



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ESTUDIO DEL TRATAMIENTO CON ESTATINAS SOBRE EL EFECTO DE LA INFLAMACIÓN EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Sofía Petrissans Moll

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2022-23

ESTUDIO DEL TRATAMIENTO CON ESTATINAS SOBRE EL EFECTO DE LA INFLAMACIÓN EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Sofía Petrissans Moll

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2022-23

Palabras clave del trabajo:

Cáncer de mama, estatinas, obesidad, cóctel inflamatorio, viabilidad, colesterol.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Jorge Sastre Serra

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

La obesidad es uno de los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. El microambiente celular que se forma en un estado de inflamación asociado a la obesidad se convierte en un escenario favorable para la formación y progresión de tumores, sumado a las hormonas y citoquinas que son liberadas por parte del tejido adiposo. Debido a la gran incidencia y mortalidad del cáncer de mama se hace cada vez más urgente la necesidad de nuevos tratamientos para combatirlo. En este trabajo se estudian los efectos proapoptóticos que podría tener el uso de estatinas en este tipo de cáncer, en concreto, en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, gracias a la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa que interviene en la biosíntesis del colesterol. Para ello, se realiza un tratamiento con Simvastatina en un grupo control y en un grupo que pretende simular las condiciones hormonales de una mujer obesa postmenopáusica gracias a un cóctel inflamatorio que contiene 17β -estradiol, leptina, IL-6 y TNF α (ELIT). Los resultados obtenidos muestran una disminución de la viabilidad celular en ambas líneas celulares gracias al tratamiento con Simvastatina que, se ve exacerbado, especialmente, en la condición ELIT para la línea MCF7. Mientras que, la línea triple negativa, más dependiente de colesterol, queda en una situación más vulnerable para ser atacada por un compuesto quimioterapéutico. De esta forma, se destaca el potencial efecto clínico de las estatinas como posible tratamiento adyuvante de las quimioterapias del que se requiere más investigación.

Resum

L'obesitat és un dels factors de risc per al desenvolupament de càncer de mama en dones postmenopàusiques. El microambient cel·lular que es forma en un estat d'inflamació associat a l'obesitat es converteix en un escenari favorable per a la formació i progressió de tumors, sumat a les hormones i citocines que són alliberades per part del teixit adipós. A causa de la gran incidència i mortalitat del càncer de mama es fa cada vegada més urgent la necessitat de nous tractaments per a combatre'l. En aquest treball s'estudien els efectes proapoptòtics que podria tenir l'ús de estatinas en aquesta mena de càncer, en concret, en les línies cel·lulars MCF7 i MDA-MB-231, gràcies a la inhibició de l'enzim HMG-CoA reductasa que intervé en la biosíntesi del colesterol. Per a això, es realitza un tractament amb Simvastatina en un grup control i en un grup que pretén simular les condicions hormonals d'una dona obesa postmenopàusica gràcies a un còctel inflamatori que conté 17β -estradiol, leptina, IL-6 i TNF α (ELIT). Els resultats obtinguts mostren una disminució de la viabilitat cel·lular en totes dues línies cel·lulars gràcies al tractament amb Simvastatina que, es veu exacerbat, especialment, en la condició ELIT per a la

línia MCF7. Mentre que, la línia triple negativa, més dependent de colesterol, queda en una situació més vulnerable per a ser atacada per un compost quimioterapèutic. D'aquesta manera, es destaca el potencial efecte clínic de les estatines com a possible tractament adjuvant de les quimioteràpies del qual es requereix més recerca.

Abstract

Obesity is one of the risk factors for the development of breast cancer in postmenopausal women. The cellular microenvironment that forms in a state of inflammation associated with obesity becomes a favourable scenario for tumour formation and progression, in addition to the hormones and cytokines that are released by adipose tissue. Due to the high incidence and mortality rate of breast cancer, the need for new treatments to combat it is becoming increasingly urgent. This work studies the proapoptotic effects that the use of statins could have on this type of cancer, specifically in the MCF7 and MDA-MB-231 cell lines, thanks to the inhibition of the HMG-CoA reductase enzyme involved in cholesterol biosynthesis. To this end, treatment with Simvastatin is carried out in a control group and in a group that aims to simulate the hormonal conditions of an obese postmenopausal woman thanks to an inflammatory cocktail containing 17β -estradiol, leptin, IL-6 and TNF α (ELIT). The results obtained show a decrease in cell viability in both cell lines due to treatment with Simvastatin, which is exacerbated, especially in the ELIT condition for the MCF7 line. Whereas the more cholesterol-dependent triple negative line is left in a more vulnerable situation to be attacked by a chemotherapeutic compound. This highlights the potential clinical effect of statins as a possible adjuvant treatment to chemotherapies for which further research is needed.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción	2
Objetivo experimental	8
Materiales y métodos	9
Reactivos	9
Cultivo de células y tratamiento	9
Determinación de la viabilidad celular	10
Western Blot	10
Ciclo celular	12
Análisis estadístico	13
Resultados	13
Viabilidad celular	13
Ciclo celular	14
Western Blot	16
Discusión	20
Conclusión	22
Agradecimientos	23
Bibliografía	24

Abreviaturas

- OMS: Organización Mundial de la Salud
- HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
- OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
- IMC: Índice de Masa Corporal
- JAK: Janus quinasa
- STAT: Traductor de la Señal y Activador de la Transcripción
- ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
- TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa
- IL-6: Interleuquina-6
- ELIT: 17 β -Estradiol, Leptina, IL-6 y TNF- α
- HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
- Rb: Retinoblastoma
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- AP-1: Proteína Activadora 1
- NFkB: Factor Nuclear Kappa B
- DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's médium without red phenol*

Introducción

En la actualidad, el cáncer de mama es el cáncer que representa un tercio de los diagnósticos de cáncer¹. Datos de año 2018, representado en la *Figura 1*², revelan que es el tipo de cáncer que presenta una mayor incidencia y mortalidad en mujeres. En 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró más de 2,2 millones de casos nuevos, de los cuales cerca de los 685.000 resultaron en fallecimiento a causa de la enfermedad y se estima que cerca de una de cada doce mujeres enfermaran de cáncer de mama³. Aunque el cáncer de mama puede afectar a todas las edades después de la pubertad, estos diagnósticos se producen, en su mayoría, en mujeres posmenopáusicas⁴, periodo en el cual la mujer produce cada vez menos cantidad de hormonas sexuales femeninas como progesterona y estrógenos.

