando el grupo isoprenil producto de la modificación post-traduccional [42, 50].

Las proteínas Rho han mostrado tener un efecto marcado en la mayoría de las alteraciones típicas en cáncer. Sin embargo, la migración e invasión toman una mayor relevancia [42]. La invasión de células tumorales malignas en tejidos adyacentes y la formación de un proceso metastático son crucialmente dependientes de las propiedades migratorias de la

célula cancerosa. La migración en tumores se puede dar de dos formas, mediante migración mesenquimal caracterizada por ser facilitada mediante proteasas y requiere la formación de protuberancias citoplasmáticas (proyecciones citoplasmáticas como filopodios, lamelipodios y fibras de estrés), su respectiva unión al borde alrededor de la matriz extracelular, la contracción de la célula para atraer el cuerpo celular frente al borde y su consecuente desprendimiento. Y segundo un proceso de migración ameboideo que se basa principalmente de la formación de proyecciones o protuberancias citoplasmáticas y la contracción celular. En cada proceso de migración mesenquimal o ameboideo, es necesario la pérdida de polaridad y forma celular [42].

Como ya se mencionó, las proteínas Rho juegan un papel central en la regulación de la forma celular, polaridad y locomoción, procesos importantes en la migración e invasión de células cancerígenas. Esto concuerda con que la sobreexpresión de estas proteínas induce la transformación tumoral de células normales, y provoca un fenotipo altamente invasivo. También se reconoce su efecto supresor de oncogenes y la hiperactivación de proteínas efectoras de Rho como ROCK o mDia potenciando la actitud invasiva del tumor [42].

- Vía de señalización PI3K/Akt

La vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) /Akt es activada por diversos tipos de estímulos celulares que regulan procesos de transcripción, proliferación, crecimiento y supervivencia celular.
La unión de factores de crecimiento a los receptores tirosina quinasa o receptores acoplados a proteínas G estimulan las isoformas de PI3K y catalizan la producción de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3) en la membrana celular. PIP3 funciona como segundo mensajero que conlleva a la activación de Akt también llamada proteína quinasa B (PKB). Una vez activada Akt puede dirigir procesos celulares a través de la fosforilación de sustratos involucrados en apoptosis, síntesis de proteínas, metabolismo y ciclo celular [51].

La familia de PI3K constituye una familia de quinasas lipídicas tipo serina/treonina que generan segundos mensajeros lipídicos por la fosforilación del grupo OH en la posición 3' de fosfoinositidos, como PI(3,4)P_2 y PI (3,4,5)P_3. Los efectos de PI3K se transmiten a través de estos productos lipídicos a efectores proteicos corriente abajo.

Las PI3Ks se clasifican según su especificidad con el sustrato y la homología en su secuencia [48]. PI3K clase I son proteínas heterodiméricas, con una región catalítica altamente homologa (p110) y una subunidad regulatoria pequeña (p85). Esta última contiene un dominio SH3 amino-terminal, una región inter SH2, un dominio amino terminal SH2, una región rica en prolina y un dominio de homología BCR (*Break PointCluster*) similar al dominio de activación GTP-asa que interactúa con proteínas G pequeñas, aunque no se le ha encontrado actividad GTPasa. PI3K clase II son péptidos sencillos de 170-210 kDa con un dominio C2 carboxi-terminal necesario para la unión de fosfolípidos y actividad quinasa. Se conoce además una PI3K clase III relacionada a proteínas vacuolares en *S. Cerevisiae* [52].

Las PI3K clase I se subdividen a su vez en la clase IA, caracterizada por ser activada por receptores con actividad tirosina quinasa (RPTK), y generando una señal bifurcada con activación de Akt y la vía de las MAPK; mientras la clase IB es activada por receptores acoplados a proteínas G [48].

La vía PI3K/Akt es altamente conservada y su activación es controlada por múltiples procesos. Akt es una familia de quinasas de tipo serina/treonina con un dominio aminoterminal tipo pleckstrina PH y un dominio catalítico carboxi-terminal. En humanos esta familia está compuesta por tres miembros, Akt 1, 2 y 3; este último con una expresión tisular restringida [53].

Seguido a la activación por fosforilación por parte de RPTK de PI3K en la parte interna de la membrana, se producen PI (3,4)P_2 y PI(3,4,5)P_3, quienes reclutan Akt hacia la membrana plasmática por unión al dominio PH. Esta unión conduce a un cambio conformacional de Akt que favorece la fosforilación en la Thr308 por parte de quinasas dependientes de fosfoinositidos (PDK), y con ello activación parcial de Akt. Para lograr la activación total es necesario que ocurra fosforilación de la Ser473. Esto se atribuye a candidatos como quinasas ligadas a integrinas (ILK), quinasa tipo 2 asociada a proteínas activadas por mitógenos (MAPK 2) o Akt por si sola. Akt regula múltiples procesos biológicos incluidos el metabolismo de la glucosa, apoptosis, expresión génica y proliferación celular [53-55]. La vía PI3K/Akt se encuentra regulada negativamente por la actividad fosfatasa de PTEN [51].

PI3K/Akt se ha establecido como una vía importante para la supervivencia del cáncer, al igual que papel fundamental en el desarrollo y progresión de tejidos malignizados. En la mayoría de tipos de cáncer se han identificado diferentes perturbaciones en la vía PI3K/Akt. De manera importante se reconoce la pérdida de PTEN que conlleva a una elevada concentración de PI(3,4)P_3 y una activación constitutiva corriente abajo de Akt y mTOR. También se conocen mutaciones en la familia de Akt, por ejemplo la sustitución E17K en el dominio PH de Akt1 lleva a una activación constitutiva de Akt en cáncer de seno, colorectal, endoletial y ovario [53, 56].

Otros mecanismos incluyen la activación de PI3K debido a la estimulación paracrina o autocrina de receptores tirosina quinasa tales como la sobreexpresión de receptores para el factor de crecimiento epidermal en glioblastoma multiforme y ErbB2/HER-2/neu en cáncer de seno y o la activación de las proteínas Ras [53, 56].

- Vía de señalización MAPK/ERK

La vía de las MAPK son activadas por estímulos extracelulares en los que influyen hormonas, mitógenos, factores tróficos y de crecimiento, citoquinas inflamatorias y diversas formas de estrés celular (osmótico, redox y radiación entre otros). Participan en el control de la expresión génica por receptores de membrana, regulando procesos celulares como proliferación, diferenciación y transformación celular, apoptosis y procesos

de inflamación crónica. Por lo tanto la supervivencia celular no solamente es mediada por la vía de señalización PI3K/Akt, sino también por la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [56, 57].

Esta vía de señalización se encuentra organizada en módulos compuestos por al menos tres tipos de proteínas quinasa, que transmiten las señales por eventos de fosforilación secuencial de modo jerárquico. El primer módulo en ser activado es el correspondiente a las quinasas de las quinasas de MAPK (MAPKKK) puntualmente proteínas de la familia Raf (Raf-1, A-Raf y B-raf). Esta es una familia de quinasas de tipo serina/treonina con un dominio catalítico carboxi-terminal y otro regulador amino-terminal. Estas proteínas no se encuentran asociadas directamente con los receptores de membrana, por lo tanto necesitan activarse por componentes intermediarios como proteínas G monoméricas pequeñas o proteínas quinasas C (PKC). La interacción entre las proteínas Raf y las proteínas G se da en el dominio regulador a través de dominio de unión a Ras (RBD). El segundo módulo en ser activado por fosforilación es el de las quinasas de MAPK (MAPKK), quinasas que presentan una doble especificidad ya que pueden fosforilar residuos de treonina y tirosina a la vez. En el grupo de proteínas de las MAPKK se han identificado siete miembros, codificados según su especificidad con relación a un sustrato MEK 1-2/ERK 1-2, MKK 3-6/p38, MKK 5/ERK 5 y MKK 4-7/JNK. Estas proteínas al presentar esta especificidad tan limitada se consideran puntos de convergencia que integran diferentes señales en una misma ruta. El último módulo en ser activado es MAPK, compuesto por proteínas de tipo serina/treonina [56].

La activación y expresión de proteínas pertenecientes a la vía de la MAPK se han correlacionado con la prognosis y resultados relacionados a la respuesta terapéutica en varios tipos de cáncer por ejemplo en glioblastoma se evidencia una sobreexpresión de p-MAPK, la cual ha sido asociada con una respuesta deficiente a la radioterapia o una alta expresión de p-MAPK se asocia igualmente con un estado metastático en cáncer gástrico [58].

- Metaloproteasas de Matriz (MMPs)

Las MMPs son un tipo de endopeptidasas dependientes de zinc sintetizada como zimógeno inactivo en estado latente; conocidas por jugar un papel clave en la regulación de la interacción célula - célula y regulación de la degradación de la matriz extracelular [59]. Por lo tanto juegan un papel importante en el remodelamiento de diferentes tejidos tales como en el desarrollo embrional, angiogénesis, ovulación y la curación de heridas. Sin embargo alteraciones en su expresión están involucradas en patologías como la osteoporosis, isquemia pulmonar, enfermedades cardiovasculares y una amplia variedad de tipos de cáncer, en los cuales las MMPs se asocian a procesos de crecimiento, invasión y metástasis [59, 60]. Las MMPs se pueden clasifican según su función y especificidad respecto al sustrato que pueden degradar, en las que encontramos colagenasas, gelatinasas, estromelininas y matrilisinas [60].

Diferentes estudios *in vivo* con ratones *knockout* han mostrado el papel de las MMPs en el crecimiento tumoral e invasión [61]. Los ratones que carecen de MMP-7 presentaron reducción de la tumorogénesis intestinal; deficiencia en MMP-11 se asoció a disminución en tumorogénesis en respuesta a mutagénesis química y ratones con deficiencia en MMP-2 y 9 muestran una reducción en la progresión, angiogénesis y metástasis en melanoma [61].

En OS se ha observado alta expresión de MMP-9 que correlaciona con el desarrollo de metástasis y menor supervivencia de pacientes; así como su actividad reducida se asoció con una disminución del efecto metastático en lesiones pulmonares [62]. Incluso se ha propuesto que la MMP-9 podría ser un biomarcador ideal para el diagnóstico de OS [63].

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar la participación de vías de señalización PI3K, MAPK y Rho como blancos del mecanismo de acción de la simvastatina en osteosarcoma.

2.2 Objetivo Específicos

Determinar los efectos de dosis bajas de simvastatina sobre la proliferación, migración e invasión de osteoblastos normales y células UMR-106 de osteosarcoma de rata.

Establecer si la acción de la simvastatina en el modelo de osteosarcoma de rata se presenta por la inhibición de proteínas Rho GTPasas.

Evaluar la presencia de las proteínas de las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK en respuesta a simvastatina en las células UMR-106 de osteosarcoma de rata.

Medir la activación de sustratos corriente abajo de la señalización de PI3K y MAPK en las células de osteosarcoma de rata.

3. Materiales y Métodos

3.1 Modelos biológicos

3.1.1 Línea celular derivada de Osteosarcoma de rata

La línea celular tumoral UMR-106 (CRL-1661™) se obtuvo de la American Type Cell Collection (ATCC), se cultivó y preservó en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, GIBCO®) con suero fetal bovino (SFB, GIBCO) 10% acorde con las indicaciones del fabricante [64]. Adicionalmente el medio de cultivo se suplementó con penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100 µg/mL (GIBCO®). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5%.

La línea UMR-106 es una línea de osteosarcoma de rata Sprague-Dawley, la cual presenta propiedades de crecimiento de tipo adherente y morfología epitelial, desarrollada a partir de una línea tumoral inducida por la inyección de isótopos radioactivos de fósforo. Esta línea presenta un fenotipo similar al expresado por osteoblastos en estados intermedios a tardíos, caracterizado por la expresión de colágeno tipo I, metaloproteasas de matriz 1 y 13, alta actividad de fosfatasa alcalina y la síntesis *in vivo* de una matriz mineralizada. Responde a la hormona paratiroidea, prostaglandinas y 1,25 dihidroxivitamina D3 [65].

3.1.2 Línea celular no tumoral de Osteoblastos de rata

El cultivo primario de osteoblastos se estableció en el Grupo de Investigación en Hormonas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y se denominó rOB-GIH. Este cultivo se mantuvo a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5%, en medio DMEM osteogénico (osDMEM) suplementado con SFB 10%, dexametasona 10 nM, ascorbato de sodio 1µM (GIBCO®), penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL.

- Obtención del cultivo primario de osteoblastos

Para el establecimiento del cultivo primario se extrajo la región calvaria perteneciente a la bóveda craneal de una rata macho Wistar recién nacida [66], proveniente del bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

La región calvaria extraída se sometió a pasos secuenciales de digestión enzimática a 37°C. En primer lugar se utilizó tripsina 1.0% (EC3.4.21.4; GIBCO Cat. No 27250) durante 10 minutos, seguida de digestión con colagenasa 0.2% (EC3.4.24.3; Sigma□Cat. No. C6885). Las soluciones enzimáticas se prepararon en medio DMEM. Se realizaron dos cambios de la solución de colagenasa incubando por 30 y 60 minutos, respectivamente. Al término de la digestión se procedió a incubar los fragmentos óseos no disueltos en placa de 24 pozos como método paralelo para obtener un mayor número de células. Por otra parte, la suspensión celular obtenida de la tercera y cuarta digestión se centrifugó a 1500 g por 5 minutos. El pellet celular se suspendió en medio osDMEM, y las células se colocaron en frascos de cultivo T25 (TPP□Techno Plastics Products) incubados bajo las mismas condiciones anteriormente nombradas. Teniendo en cuenta que los osteoblastos crecen de forma adherente, tres días después de la extracción se realizó un primer cambio de medio con el cual se buscó eliminar todas las células que no formaran parte de la monocapa. Este proceso de cambio de medio se llevó a cabo por quince días, periodo que permitió llegar a un estado de diferenciación celular. Con las células a una confluencia mayor al 80%, se procedió con el repique celular por tripsinación de los frascos T25 y la placa con los fragmentos de hueso. La suspensión celular después del repique se sembró en nuevos frascos T25 y se denominó pase N°1. A partir del pase N°3 se empezaron a realizar los experimentos con el cultivo.

- Tinción del cultivo primario con Hematoxilina-eosina

Con el fin de obtener una caracterización morfológica de las células obtenidas en el cultivo se realizó una tinción con hematoxilina-eosina, en la cual primero se fijaron las células con etanol absoluto por 5 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se tiñeron con hematoxilina por 2 minutos eliminando el exceso de solución con dos lavados con agua. Después se realizó un nuevo lavado con agua amoniacal, dos lavados con agua y finalmente se adicionó eosina.
Después de la tinción, las células se observaron al microscopio con un aumento de 40X para el registro fotográfico.

- Caracterización del cultivo primario de osteoblastos

Con el fin de caracterizar el cultivo primario obtenido, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina y la presencia de Osteocalcina, marcadores para el tipo celular osteoblástico (71). La determinación de la actividad fosfatasa alcalina se realizó mediante el uso de pNitrofenil-fosfato (SIGMAFAST™ Cat. No 2770), que actúa como sustrato soluble para

la enzima secretada al medio de cultivo por parte de las células. La absorbancia de esta solución se determinó a 405nm en lector de microplaca Modelo 680 de BioRad. La identificación de la proteína Osteocalcina o Bglap *(Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein)* se realizó mediante western blotting, haciendo uso del anticuerpo monoclonal anti-osteocalcina [OCG3] (ab13420) proveniente de abcam®.

3.2 Tratamientos

3.2.1 IGFs

Ambos modelos celulares, UMR-106 y osteoblastos se estimularon con los factores de crecimiento similares a insulina I y II (IGF-I e IGF-II) en concentración final de 10 nM.

3.2.2 Simvastatina

Las líneas celulares se trataron con Simvastatina (Calbiochem), preparada en NaOH 0.25M como una solución patrón de 2.4 mM. Con el fin de observar efectos dosis respuesta se utilizó un rango de concentraciones que osciló entre 0.01 y 100 µM.

3.3 Determinación del efecto de simvastatina en la viabilidad celular

La viabilidad celular y citotoxicidad se determinaron en la línea rOB-GIH mediante el ensayo de MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Este ensayo está basado en el clivaje de la sal de tetrazolio amarilla y su conversión a cristales púrpura de formazán por deshidrogenasas mitocondriales presentes en células metabólicamente activas [67].

Los osteoblastos se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad aproximada de $1x10^4$ células/pozo en 100 µL de medio de cultivo DMEM con SFB 10%, y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5% hasta evidenciar la formación de la monocapa. Posteriormente las células se lavaron con solución de buffer salino (PBS) [137 mM de NaCl, 1.5 mM de KH2PO4, 2.7 mM de KCl y 8.1 mM de Na2HPO4, pH 7.4] estéril y se colocaron por 12h en medio DMEM carente de SFB 10%. Al cabo de este tiempo las células se trataron con los factores de crecimiento y/o simvastatina, tal como se menciona en el numeral Tratamientos. Para finalizar el ensayo se agregaron 10 µL de MTT 5 mg/mL, y se incubó nuevamente por un periodo de 3h bajo las condiciones anteriormente nombradas. Después de cumplido el tiempo se procedió a eliminar el sobrenadante de cada uno de los pozos e inmediatamente disolver los cristales formados con 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). Se realizó lectura de absorbancia a 570 nm con referencia en 655 nm en un lector de microplaca (Bio-Rad). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado, con réplica biológica y por tiempos de 0, 24, 48 y 72 h.

3.4 Determinación del efecto de simvastatina sobre migración, adhesión e invasión celular

3.4.1 Ensayo de migración celular por curación de herida (Wound Healing)

Para llevar a cabo este ensayo ambos modelos celulares se sembraron en placas multipozo de 12 o 24 pozos. Al alcanzar una confluencia del 95%, la monocapa se lavó con PBS estéril y se privó de SFB por 12 h. Después del tiempo de privación se procedió a crear una herida en la monocapa, usando una punta de micropipeta de 1-10 µL; la punta se colocó de forma perpendicular a la superficie del cultivo, y se produjo la herida en dirección vertical a lo largo del diámetro del pozo. Después de haber realizado la herida, se procedió a eliminar toda célula flotante o no adherida lavando con PBS. Luego, las células se incubaron en presencia de los tratamientos por un tiempo de 48 a 72 h. Cada tratamiento se realizó por duplicado haciendo seguimiento [68] del proceso con registro fotográfico en microscopio de contraste de fase (Leika). En el análisis del proceso de curación se usó el programa ImageJ 1.48V (National Institute of Health, NIH, USA), midiendo el área total de la herida en el tiempo cero y en el tiempo de cierre de la herida. Después de obtener los valores de área por tratamiento en los diferentes tiempos, se calculó el porcentaje del área de la herida y el porcentaje de curación de herida [68].

% del área de la herida = (Área de la herida en tx/ Área de la herida en el t0)* 100

donde el tiempo tx = t0,t1,t2,t4…

% de curación de la herida = 100 -% del área de la herida.

3.4.2 Ensayo de adhesión celular

Con el fin de determinar el efecto de la simvastatina en el proceso de adhesión celular, las células UMR-106 se sembraron en placas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con SFB 10%. Después de alcanzar una confluencia aproximada del 95%, cada pozo se lavó dos veces con PBS estéril, se privó de SFB y se incubó con simvastatina por 12 h en una de las dosis de interés, 0,01 a 30 µM. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se tripsinaron con 1 mL de tripsina 0.25% y sembraron nuevamente en presencia de medio DMEM en una placa de 96 pozos y se permitió la adhesión por un periodos de 2 y 4 h. Para realizar el seguimiento de la adhesión, en el tiempo de interés se retiró el medio y a las células adheridas se les colocó medio fresco con 10 µL del reactivo de MTT. Las células viables adheridas se asumieron de acuerdo con la incorporación del reactivo MTT y consecuente formación de cristales de formazán de igual forma que en el ensayo de viabilidad. El ensayo se llevó a cabo por duplicado y los resultados se expresan normalizados al tratamiento en presencia de SFB 10%, que se consideró el control positivo de adhesión celular.

3.4.3 Determinación de la actividad de MMPs

La actividad proteolítica tipo gelatinasa de las metaloproteasas de matriz presentes en ambas líneas celulares se evaluó en los medios condicionados provenientes de las células tratadas. Los medios condicionados se colectaron y guardaron a -20°C para preservar su actividad hasta el momento del análisis.

Las proteínas presentes en 36 µL de cada uno de los medios se separaron en geles de poliacrilamida 10% co-polimerizados con gelatina de piel bovina (Sigma-Aldrich) al 0.4% como sustrato a ser degradado. Una vez concluida la electroforesis se realizaron cinco lavados, dos con tritón X-100 al 4% por 20 minutos y tres lavados con agua destilada cada uno de 5 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Después de los lavados, los geles se incubaron en buffer de zimografía (Tris base 50 mM, NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 5 mM, HCl 40 mM, Tritón X-100 0.2%, $ZnCl_2$ 10 mM) por 20 minutos a temperatura ambiente y a su término en el mismo tipo de buffer se incubó a 37°C con agitación constante por un periodo de 18 a 20h. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 y se destiñeron con solución de ácido Acético-Etanol-H_2O (1:3:6) para visualizar las bandas claras correspondientes a actividad gelatinasa. Estos geles se documentaron en el equipo VersaDoc (Bio-Rad) y se analizaron según la densitometría de cada banda obtenida usando el programa ImageJ 1.48V (NIH, USA).

3.5 Determinación de cambios en la expresión génica de UMR-106 en respuesta a simvastatina

3.5.1 Extracción de RNA

El RNA se extrajo de células UMR-106 sembradas en platos de 60mm de diámetro y a una confluencia aproximada de 95% con y sin estímulos. Cada plato se lavó con PBS frío y las células se homogenizaron en 1 mL del reactivo Trizol (Invitrogen). Después de la homogenización se procedió a separar el DNA y las proteínas y recuperar el RNA en la muestra mediante extracción fenol-cloroformo. El RNA se precipitó con 2-propanol y se lavó con etanol frío, para ser finalmente suspendido en agua libre de ribonucleasas. La cuantificación del RNA total se llevó a cabo por absorción UV a 260 nm en espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) y su pureza se verificó según la relación de absorbancia 260/280 nm. Alícuotas del material se preservaron a -70°C.

3.5.2 Transcripción reversa (RT-PCR)

Se sintetizó la cadena de DNA complementario (cDNA) mediante el uso del estuche SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante [69], y partiendo de 5µg de RNA total por muestra.