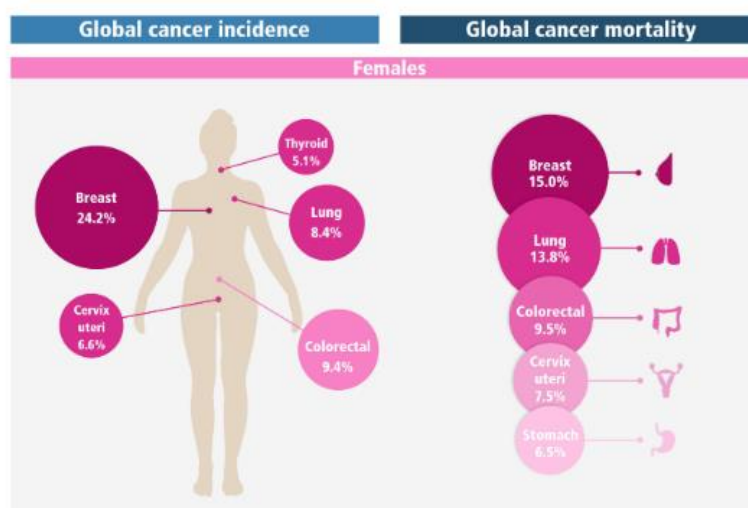


Figura 1. Datos globales de 2018 sobre el patrón de cáncer en mujeres. Obtenido de *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2018.*

El porcentaje de incidencia varía por región como se muestra en la *Figura 2*, afectando principalmente en el continente asiático con una incidencia que representa el 45,4% y con una tasa de mortalidad que representa el 50,4% de todas las muertes que se producen por cáncer de mama. Seguido de Asia encontramos Europa como el segundo continente con mayor número de diagnósticos y fallecimiento a causa de esta enfermedad⁵. Destacan los datos del continente africano donde de las 186.598 personas afectas, 85.787 acaban falleciendo, lo que implica una tasa de mortalidad de más del 45%.

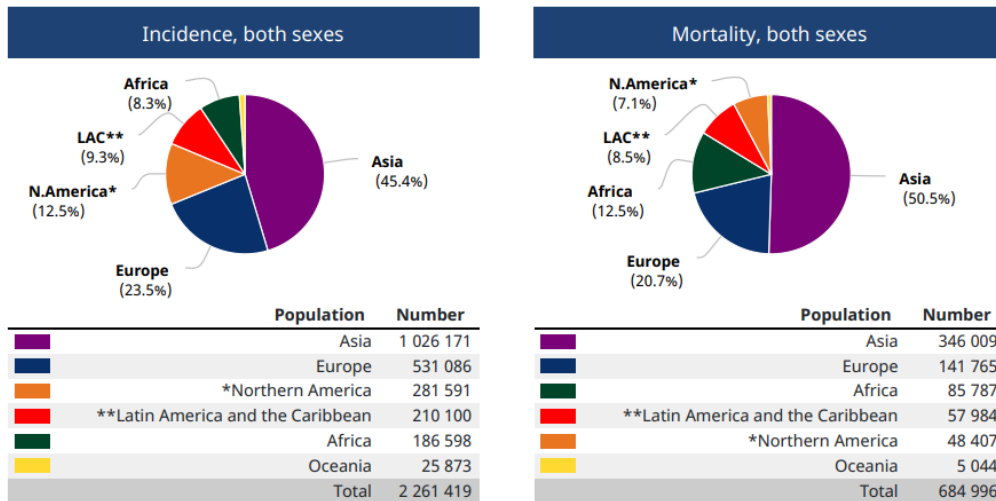


Figura 2. Datos de la incidencia y mortalidad del cáncer de mama por región. Obtenido de *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2020*.

El cáncer de mama se puede clasificar según las características moleculares de las células que lo general. Se diferencian principalmente por la presencia o no de receptores hormonales para estrógenos y progesterona, así como por la expresión aumentada o no del factor de crecimiento epidérmico de tipo 2 (HER2). Este último se encuentra en la superficie de las células ayudando a la regulación de su crecimiento y división. Las células tumorales HER2+ sufren una sobreexpresión del gen lo que hace que sea más agresivo, mientras que los HER2- presentan niveles normales o bajos de este mismo⁶.

Por un lado, las células que presentan receptores hormonales positivos dependen de las hormonas sexuales para su supervivencia, lo que facilita que las terapias hormonales puedan ser efectivas para tratar los tumores formados por estas células. Por otro lado, las células independientes de hormonas requieren otros enfoques terapéuticos diferentes a los tratamientos hormonales^{7,8}. Este tipo de células cancerosas se denominan triple negativas, no presentan receptores hormonales para estrógenos, progesterona y presentan una expresión reducida de HER2, se trata de una línea muy agresiva e invasiva⁹. Como se muestra en la *Figura 3* el cáncer de mama triple negativo representa un 15% de todos los cánceres de pecho¹⁰.

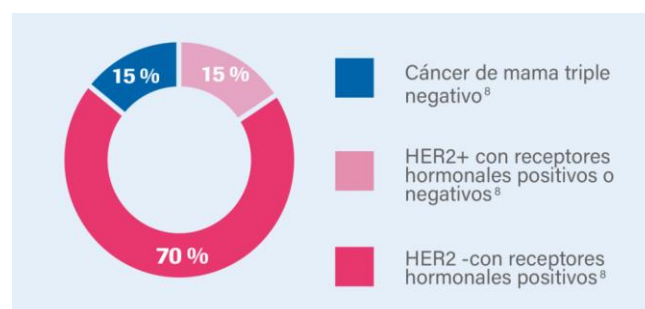


Figura 3. Datos sobre la incidencia de los diferentes tipos de cáncer de mama según la cantidad de proteínas HER2 y sus receptores hormonales. Fuente: *Cáncer de Mama, Hoffmann-La Roche*.