3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qPCR)

Los cambios en la expresión génica se establecieron para los genes de la metaloproteasa de matriz 9 (*mmp9*), Rho A (*rho A, Ras homolog Family member A*), el gen de la ciclofilina y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*). Estos dos últimos se usaron como genes de referencia.

Las reacciones de amplificación se realizaron con el sistema iQ SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad) en equipo CFX96 (Bio-Rad). Esta técnica se basa en la propiedad del SYBR Green de intercalarse en el DNA de doble cadena, produciendo fluorescencia proporcional al monto de DNA presente en la reacción, por lo cual a cada ciclo de la reacción de PCR, la intensidad de la señal se incrementa de manera proporcional al producto [70]. Para cada ensayo de qPCR se usó como plantilla 1 µL de cDNA para un volumen final por reacción de 3 µL según estandarización del grupo de investigación. Los primers correspondientes a cada uno de los genes nombrados anteriormente se encuentran consignados en la tabla 2 y se establecieron de acuerdo a las secuencias reportadas en el GenBank del NCBI. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido de amplificación en 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, temperatura de anillamiento durante 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos, se permitió extensión posterior por 2 minutos. Al final se realizó curva de fusión para confirmar la presencia de un solo amplímero. El análisis de expresión se determinó mediante cálculo empleando el método ΔΔCt [70]. Los resultados son la expresión relativa a la media geométrica de los genes de referencia *ciclofilina* y *gapdh.*

Tabla 3-1: Información de genes cuantificados en qPCR

Nombre del Gen	Acronimo	No. Secuencia NCBI	Secuencia de Primer's 5'-3'	Tamaño	Tm	Amplimero
Ciclofilina	Ciclofilina	M19533.1	GGTGACTTCACACGCCATAA	20	58	173
			AGCCACTCAGTCTTGGCAGT		61	
Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase	Gapdh	NM_017008.4	GCCTTCCGTGTTCCTACC	18	57	96
			CTTCACCACCTTCTTGATGTC	21	56	
Ras homolog family member A	RhoA	NM_057132.3	ACCAGTTCCCAGAGGTT	17	54	147
			TGTCTGGGTAGGAGAGA		51	
Matrix metallopeptidase 9	Mmp9	NM_031055.1	CTTCTCTGGGCGCAAAATG	19	57	102
			CCGGTGACCAGGGTTACCT		60	

3.6 Determinación de cambios en la expresión proteica de UMR-106 en respuesta a simvastatina

Como una aproximación para determinar el estado de activación, por parte de los ligandos o la estatina, de las proteínas cascada abajo del IGF-IR se empleó la técnica de Western blotting. Brevemente, se sembraron las células en plato de 60 o 100 mm de diámetro, se permitió llegar a confluencia del 90%, momento en el cual se retiró el medio de cultivo, se lavó con solución de PBS durante dos oportunidades procurando no alterar la monocapa del cultivo. Posteriormente se colocó solución de estímulo en medio DMEM y se incubó a 37°C durante el tiempo establecido. Al final del tratamiento se procedió a extraer el contenido proteico. A este extracto celular se le cuantificó la cantidad de proteína y el equivalente a 25 µg de proteína se separó por electroforesis denaturante en poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, sobre la que se aplicaron anticuerpos específicos para cada una de las proteínas de interés.

3.6.1 Obtención de extractos celulares

Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron utilizando buffer de lisis RIPA (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 1 mM, Na3VO4 1 mM, Pepstatina, Leupeptina y Aprotinina 1 µg/mL cada una). Se incubó el extracto a 4°C durante 30 minutos y luego se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos. La proteína se cuantificó por el método de ácido bicinconínico, se realizaron alícuotas que se almacenaron a –20°C hasta el momento del análisis.

3.6.2 Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

Los extractos proteicos se sometieron a separación electroforética, para lo cual se tomó 25 µg de proteína total y se preparó la mezcla con buffer carga 4X (Tris 500 mM pH 6.8, SDS 10%, Glicerol 87%, β-mercaptoetanol 5% y Azul de bromofenol 0.01%), se denaturaron a 92°C durante 3 minutos, y se realizó choque térmico inmediatamente. La muestra así preparada se concentró en un gel del 5% de poliacrilamida y se separó en un gel del 15, 12 ó del 10% según la proteína de análisis. La electroforesis se realizó a 100V durante aproximadamente 2 h.

3.6.3 Western Blotting

Las proteínas se transfirieron por vía húmeda, utilizando una cámara de transferencia Hoeffer Inc, desde el gel de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm en buffer de transferencia (Tris 15 mM, glicina 120 mM y metanol 15%, pH 8.6), durante 2 h a 250 mA con agitación continua. En el caso de detección de Rho A se probaron diferentes

condiciones y entre ellas, la que permitió obtener señal correspondió a transferencia a 40 mA en agitación a 4°C durante 16h [71].

Se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos en la membrana con leche descremada al 5% ó con BSA al 3% en TBS (Tris 2.5 mM, NaCl 20 mM, KCl 0.25 mM), según el anticuerpo a usar (Tabla 3). Después del bloqueo se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno, con buffer TTBS (TBS con Tween-20 0.05%). Se incubó con el primer anticuerpo durante 12–16h en la dilución adecuada y luego se retiró el exceso realizando 3 lavados con TBS. Posteriormente se incubó durante 2 h con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo (dilución 1:10000) o anti-IgG de ratón (dilución 1:3000) acoplados a peroxidasa de rábano (HRP); y por último se realizaron 3 lavados con TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo. La detección de la proteína de interés se realizó con el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham, Pharmacia Biotech o Chemicon).

Cuando fue necesario las membranas se lavaron con buffer glicina 100 mM pH 2.9 para ser probadas nuevamente.

Tabla 3-2: Condiciones de análisis de proteínas en western blotting.

Proteína de interés	Primer anticuerpo	Dilusion Primer anticuerpo	Ref. Primer anticuerpo	Solution de Bloqueo	Segundo anticuerpo
RhoA	Rho A/B/C (H-70)	Sc 1:500	sc-28565/Santa Cruz	BSA 3%	Rabbit–HRP 1:10000
Osteocalcina	Anti-Osteocalcin antibody [OCG3]	Sc 1:1000	Ab13420/ abcam		Mouse–HRP 1:3000
Fosfotirosina	Phosphotyrosine-PY20	TL 1:1000	610000/BD TL	Leche 5%	Mouse–HRP 1:3000
PI3K	PI 3-kinase p85α (S-20)	Sc 1:1000	sc-31970/Santa Cruz		Mouse–HRP 1:3000
ERK	ERK 2 (C-14)	Sc 1:1000	sc-154/ Santa Cruz		Rabbit–HRP 1:10000
pERK	p-ERK 1/2 (Thr 177)-R	Sc 1:1000	sc-16981-R/Santa cruz		Rabbit–HRP 1:10000
AKT	Akt1/2/3 (H-136)	Sc 1:1000	sc-8312/Santa cruz		Rabbit–HRP 1:10000
pAKT	p-Akt1/2/3 (Ser 473)-R	Sc 1:500	sc-7985-R/Santa cruz		Rabbit–HRP 1:10000
IGF-IR	IGF-IRβ (C-20)	Sc 1:1000	sc-713/Santa Cruz		Rabbit–HRP 1:10000

*Sc representa; Santacruz Biotechnology y TL representa; Transduction Laboratories.

3.6.4 Separación de proteínas en electroforesis bidimensional (2DE)

Se realizó isoelectroenfoque (IEF) en tiras de gradiente inmovilizado (IPG) de 7 cm, pH 310 No lineal usando el sistema PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad). Para la separación en este formato se precipitaron 100 µg de proteína, los cuales se disolvieron en 125 µL del buffer de disolución (CHAPS 2%, anfolitos pH 3-10 0.2%, DTT 40 mM, azul de bromofenol 0.01%, urea/tiourea 7M/2M) y se corrió el programa de enfoque descrito en la tabla 4 bajo condiciones optimizadas por el Grupo de investigación en Hormonas. Las muestras se centrifugaron a 5000 g durante 60 segundos, asegurando que no hubiese residuos sólidos que interfirieran con la migración de las proteínas. La tira se cubrió con 1 mL de aceite de mineral para evitar la deshidratación y el sobrecalentamiento durante el proceso. Después del IEF, la tira se trasladó a una cubeta plástica, donde se realizó el equilibrio por reducción con ditiotreitol (DTT) 130 mM seguida de alquilación con yodoacetamida (IAA) 135 mM, cada uno en 2 mL de buffer de equilibrio (Tris-HCl 375mM, Glicerol 20%, SDS 2%, pH 8.8). Cada paso se ejecutó por 15 minutos con agitación horizontal moderada. La tira se acopló con la segunda dimensión sellando con solución de agarosa (Agarosa 1% en Tris base 25 mM, Glicina 0.19 M, SDS 0.1%, azul de bromofenol 0.01%). Finalmente, la separación por masa molecular se llevó a cabo en condiciones denaturantes usando geles de poliacrilamida al 12% en cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), las condiciones de corrida fueron 80V por 40 minutos, 100V por una hora y 120V hasta terminar la corrida. Como marcador de peso molecular se usó PageRuler Prestained Broad Range Protein Ladder (Cat. No 26619, Thermo Scientific).

Tabla 3-3: Programa de Isoelectroenfoque

Voltaje (V)	Tiempo (h)	Observaciones
0	1	Rehidratación Activa
50	11	
200	1	Rampa Rápida
500	1	
1000	1	
2000	1	
4000	Hasta 10000 Vh	
500	5	Paso de seguridad

3.6.5 Tinción de geles

Para la detección de la proteína en geles de electroforesis se utilizó tinción con azul de Coomassie coloidal [72]. Brevemente, se realizó incubación del gel en una solución acuosa de etanol 50%, ácido fosfórico 2% por 16h, para permitir el fijado de las proteínas en el gel.

En seguida se realizaron cuatro lavados sucesivos con 25 mL de agua destilada de 15 minutos cada uno, y se incubaron por 1 h con 25 mL de solución acuosa de etanol 18%, ácido fosfórico 2% y sulfato de amonio 15% para el acondicionamiento de los geles. Finalmente se adicionó a esta solución, 250 µL de solución de azul de Coomassie G-250 2% en etanol y se permitió la tinción por 72 h. El ruido de fondo se eliminó por lavados sucesivos con agua destilada.

Los geles se documentaron en VersaDoc (Bio-Rad). En el caso de 2DE los spots se identificaron usando el software Melanie (GeneBio). Se compararon los patrones de expresión para establecer cuáles spots presentaron una diferencia entre las muestras con miras a realizar un acercamiento proteómico para esclarecer otros eventos mediados por la simvastatina.

3.7 Ensayo de fraccionamiento de DNA (DNA Ladder)

Las células de osteosarcoma se cultivaron en una placa de 12 pozos en medio DMEM suplementado con SFB 10%, se esperó a una confluencia aproximada del 95% en monocapa. Después las células se incubaron con diferentes dosis de simvastatina (0.01 a 10 µM) por un tiempo de 12h. Concluido el tiempo de incubación las células se recogieron en PBS frio por remoción mecánica y se colectaron en un tubo cónico de 15 mL. La suspensión celular se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y cada pellet se incubó con 200 µL de buffer de lisis (Tris HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0.2%) durante 20 minutos, el lisado se centrifugó a 12000 g por 20 minutos. El sobrenadante se incubó con RNasa A (Sigma) a una concentración final de 5 mg/mL durante 1 h a 37°C para eliminar su contenido en RNA, seguido de incubación con Proteinasa K (Sigma) 2 mg/mL durante 1 h a 37°C. Después de varias extracciones con fenol, las muestras se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante 12 h como mínimo. Nuevamente se centrifugó a 12000 g y el pellet obtenido se lavó con etanol 70%. El DNA se suspendió con 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). El material se separó en gel de agarosa 1% en TBE (Tris base 0.089 M, Ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M). El DNA se revelo por contacto con solución de bromuro de etidio 1 mg/mL y exposición a ultravioleta.

3.8 Análisis estadístico

Los datos se expresan como promedio ± SEM. Cuando fue necesario se analizaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA) o prueba de t-test, utilizando el programa GraphPad Prisma 5.0 y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p<0.05$.

3.9 Consideraciones éticas

El trabajo aquí presentado se realizó bajo la reglamentación mencionada en la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de Colombia referente a manejo de animales y trabajo con sistemas biológicos *in vitro*. Por otra parte, se trabajó teniendo en cuenta los parámetros apropiados para la manipulación, transporte, utilización, descontaminación y eliminación de desechos biológicos y químicos.

4. Resultados

La acción de la simvastatina como medicamento capaz de controlar la hipercolesterolemia se conoce extensamente. No obstante, su caracterización como agente quimioterapéutico no está completamente establecido. Con el fin de caracterizar los efectos de la simvastatina en procesos de proliferación, migración e invasión en población osteoblástica se utilizó un modelo tumoral de osteosarcoma de rata UMR-106 y uno no tumoral rOBGIH que se obtuvo de un cultivo primario de osteoblastos de rata.

4.1 Obtención y caracterización de una línea de osteoblastos de rata

Inicialmente, como se describió en métodos, se realizó una digestión enzimática con tripsina de la zona calvaría (huesos parietal y occipital) (Figura 4-1) y posteriormente con colagenasa (Figura 4-2). De esta forma se eliminó cualquier fibra densa de colágeno y restos de la matriz ósea extracelular no digeridos por la tripsina. Como resultado se obtuvo una mezcla de poblaciones celulares que emergieron de la matriz ósea (Figura 4-3). Es común en las primeras fases de un cultivo primario de hueso que no se obtenga un cultivo 100% puro, que este contaminado frecuentemente con fibroblastos al igual que otros tipos celulares propios y diferentes del linaje osteoblástico, originados a partir del precursor mesenquimal del cual se originan los osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos. Esta fase inicial de la obtención del cultivo primario resultó ser un paso crítico, dada la necesidad de contrarrestar la alta vulnerabilidad a agentes biológicos contaminantes como bacterias, hongos y levaduras. De igual forma, durante el establecimiento del cultivo, éste generó alteraciones en el pH, factor clave en la regulación de la mineralización, y que probablemente causaron un porcentaje de inhibición de la expresión de la fosfatasa alcalina. Por lo tanto después de varios intentos fallidos y superar los factores anteriormente nombrados se logró la obtención de una línea celular de osteoblastos (Figura 4-4)

Figura 4-1: Micrografía del producto de digestión con tripsina de bóveda craneal. La región calvaría de rata neonato Wistar macho se digirió con tripsina 1% por 10 minutos a 37ºC generando una suspensión densa de células, fragmentos de hueso y fibras de colágeno. El producto se colocó en medio DMEM y se realizó registro fotográfico en microscopio de contraste de fase. La microfotografía corresponde a un aumento de 40X.

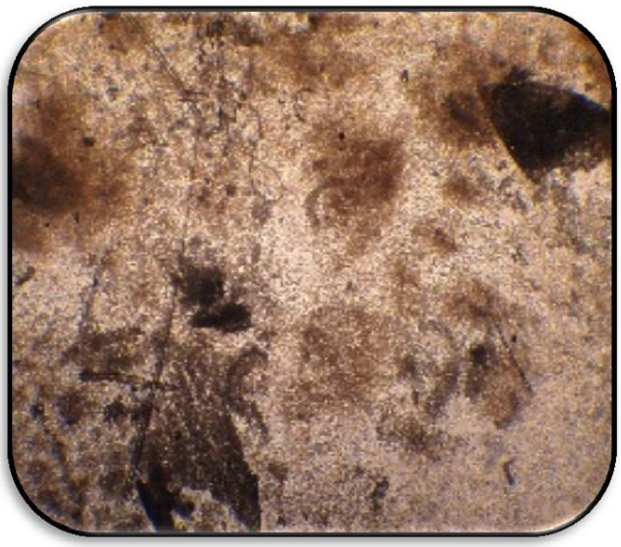


Figura 4-2: Micrografía de suspensión celular producto de digestión con colágenasa. La suspensión celular obtenida después de la digestión con tripsina se sometió a una digestión seriada, en dos tiempos de 30 minutos, con colágenasa 0.2% en DMEM. El producto se colocó en medio DMEM y se realizó registro fotográfico en microscopio de contraste de fase. La microfotografía corresponde a un aumento de 40X.

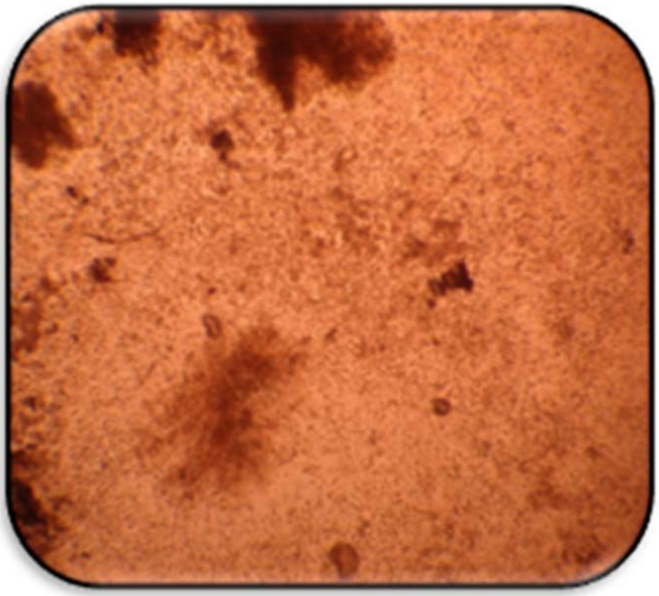
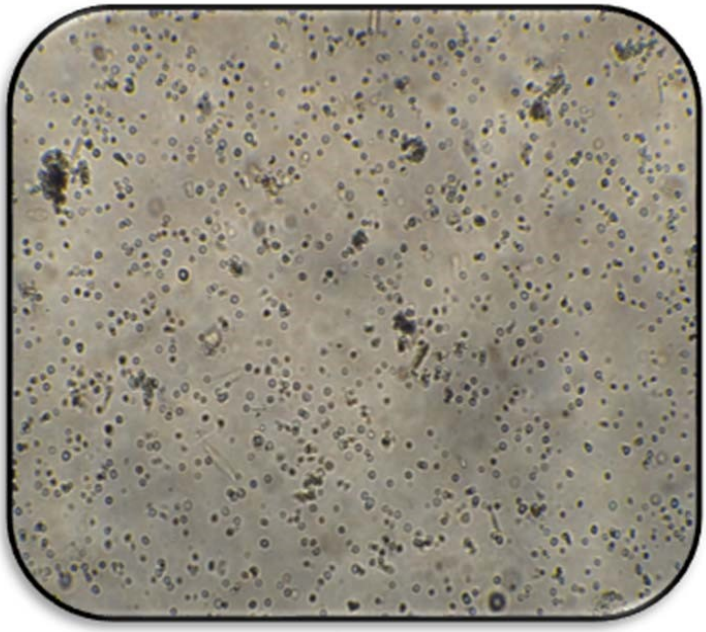


Figura 4-3: Micrografía de la suspensión celular no diferenciada. Cultivo de poblaciones celulares mixtas originadas del osteoprecursor mesenquimal. Las células se incubaron a 37ºC en atmosfera húmeda con CO_2 5% en medio de diferenciación. Se realizó registro fotográfico en microscopio de contraste de fase. La microfotografía corresponde a un aumento de 40X.



En el cultivo que fue exitoso se realizó incubación en presencia de medio osteogénico durante quince días con cambios cada tercer día, lo cual permitió obtener un cultivo en monocapa con una confluencia mayor al 80%, y con un tipo celular diferenciado predominantemente de osteoblastos (Figura 4-4 izquierda). Se realizó repique celular por tripsinación y posteriormente se mantuvo el cultivo en las condiciones descritas en métodos. Después del pase número 3, el cultivo celular presentó una homogeneidad superior al 95%, forma tipo cúbica y aspecto fibroblástico, células mononucleares en proceso de formación de la monocapa (Figura 4-4 derecha). El cultivo se preservó para usos posteriores según indicaciones de la ATCC y se introdujo al banco de células del Grupo de investigación en Hormonas bajo la referencia rOB-GIH, estando disponible para uso en otros proyectos de investigación. De acuerdo con lo anterior la tabla 5 resume las características de la línea celular obtenida.

Figura 4-4: Micrografía de cultivo primario de osteoblastos de rata rOB-GIH. Izquierda; Cultivo primario de osteoblastos de rata en confluencia después del proceso de diferenciación en medio osteogénico a un aumento de 10X. Derecha; Cultivo primario en el pase cinco, teñido con Hematoxilina-eosina en imagen con un aumento 40X.

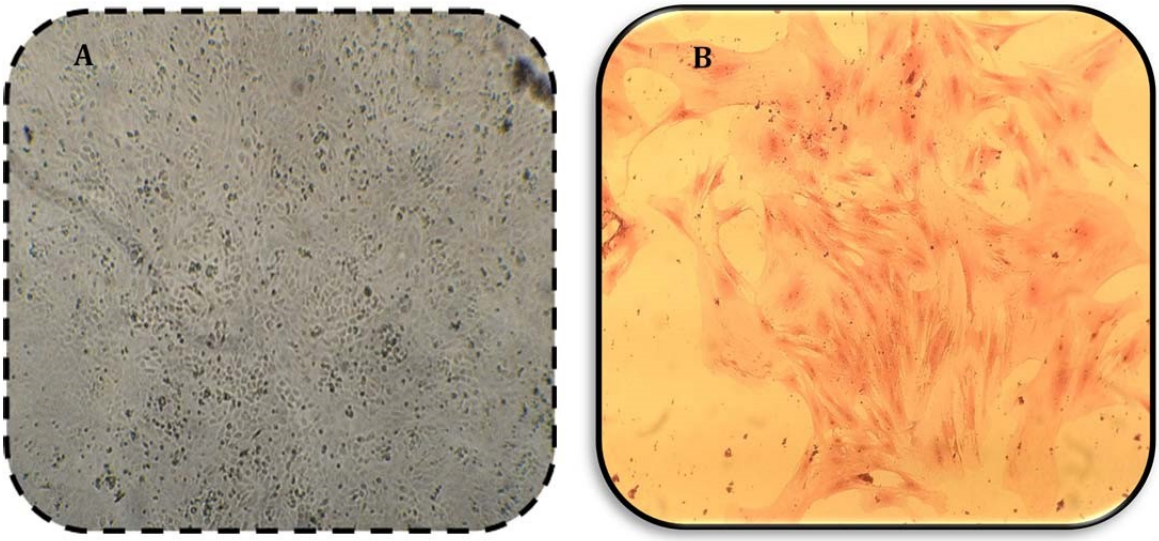


Tabla 4-1: Aspectos generales del cultivo primario de osteoblastos de rata rOB-GIH

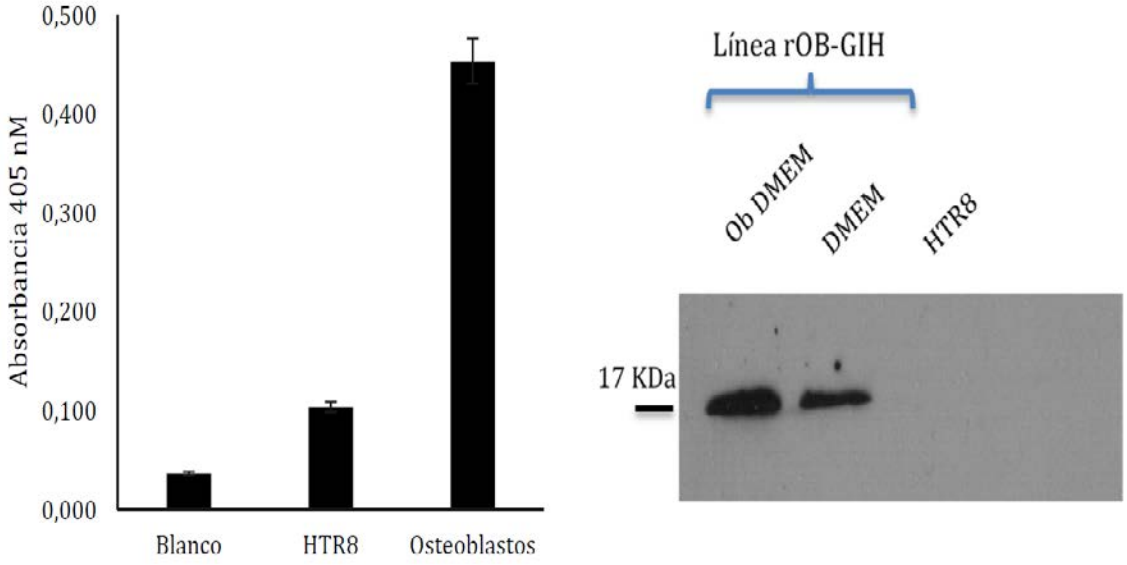
Organismo	Rattus norvegicus
Tejido origen	Hueso calvario
Propiedades del cultivo	Adherente
Cepa	Wistar
Marcador	Fosfatasa alcalina, Osteocalcina
Medio de cultivo	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Suero fetal bovino al 10%, Dexametasona 10nM, Ascorbato 1µM
Criopreservación	DMSO5% - SFB 50%
Condiciones de cultivo	37°C, CO_2 5%

Adicional a la observación morfológica de la línea rOB-GIH, en esta se evaluaron dos parámetros característicos. La actividad fosfatasa alcalina secretada, característica del

tejido óseo, en particular del osteoblasto, y que es expresada en altos niveles principalmente en los primeros estadios de la mineralización [73]. En la figura 4-5 izquierda se observan los niveles de la fosfatasa alcalina presente en medio condicionado de cultivo de osteoblastos rOB-GIH y de HTR8, una línea de trofoblasto humano. Se colocó este medio de trofoblasto para efectos comparativos, dado que ALP es una enzima presente en otros tejidos. La expresión relativa es superior a 4 veces. Esta secreción elevada es concordante con un cultivo enriquecido en la población secretora de ALP. Como segundo parámetro de caracterización se usó la expresión de la osteocalcina, también llamada *bone Gla-protein* (BGP), proteína de 49 aminoácidos, específica del tejido óseo y la dentina, que constituye el 20% de las proteínas no colágenas presentes en la matriz ósea. La biosíntesis de la osteocalcina es dependiente de la vitamina K y es estimulada por la presencia de vitamina D. La osteocalcina sintetizada se queda mayoritariamente incorporada a la matriz ósea debido a su capacidad de unión al calcio y a la hidroxipatita [74, 75].

Su determinación bioquímica es un buen indicador de índice de formación ósea. En la figura. 4-5 derecha, resultado de reconocimiento por western blotting con anticuerpo específico contra osteocalcina, se observó la presencia de la proteína en el cultivo rOBGIH y no en trofoblasto. El acondicionamiento de las células en medio osteogénico con presencia de Vitamina D permitió ver una mayor cantidad de proteína presente en el extracto proteico (comparación de carril 1 vs 2).

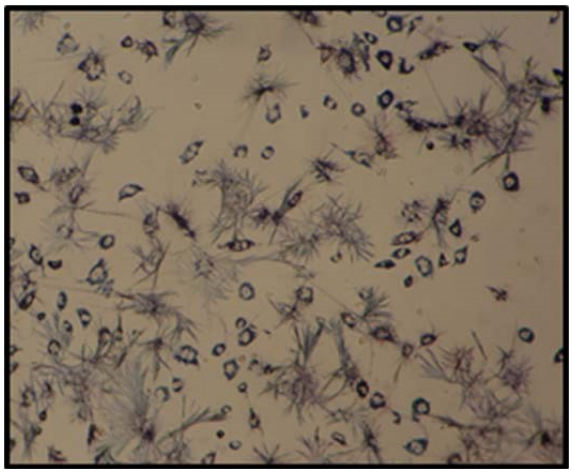
Figura 4-5: Parámetros de caracterización de la línea rOB-GIH. Izquierda; Niveles de fosfatasa alcalina secretada al medio por un cultivo confluente de osteoblastos de rata rOB-GIH y de trofoblasto extravelloso humano HTR-8. Como blanco de ensayo se utilizó medio DMEM no condicionado. Derecha; Identificación de osteocalcina por western blotting en 25 □g de extracto proteico de células rOB-GIH cultivadas en medio osteogénico inductor de diferenciación (Ob DMEM) o en medio DMEM no suplementado.



4.2 Efecto de la simvastatina en la viabilidad celular de rOB-GIH

Previamente se ha establecido que la simvastatina afecta la viabilidad celular de UMR106 de manera diferencial con líneas celulares provenientes de otros tipos de cáncer (81) Sin embargo, no se ha descrito el efecto de la simvastatina en líneas no tumorales del mismo tipo celular que el osteosarcoma, aunque se ha reportado que induce diferenciación en osteoblastos. Fue de nuestro interés evaluar si la simvastatina altera la viabilidad celular de la línea rOB-GIH y de esta forma establecer si el medicamento afecta diferencialmente células de tejido de normal versus las células de cáncer. Con este fin, se realizó el ensayo colorimétrico de sales de tetrazolio basado en MTT, el cual permite cuantificar la actividad metabólica de las células (Figura 4-6)[67].

Figura 4-6: Micrografía de cultivo rOB-GIH en presencia de MTT. Las células en presencia de SFB 10% se incubaron con MTT en concentración 5 µg/mL durante 3 h, tiempo en el cual se observó la formación de cristales de formazán de color púrpura. Aumento 40X en microscopio de contraste de fase.

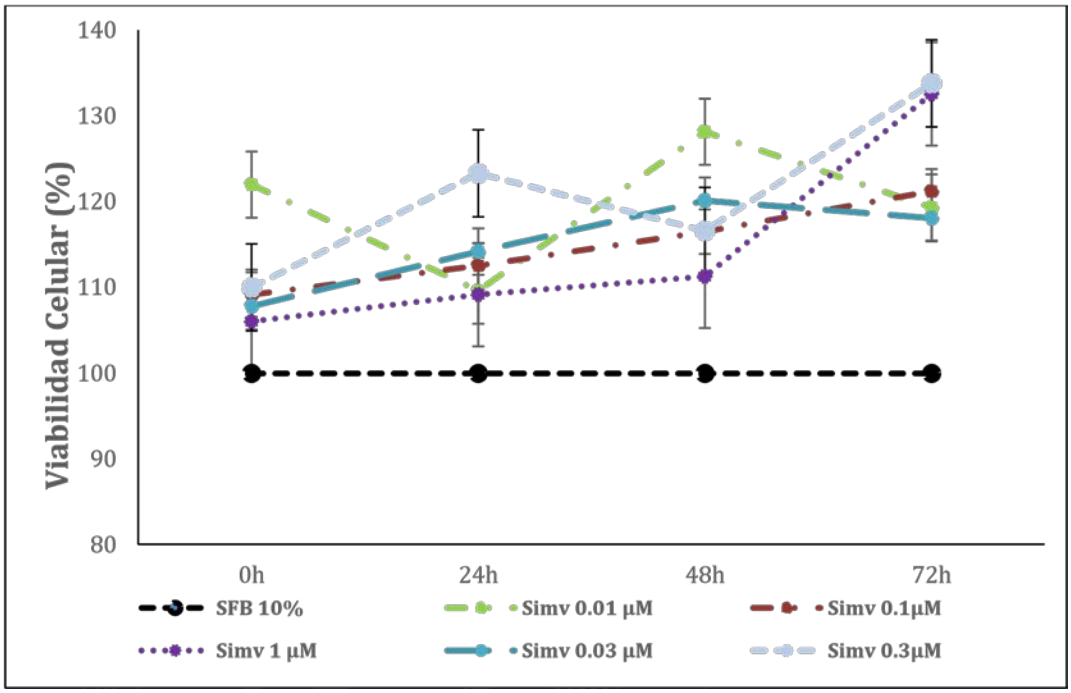


El efecto de la simvastatina en la viabilidad se evaluó incubando las células en medio DMEM con concentraciones variables del medicamento desde 0.01 µM hasta 100 µM por un periodo de hasta 72 h. Se realizó seguimiento de células en DMEM suplementado con SFB 10%, como control de crecimiento del cultivo.

Para mayor claridad, el resultado obtenido se muestra en dos etapas: Un primer comportamiento lo describen los tratamientos de simvastatina a concentraciones de 0.01 µM hasta 1 µM, en los cuales no se ve que la simvastatina induzca disminución en la viabilidad celular al ser comparada con el control de SFB 10% independientemente del tiempo registrado (Figura 4-7), por el contrario parece generar incremento en la actividad

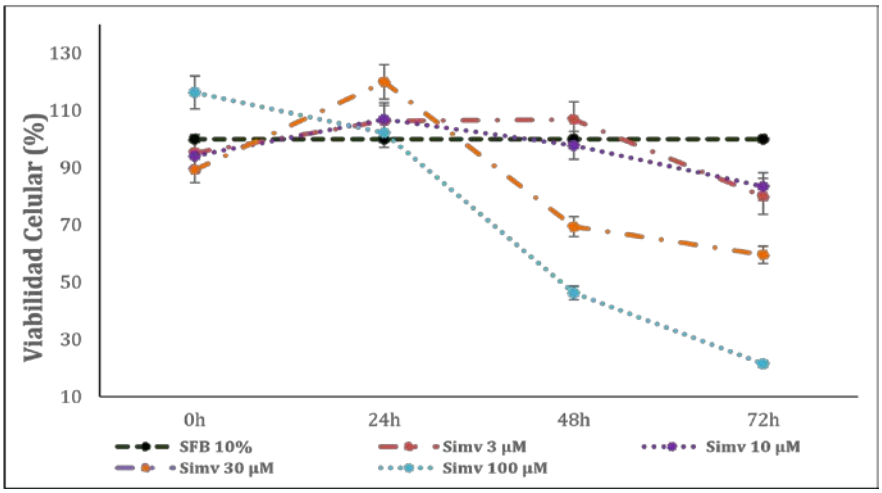
metabólica. Entre los tratamientos de simvastatina no existió diferencia significativa. Los primeros ensayos, en los cuales no hubo efecto aparente del medicamento, condujeron a ampliar el rango de concentración de la simvastatina hasta 100 µM.

Figura 4-7: Efecto de simvastatina en la viabilidad celular de rOB-GIH a dosis inferiores a 1 µM. Las células se colocaron en presencia de simvastatina por los tiempos y dosis indicados en la figura, y posteriormente se adicionó MTT a 5 µg/mL y se permitió formación de cristales por 3h. Estos se disolvieron en DMSO y se realizó lectura a 595 nm. Los datos se expresan como porcentaje respecto al control de cada tiempo y normalizado al cultivo en condición de crecimiento con SFB 10% ± SEM.



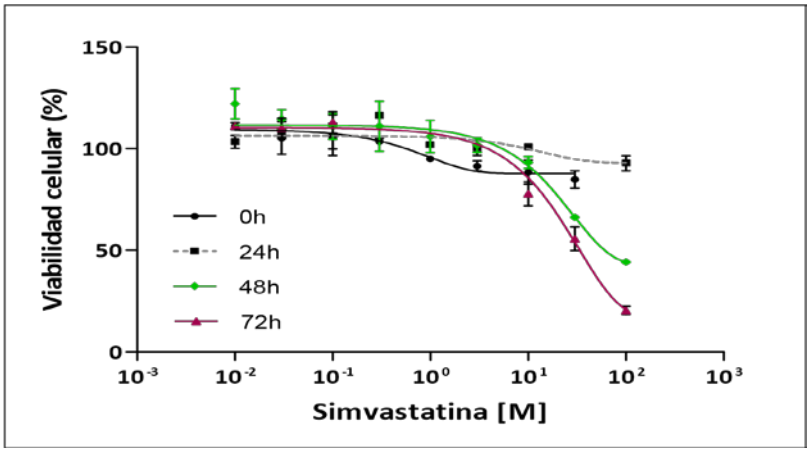
Un segundo comportamiento se observó en los tratamientos de simvastatina a concentraciones de 3 µM hasta 100 µM. Al evaluar el porcentaje de células viables a las 48 h de incubación de simvastatina, se observó una caída en la viabilidad celular a partir de la dosis 3 µM con respecto a lo observado en el control. Este comportamiento se acentuó en el cultivo luego de 72 h en presencia de la estatina. Se hizo evidente la reducción de la viabilidad celular al ser comparado con SFB 10%, de forma proporcional a la concentración, lo cual indica que a medida que aumenta la concentración disminuye la viabilidad celular en la línea rOB-GIH a través del tiempo (Figura 4-8).

Figura 4-8: Efecto de simvastatina en la viabilidad celular de rOB-GIH a dosis superiores a 3 µM. Las células se colocaron en presencia de simvastatina por los tiempos y dosis indicados en la figura, y posteriormente se adicionó MTT a 5 µg/mL y se permitió formación de cristales por 3h. Estos se disolvieron en DMSO y se realizó lectura a 595 nm. Los datos se expresan como porcentaje respecto al control de cada tiempo y normalizado al cultivo en condición de crecimiento con SFB 10% ± SEM.



El ensayo de MTT frecuentemente es usado para medir la citotoxicidad de sustancias a nivel celular. En la figura 4-9 se resume el efecto citotóxico de la simvastatina en el rango de concentración de 0,01 µM hasta 100 µM. A partir de los datos se estableció como valor de IC50 a 48 h, 35 µM, y 29 µM a 72 h. En tiempos inferiores el medicamento no causo efecto citotóxico medible en este rango de concentración.

Figura 4-9: Efecto citotóxico de la simvastatina en rOB-GIH. Los datos se expresan como porcentaje respecto al control de cada tiempo y normalizado al cultivo en condiciones basales en presencia de vehiculo de simvastatina ± SEM.

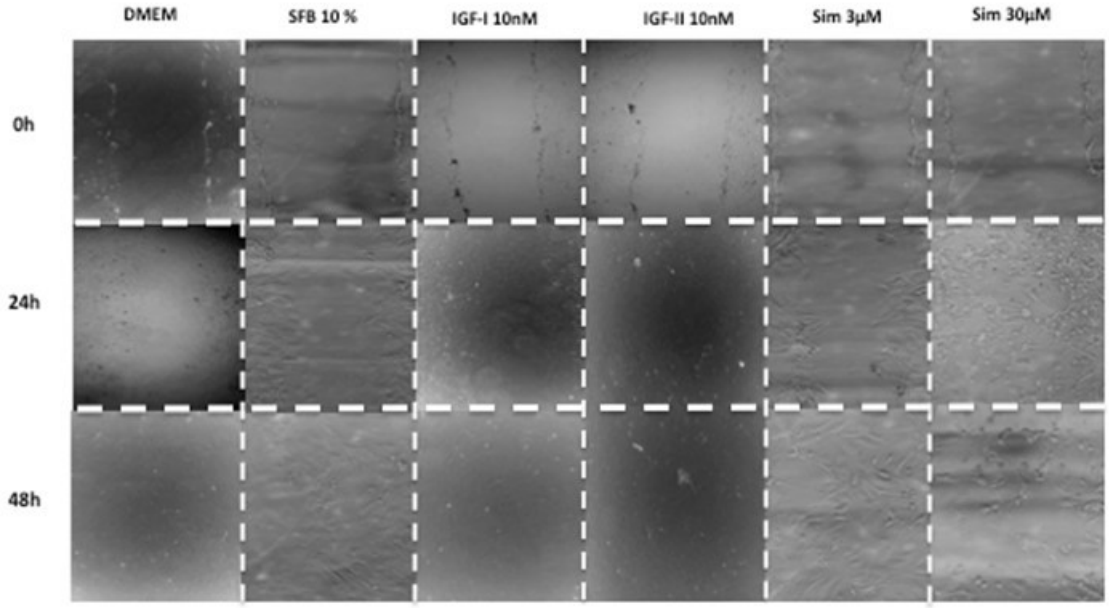


4.3 Efecto de la simvastatina en la migración celular

Uno de los procesos biológicos celulares más comúnmente realizados por las células sanas o malignas es la migración. Con el fin de establecer si la simvastatina afecta la migración celular en las líneas rOB-GIH y UMR-106, la migración celular se evaluó mediante el ensayo de curación de herida (*Wound healing*). Este ensayo destaca por su simplicidad, costo, efectividad y posibilidad de visualizar las células durante el proceso de migración mediante la generación de una herida transversal a la cual se le hace seguimiento en el tiempo, hasta que gracias a su capacidad migratoria se cubre el espacio vacío existente, lo cual permite evaluar la migración colectiva e interacción celular en un cultivo celular bajo diferentes condiciones [76].

Inicialmente se evaluó el efecto de la estatina en la línea rOB-GIH mantenida en medio DMEM con simvastatina a una concentración de 3 o 30 µM, siguiendo el cultivo desde que se creó la herida hasta cuando se cerró a las 72 h De igual forma se evaluaron los efectos de IGF-I e IGF-II a una concentración de 10 nM por péptido y su influencia como factor quimiotáctico pro-migratorio (Figura 4-10).

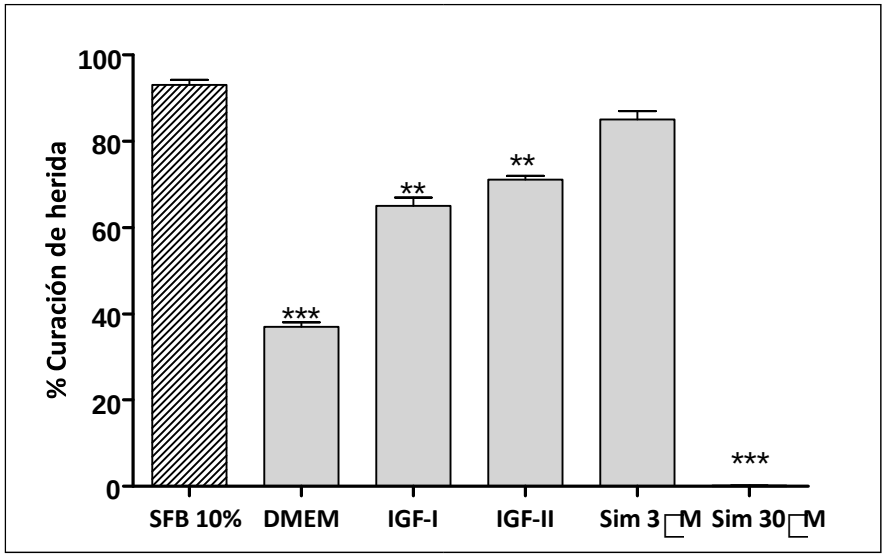
Figura 4-10: Micrografías de ensayo curación de herida en la línea rOB-GIH. A las células en monocapa al 95% se les realizó herida, se retiró células en suspensión, se trataron con simvastatina, IGFs o SFB y se realizó seguimiento en el tiempo. Se realizó registro fotográfico en microscopio de contraste en aumento 20X.



Al incubar la línea rOB-GIH con simvastatina se identificó que a una concentración de 3 µM hubo reducción del porcentaje de células migrantes (aproximadamente 5%) pero no fue significativamente diferente con el porcentaje de curación de las células control, las cuales se mantuvieron con DMEM suplementado con SFB 10% (Figura 4-11). Caso contrario al observado en las células tratadas con simvastatina 30 µM, las cuales a partir de las 24 h de tratamiento mostraron una pérdida de la integridad de la monocapa, que se incrementó en tiempos mayores, generando que todas las células quedaran en suspensión y en consecuencia la pérdida del seguimiento de curación de herida (Figura 4-10).

En las células estimuladas con IGFs por 24 h, se evidenció el efecto quimiotáctico de los péptidos. En este tiempo las células experimentan un porcentaje de curación equivalente al doble del porcentaje de curación resultante en células sin SFB ($p<0.001$) y alcanzan aproximadamente el 70% del efecto logrado por el SFB ($p<0.01$). A las 48h del ensayo todos los tratamientos llegaron a un cien por ciento de curación de herida. Es de anotar que al comparar con las células que no reciben ningún tratamiento, la simvastatina 3µM parece comportarse como un estímulo quimiotáctico superior a los ligandos del sistema IGF.