Debido a los alarmantes valores sobre la incidencia y mortalidad del cáncer de mama, se estudian los diversos factores etiológicos que predisponen al desarrollo de esta enfermedad entre las que destacan, el sexo, la etnia, la edad, la genética, la exposición a ciertas sustancias, el tabaquismo, entre otros, y recientemente, la obesidad¹¹. La obesidad parece tener una relación con el aumento del riesgo de presentar ciertos tipos de cáncer entre los que se encuentra el cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas^{12,13}. Hay que tener en cuenta que se trata de una fisiopatología multisistémica compleja lo que complica el estudio de los mecanismos implicados.

La prevalencia de la obesidad ha aumentado en todo el mundo en los últimos años convirtiéndose en un problema de salud pública. Datos de 2017 muestran que cerca del 13% de la población adulta mundial tiene obesidad y que el 39% presenta sobrepeso¹⁴. Según un estudio de la OCDE de 2019 "*The heavy burden of obesity*", junto con los datos de prevalencia del Observatorio Mundial de la Salud de la OMS, España se clasifica en la posición 22ª, de entre los 54 países miembros de la OCDE, en prevalencia de obesidad en personas mayores de 15 años. Mientras que, si solo se consideran los países de la Unión Europea, España pasa a ocupar la séptima posición, con un 16,5% de hombres y un 15,5% de mujeres que padecen obesidad según una Encuesta Europea de Salud en España del año 2020¹⁵. Otro dato de interés extraído del informe de la OCDE muestra que, España, junto a Bélgica, Francia y Luxemburgo, es uno de los países donde las mujeres presentan mayores índices de obesidad y que esta condición parece tener relación con la desigualdad económica¹⁶.

La clasificación del peso corporal generalmente se realiza mediante la obteniendo del índice de masa corporal (IMC), como una aproximación de la adiposidad. Los estudios indican que el aumento de este índice eleva la probabilidad de desarrollar enfermedades, relacionado sobre todo con el aumento del nivel de estrés oxidativo que esta condición fisiopatológica provoca y que conduce a una inflamación crónica que lleva a alteraciones bioquímicas como puede ser el daño del material genético y el aumento del riesgo de mutaciones en este^{11,17}. Además, el tejido adiposo se trata de un órgano endocrino y metabólicamente activo, que modula de por sí el metabolismo mediante la liberación de hormonas y citoquinas proinflamatorias.

Durante la obesidad se produce una disfunción del tejido, llevando a un aumento de la liberación de adipocinas con carácter quimiotáctico para los macrófagos instaurándose un estado inflamatorio. Este estado genera un microambiente que favorece los procesos carcinogénicos que estimulan el crecimiento de las células tumorales y favorecen su inestabilidad genómica lo que favorece su progresión y diseminación tumoral¹¹. Se ha observado una correlación entre el

IMC y el estado proinflamatorio del tejido mamario (p-valor = 0,004)¹⁸ e informes que se centran en el estudio del microambiente del tumor demuestran que la inflamación se correlaciona con un aumento de la capacidad invasora y peor pronóstico¹⁹. Sumado a esto, la alteración del tejido adiposo genera radicales libres por estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) que no son neutralizados pueden dañar las diferentes biomoléculas de la célula y activar la vía PI3K/Akt²⁰. Esta vía, que regula los procesos celulares normales, relacionados con la proliferación, supervivencia, crecimiento, motilidad, metabolismo y apoptosis celular, puede promover la supervivencia y proliferación de células tumorales cuando su activación se ve desregulada.

Como se ha mencionado la inflamación asociada a la adiposidad se ve favorecida por la liberación de ciertas citoquinas, muchas de las cuales son sintetizadas por la fracción no adipocitaria del tejido, como son los macrófagos y fibroblastos que se infiltran en este, entre las que destacan, la interleucina-6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α)²⁰. La IL-6 presenta una actividad local y sistémica, y se han relacionado niveles altos de esta citoquina con un peor pronóstico de la enfermedad en los pacientes ya que activa las vías MAPK favoreciendo la migración del tumor²¹. Se conocía que la IL-6 funcionaba como un factor de crecimiento para los linfocitos B, la activación y diferenciación de células T, diferenciación de macrófagos y participación en otros procesos relacionados con el sistema inmune, pero parece que también actúan sobre mielomas y precursores mieloides²². La interacción de la IL-6 con su receptor específico (IL-6R α , también conocido como CD126) es lo que determina su función biológica. Este receptor, a su vez, también interactúa con la Janus quinasa JAK1 que lleva a la activación de las STAT, que según algunos estudios promueve la expresión de ciertos genes involucrados en el inicio y la progresión de algunos tipos de tumores^{12,23}. Al ser una proteína secretada puede ser detectada en el suero. Está demostrado que los pacientes con cáncer de mama presentan valores más elevados que los sanos y que el aumento de esta citoquina en los pacientes enfermos está correlacionado con un peor pronóstico además de responder menos a las quimioterapias endocrinas^{19,24}.

La otra citoquina inflamatoria clave es TNF- α . Se identificó funcionalmente como un componente del suero que es producido como respuesta a endotoxinas y que podría inducir la necrosis en células tumorales. Una desregulación de esta citoquina ha sido asociada con muchas condiciones patológicas como la enfermedad de Crohn, osteoporosis y artritis reumatoide entre otras. Algunos estudios muestran que hay un aumento de la expresión de TNF- α en aquellas muestras de cáncer de mama más invasivos comparado con tejidos mamarios benignos¹⁹. Por lo que se ha observado una dualidad en su efecto ya que por un lado puede inducir la apoptosis,

mientras que por otro lado puede tener un efecto proliferativo en las células cancerígenas cuando sus niveles son elevado. Todavía no está esclarecido como podría promover los diferentes efectos durante la progresión del cáncer.