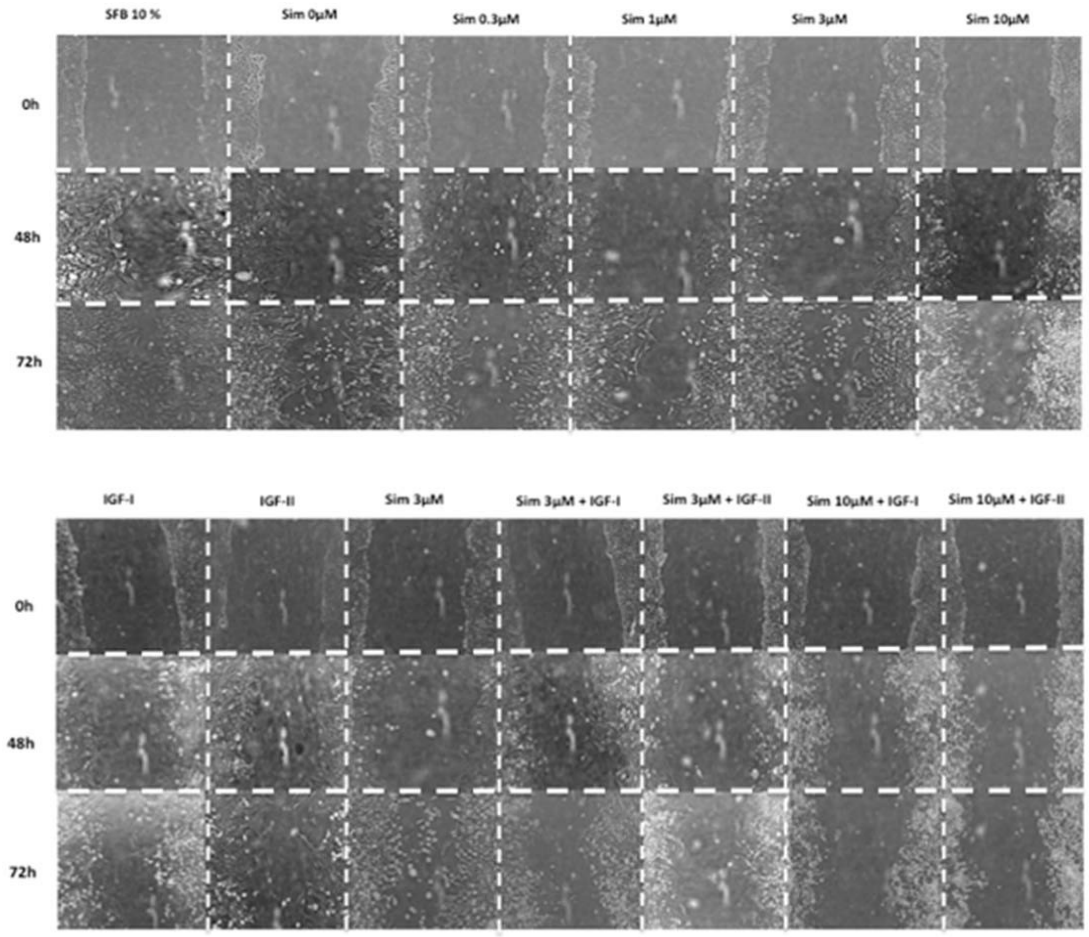
Figura 4-11: Efecto de simvastatina en la migración celular de rOB-GIH. Los valores son promedio ± SEM de 2 réplicas en tiempo de curación de 24h. Las diferencias se calcularon mediante prueba t-student no pareada con respecto al tratamiento con SFB, siendo ** p<0.01 y *** p<0.001.



En forma paralela a los osteoblastos se evaluó el efecto de la simvastatina en la línea tumoral UMR-106. Se prolongó el tiempo de seguimiento del ensayo hasta 72 h dado el tiempo de cierre de las células en la condición control. La presencia de simvastatina en el cultivo generó una disminución en la curación de la herida (Figura 4-12 superior y 4-13 superior). Se observó una respuesta dosis-dependiente. El aumento de la dosis de simvastatina disminuye la capacidad para cerrar la herida inicial y a partir de la dosis 3 µM se observó una estabilización del proceso de migración, alcanzando una inhibición aproximada del 48% (Figura 4-13). Este ensayo se realizó bajo condiciones de cultivo que minimizaron la proliferación celular.

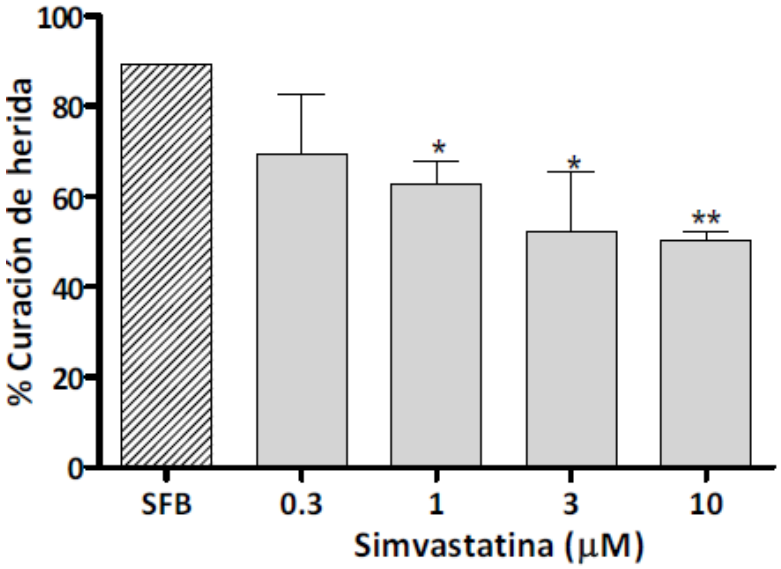
Adicionalmente, con el fin de evaluar si el efecto de la simvastatina podría ser atenuado o revertido por factores de crecimiento provenientes del ambiente tumoral *in vivo*, se incubó con IGF-I e IGF-II (Figura 4-12 inferior). Como resultado obtenido del uso de los péptidos a una concentración de 10 nM se observó que ambos promueven el cierre de la herida. En el caso del IGF-I, la migración es comparable al efecto del SFB, corroborando que este tipo celular es altamente sensible a este factor mitogénico (Figura 4-13 intermedia). La respuesta a IGF-II alcanzó un valor superior al 60% del control (Figura 4-13 inferior). No obstante, no fue significativamente diferente de lo observado con simvastatina 3 µM, debido a la variación de los datos en el punto de la estatina.

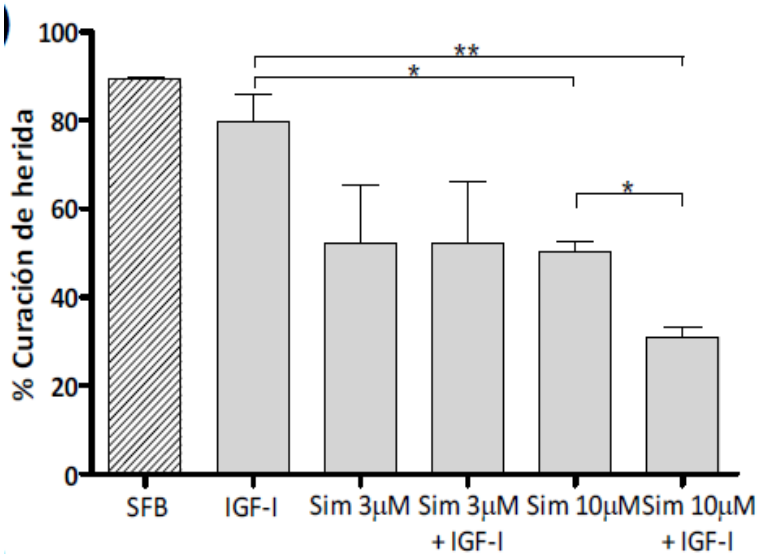
Figura 4-12: Micrografías de ensayo curación de herida en la línea UMR-106. Superior; Células tratadas con simvastatina a concentraciones de 0.3 hasta 10µM. Inferior; Células estimuladas con IGF–I o IGF-II 10nM. Cada tratamiento se registró fotográficamente por observación al microscopio en aumento 20x.

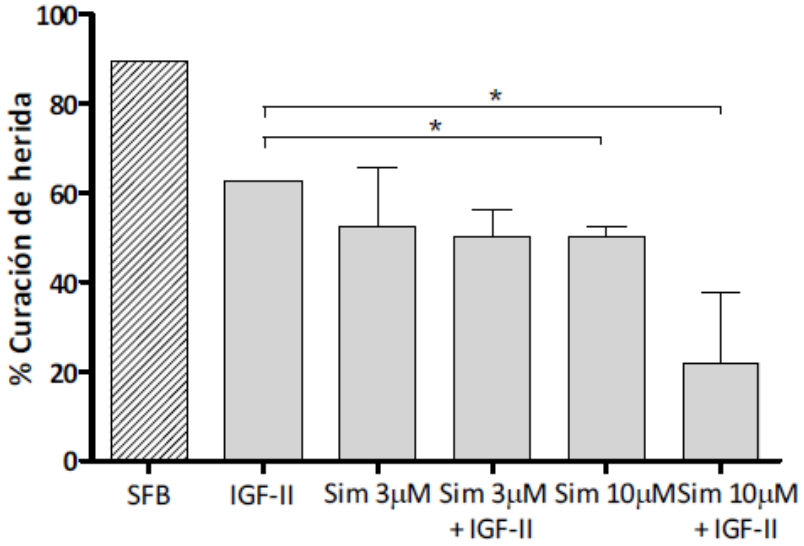


A pesar de lo anterior, si se observa la tendencia podemos anotar que el efecto quimioatrayente de los péptidos fue aplacado por la simvastatina independientemente de la dosis utilizada. Llama la atención que el efecto combinado de simvastatina 10 µM e IGFs generó una reducción aún mayor en la migración celular, alcanzando alrededor de un 30% del porcentaje de cierre de la herida (Figura 4-13 intermedia e inferior).

Figura 4-13: Efecto de simvastatina en la migración celular de la línea UMR-106. Cuantificación del cierre de herida en presencia de Simvastatina sola (superior), o en conjunto con IGF-I 10nM (intermedia) o IGF-II 10nM (inferior). Se utilizó SFB 10% como control. Los valores se expresan como promedio ± SEM. Diferencias estadísticas se calcularon mediante prueba t-student, * p<0.05 y ** p<0.01.



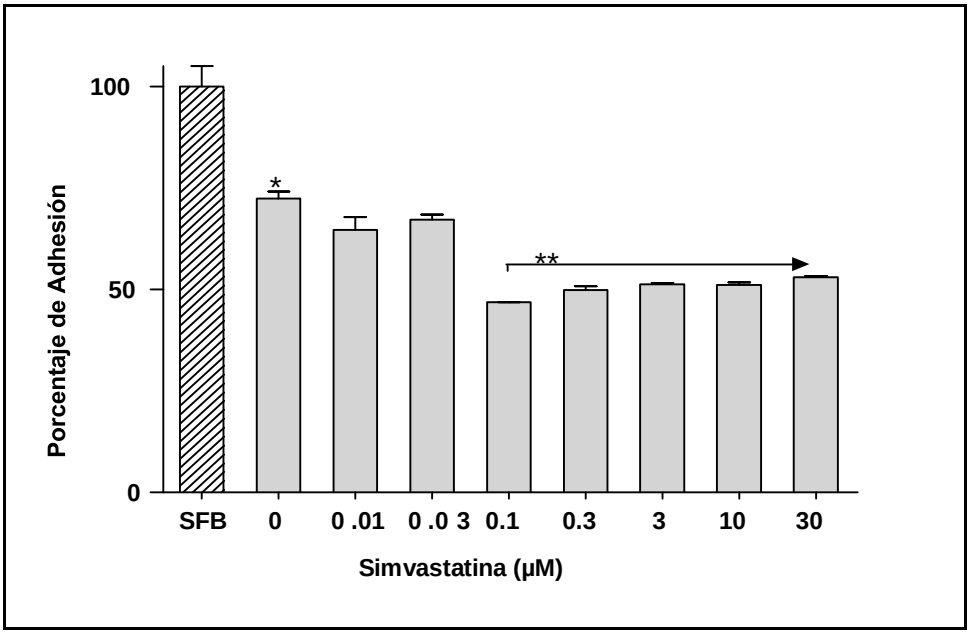




4.4 Efecto de la simvastatina en la capacidad de adhesión celular

Para evaluar si la simvastatina altera la capacidad funcional de la célula de adherirse a una superficie de cultivo en poliestireno, se realizó un ensayo en el cual se pre incubaron las células con simvastatina por 12 h bajos condiciones típicas del cultivo. Se observó la alteración de la morfología celular ya descrita anteriormente cuando se trata con dosis superiores a 3 μM. Al realizar el despegue de las células se observó que a mayor concentración de simvastatina un aparente menor tiempo de acción requerido de la tripsina para despegar la monocapa celular. El resultado de adhesión posterior de estas células a una placa de cultivo reflejó que la incubación previa con la estatina altera el número de células que se fijan nuevamente en comparación a cuando se mantienen en suero. En un tiempo de 4 h la totalidad de las células originales cultivadas en presencia de SFB se adhirieron nuevamente a la placa (Figura 4-14). En contraste, las células que se privaron de suero no lograron adherirse en el mismo tiempo, correspondiendo a una pérdida de células de aproximadamente el 28% ($p<0.05$), lo cual muestra que la privación de factores de crecimiento causa efecto deletéreo en la adhesión celular. Las células pre-tratadas con la simvastatina perdieron la capacidad de adherirse en ese mismo tiempo de una forma más pronunciada que con el vehículo ($p<0.005$). Dosis superiores a 0.1 μM fueron suficientes para generar y mantener una disminución del 50% en el número de células adheridas.

Figura 4-14: Efecto de la simvastatina en la adhesión celular de la línea UMR-106. Las células UMR-106 en ausencia de SFB se incubaron con vehículo o Simvastatina por 12h. Luego se despegaron con tripsina y se colocaron en un medio suplementado con SFB y se permitió adhesión por 4h. Los datos representan porcentaje de células adheridas en cada tratamiento ± SEM de dos réplicas biológicas. Diferencias estadísticas se calcularon mediante prueba t-student, * p<0.05 con respecto a SFB y ** p<0.005 con respecto a tratamiento a 0.



4.5 Efecto de la simvastatina en el remodelamiento de la matriz extracelular e invasión celular

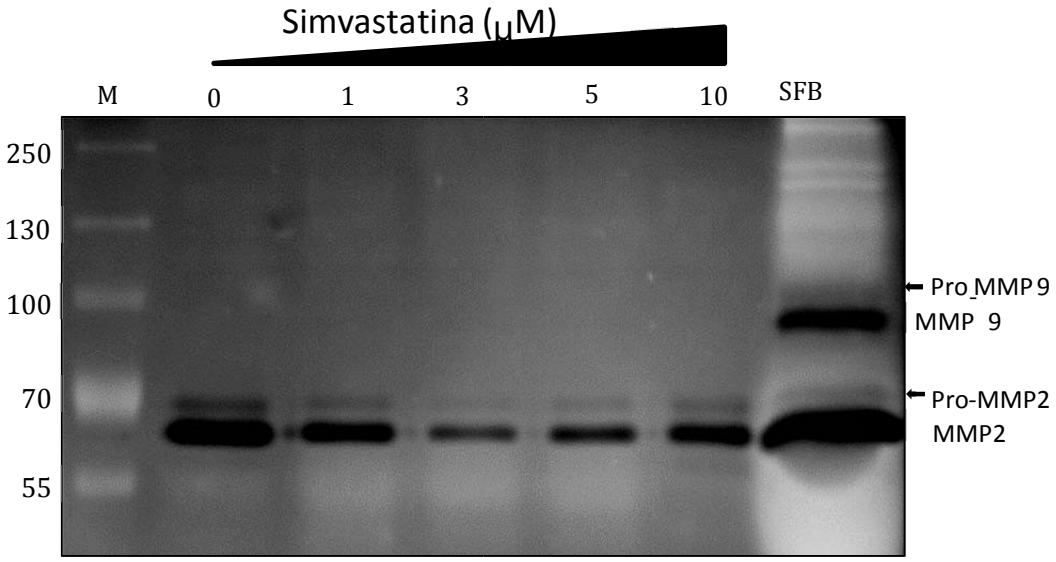
Siendo las metaloproteasas una familia de proteínas asociadas al remodelamiento de la matriz extracelular MMP y el proceso de invasión celular, se evaluó su actividad en los modelos de estudio. La medición de los cambios en la actividad de las MMPs se realizó mediante zimografía, haciendo uso de medios condicionados colectados en los diferentes ensayos en las líneas rOB-GIH y UMR-106; cada banda reflejo de actividad proteasa se analizó por densitometría. La banda de gelatinasa de la Pro-MMP-2/MMP-2 se reconoce en una zona de peso de 72/62 kDa y la de Pro-MMP-9/MMP-9 con bandas en peso de 92/82 kDa, respectivamente.

Inicialmente se evaluó el efecto de la simvastatina en la línea rOB-GIH incubando las células con el medicamento en concentración creciente de 1 a 10 µM, por un periodo de 12 h (Figura 4-15). Se observó que la simvastatina indujo cambios en la actividad de las MMPs. Interesantemente todos las dosis de la estatina causaron un detrimento estadísticamente significativo (p<0.05} en la actividad de la proteasa en comparación con

el control estimulado con SFB o el nivel basal en la condición de ensayo. De manera particular resalta que la dependencia en la respuesta a la dosis es directamente proporcional, a mayor dosis de simvastatina mayor nivel de actividad, cuando se ha superado el valor de 3 µM. Sorpresivamente las células tratadas con 1µM presentan una discontinuidad en la tendencia de la actividad de la metaloproteasa 2, siendo superior a las otras dosis analizadas. La actividad de la MMP-9 solo se observó en el tratamiento con SFB 10%, en el resto de tratamientos no se detectó su actividad (Figura 4-15).

Teniendo en cuenta el alto nivel de actividad de las MMPs en células tratadas con SFB, se evaluó el efecto de la simvastatina en población celular no privada de SFB bajo las mismas condiciones de uso del medicamento (Figura 4-16 superior). El resultado del tratamiento del cultivo con simvastatina en presencia de SFB fue una nivelación de la actividad de la MMP-2, es decir no hubo una disminución en la actividad de la proteasa por efecto de la estatina como se observó en ausencia del suero, tanto que en la condición 10µM hubo una aparente mayor actividad con respecto al SFB. Se observó la aparición de la actividad de la MMP-9 con una cinética similar a lo observado en ausencia de SFB para MMP-2, en donde la dosis 3µM presenta la menor actividad metaloproteinasa (Figura 4-16 inferior).

Figura 4-15: Efecto de la simvastatina en la actividad gelatinasa de MMPs en rOB-GIH. Superior; Zimografía en gel de poliacrilamida 10%, co-polimerizada con gelatina 0.4%. Inferior; Análisis densitométrico de la actividad de la MMP 2 en zimografía. Diferencias estadísticas se calcularon mediante prueba t-student con respecto a SFB, ** $p<0.005$ y *** $p<0.001$.