Las hormonas principales secretados por los adipocitos que parecen tener implicaciones en el cáncer son leptina, prolactina e insulina. Destaca la leptina que tiene como función regular el apetito a nivel de hipotálamo. La liberación de esta hormona es, por lo tanto, directamente proporcional a la cantidad de tejido adiposo. El receptor de la leptina está ligado a miembros de la familia de las quinasas Jak que, como se ha mencionado, su activación conduce a la activación de las STAT, principalmente Jak2/STAT3, que promueven la carcinogénesis¹³.

Algunos estudios establecen una relación entre el riesgo de padecer cáncer de mama con la vía de estrógenos y las concentraciones alteradas de esta hormona en circulación ya que, los ovarios son el principal lugar de síntesis de estrógenos, papel que pasa a ocupar el tejido adiposo en mujeres posmenopáusicas siendo la fuente principal del estrógeno circulante²⁰. Por este motivo, la aparición de esta enfermedad en mujeres posmenopáusicas obesas se podría explicar también por el aumento de tasa de conversión de precursores androgénicos a estradiol debido al aumento de la actividad enzimática de la enzima aromatasa que se encuentra en el tejido adiposo¹¹.

Se ha visto que el tratamiento combinado de citoquinas proinflamatorias con leptina y estrógenos conduce a un aumento del estrés oxidativo, de la capacidad invasora y un aumento de motilidad, simulando lo que ocurre en un estado de inflamación asociado a la obesidad²⁵.

La búsqueda de nuevos tratamientos anticancerígenos hoy en día es constante debido a la alta prevalencia de esta enfermedad. Una de las propuestas más interesantes es el uso de las estatinas. Este fármaco es utilizado en pacientes con hipercolesterolemia ya que interfiere en la producción de colesterol en el hígado, como se muestra en la *Figura 4*, al inhibir de forma competitiva la enzima HMG-CoA reductasa, disminuyendo así los niveles de mevalonato, metabolito necesario para la formación del colesterol²⁶. Hay evidencias de que esta vía bioquímica tiene un papel importante durante el proceso carcinogénico²⁷. Al reducir los niveles de mevalonato, también lo hace de los isoprenoides que son producto intermedio del colesterol. Las estatinas inhiben la prenilación de estas proteínas, suprimiendo la activación de proteínas G como Ras, Rho y Rac. Por lo tanto, las estatinas podrían, de esta manera, tener efectos proapoptóticos en las células cancerosas²⁸.

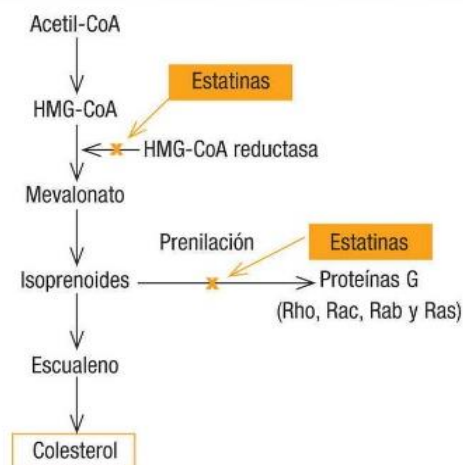


Figura 4. Vía del mevalonato y mecanismo de acción de las estatinas. Inhiben la enzima HMG-CoA reductasa de manera competitiva, bloqueando la producción del precursor del colesterol. Datos obtenidos de la Revista Española de Cardiología, 2015⁴⁸.

Hay diferentes hipótesis de cómo las estatinas podrían ayudar a reducir el cáncer. Parece que el enfoque del uso de este medicamento sería su uso como prevención secundaria, y no como una terapia para combatir directamente el cáncer activo. Por una parte, es sabida la gran relevancia que presenta el colesterol para la integridad y el dinamismo de la membrana celular, que cobra todavía más importancia en la progresión del cáncer ya que las células en división requieren de un suministro constante de este. Las células en proliferación obtienen los lípidos y colesterol de dos formas, o bien mediante la síntesis *de novo* o mediante la captación de los lípidos circulantes, por lo que la reducción del LDL circulante gracias a la terapia con estatinas podría influir en este sentido en la carcinogénesis y la progresión del cáncer. Además, se ha visto que las estatinas reducen la secreción de citoquinas proinflamatorias que se conoce que aumentan la posibilidad de metástasis y carcinogénesis como se ha mencionado anteriormente³⁰⁻³². Por otra parte, este fármaco, podría tener un efecto sobre el ciclo celular. Como se muestra en la Figura 5, la detención de las células cancerosas en la fase G1 del ciclo, gracias a la acción de las estatinas, parece relacionada con el aumento de la expresión de inhibidores de las quinasas del ciclo celular p21Cip1/WAF1 y p27Kip1, así como la inhibición de su proteólisis. Sumado a la reducción de la expresión de los mediadores promotores del ciclo celular, como la Ciclina D1 y Ciclina E, así como la expresión de la quinasa dependiente del ciclo 4 (CDK4). Además, inhibe la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) y por lo tanto estabiliza el complejo E2F-Rb transcripcionalmente inactivo, además de ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la actividad del factor de transcripción E2F. Por lo tanto, las estatinas, al evitar la fosforilación de la proteína

Rb, no permite su activación y por lo tanto quedan bloqueados los procesos de inicio de síntesis de ADN y, en consecuencia, la entrada a la fase S del ciclo celular³².

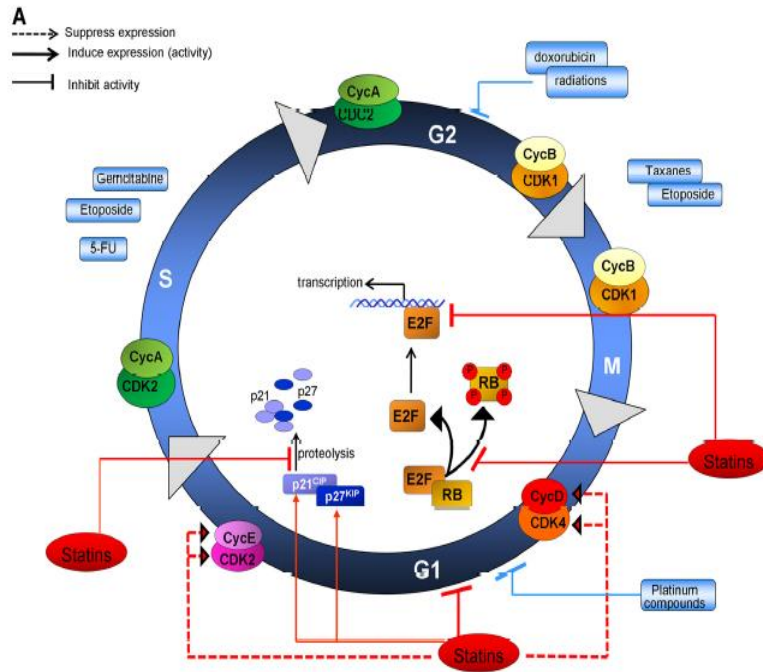


Figura 5. Sitios de acción moleculares y celulares de las estatinas en el ciclo celular. Obtenido de Pharmacological Reviews January 1, 2012, 64 (1) 102-146.

Se ha investigado también el efecto de las estatinas en el bloqueo de la unión al ADN de NFκB y la proteína activadora 1 (AP-1), lo que resulta en una disminución de la transcripción de los genes que regulan la proliferación celular³⁰.

Objetivo experimental

De modo que, el objetivo experimental de este trabajo se centra en conocer los efectos metabólicos que se producen en células de cáncer de mama tras un tratamiento con estatinas en una situación control y en una situación de inflamación asociada a la obesidad simulada gracias al tratamiento ELIT compuesto por leptina (100 ng/ml), 17β-estradiol (10 nM), TNF-α (10ng/ml) y Interleuquina-6 (50 ng/ml). El experimento se ha realizado en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 a concentraciones de Simvastatina 8 μM y 0,5 μM respectivamente.

Materiales y métodos

Reactivos

El medio de cultivo, *Dulbecco's modified Eagle's médium without red phenol* (DMEM sin rojo fenol) fue obtenido de la casa comercial GIBCO (Paisley, UK). La estreptomicina, la penicilina y el suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*, FBS) fueron obtenidos de la casa comercial Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). La leptina, la Interleuquina-6, el TNF- α y el 17 β -estradiol fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Finalmente, los reactivos de rutina se obtuvieron de Roche (Barcelona, España), Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA), Panreac (Barcelona, España) y Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

Cultivo de células y tratamiento

Las dos líneas celulares utilizadas, MDA-MB-231 y MCF7 fueron obtenidas de la casa comercial American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

MDA-MB-231, es una línea celular triple negativa. Se trata de células epiteliales extraídas de un adenocarcinoma de la glándula mamaria³³. Presenta una morfología endotelial con proyecciones estrelladas que se pueden unir a múltiples colonias celulares³⁴.

Por otro lado, MCF7 es una línea HER2-, positiva para el receptor de progesterona (PR+) y de estrógenos (ER+), con un nivel bajo del receptor beta, pero alto del receptor de estrógenos alfa³⁵. Presenta una morfología epitelial y se disponen en monocapa. Extraídas de una glándula mamaria con adenocarcinoma³⁶.

Para el cultivo de las células, se sembrando en DMEM sin rojo fenol suplementado con FBS al 10% (v/v) y una mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomicina al 1% (v/v). El ambiente de cultivo fue en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Durante el ensayo de proliferación, se sembraron en una placa p96 apta para fluorimetría, 8.000 células/pocillo en el caso de la línea celular MDA-MB-231 y 10.000 células/pocillo para MCF7.

Las estatinas del mercado se pueden clasificar, dependiendo del coeficiente de partición, en dos grupos, estatinas lipofílicas e hidrofílicas. Estas últimas necesitan un transportador celular que se encuentra mayoritariamente en los hepatocitos para ser captadas, mientras que las lipofílicas son captadas por transporte pasivo a través de la membrana de la célula lo que le permite distribuirse también a los tejidos extrahepáticos²⁹. Para evitar posibles problemas en la entrada del medicamento a la célula, en este trabajo se eligió el uso de estatinas lipofílicas, concretamente la Simvastatina.

Los cultivos celulares fueron sometidos a diferentes tratamientos. Por un lado, se aplicó un conjunto de componentes que imita un estado de obesidad simulando las concentraciones fisiológicas circulantes, compuesto por leptina (100 ng/ml), 17 β -estradiol (10 nM), TNF- α (10ng/ml) y Interleuquina-6 (50 ng/ml). Por otro lado, se utilizó Simvastatina a una concentración de 0,5 μ M para MDA-MB-231 y de 8 μ M para MCF7, seleccionadas en base a los valores de viabilidad (ver más adelante).

Determinación de la viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular las diferentes líneas celulares fueron sembradas en placas de 96p con una densidad de 8.000 células/pocillo para MDA-MB-231, 14.000 células/pocillo para T47D y 10.000 células/pocillo para MCF7. Tras 24 horas de la siembra, cada línea celular fue tratada en las diferentes condiciones durante 48 horas, con un rango de diferentes concentraciones de Simvastatina (de 0 μ M a 32 μ M). Mediante un ensayo con Cristal Violeta se determinó la viabilidad celular gracias a la cuantificación indirecta al teñir el núcleo de las células gracias a la unión del tinte a las proteínas y ADN. Para la determinación se eliminó el medio de las células por aspirado tras lo que se añadieron 100 μ L/pocillo de glutaraldehído al 10%. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente para la fijación de las células, se realizaron tres lavados con agua destilada por inmersión y se agregaron 50 μ L/pocillo al 0,5% de cristal violeta. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y se dejó seca la placa overnight. Finalmente se solubilizó el colorante mediante la adición de 100 μ L/pocillo de ácido acético al 10%. Se agitó la placa y para su lectura de las placas se utilizó el FLx800 microplate fluorescence reader (BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) a una longitud de onda de 560nm.