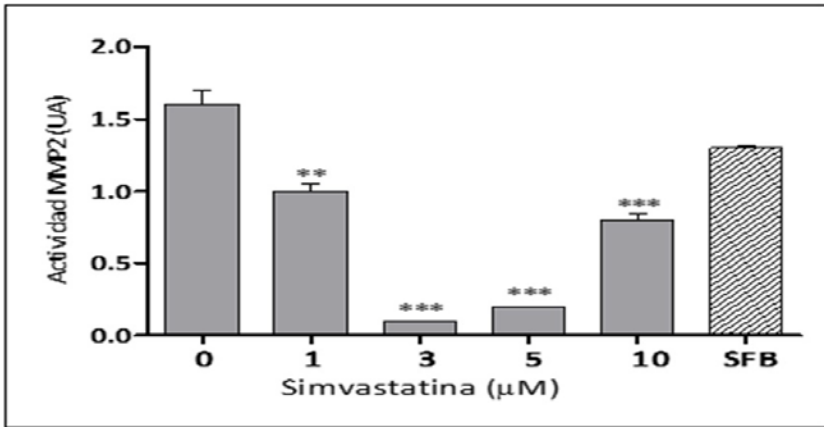
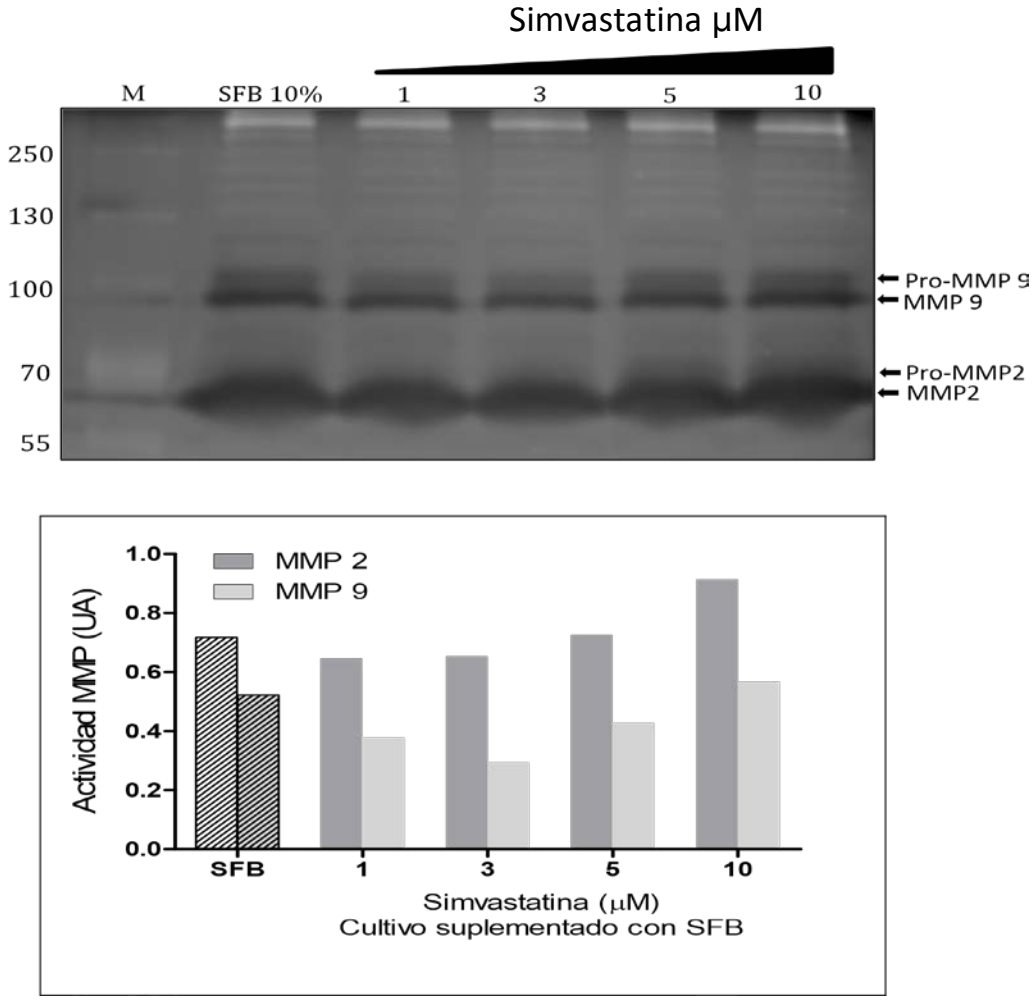
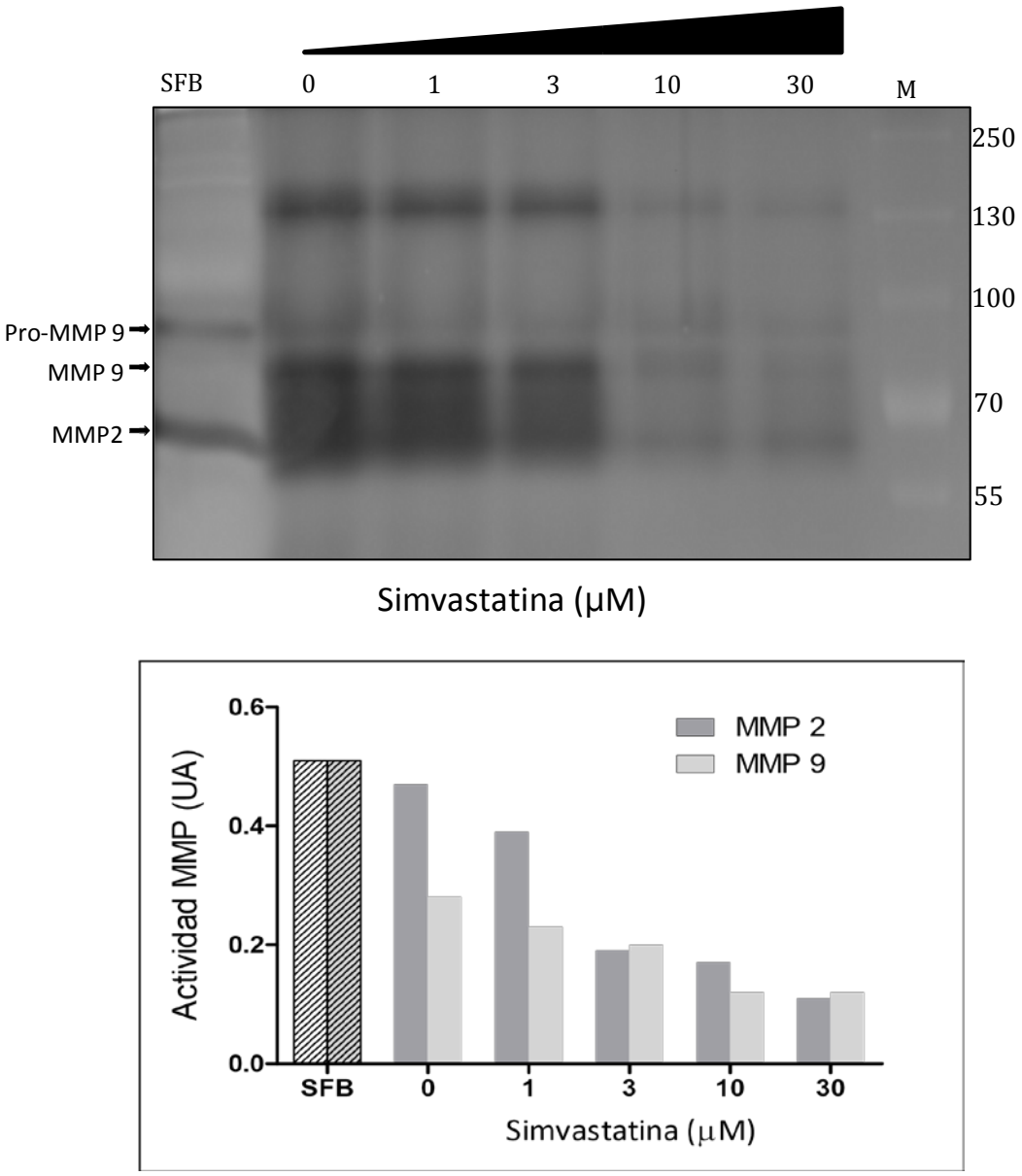


Figura 4-16: Efecto de la simvastatina sobre la actividad gelatinasa de MMPs en rOBGIH en presencia de SFB. Superior; Zimografía en gel de poliacrilamida 10%, co-polomerizada con gelatina 0.4%. Inferior; Análisis densitométrico de la actividad de las MMPs en zimografía.



En forma análoga se evaluó el efecto de la simvastatina en la línea UMR-106 sobre la actividad de las MMP-2 y 9, según las condiciones descritas (Figura 4-17 superior). Los resultados indican que la simvastatina actúa como un agente reductor de la actividad de las MMPs en este modelo, evidenciando que la reducción en la actividad de las MMP-2 y 9 es proporcional a la dosis, por lo tanto a medida que aumenta la concentración de simvastatina se reduce la actividad de las MMPs de forma significativa a un 24% comparado con el valor del tratamiento de SFB 10% (Figura 4-17 inferior).

Figura 4-17: Efecto de la simvastatina en la actividad gelatinasa de MMPs en UMR-106. Superior; Zimografía en gel de poliacrilamida 10%, co-polomerizada con gelatina 0.4%. Inferior. Análisis densitométrico de la actividad de las MMPs en zimografía.



4.6 Efecto de la simvastatina en la expresión génica de MMPs

Teniendo en cuenta que la simvastatina puede inducir cambios en la actividad de las MMPs, se analizó si lo hace sobre la expresión génica de las metaloproteasas. Se determinaron los cambios en la expresión del gen *mmp9* por medio de qPCR, a partir de material de las células de OS tratadas con dosis de simvastatina por un tiempo de 12 h. En el caso de *mmp2* hubo inconvenientes en la estandarización que impidieron evaluar su expresión.

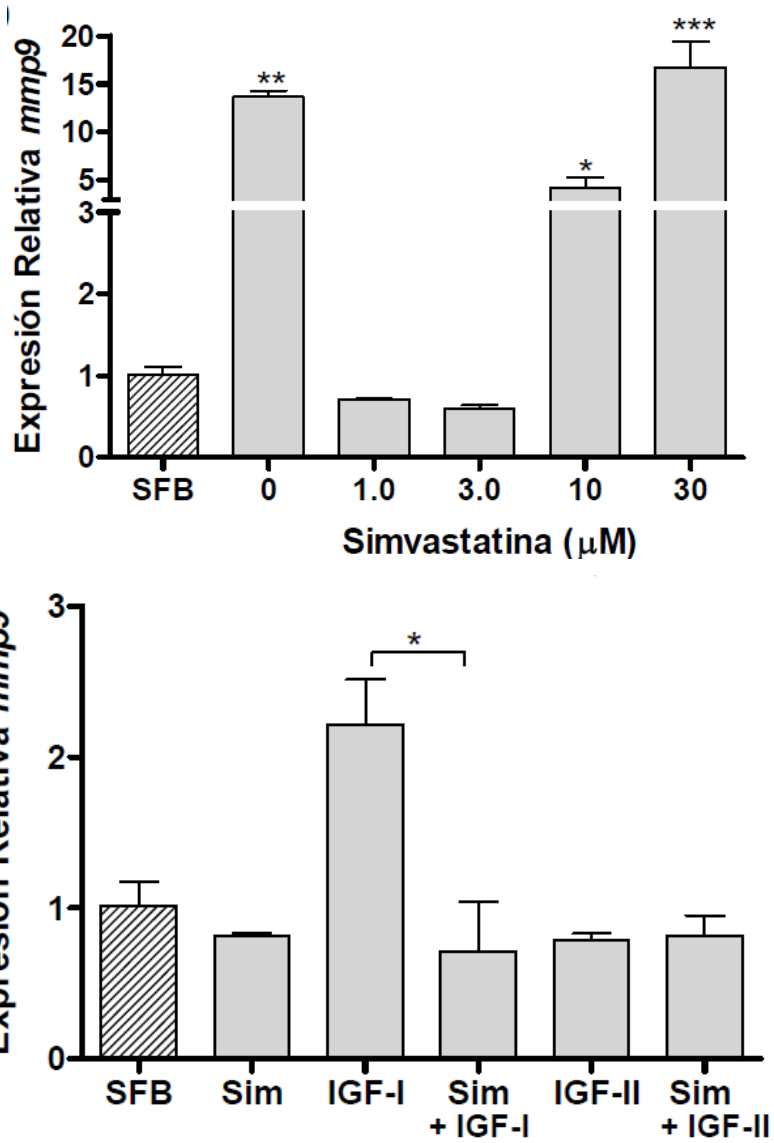
A 12 h de tratamiento los resultados evidencian una elevada presencia de transcritos de MMP-9 cuando se mantienen las células en privación de factores de crecimiento (Dosis 0 de simvastatina) o en concentraciones elevadas de la simvastatina en comparación con las células bajo condiciones de mantenimiento del cultivo (SFB) (Figura 4-18 superior). El primer cambio significativo en la expresión de *mmp9* se evidenció precisamente en las células incubadas con simvastatina 10 µM, tratamiento en el cual se observó una expresión génica cuatro veces mayor que las células mantenidas en condiciones normales. Si se compara con las células tratadas con el vehículo, es posible sugerir que la simvastatina en bajas concentraciones reprime los efectos de la privación de nutrientes.

Cuando las células se pusieron en contacto con IGF-I 10 nM durante 15 minutos, se observó inducción de la transcripción del gen *mmp9*, equivalente a 2 veces con respecto a células en cultivo en presencia de SFB (Figura 4-18 inferior). El pre-tratamiento con simvastatina impidió ese aumento específico del gen. El IGF-II no generó ningún efecto sobre la transcripción génica de osteosarcoma comparado con el control.

4.7 Efecto de la simvastatina en la inducción de apoptosis en la línea UMR-106

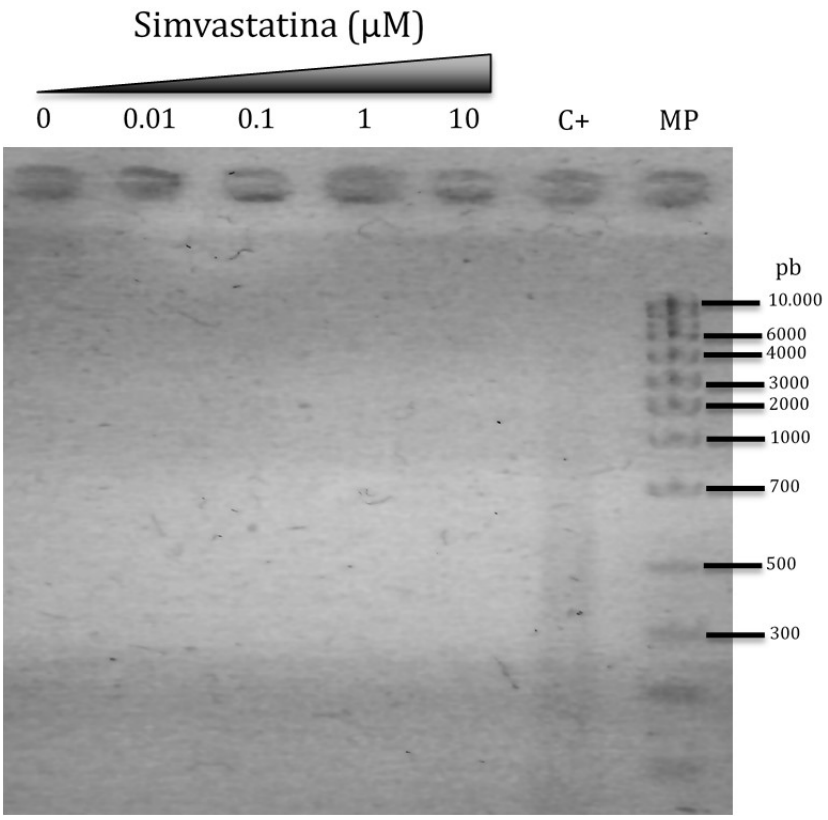
Se realizó extracción de DNA de células en tratamientos similares a los evaluados en los ensayos funcionales y observación de degradación del mismo como indicativo del estado apoptótico del cultivo. Se utilizó como control de escalera de DNA las células tratadas por 30 minutos con 1.5 µM de doxorubicina, inductor conocido de apoptosis. Al realizar la separación en gel de agarosa, se estableció que no había fragmentación observable del DNA por la privación de SFB o tratamiento por 12 h (Figura 4-19).

Figura 4-18: Efecto de la simvastatina en la expresión génica de MMP 9 en UMR-106. Los datos se muestran como expresión relativa de *mmp9* en relación a media geométrica de la expresión de *gapdh* y *ciclofilina* ± SEM de dos mediciones independientes. SFB corresponde a células en condiciones de mantenimiento del cultivo. Superior; Expresión génica en respuesta a dosis variables de simvastatina por 12h de exposición. Diferencias estadísticas se calcularon mediante ANOVA de una vía con pos test Bonferroni, *p<0.05, ** p<0.01 y *** p<0.001 con respecto a SFB. Inferior; Expresión génica en respuesta a ligandos IGFs (10 nM por 15 minutos) con o sin pre-tratamiento con simvastatina 3 □M durante 12h. Prueba t-student, *p<0.05.



Durante la inspección del cultivo tampoco se observó la formación de cuerpos apoptóticos en el tiempo de estudio. Lo anterior nos permite asegurar que en este tiempo en las dosis de interés no hubo eventos apoptóticos tardíos. No se descarta que haya pérdida celular por necrosis.

Figura 4-19: Efecto de la simvastatina sobre la apoptosis de UMR-106. Gel de agarosa 1% teñido con solución de bromuro de etidio. Las muestras corresponden a DNA de ensayo de fragmentación proveniente de 1x106 células tratadas con simvastatina. MP corresponde a marcador de peso molecular Axygen DNA 1kb. C+ es referente a tratamiento con Doxorubicina 1.5 µM.



Fue de nuestro interés contar con un cultivo en donde se pudiesen observar eventos de señalización relativamente tempranos antes del daño celular apoptótico. Es de nuestro conocimiento que con un tiempo de incubación superior a 24h el cultivo en presencia de simvastatina superior a 1µM entra en etapa apoptótica.

4.8 Efecto de simvastatina en la señalización por Rho, PI3K/Akt y MAPK/ERK en UMR-106

La simvastatina moduló efectos funcionales en población osteoblástica bajo las condiciones de estudio, por lo cual fue de interés de este trabajo correlacionarlos con la modulación de las vías de señalización inducidas por factores de crecimiento, tomando como modelo, las estimuladas por los ligandos IGFs.

4.8.1 Efecto de la simvastatina sobre RhoA

Inicialmente se determinaron los cambios de la expresión de Rho mediante qPCR. La cuantificación del gen mostró que los tratamientos con dosis superiores a 3 µM de simvastatina poseen una transcripción génica mayor a la presente en el vehículo o cuando es comparada con células cultivadas con SFB (Figura 4-20 superior). En dosis inferiores se observa una tendencia a presencia reducida de transcrito en forma dependiente de la dosis, aunque no se presentó significancia.

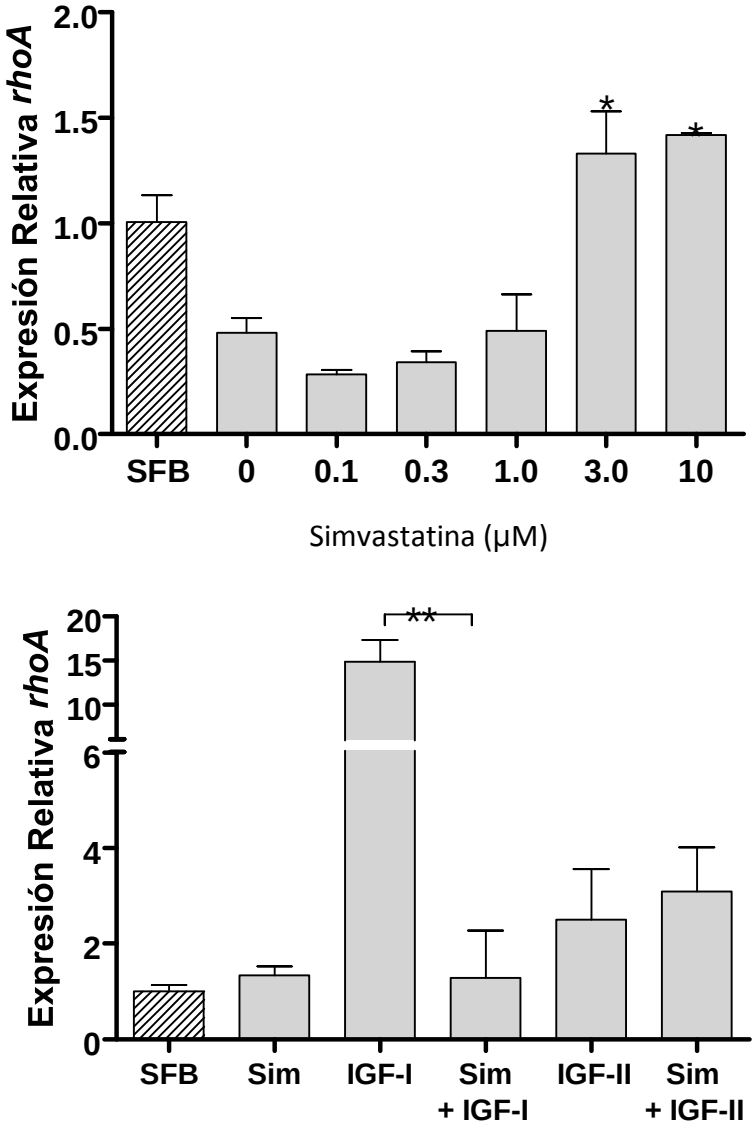
El factor de crecimiento IGF-I estimuló la transcripción del gen *rhoA* de una manera exacerbada, siendo alrededor de 13 veces con respecto al control. El pre-tratamiento con simvastatina abolió completamente esa transcripción (Figura 4-20 inferior).

Fue de interés evaluar la proteína presente en el cultivo frente a los diferentes tratamientos. Se probaron buffers de extracción tipo RIPA [77] e hipotónicos, se modificaron las condiciones de separación y de transferencia; sin embargo no fue posible reconocer la proteína en el extracto recuperado. Son diversas las causas probables de esta falta de reconocimiento en el Western blotting: niveles bajos de proteína en extracto, poca recuperación o poca especificidad del anticuerpo, entre otras.

4.8.2 Efecto de la simvastatina sobre PI3K/ Akt y Erk

Para esclarecer si la simvastatina puede ejercer los efectos funcionales anteriormente descritos por modulación de la vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK en la línea UMR-106 se incubaron las células con el medicamento a concentraciones variables entre 0.1 y 30 µM por 12 horas y se valoró algunos de las proteínas asociadas a las vías mitogénicas.

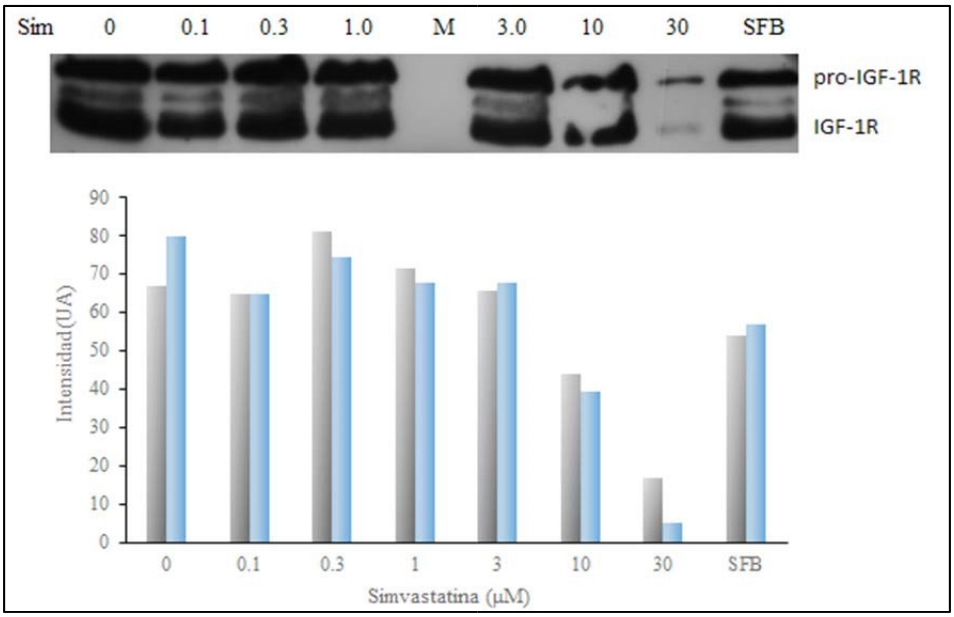
Figura 4-20: Efecto de la simvastatina en la expresión génica de Rho A en UMR 106. Los datos se muestran como expresión relativa de *rhoA* en relación a media geométrica de la expresión de *gapdh* y *ciclofilina* ± SEM de dos mediciones independientes. SFB corresponde a células en condiciones de mantenimiento del cultivo. Superior; Expresión génica en respuesta a dosis variables de simvastatina por 12h de exposición. Diferencias estadísticas se calcularon mediante ANOVA de una vía con pos test Bonferroni, *p<0.05 con respecto a 0. Inferior; Expresión génica en respuesta a ligandos IGFs (10 nM por 15 minutos) con o sin pre-tratamiento con simvastatina 3 □M durante 12h. Prueba t-student, **p<0.001.



Primero, se evaluó la expresión del receptor tirosina quinasa para IGF-I (IGF-IR), efector corriente arriba en ambas vías de señalización. La simvastatina indujo un cambio en la expresión de IGF-IR de forma dosis-dependiente en la línea UMR-106. A concentraciones de simvastatina inferiores a 3 µM se observó un ligero aumento en la expresión de la subunidad beta del receptor en comparación con la expresión en las células tratadas con

SFB. Sin embargo, por ser el reflejo de un único ensayo no se puede asegurar que este aumento sea significativo estadísticamente. En las dosis de 10 y 30 µM la disminución en la cantidad de del receptor, como de la forma precursora pro-IGF-1R, es notoria. Estos resultados pueden ser causados por la alteración que la simvastatina ejerce en la membrana celular pero también puede contemplar la interrupción en la síntesis de la proteína dado que los extractos analizados corresponden a extractos totales (Figura 4-21).

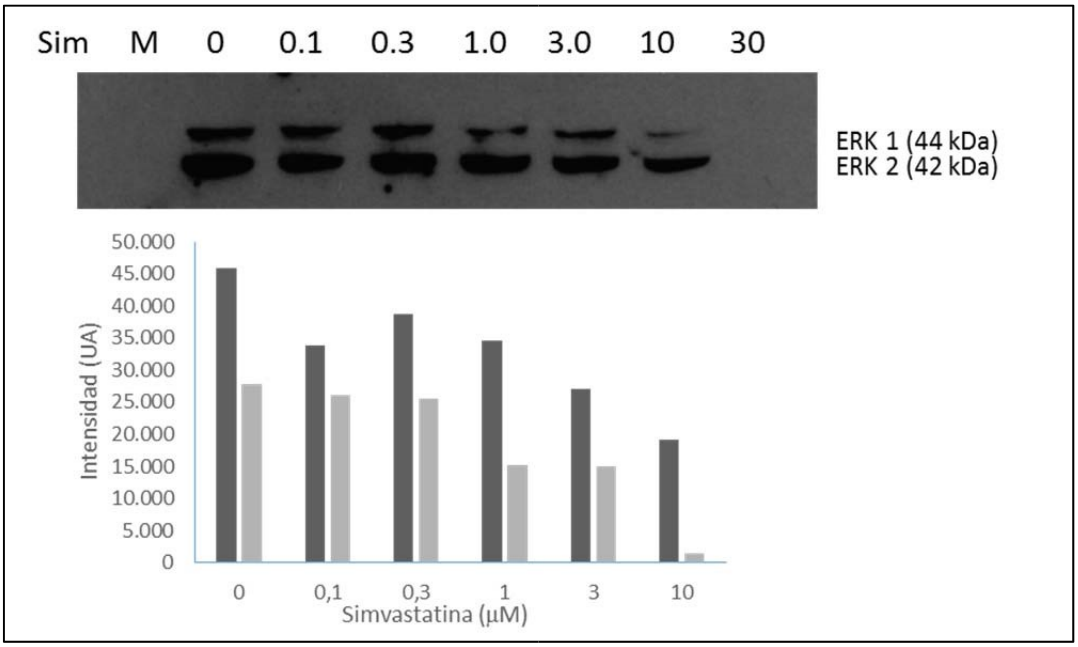
Figura 4-21: Efecto de la simvastatina en la expresión del receptor tirosina quinasa para IGF-I en la línea UMR-106. 25 µg de extracto total de proteína proveniente de células UMR-106 incubadas con vehículo o simvastatina se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se realizó western blotting tal como se describe en Materiales y métodos.



SFB, representa extracto de células cultivadas en presencia de SFB 10% bajo condiciones típicas de manutención del cultivo. M, corresponde a marcador de peso molecular. La figura inferior refleja la cuantificación densitométrica de las bandas proteicas observadas arriba.

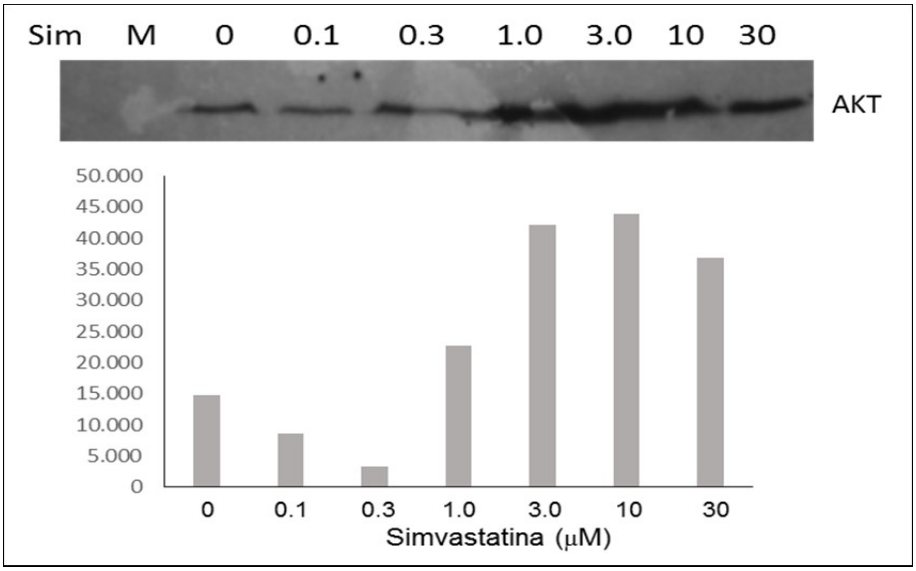
Posteriormente se observaron los efectores corriente abajo, Erk 1/2 y Akt, de las vías MAPK y PI3K, respectivamente. Al evaluar el efecto de la simvastatina sobre Erk 1/2 en función de la concentración se observó una disminución evidente en la expresión de ambas proteínas dependiente de la dosis (Figura 4-22). No obstante, la proteína p44 fue más sensible al tratamiento y en 10 µM es casi inexistente. Las bandas correspondientes a las proteínas no aparecieron en el carril correspondiente a 30 µM, a pesar de la carga semejante de la proteína. En todas las membranas se verificó que la cantidad de proteína sembrada fuese semejante por tinción reversible con solución 2% Rojo Ponceau.

Figura 4-22: Efecto de la simvastatina en Erk 1/2 en la línea UMR-106. 25 µg de extracto total de proteína proveniente de células UMR-106 incubadas con vehículo o simvastatina se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se realizó western blotting tal como se describe en Materiales y métodos. M, corresponde a marcador de peso molecular. La figura inferior refleja la cuantificación densitométrica de las bandas proteicas observadas arriba.



El reconocimiento de Akt, mostró que la proteína se aumentó a medida del incremento de la dosis de la simvastatina, alcanzando aproximadamente 2.3 veces mayor expresión a partir de la dosis 3 µM, en contraste con lo observado previamente en las otras proteínas (Figura 4-23).

Figura 4-23: Efecto de la simvastatina en la expresión de Akt en la línea UMR-106. 25 µg de extracto total de proteína proveniente de células UMR-106 incubadas con vehículo o simvastatina se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se realizó western blotting tal como se describe en Materiales y métodos. M, corresponde a marcador de peso molecular. La figura inferior refleja la cuantificación densitométrica de las bandas proteicas observadas arriba.



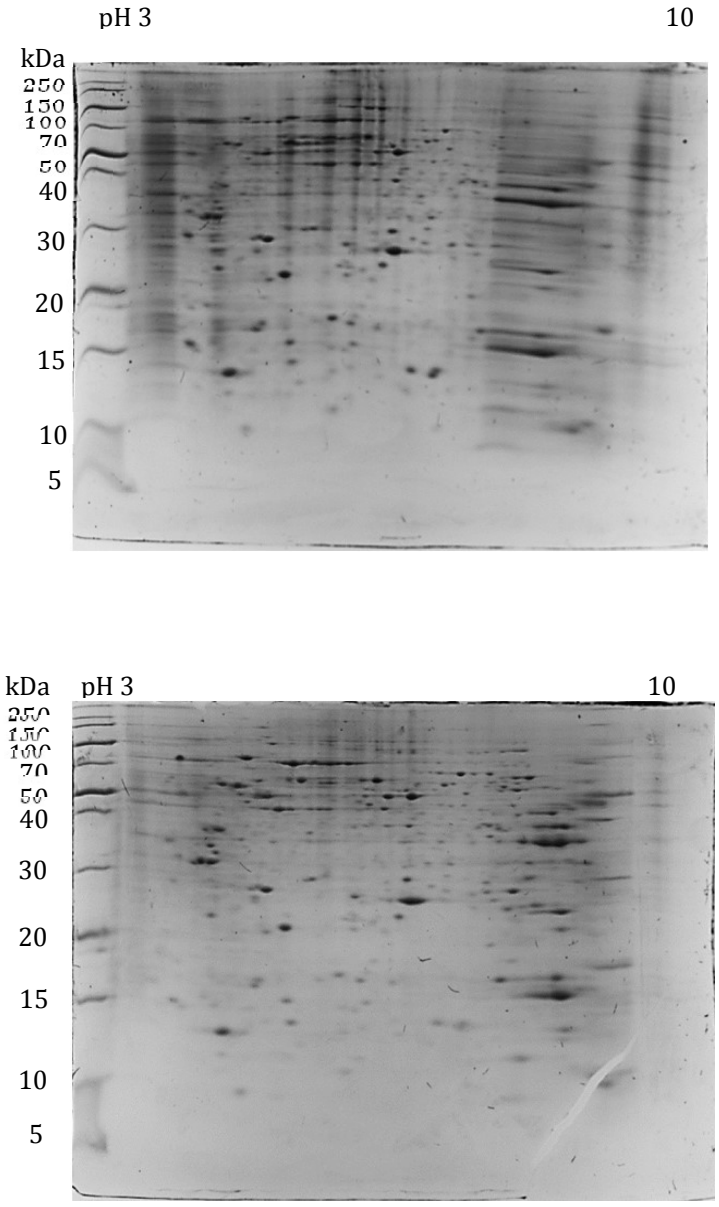
4.9 Aproximación al proteoma de UMR 106

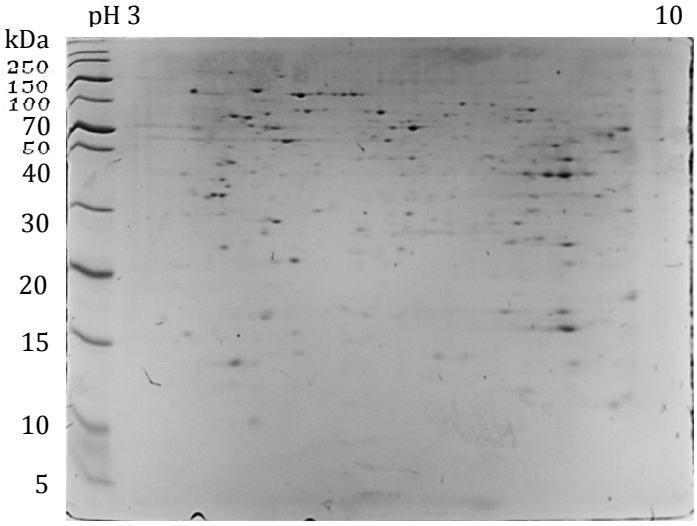
El tratamiento con simvastatina genera múltiples cambios en el proteoma de las células UMR-106, tal como se encontró al usar la aproximación proteómica con separación en electroforesis bidimensional. Para contextualizar, extractos proteicos provenientes de las células incubadas en medio DMEM en ausencia (Figura 4-24A) o presencia de simvastatina 3 µM (Figura 4-24B) y 10µM (Figura 4-24C) durante 12 h, se separaron según su punto isoeléctrico en tiras inmovilizadas de pH 3 a 10 en condición no lineal en una primera dimensión, para posteriormente separar según su relación de masa molecular en geles de poliacrilamida SDS al 12%.

Las proteínas separadas se visualizaron en forma de spots por tinción con el colorante azul de Coomassie coloidal. La documentación de los geles permitió hacer un análisis comparativo con el software Melanie (GeneBio). Como primer acercamiento se realizó un duplicado de cada condición. En el proteoma de las células en condición control en ausencia del medicamento se observaron aproximadamente 328 spots distribuidos a lo largo del rango completo de separación de pH. Este número se mantuvo el caso de las células tratadas con simvastatina 3 µM mientras que hubo una reducción apreciable con el incremento de la dosis, siendo de 205 spots a 10 µM (Figura 4-24C). El gel representativo que se observa en la figura 22A, de acuerdo con los investigadores del

grupo, parece tener una concentración mayor de proteína que los otros, a causa de una aparente falta de enfoque, no obstante esto se verifico y la réplica dio resultados similares. Lo anterior nos permite sugerir que el tratamiento con la estatina cambia el perfil proteico de manera dosis dependiente.

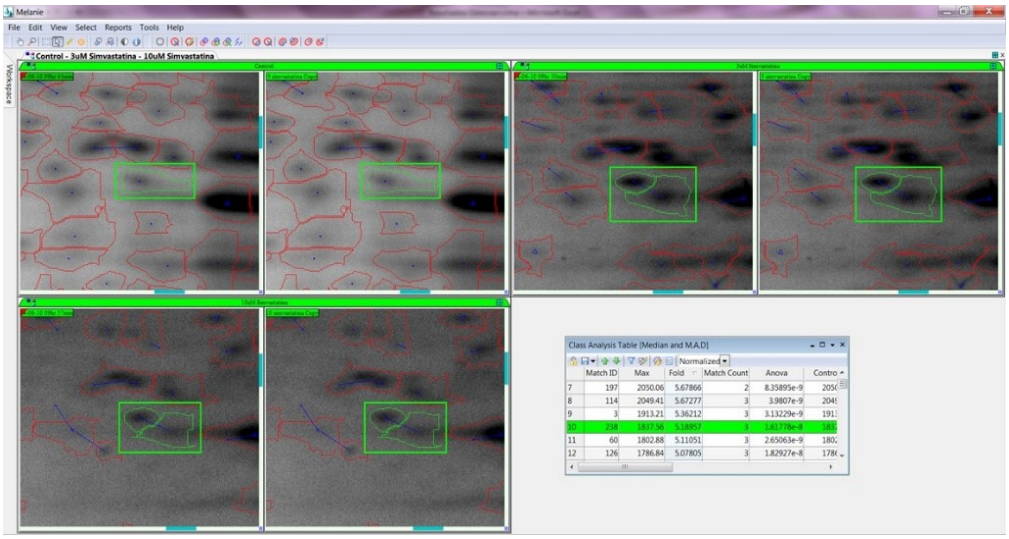
Figura 4-24: Perfil electroforético en dos dimensiones de la línea UMR-106. 100µg de proteína proveniente de células incubadas en medio solo (Superior), o con simvastatina 3µM (Intermedio) o 10µM (Inferior) se separaron en tiras IPG 3-10 no lineal y SDS PAGE según se describe en Métodos. Tinción por azul de Coomassie.

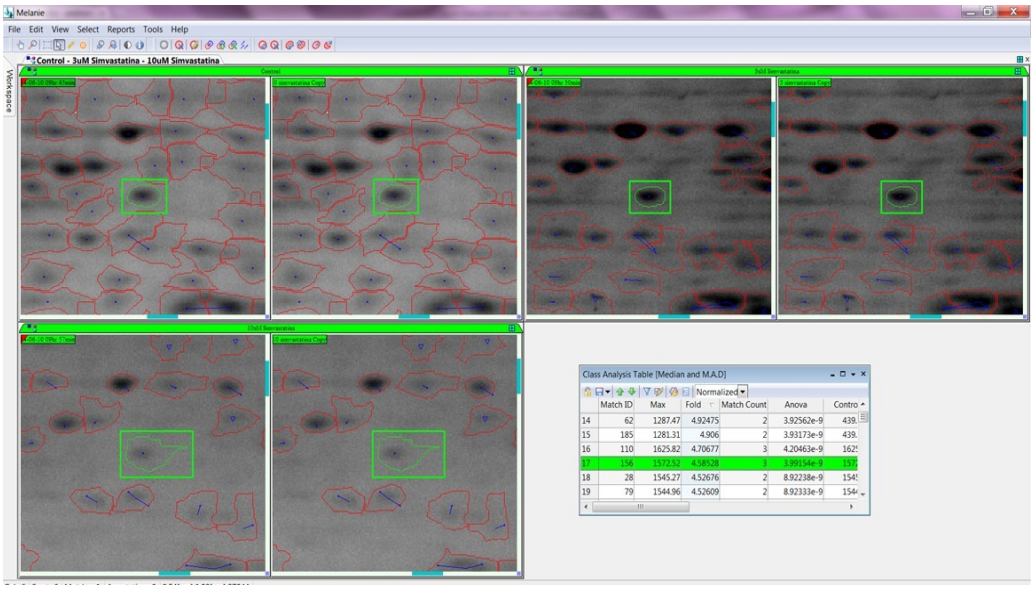


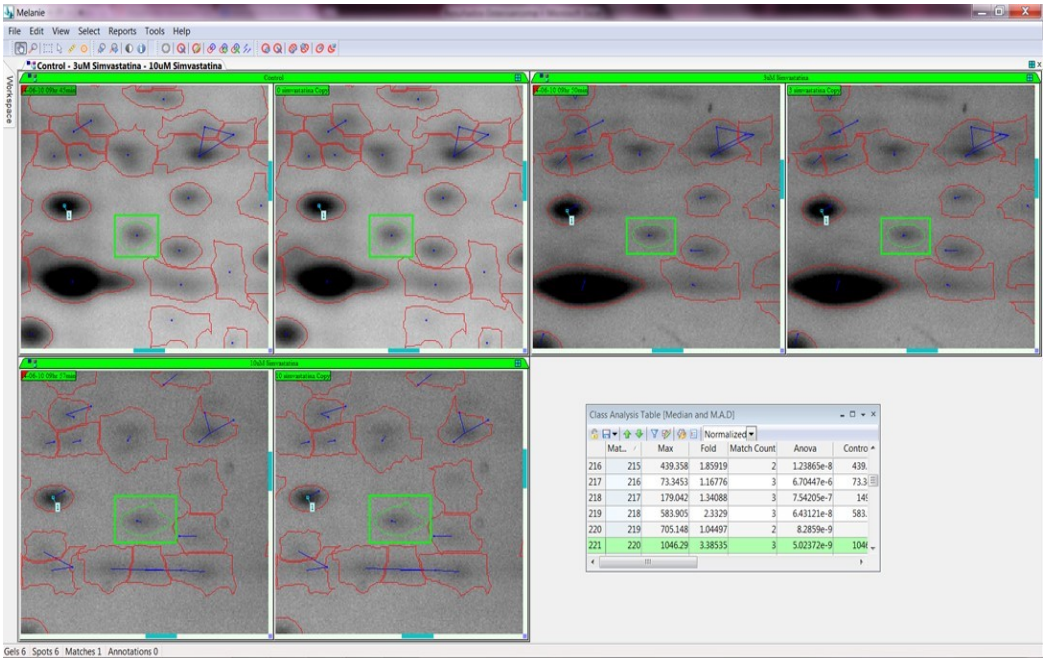


Se aplicó la prueba de análisis de factores relacionados en el reconocimiento de spots con que cuenta el sistema Melanie, como herramienta para verificar la concordancia de geles y la posible discriminación de spots que permitan inferir que los tratamientos tienen respuesta diferencial. En esta prueba se tiene en cuenta volumen, profundidad, y otros elementos que utiliza el programa para caracterizan cada spot y generar ejes de comparación. Cada punto del plano representa un gel encontrándose sobrelapados las correspondientes réplicas Se observó claramente que hay discriminación entre los geles por tratamiento, estando más alejados del control, como era de esperarse los spots del tratamiento con dosis 10 µM de simvastatina (Figura 4-25).

Figura 4-25: Spots representativos de cambio en tratamiento de UMR 106 con simvastatina. Los spots ID 238 (A), ID 17(B) y ID 220 (C) se documentaron con programa Melanie y se compararon por prueba de Anova y Kolmogorov- Smirnov a un nivel de significancia del 0.05.

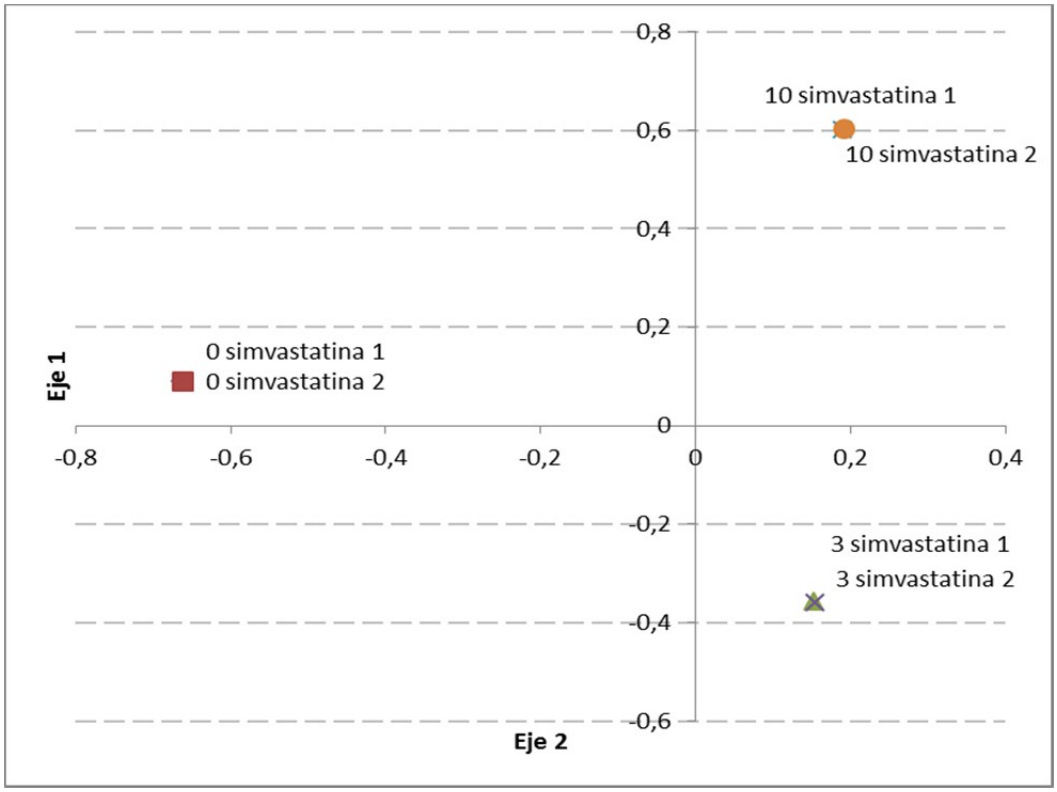






Se reconocieron spots que presentan expresión diferencial entre el tratamiento y el control. Para ello se utilizó filtro por el número de veces que un spot cambio con respecto al control con un valor de 3, lo cual concordó con diferencias significativas menores a $p< 0.05$, en 23 spots. Estos spots son aquellos que mantuvieron su cambio en los dos tratamientos de simvastatina. A manera de ejemplo se presentan 3 spots representativos de este comportamiento. En el primero de ellos se observa un incremento en la respuesta a simvastatina y presenta una diferencia superior a 5, por tanto es de interés su identificación. Los otros dos presentaron reducción progresiva a causa del tratamiento, siendo de 4.4 y 3.4 respectivamente (Figura 4-26).