Western Blot

Una vez escogida la concentración de Simvastatina para cada línea celular, se realizaron siembras en placas de 6 pocillos (n=3) con una densidad de 300.000 células/pocillo para MDA-MB-231, de 600.000 células/pocillo para T47D y de 400.000 células/pocillo para MCF7.

Tras 24 horas de la siembra se realizan los diferentes tratamientos. Para cada línea celular fueron tratados los dos grupos (control y ELIT) con la concentración de Simvastatina elegida o vehículo durante 48 horas.

Pasadas 48 horas de la aplicación de los tratamientos se recogieron las células, con tripsina, en 100 μ L de tampón RIPA (50 mM Tris-HCL pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato, 1% Triton X-100, 1mM EDTA) con inhibidores (10 μ M Pepstatina, 2mM PMSF, 1mM NaF y 1mM Na₃VO₄). Posteriormente, fueron sonicadas con un 40% de amplitud, en hielo, durante 7-10 segundo en tres pulsos para la conseguir la lisis de las células. Para determinar el contenido

proteico de las muestras mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA) se realizó una centrifugación a 14000 xg durante 10 minutos a 4°C tras la cual se descarta el precipitado.

Tras conocer el contenido de proteínas de cada muestra fue calculada la cantidad de muestra necesaria. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% de 1.5 mm de grosor. En cada pocillo se cargaron 25 µg de muestra junto con el tampón de carga (50% glicerol, 10% SDS, 300 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% azul de bromofenol, 10% de β-mercaptoetanol), hervida 5 minutos, alcanzando un volumen final de 36 µL para las muestras provenientes de la línea celular MDA-MB-231 y de 24µL para T47D y MCF7. Se dejó correr a 80 V durante 15-20 minutos hasta que se concentraron las muestras (etapa de *stacking*), tras los cuales se aumentó el voltaje a 150 V durante 60 minutos (etapa *resolving*). Para llevar a cabo la electrotransferencia a las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) se utilizó el sistema de transferencia Trans-blot Turbo (Bio-Rad).

Primero se realizó una incubación de las membranas en una solución de bloqueo de leche en polvo desnatada al 5% en TBS-Tween durante 1 hora en agitación. Seguidamente se incubaron con los anticuerpos primarios, indicados en la *Tabla 1*, durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se llevaron a cabo 3 lavados rápidos y 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween para después poder realizar la incubación con los anticuerpos secundarios correspondiente en una dilución 1:10.000 en TBS-Tween con leche desnatada en polvo al 2%.

Para finalizar, tras dos lavados con TBS-Tween y un último lavado con TBS se revelaron las membranas con el kit Inmuno-Star WesternC Chemiluminescence (Bio-rad) y mediante el densitómetro ChemiDoc (Bio-rad) se leyó la señal luminiscente. Las bandas fueron cuantificadas gracias al software Image Lab (Bio-rad).

Tabla 1. Información de los anticuerpos primarios utilizados en Western Blot. HMGC_oA-R: Hidroximetilglutaril-CoA Reductase; FAS: Fatty acid synthase; FDFT1: Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Anticuerpo primario	Peso molecular (kDa)	Número Catálogo	Animal de origen	Dilución	Casa comercial
HMGC _o A-R	80-97	sc-271595	Mouse	1:300	Santa Cruz Biotechnology, INC. CA, USA

FAS	270	sc-20140	Mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, INC. CA, USA
SQS	52	sc-271143	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotechnology, INC. CA, USA
CyclinD1	36	2926	Mouse	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA.
GAPDH	37	sc-365062	Mouse		Santa Cruz Biotechnology, INC. CA, USA

Ciclo celular

Se realizaron siembras en placas de 6 pocillos (n=3) con una densidad de 300.000 células/pocillo para MDA-MB-231, de 600.000 células/pocillo para T47D y de 400.000 células/pocillo para MCF7.

Tras 24 horas de la siembra se realizan los diferentes tratamientos. Para cada línea obtuvimos un grupo control y un grupo ELIT que fueron tratados con Simvastatina a una concentración de 0,5 μ M en el caso de MDA-MB-231 y de 8 μ M para MCF7 o vehículo.

Pasadas 48 horas de la aplicación de los tratamientos se recogieron las células, con tripsina. Tras una centrifugación a 1600 xg, durante 5 minutos a RT se retiró el sobrenadante y para su fijación se añadió 1mL de metanol frío gota a gota mientras en agitación constante. Se procedió a la tinción de las células mediante adición de 500 μ L solución de tinción (Ioduro de Propidio 50 μ g/mL, ARNasa 50 μ g/mL disuelto en PBS). Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo lo de la exposición directa a la luz.

Una vez teñidas las muestras, se analizó el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro de flujo Beckton-Dickinson FACSVerse y se analizaron con el software FACSuite v1.0.6.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados y representados mediante el software GraphPad Prism 9.5.1 (San Diego, California). La representación fue realizada con las medias \pm el error estándar de la media (SEM). Se utilizó una prueba t-student de una cola para muestras independientes. La significancia estadística fue establecida en p-valor < 0.05 y se representaron mediante un asterisco (*).

Resultados

Viabilidad celular

Primeramente, la viabilidad celular fue analizada mediante un ensayo con cristal violeta. El ensayo se realizó en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 en una situación control y en una situación ELIT con diferentes concentraciones de Simvastatina. Para el análisis y representación de los datos los diferentes grupos han sido comparados con relación al grupo control, al cual se le ha asignado un valor absoluto del 100%.

Como muestra la *Figura 6*, la línea MCF7 ve afectada su viabilidad celular en un 60% cuando se encuentra en una situación de inflamación asociada a la obesidad respecto a la control. Este porcentaje se ve también disminuido a medida que se aumenta la concentración del posible tratamiento, en ambos grupos, presentado una diferencia estadísticamente significativa (p-valor < 0.05) a concentraciones de Simvastatina de 8 μ M, 16 μ M y también a 32 μ M en la situación control.