Figura 4-26: Análisis de factores de geles bidimensionales de la línea UMR 106



Aunque no se cuenta con la identificación de las proteínas por espectrometría de masas para este documento, esta es una labor prioritaria, convirtiendo estos resultados en un escaneo inicial de otros puntos de modificación de la simvastatina que nos permitan ampliar el conocimiento sobre su mecanismo de acción en el OS.

5. Discusión

El uso terapéutico de las estatinas en el tratamiento de las enfermedades asociadas a hipercolesterolemia es amplio dado sus reconocidos beneficios sobre el metabolismo del colesterol. No obstante, su aplicación con otros fines clínicos ha sido más polémica y reservada, probablemente a causa de la diversidad de eventos bioquímicos y moleculares que se han observado *in vivo* o que son dependientes del modelo celular *in vitro* empleado.

Para la comunidad científica interesada en la búsqueda de medicamentos como soporte a tratamientos que apoyen una mejor calidad de vida de pacientes, no ha sido posible pasar por alto las potenciales bondades de las estatinas en cuanto a tratamiento de cáncer. En ese orden de ideas, este trabajo pretendió discernir si la simvastatina modula efectos antitumorales en osteosarcoma, el cual además de ser un cáncer agresivo usualmente desarrolla resistencia a medicamentos. Fue de particular interés establecer el nivel citotóxico de la estatina en células cancerosas comparativamente con el linaje celular no tumoral; así como los efectos en la migración e invasión celular, y reconocer si estos están relacionados con la modulación de la expresión de proteínas asociadas a vías de señalización mitogénicas típicas de estados alterados de crecimiento.

Para discutir los alcances del trabajo es preciso reconocer que la simvastatina es uno de los miembros de la familia de las estatinas mejor toleradas por el organismo, se caracteriza por ser lipofilica, lo cual facilita su paso a través de la membrana plasmática y en consecuencia su absorción por el intestino. El hígado es el principal órgano blanco de acción de las estatinas, por su papel como productor de colesterol [26]. Sin embargo, diferentes grados de selectividad hepática se han observado para estos compuestos y no existe un consenso entre la comunidad científica. El seguimiento del tratamiento con simvastatina ha permitido observar que toma de 4 a 6 semanas para reducir los niveles de colesterol. Esto lleva a pensar que un efecto dosis dependiente de la estatina es más plausible farmacodinámicamente que una concentración única [78].

Es de suponer que factores como la salida del medicamento del hígado y la exposición sistémica a los compuestos activos repercuten en las acciones clínicas de las estatinas.
Aunque los datos cinéticos son pocos e incompletos, especialmente para lovastatina y simvastatina, es claro que el mecanismo por el cual actúan está relacionado con la selectividad tisular. Los efectos de las estatinas a nivel hepático han sido ampliamente estudiados, sin embargo los efectos pleiotrópicos pueden depender del grado de acción

en tejidos extra hepáticos; así, estudios en población de osteoblastos pueden ser un buen contribuyente de información sobre su modo de acción.

Los estudios muestran que altas dosis de simvastatina pueden tener efectos anticancerígenos. En los modelos *in vitro* se probaron dosis de la estatina en un rango de 0.1 a 100 µM con el fin de observar si existe dependencia de los efectos anticancerígenos con la dosis. Es de resaltar que en humanos a pesar de las altas dosis suministradas de forma oral, la simvastatina disponible en plasma es reducida, con valores que oscilan entre 0.08 a 2.2 µM [78]. Estos valores muestran correlación con las dosis usadas en esta investigación.

5.1 La simvastatina tiene un efecto bimodal en la viabilidad celular de osteoblastos no tumorales

Según los resultados que se obtuvieron en esta tesis, la simvastatina mostró capacidad de inducir una disminución en la viabilidad celular en la línea rOB-GIH. Esta disminución fue significativa a una concentración de 30 µM, y se mantuvo a partir de las 48 h de tratamiento, indicando que los efectos son dosis y tiempo dependientes. Un análisis más detallado, muestra que en la línea rOB-GIH, las concentraciones de simvastatina de 0.1 a 1 µM, consideradas como dosis bajas; generan un aumento en la viabilidad, en comparación con las células mantenidas en condiciones normales. Este aumento puede ser interpretado como la inducción de un evento proliferativo por efecto de la simvastatina a concentraciones bajas. Esto refuerza los resultados de *Hwang et al.* 2004 [79], quienes reportaron que la simvastatina en concentración de 1 µM por tiempos superiores a 72 h induce proliferación en la línea MC3T-E1 transformada de osteoblastos de rata de origen calvario. A pesar de esto el uso de simvastatina a una concentración de 10 µM indujo procesos de diferenciación celular en los osteoblastos, caracterizados por la disminución en la expresión de colágeno tipo 1, osteocalcina y fosfatasa alcalina [79].

Estos efectos de tipo anabólico en el hueso también se han visto *in vivo* en ensayos donde se evaluó el efecto de la simvastatina en dosis de 1 y 10 mg/kg/día (la dosis óptimas de uso de la simvastatina se encuentra entre 20-80mg/Kg/día) en ratones. Estos efectos de remodelamiento óseo se atribuyeron a la activación del promotor del gen BMP2 *(Bone Morfogenic Protein -2)* y el consecuente incremento en la expresión de la proteína BMP-2 [80]. Es importante resaltar que este comportamiento está estrechamente relacionado al tipo celular y a la dosis de simvastatina. En otros ensayos con dosis cercanas a 50 mg/kg/día aún se preservan un efecto positivo que promueve la curación de fracturas en hueso pero simultáneamente efectos citotóxicos en otros tejidos, tales como rabdomiolisis, necrosis hepática e incluso la muerte [25, 31, 81].

Aunque nuestros datos corroboran que la simvastatina es citotóxica para rOB-GIH, con un IC50 de 35 µM, resulto ser más resistente en comparación con otros modelos no tumorales como la línea BRL-4 de hígado de rata, los cual presenta un IC50 de 15.2 µM a las 24h de tratamiento [82].

La simvastatina inhibe la viabilidad e induce citotoxicidad celular en la línea UMR-106 con un IC50 de 2.7 µM en 48h [82], indicando una mayor tolerancia por parte de rOB-GIH a la simvastatina que la tolerancia de UMR-106 al mismo medicamento (2.7 M vs 35 µM, respectivamente). Valores similares de IC50 a los de UMR-106 han sido manifestados para otros modelos de cáncer, en los cuales la simvastatina resulto ser altamente eficiente reduciendo viabilidad e induciendo citotoxicidad, por ejemplo en las líneas de cáncer de seno MDA-MB-231, MCF-7 y SUM-159 se han reportado valores de IC50 de 2.7±0.2, 6.0±1.0 y 4.0±0.6 respectivamente [38], o en la línea OCM-I de melanoma coroidal con un IC50 de 5.4±0.8µM a las 48h [83].

Lo anterior es relevante porque una actividad diferencial de la simvastatina sobre la población de osteoblastos no tumorales con modelo tumoral reviste gran importancia en la clínica. Estudios que profundicen esta diferencia serán necesarios más adelante.

5.2 La simvastatina disminuye la migración y adhesión celular en osteoblastos y osteosarcoma

La migración es un proceso complejo que se lleva a cabo por casi todos los tipos celulares eucariotas. En algunos de los tipos celulares como el epitelial, estromal o neuronal la migración se da únicamente en algún momento de su desarrollo, a diferencia que otros tipos como en los leucocitos donde la migración es un proceso integral asociado a su función y manutención lo largo de la vida [84]. Los osteoblastos migran de forma constante con el fin de remodelar la matriz ósea proceso que se da a lo largo de la vida. En cáncer las células migran de forma muy activa durante la metástasis, y así inducir la diseminación del cáncer.

Lo que se obtuvo con relación al efecto de la simvastatina en nuestras líneas celulares fue una reducción de la misma de forma dosis dependiente. Al evaluar el efecto de la simvastatina a una concentración de 3 µM en la línea rOB-GIH, se observó un retraso en el proceso de migración colectiva, retraso apreciable a las 24 h en comparación con las células en condiciones normales. Al aumentar la concentración de simvastatina a 30 µM se percibieron cambios drásticos en el resultado. El cultivo a partir de 24 h sufrió cambios a nivel morfológico, caracterizado inicialmente por el redondeamiento de las células asociado con reorganización en la formación de las fibras de estrés de actina y un daño progresivo del citoesqueleto que se incrementó con el tiempo a partir de las 16 h de incubación (datos no mostrados).

Al evaluar como la simvastatina afectó la migración celular en la línea UMR-106, se observó un efecto más marcado en UMR-106 que en rOB-GIH. La simvastatina indujo una disminución de la migración celular de forma dosis y tiempo dependientes, evidente a concentraciones de 3 y 10 µM, con una reducción aproximada del 50% en el porcentaje de migración. Los efectos a nivel morfológico se observaron en la línea de OS a dosis de 10 µM.

Efectos similares en la reducción de la migración se observaron en la línea PC3 de cáncer de próstata, que presentó una perdida en la habilidad migratoria al ser tratada con simvastatina 25 µM y una pérdida total de migración a 100 µM [85]. De igual forma en la línea THP-1 de leucemia aguda humana se observó como la simvastatina 20 µM inhibe completamente la migración celular [86]. En estos casos en que la simvastatina inhibe la migración celular, el proceso se ha asociado con la inhibición de la geranilgeranillacion de Rho A, la cual al no ser modificada postraduccionalmente no activa los efectores corriente abajo de la vía de señalización de Rho A/ROCK [87]. Durante el transcurso de este trabajo, múltiples autores reportaron que la simvastatina induce cambios en la expresión de Rho A.

Como se mencionó anteriormente el tejido óseo es altamente dinámico y los diferentes tipos celulares que lo componen migran de forma constante gracias a diferentes factores quimiotácticos, que generan una migración direccional, dentro de los cuales los IGFs juegan un papel clave en la formación y mantenimiento del hueso. En la línea celular MC3T3-E1 se identificó que el IGF-I es el factor quimiotáctico secretado a nivel celular más abundante durante la migración de curación de herida [88].

En esta tesis se evaluó si los IGFs actúan como factores quimiotácticos induciendo migración en nuestro modelo y si la estatina contrarresta esta función. Según los resultados, los IGFs indujeron un proceso de migración en las líneas rOB-GIH y UMR106, confirmado su efecto quimiotáctico para este tipo celular. Cuando se evaluó el efecto de los IGFs junto a la simvastatina a una concentración de 3 µM no se observaron cambios entre los tratamientos. Al aumentar la dosis de simvastatina a 10 µM se observó una reducción significativa de la migración, indicándonos como es anulado por completo el efecto quimiotáctico de los IGFs por parte de la simvastatina.
La adhesión celular es un proceso crítico para que ocurra la migración y resulta común asociar una disminución en la adhesión celular junto a la reducción de la migración. La simvastatina inhibió la adhesión celular en UMR-106 de forma dosis dependiente. Según nuestro ensayo en condiciones de mantenimiento del cultivo, el tiempo necesario para que las células de OS se adhieran en un cien por ciento fue de 4h, tiempo en el cual las células tratadas con simvastatina en concentraciones de 0.1 µM hasta 30 µM perdieron su capacidad de adhesión lo cual es concordante con los resultados en la migración.

5.3 La simvastatina disminuye la invasión celular en UMR-106

El remodelamiento óseo se da gracias a la interacción coordinada entre osteoblastos encargados de la formación del hueso mediante la síntesis de componentes de la matriz ósea y los osteoclastos que facilitan la reabsorción del hueso por medio de la degradación de la matriz ósea. Este proceso involucra dos clases de enzimas proteolíticas, las cisteinproteasa y las MMPs [89]. Las MMPs son capaces de degradar diferentes tipos de colágeno, tal como el colágeno tipo I, IV y V, siendo el colágeno de tipo I el mayor componente de la matriz ósea. Se ha identificado que las MMP-1, 8 y 13 así como la MMP-2 y 9 tienen la capacidad de degradar el colágeno y otros componentes de la matriz, por lo tanto se encuentran normalmente expresadas y activas en osteoblastos y osteoclastos [90, 91]. Según nuestros resultados, no se detectó una actividad por parte de la MMP-9 en la línea rOB-GIH en ningún tratamiento a excepción de las células mantenidas en condiciones normales con SFB. La MMP-9 se puede encontrar de forma activa en el tejido óseo; se ha evidenciado principalmente en osteoblastos maduros aunque con una actividad baja [92]. Es más común ver una mayor expresión y actividad de la MMP-9 en otros tipos celulares propios del mismo tejido como los osteoclastos y sus precursores los monocitos [93]. La falta de actividad por parte de la MMP-9 también se reportó en la línea HFL-1 de fibroblastos humanos de pulmón, los cuales se emplearon en un estudio que evaluó el efecto la simvastatina a una concentración de 5 µM [94].

Por otra parte, se detectó actividad de la MMP-2 en la línea rOB-GIH, en presencia o ausencia de SFB. Se observó que la simvastatina generó cambios significativos inhibiendo la actividad de la MMP-2 de forma dosis dependiente, siendo el tratamiento de simvastatina 3 µM, el que generó la mayor inhibición en la actividad. Como parte de este efecto dosis dependiente, se observó que a dosis de 1 µM hay una mayor actividad de la MMP-2 posiblemente por el efecto proliferativo de la simvastatina que generó un mayor número de células que pueden secretar una mayor cantidad de la metaloproteasa. Una mayor actividad a 10 µM de simvastatina, por su parte, puede ser debida a la modulación que causa la estatina en la diferenciación en osteoblastos [95]. Aunque este fenómeno es peculiar, efectos similares se ha observado en trofoblastos los cuales participan en el remodelamiento de la matriz extracelular endotelial, en los cuales la simvastatina a dosis de 10 µM por 24 h, indujo una disminución en la actividad de la MMP-2 pero al aumentar el tiempo de tratamiento a 72 h se observó un aumento en la actividad de la misma [96]. Igualmente es necesario esclarecer y profundizar más sobre estos efectos particulares.

Según los resultados en la línea UMR-106 la simvastatina demostró tener un efecto dosis dependiente, a medida que aumenta la concentración de simvastatina se disminuye la actividad de la MMP-2 y 9 confirmando su efecto en el control de la invasión y metástasis en OS. Efectos similares se han observados en otras líneas celulares como la HT1080 de fibrosarcoma humano en las cuales la simvastatina redujo significativamente la actividad de las MMP-2 y 9 a medida que aumenta la dosis de simvastatina [97]. Al evaluar el efecto de la simvastatina en la expresión génica de la MMP-9 se observaron cambios

significativos dependientes de la dosis, induciéndose una mayor expresión génica de la *mmp9* en los tratamientos con 10 y 30 µM, en comparación con las células mantenidas en condiciones normales. Esta acumulación puede deberse a una alteración en la traducción de la proteína, sugiriendo que la simvastatina ejerce una regulación a nivel transcripcional y de actividad en la MMP-9.

A dosis bajas entre 1 y 3 µM la simvastatina no indujo cambios significativos en la transcripción de *mmp9* en comparación con las condiciones normales de mantenimiento de la línea celular. Adicionalmente se evaluó el efecto de la simvastatina en la regulación génica de la *mmp9* en presencia de IGF-I y II. Se ha identificado que IGF-I no solamente es uno de los factores más importantes en la estimulación de la migración celular sino que también influye en la invasión y metástasis en OS al igual que en diferentes tipos de cáncer. Según los resultados obtenidos, el único péptido que indujo un cambio significativo en la transcripción del gen fue el IGF-I, ratificando su importancia en la modulación de la expresión génica de la MMP-9 en OS. Se evidenció que la simvastatina regula la invasión celular modulando el efecto del factor de crecimiento sobre la transcripción del gen de la proteasas.

Es importante destacar la asociación del péptido con la diferenciación celular de osteoblastos [98], nuestros resultados nos permiten inferir que la simvastatina como agente modulador de la diferenciación en este tipo celular no solamente es a través de la regulación de la ALP o la expresión de BMP-2 sino que puede hacerse por la modulación directa de vías asociadas a la señalización de IGF-I. Definitivamente, los resultados obtenidos en este estudio son concordantes con que la simvastatina tiene efectos sobre la migración e invasión celular.

5.4 La simvastatina modula la expresión de Rho A, ERK y Akt

Aunque los mecanismos moleculares responsables de los efectos anti-proliferativos y anti-invasivos de las estatinas aún no se conocen, los efectos de las estatinas son asociadas con la modulación de diferentes vías de señalización y originalmente su efecto en la regulación del cáncer se asoció directamente con la regulación de las vías de señalización asociadas a las proteínas de la familia Ras como blanco de acción. Dentro de esta familia la investigación ha vinculado el efecto de la simvastatina especialmente con la proteína Rho A de las Rho GTPasa. En este trabajo de tesis se evaluó el efecto de la simvastatina en la modulación de la expresión génica de Rho A, encontrando un efecto dosis dependiente que muestra que a medida que se aumenta la concentración de simvastatina se genera una acumulación de transcrito. Esto puede llevar a pensar que hay un aumento en la síntesis proteica de Rho A. Cabrera mostró que la estatina efectivamente aumenta los niveles citoplasmáticos de la proteína, al no ser translocada hacia la membrana celular [71]. Lo anterior nos permite proponer que el aumento en la transcripción génica observado en el osteosarcoma es un intento de las células por restablecer los niveles de la proteína

anclada a membrana. Nuevamente, en este modelo se observa que el IGF-I estimula la transcripción de Rho A de una manera altamente significativa en comparación con el control. De igual forma que lo observado en la transcripción de la *mmp9*, la simvastatina anula el aumento en la expresión del gen causado por el IGF-I, sugiriendo que la acción de la simvastatina puede estar asociada a la regulación de factores de crecimiento.

Con el fin de caracterizar el efecto de la simvastatina en las diferentes vías de señalización asociadas a estos ligandos, se evaluó la expresión del receptor de IGF-I en las células de UMR-106. Se observó un efecto dosis dependiente en la expresión del receptor, caracterizado por una disminución de su expresión a concentraciones de 10 y 30 µM, lo cual que implica que las acciones mediadas por este receptor se vean drásticamente alteradas en concentraciones altas de la simvastatina, y se desencadene los efectos anti-cancerígenos que hemos atribuido a la estatina en osteosarcoma.

Efectos a dosis bajas se observaron previamente en la línea C2C12 de mioblastos de ratón en los cuales al evaluar el efecto de la simvastatina a concentraciones de 0,1 a 1 µM no se observaron cambios en la expresión de receptor, pero si se observaron cambios en la expresión de precursor del receptor aumentando a medida que se incrementó la concentración de simvastatina, efectos similares a los obtenidos por nosotros en los cuales a concentraciones similares no se observaron cambios en la expresión del receptor y a una concentración de simvastatina 30 µM en la que el precursor de receptor presento una mayor expresión [98].

Al evaluar el efecto de la simvastatina sobre la vía de señalización MAPK mediante la expresión de las proteínas ERK 1-2 fue posible evidenciar un efecto dosis dependiente de la simvastatina, generando una disminución apreciable a la concentración de 10 µM. Teniendo en cuenta que la vía de las MAPK participa en la regulación de diferentes proceso celulares, es posible ratificar el efecto pro-apoptótico y anti-proliferativo de la simvastatina en nuestro modelo de cáncer a esta concentración o una concentración mayor.

La activación de vías de señalización dependientes de factores de crecimiento es otro punto en la mira cuando se presenta cáncer. Recientes datos indican que la activación de la vía PI3K es asociada con la agresividad biológica, la resistencia a medicamentos y pobre prognosis en tipos de cáncer como la leucemia linfoide tipo T [99], que hacen retomar la idea que PI3K es una vía oncogénica dominante y promueve el crecimiento de células resistentes.

Nuestros resultados indican que la simvastatina no altera la cantidad de proteína quinasa, sin embargo causa una alteración en la actividad de Akt, siendo dosis dependiente evidenciable a partir de concentraciones 1 µM de simvastatina aumentando su expresión. Esta alteración puede conllevar a deficiencia en el sistema de defensa de antioxidantes por la supresión de la expresión de *scavengers* de especies reactivas de oxígeno, como MnSOD, CAT y de esta forma inducir estrés oxidativo y muerte celular apoptótica, en concordancia con reportes recientes en células de cáncer de colon [100]. Al menos un

porcentaje de muerte es debido al incremento del estrés oxidativo intracelular y la inducción de la apoptosis.

Se sabe que las células transformadas producen altos niveles de ROS, mayores a las de las células normales conllevando a progresión del cáncer. De esta forma mecanismos de regulación sobre la producción de ROS pueden modular la progresión por sensibilización de células transformadas oncogénicamente. Si las estatinas incrementan la generación de ROS esto selectivamente pueden afectar las células cancerosas llevándolas a la muerte, mientras el estrés no causaría el mismo efecto sobre las células no transformadas [101]. Lo anterior sugiere la vulnerabilidad de células de cáncer al mayor estrés oxidativo. Esto puede explicar las diferencias de sensibilidad de los osteoblastos no tumorales en relación a células de osteosarcoma. También es de reconocer que el análisis morfológico reveló que las células pierden su fenotipo adherente y asumen una morfología circular, siendo evidente en dosis superiores a 1 µM en tiempos de cultivo superiores a 10 h (datos no mostrados), y que permanecen así hasta las 24h. Fue posible observar citolisis por inspección en microscopia de contraste de fase.

Ensayos de análisis proteico en dosis 3 µM se trabajaron en tiempos de incubación de 12h deseando tener una población celular cuyas vías de señalización podrían reflejar efectos tempranos del medicamento sin el desencadenamiento final de muerte irreversible o eventos necróticos.

Para descartar los eventos necróticos a consecuencia de tratamiento con simvastatina, diversos autores han evaluado la liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo celular. En carcinoma de colon, por ejemplo, se encontró una liberación de LDH de manera dosis dependiente, sugiriendo muerte necrótica en rango de dosis de 5 a 20 µM [100]. Sin embargo, se determinó que esta liberación de LDH indicativo de ruptura de la membrana en etapas tempranas de muerte celular fue liberada por necrosis secundaria a causa de apoptosis tardía en el cultivo celular.