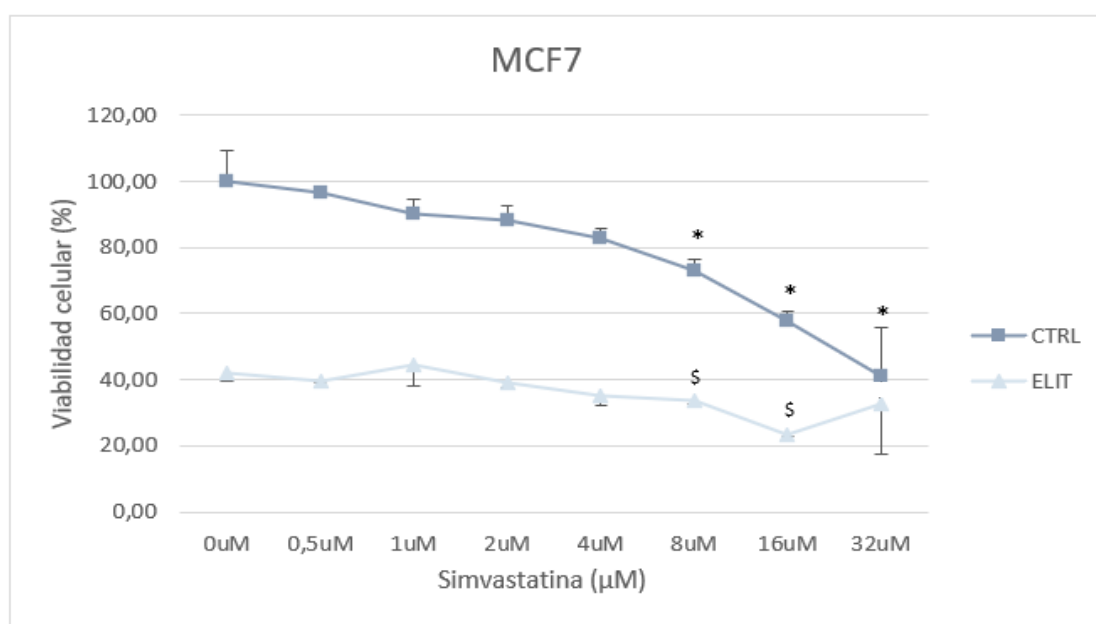


Figura 6. Representación gráfica de la viabilidad celular de las células MCF7 tras 48 horas de diferentes concentraciones de Simvastatina (μ M). *, \$: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control 0 μ M y ELIT 0 μ M respectivamente (prueba t-student).

Siguiendo con la línea MDA-MB-231 se observa una disminución de un 40% en una situación ELIT, que se ve exacerbada tras la adición de Simvastatina a las células que, con la concentración mínima aplicada (0,5 μM) disminuye un 53.87% y un 22.66% su viabilidad celular en la situación control y ELIT respectivamente, con un p-valor de 0.0072 y 0.042, alcanzando una viabilidad del 0% cuando la concentración de Simvastatina supera los 4 μM (Figura 7).

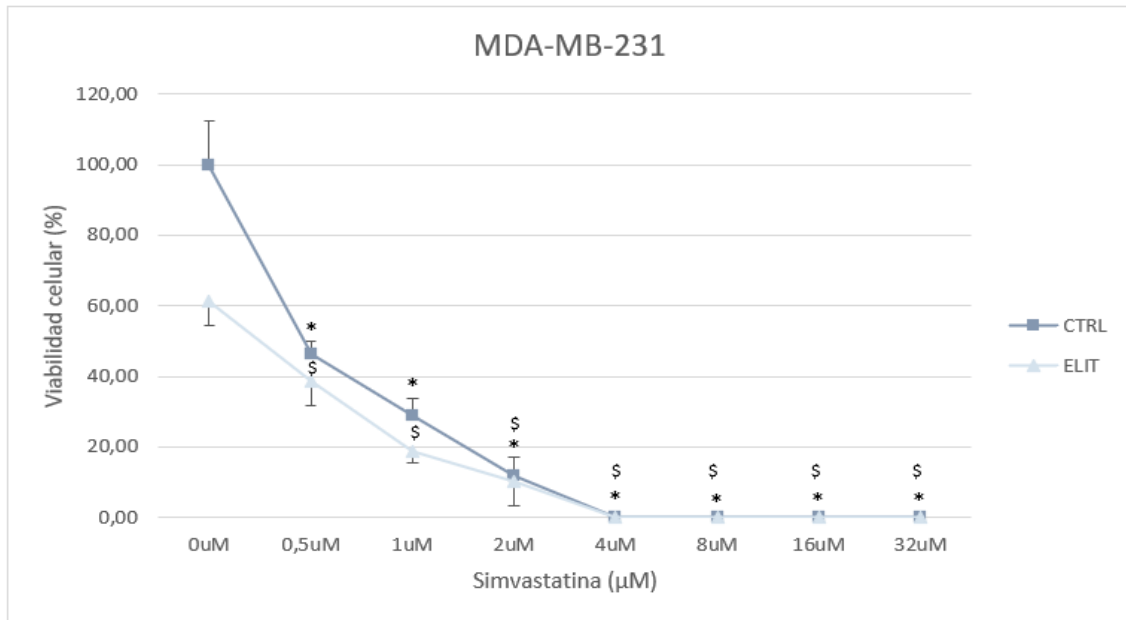


Figura 7. Representación gráfica de la viabilidad celular de las células MDA-MB-231 tras 48 horas de diferentes concentraciones de Simvastatina (μM). *, \$: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control 0 μM y ELIT 0 μM respectivamente (prueba t-student).

Ciclo celular

Tras el estudio de la viabilidad celular, se utilizó la citometría de flujo para el análisis de su ciclo celular. Las células MCF7, como muestra la Figura 8, sufren un aumento del porcentaje de células que se encuentra en la fase del ciclo G0/G1 cuando estas se encuentran en un escenario de inflamación asociada a la obesidad respecto a la situación control. Al someterlas al tratamiento con Simvastatina 8 μM , presentan un aumento estadísticamente significativo en ambas condiciones, produciéndose un aumento del $13,32 \pm 4,273$ (p-valor = 0,0178) en la situación control y del $10,5 \pm 3,338$ (p-valor = 0,018) en la situación ELIT. El análisis estadístico muestra también diferencias estadísticamente significativas en las fases S y G2/M, de la segunda condición al tratarlas con la estatina, aumentando el porcentaje de células que se encuentran en estas fases.