Aunque se considera que Akt juega un papel importante en supervivencia celular y contribuye a la resistencia de células cancerosas a terapias citotóxicas, investigaciones en fibroblastos embriónicos provenientes de ratones knock-out en Akt mostraron que Akt induce la acumulación de radicales de oxigen. Al igual que lo observado en nuestro ensayo, Qi y cols reportaron recientemente que la simvastatina induce la fosforilación de Akt en tiempo dependiente a 5 µM [100]. Evento que fue revertido por inhibidores de la via PI3K/Akt. Estos autores sugieren un sistema de retroalimentación que promueve la generación intracelular de ROS. Activación elevada de Akt suprime la expresión de antioxidantes [101].

Esto podría ser concordante, dado que la reducción de los intermediarios isoprenoides en la vía del mevalonato involucrados en la modulación positiva de isoprenoides no

esteroidales como coenzima q10 y dolicoles, están controlando el estado antioxidante de la célula. Su reducción conduce a estrés oxidativo y con ello la diferencia entre modelos no tumoral y tumoral.

En conclusión, consideramos que la simvastatina altera proteínas pertenecientes a diversas vías de señalización claves en el favorecimiento del cáncer. Esta investigación contribuye a sustentar el papel de la simvastatina como un medicamento promisorio en el tratamiento de osteosarcoma, y de esta forma mejorar la calidad de vida de los pacientes.

6. Conclusiones

A partir de este trabajo se concluyó que la simvastatina inhibe la viabilidad celular en osteoblastos de forma dosis y tiempo dependientes. No obstante, las células de osteoblasto no tumoral son más resistentes a los efectos de la simvastatina que las células de osteosarcoma de rata.

El osteoblasto respondió a concentraciones bajas de simvastatina con un fenotipo proliferante. A pesar de ello, se observó inhibición de la migración celular, sugiriendo mecanismos de acción de la simvastatina en procesos de diferenciación de las células óseas.

Se observó que la simvastatina disminuye la adhesión y la migración *in vitro* de células de osteosarcoma de rata. Este trabajo permite además concluir que la simvastatina tiene la capacidad de inhibir la invasión en osteosarcoma mediante la modulación de la actividad de la MMP-2 y MMP-9 de forma dosis dependiente, y de igual forma parece modular la expresión génica de MMP-9.

Se observó un potente factor quimiotáctico del IGF-I y su influencia a nivel celular favoreciendo la migración celular y la expresión génica de MMP-9 y Rho A en osteosarcoma.

La simvastatina disminuyó la expresión del receptor tirosina quinasa para IGF-I y ERK de forma dosis dependiente en osteosarcoma. En contraste con un aumento de la expresión de Akt, sugiriendo que hay una modulación de las vías de señalización asociadas a factores de crecimiento. De manera preliminar se encontró que la simvastatina induce cambios en el proteoma de osteosarcoma de forma dosis dependiente.

7. Bibliografía

1. Miao, J., Wu, S., Peng, Z., Tania, M., and Zhang, C., MicroRNAs in osteosarcoma: diagnostic and therapeutic aspects. Tumour Biol, 2013. 34(4): p. 2093-8.

2. Ottaviani, G. and Jaffe, N., The epidemiology of osteosarcoma. Cancer Treat Res, 2009.152: p. 3-13.

3. Picci, P., Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). Orphanet J Rare Dis, 2007. 2: p. 6.

4. Jaffe, A.B. and Hall, A., Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 247-69.

5. Sandoval-Usme, M.C., Umana-Perez, A., Guerra, B., Hernandez-Perera, O., Garcia- Castellano, J.M., Fernandez-Perez, L., and Sanchez-Gomez, M., Simvastatin impairs growth hormone-activated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway in UMR-106 osteosarcoma cells. PLoS One, 2014. 9(1): p. e87769.

6. Sandoval-Usme, M., Ordóñez, N., Umaña-Pérez, A., Fernández-Pérez, L., and Sánchez- Gómez, M., Anti-tumor effects of simvastatin on umr-106 osteosarcoma cell line. Rev. acad.colomb.cienc.exact.fis.nat., 2011. 35(136): p. 8.

7. Lin, P. and Patel, S., Osteosarcome, in Bone Sarcome, A. Buzdar and R. Freedman, Editors. 2013, Springer: New York. p. 75-97.

8. Hendershot, E., Solid tumor, in Solid Tumors Pediatric Oncology 2005.

9. Dorfman, H.D., Czerniak, B., Kotz, R., Vanel, D., Park, Y.K., and Unni, K.K., Pathology and Genetics of Tumors of Soft Tissue and Bone. World Health Organization Classification of Tumors, ed. K.K.U.F.M. Fletcher2002, Lyon: IARC Press.

10. Geller, D.S. and Gorlick, R., Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. Clin Adv Hematol Oncol, 2011. 8(10): p. 705-18.

11. Bielack, S., Carrle, D., and Casali, P.G., Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol, 2009. 20 Suppl 4: p. 137-9.

12. Roopnariane, A.P., The role of cell adhesion molecules and matrix metalloproteinases in osteosarcoma metastatic potential, in Genetics2009, Pennsylvania State University: Pennsylvania. p. 91.

13. Broadhead, M.L., Clark, J.C., Myers, D.E., Dass, C.R., and Choong, P.F., The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. Sarcoma, 2011: p. 959248.

14. Martin, J.W., Squire, J.A., and Zielenska, M., The genetics of osteosarcoma. Sarcoma, 2012: p. 627254.

15. Ricafort, R. and Gorlick, R., Molecularly Targeted Therapy for Osteosarcoma: Where Do We Go from Here? , in Molecularly Targeted Therapy for Childhood Cancer, P. Houghton and R. Arceci, Editors. 2010, Springer Science: New York. p. 459-498.

16. Wang, L.L., Biology of osteogenic sarcoma. Cancer J, 2005. 11(4): p. 294-305.

17. Fagioli, F., Biasin, E., Mereuta, O.M., Muraro, M., Luksch, R., Ferrari, S., Aglietta, M., andMadon, E., Poor prognosis osteosarcoma: new therapeutic approach. Bone Marrow Transplant, 2008. 41 Suppl 2: p. S131-4.

18. Gill, J., Ahluwalia, M.K., Geller, D., and Gorlick, R., New targets and approaches in osteosarcoma. Pharmacol Ther, 2012. 137(1): p. 89-99.

19. Luetke, A., Meyers, P.A., Lewis, I., and Juergens, H., Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. Cancer Treat Rev, 2013. 40(4): p. 523-32.

20. Huang, J., Ni, J., Liu, K., Yu, Y., Xie, M., Kang, R., Vernon, P., Cao, L., and Tang, D., HMGB1 promotes drug resistance in osteosarcoma. Cancer Res, 2012. 72(1): p. 230-8.

21. Kager, L., Potschger, U., and Bielack, S., Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. Ther Clin Risk Manag, 2010. 6: p. 279-86.

22. Fromigue, O., Hamidouche, Z., and Marie, P.J., Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 cascade by atorvastatin reduces osteosarcoma cell invasion. J Biol Chem, 2008. 283(45): p. 30549-56. 23.

23. Endo, A., The origin of the statins. 2004. Atheroscler Suppl, 2004. 5(3): p. 125-30.
24. Wong, W.W., Dimitroulakos, J., Minden, M.D., and Penn, L.Z., HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. Leukemia, 2002. 16(4): p. 508-19.

25. Vasconcelos, J., da Silva Leite, L., Vasconcelos, G., Souto Maior Araujo, I., and Garcia Ferro, L., Evaluation of simvastatin in the process of fracture healing in tibiae of rats. Rev Bras Ortop, 2013. 48(2): p. 191-195.

26. Maron, D.J., Fazio, S., and Linton, M.F., Current perspectives on statins. Circulation, 2000. 101(2): p. 207-13.

27. Wierzbicki, A.S., Poston, R., and Ferro, A., The lipid and non-lipid effects of statins. Pharmacol Ther, 2003. 99(1): p. 95-112.

28. Kuipers, H.F. and van den Elsen, P.J., Immunomodulation by statins: inhibition of cholesterol vs. isoprenoid biosynthesis. Biomed Pharmacother, 2007. 61(7): p. 400-7.

29. Rodríguez Perea, A.L., Montoya Guarín, C., and Velilla Hernández, P., Actividad inmunomoduladora de las estatinas y su efecto potencial sobre las células T reguladoras FOXP3+. IATREIA, 2011. 24(3): p. 1-12.

30. Koh, K.K., Quon, M.J., Han, S.H., Lee, Y., Kim, S.J., Park, J.B., and Shin, E.K., Differential metabolic effects of pravastatin and simvastatin in hypercholesterolemic patients. Atherosclerosis, 2009. 204(2): p. 483-90.

31. Calixto, J.C., Lima, C.E., Frederico, L., Lima, R.P., and Anbinder, A.L., The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. J Craniomaxillofac Surg, 2011. 39(3): p. 215-20.

32. Zhang, J., Yang, Z., Xie, L., Xu, L., Xu, D., and Liu, X., Statins, autophagy and cancer metastasis. Int J Biochem Cell Biol, 2012. 45(3): p. 745-52.

33. Sassano, A. and Platanias, L.C., Statins in tumor suppression. Cancer Lett, 2008. 260(1-2): p. 11-9.

34. Wang, C.Y., Liu, P.Y., and Liao, J.K., Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. Trends Mol Med, 2008. 14(1): p. 37-44.

35. Hindler, K., Cleeland, C.S., Rivera, E., and Collard, C.D., The role of statins in cancer therapy. Oncologist, 2006. 11(3): p. 306-15.

36. Zhou, Q. and Liao, J.K., Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. Circ J, 2010. 74(5): p. 818-26.

37. Schointuch, M.N., Gilliam, T.P., Stine, J.E., Han, X., Zhou, C., Gehrig, P.A., Kim, K., and Bae-Jump, V.L., Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exhibits anti metastatic and anti-tumorigenic effects in endometrial cancer. Gynecol Oncol, 2014. 134(2): p. 346-55.

38. Gopalan, A., Yu, W., Sanders, B.G., and Kline, K., Simvastatin inhibition of mevalonato pathway induces apoptosis in human breast cancer cells via activation of JNK/CHOP/DR5 signaling pathway. Cancer Lett, 2012. 329(1): p. 9-16.

39. Chiu, H.F., Ho, S.C., Chen, C.C., and Yang, C.Y., Statin use and the risk of liver cancer: a population-based case-control study. Am J Gastroenterol, 2011. 106(5): p. 894 8.

40. Osmak, M., Statins and cancer: current and future prospects. Cancer Lett, 2012. 324(1): p. 1-12.

41. Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J., Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? Nat Rev Cancer, 2010. 10(12): p. 842 57.

42. Riganti, C., Aldieri, E., Doublier, S., Bosia, A., and Ghigo, D., Statins-mediated inhibition of rho GTPases as a potential tool in anti-tumor therapy. Mini Rev Med Chem, 2008. 8(6): p. 609-18.

43. Hall, A., Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science, 1998. 279(5350): p. 509 14.

44. Yonemura, S., Hirao-Minakuchi, K., and Nishimura, Y., Rho localization in cells and tissues. Exp Cell Res, 2004. 295(2): p. 300-14.

45. Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P., Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. Mol Biol Evol, 2007. 24(1): p. 203-16.

46. Tybulewicz, V.L. and Henderson, R.B., Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. Nat Rev Immunol, 2009. 9(9): p. 630-44.

47. Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T., Small GTP-binding proteins. Physiol Rev, 2001. 81(1): p. 153-208.

48. Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A., JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia, 2004. 18(2): p. 189-218.

49. Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C., Rho GTPases and signaling networks. Genes Dev, 1997. 11(18): p. 2295-322.

50. DerMardirossian, C. and Bokoch, G.M., GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. Trends Cell Biol, 2005. 15(7): p. 356-63.

51. Hemmings, B.A. and Restuccia, D.F., PI3K-PKB/Akt pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. 4(9): p. a011189.

52. Cain, R.J. and Ridley, A.J., Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. Biol Cell, 2009. 101(1): p. 13-29.

53. Li, L., Ittmann, M.M., Ayala, G., Tsai, M.J., Amato, R.J., Wheeler, T.M., Miles, B.J., Kadmon, D., and Thompson, T.C., The emerging role of the PI3-K-Akt pathway in prostate cancer progression. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005. 8(2): p. 108-18.

54. Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez- Baron, M., PI3K/Akt signalling pathway and cancer. Cancer Treat Rev, 2004. 30(2): p. 193-204.

55. Kandel, E.S. and Hay, N., The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. Exp Cell Res, 1999. 253(1): p. 210-29.

56. Courtney, K.D., Corcoran, R.B., and Engelman, J.A., The PI3K pathway as drug target in human cancer. J Clin Oncol, 2010. 28(6): p. 1075-83.

57. Shaul, Y.D. and Seger, R., The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. Biochim Biophys Acta, 2007. 1773(8): p. 1213-26.

58. Chandhanayingyong, C., Kim, Y., Staples, J.R., Hahn, C., and Lee, F.Y., MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions. Sarcoma, 2012: p. 404810.

59. Murphy, G. and Nagase, H., Progress in matrix metalloproteinase research. Mol Aspects Med, 2008. 29(5): p. 290-308.

60. Cascales Angosto, M. and Álvarez-Gómez, J., Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. An. R. Acad. Nac. Farm, 2010. 76(1): p. 59-84.

61. Vihinen, P. and Kahari, V.M., Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int J Cancer, 2002. 99(2): p. 157-66.

62. Foukas, A.F., Deshmukh, N.S., Grimer, R.J., Mangham, D.C., Mangos, E.G., and Taylor, S., Stage-IIB osteosarcomas around the knee. A study of MMP-9 in surviving tumour cells. J Bone Joint Surg Br, 2002. 84(5): p. 706-11.

63. Wang, J., Shi, Q., Yuan, T.X., Song, Q.L., Zhang, Y., Wei, Q., Zhou, L., Luo, J., Zuo, G., Tang, M., He, T.C., and Weng, Y., Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma: review and meta-analysis. Clin Chim Acta, 2014. 433: p. 225-31.

64. ATCC. American Type Cell Collection. 2011 [cited 2014 Marzo 17]; Available from: http://www.atcc.org/Products/All/CRL-1661.aspx.

65. Ek, E.T., Dass, C.R., and Choong, P.F., Commonly used mouse models of osteosarcoma. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. 60(1): p. 1-8.

66. Bakker, A.D. and Klein-Nulend, J., Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones. Methods Mol Biol, 2012. 816: p. 19-29.

67. Roche, Cell Proliferation kit I (MTT), ed. R.D. GmbH2005, Mannheim. 4.

68. Hasamnis, A., Mohanty, B., Muralikrishna, and Patil, S., Evaluation of wound healing effect of topical phenytoin on excisional wound in albino rats. J Young Pharm, 2010. 2(1): p. 59-62.

69. Invitrogen. Superscript III. 2012 [cited 2012 Octubre 25]; Available from: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals.

70. Bio-Rad, Real-Time PCR Applications Guide, ed. I. Bio-Rad Laboratories2006. 105.

71. Cabrera, B.N., Papel de los inhibidores de la 3-hodroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (estatinas) en las lineas celulares de osteosarcoma, in Departamento de Ciencias Clinicas2008, Universidad de Las palmas Gran Canaria: Espana. p. 141.

72. Gorg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics, 2004. 4(12): p. 3665-85.

73. Aubin, J.E. and Heersche, J.N., Pediatric Bone Biology & Disearses2003.

74. Kartsogiannis, V., Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. Mol Cell Endocrinol, 2004. 228(1-2): p. 79-102.

75. Camozzi, V., Moro, L., Luisetto, G., and Vescini, L., Bone turnover markers in clinical practice and their potential use in HIV-related bone disease. HAART and correlated pathologies 2009: p. 6.

76. Riahi, R., Yang, Y., Zhang, D.D., and Wong, P.K., Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. J Lab Autom, 2012. 17(1): p. 59-65.

77. Fromigue, O., Hay, E., Modrowski, D., Bouvet, S., Jacquel, A., Auberger, P., and Marie, P.J., RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl-2 signaling independently of BMP-2 and cell differentiation. Cell Death Differ, 2006. 13(11): p. 1845-56.

78. Lennernas, H. and Fager, G., Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. Clin Pharmacokinet, 1997. 32(5): p. 403-25.

79. Hwang, R., Lee, E.J., Kim, M.H., Li, S.Z., Jin, Y.J., Rhee, Y., Kim, Y.M., and Lim, S.K., Calcyclin, a Ca2+ ion-binding protein, contributes to the anabolic effects of simvastatin on bone. J Biol Chem, 2004. 279(20): p. 21239-47.

80. Chissas, D., Stamatopoulos, G., Verettas, D., Kazakos, K., Papalois, A., Agrogiannis, G., Papaeliou, A., Agapitos, E., Balanika, A., Papadopoulou, E., Anastopoulos, G., Ntagiopoulos, P.G., and Asimakopoulos, A., Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. Injury, 2010. 41(7): p. 687-92.

81. Naito, Y., Terukina, T., Galli, S., Kozai, Y., Vandeweghe, S., Tagami, T., Ozeki, T., Ichikawa, T., Coelho, P.G., and Jimbo, R., The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. Int J Pharm, 2013. 461(1-2): p. 157-62.

82. Sandoval Usme, M., Mecanismos moleculares de las estatinas sobre el cáncer, in Química2012, Universidad Nacional de Colombia: Colombia. p. 104.

83. Wang, Y., Xu, S.L., Wu, Y.Z., Zhao, M.S., Xu, W.J., Yang, H.Y., and Li, Y.X., Simvastatin induces caspase-dependent apoptosis and activates P53 in OCM-1 cells. Exp Eye Res, 2013. 113: p. 128-34.

84. Friedl, P. and Wolf, K., Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. J Cell Biol, 2009. 188(1): p. 11-9.

85. Kochuparambil, S.T., Al-Husein, B., Goc, A., Soliman, S., and Somanath, P.R., Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is

associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression. J Pharmacol Exp Ther, 2010. 336(2): p. 496-505.

86. Pozo, M., de Nicolas, R., Egido, J., and Gonzalez-Cabrero, J., Simvastatin inhibits the migration and adhesion of monocytic cells and disorganizes the cytoskeleton of activated endothelial cells. Eur J Pharmacol, 2006. 548(1-3): p. 53-63.

87. Copaja, M., Venegas, D., Aranguiz, P., Canales, J., Vivar, R., Avalos, Y., Garcia, L., Chiong, M., Olmedo, I., Catalan, M., Leyton, L., Lavandero, S., and Diaz-Araya, G., Simvastatin disrupts cytoskeleton and decreases cardiac fibroblast adhesion, migration and viability. Toxicology, 2012. 294(1): p. 42-9.

88. Nakasaki, M., Yoshioka, K., Miyamoto, Y., Sasaki, T., Yoshikawa, H., and Itoh, K., IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. Bone, 2008. 43(5): p. 869-79.

89. Everts, V., Korper, W., Jansen, D.C., Steinfort, J., Lammerse, I., Heera, S., Docherty, A.J., and Beertsen, W., Functional heterogeneity of osteoclasts: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvarial bone but not in resorption of long bone. FASEB J, 1999. 13(10): p. 1219-30.

90. Pratap, J., Javed, A., Languino, L.R., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B.,The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. Mol Cell Biol, 2005. 25(19): p. 8581- 91.

91. Filanti, C., Dickson, G.R., Di Martino, D., Ulivi, V., Sanguineti, C., Romano, P., Palermo, C., and Manduca, P., The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. J Bone Miner Res, 2000. 15(11): p. 2154-68.

92. Krane, S.M. and Inada, M., Matrix metalloproteinases and bone. Bone, 2008. 43(1): p. 7-18.

93. Himelstein, B.P., Asada, N., Carlton, M.R., and Collins, M.H., Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in childhood osseous osteosarcoma. Med Pediatr Oncol, 1998. 31(6): p. 471-4.

94. Ra, J., Lee, J., and Kim, H., Simvastatin as a modulator of tissue remodeling through inhibition of MMP release from human lung fibroblast. Tuber Resp Dis, 2011. 71: p.172-179.

95. Lu, M. and Rabie, A.B., Matrix metalloproteinase-9 regulates graft bone resorption. Angle Orthod, 2006. 76(4): p. 598-604.

96. Tartakover-Matalon, S., Cherepnin, N., Kuchuk, M., Drucker, L., Kenis, I., Fishman, A., Pomeranz, M., and Lishner, M., Impaired migration of trophoblast cells caused by simvastatin is associated with decreased membrane IGF-I receptor, MMP2 activity and HSP27 expression. Hum Reprod, 2007. 22(4): p. 1161-7.

97. Thunyakitpisal, P.D. and Chaisuparat, R., Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduced the expression of matrix metalloproteinase-9 (Gelatinase B) in osteoblastic cells and HT1080 fibrosarcoma cells. J Pharmacol Sci, 2004. 94(4): p. 403-9.

98. Ogura, T., Tanaka, Y., Nakata, T., Namikawa, T., Kataoka, H., and Ohtsubo, Y., Simvastatin reduces insulin-like growth factor-1 signaling in differentiating C2C12 mouse myoblast cells in an HMG-CoA reductase inhibition-independent manner. J Toxicol Sci, 2007. 32(1): p. 57-67.

99. Dail, M., Wong, J., Lawrence, J., O'Connor, D., Nakitandwe, J., Chen, S.C., Xu, J., Lee, L.B., Akagi, K., Li, Q., Aster, J.C., Pear, W.S., Downing, J.R., Sampath, D., and Shannon, K., Loss of oncogenic Notch1 with resistance to a PI3K inhibitor in T-cell leukaemia. Nature, 2014.

100. Qi, X.F., Kim, D.H., Yoon, Y.S., Kim, S.K., Cai, D.Q., Teng, Y.C., Shim, K.Y., and Lee, K.J., Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine CT26 colon carcinoma cells. Toxicol Lett, 2010. 199(3): p. 277-87.

101. Kanugula, A.K., Gollavilli, P.N., Vasamsetti, S.B., Karnewar, S., Gopoju, R., Ummanni, R., and Kotamraju, S., Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms. FEBS J, 2014. 281(16): p. 3719-38.