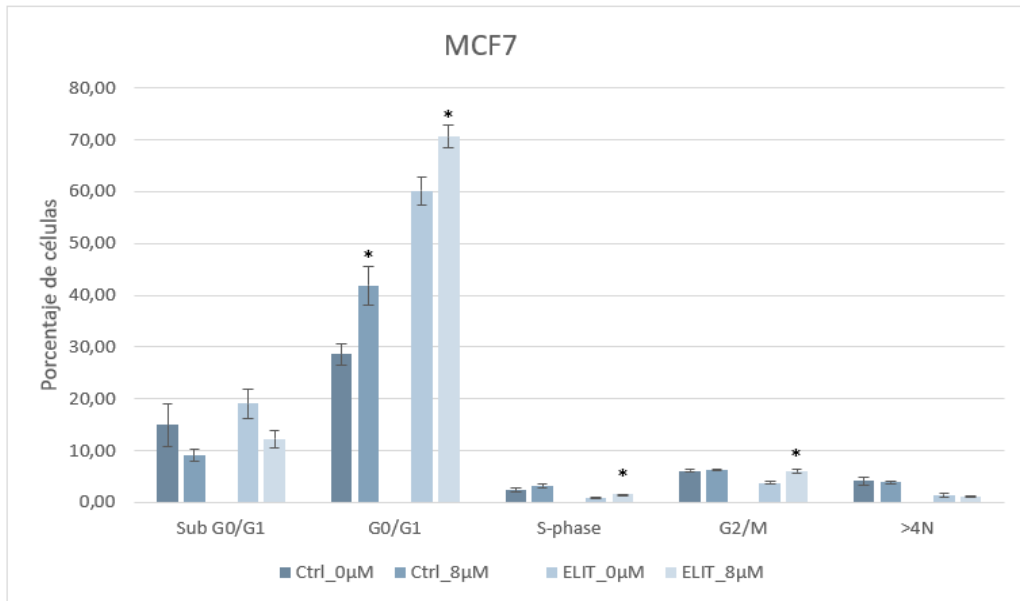


Figura 8. Representación gráfica del ciclo celular de las células MCF7 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 8μM. *: Diferencia estadísticamente significativa respecto a la situación 0 μM (prueba t-student: p-valor < 0,05).

Con relación a la línea MDA-MB-231, como muestra la Figura 9, ambos grupos siguen el mismo patrón de ciclo celular. Al someterles a una concentración de Simvastatina 0,5 μM la mayoría de las células no pasan a la fase G0/G1 del ciclo. Esto provoca un aumento del porcentaje de células que pasan a encontrarse en la fase sub G0/G1, con una subida del $64,09 \pm 4,194$ (p-valor = 0,0001) y del $46,98 \pm 4.250$ (p-valor = 0,0002) respecto a las no tratadas, mostrando diferencias estadísticamente significativas. Estos cambios que aparecen al aplicar el tratamiento se mantienen durante el resto del ciclo celular, mostrando una disminución de células que se encuentran en las siguientes fases, con diferencias estadísticamente significativas.

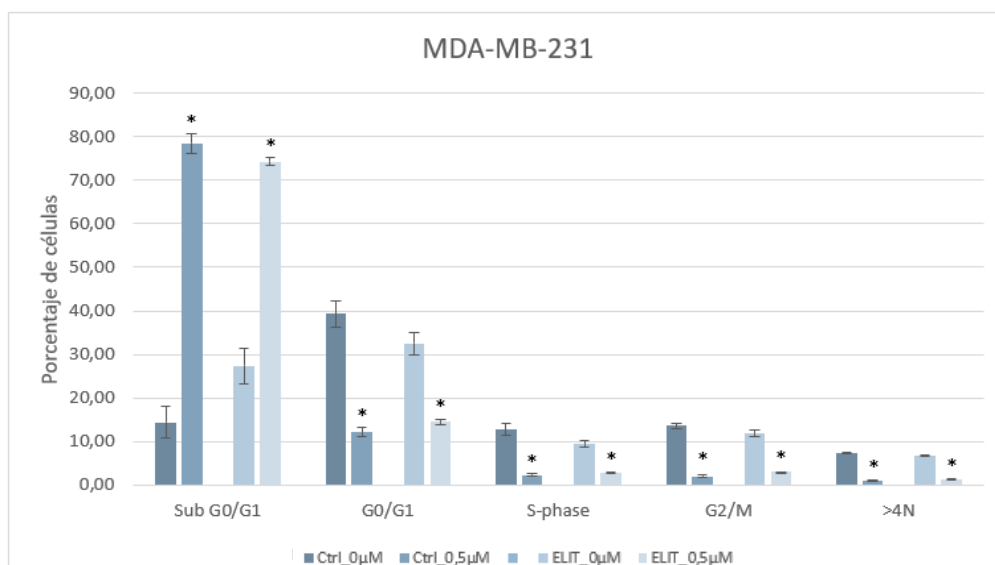


Figura 9. Representación gráfica del ciclo celular de las células MDA-MB-231 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 0,5μM. *: Diferencia estadísticamente significativa respecto a la situación 0 μM (prueba t-student: p-valor < 0,05).

Tras observar las diferencias estadísticamente significativas que aparecen tras las 48 horas del tratamiento con estatinas en la línea MDA-MB-231 se quiso conocer los niveles proteicos de la Ciclina D1 que permite la activación de las Cdk4 o Cdk6 permitiendo la transición G1/S del ciclo celular.

Los resultados obtenidos mediante Western Blot y mostrados en la *Figura 10*, señalan una disminución estadísticamente significativa con la aplicación de Simvastatina 0,5 μ M (Control: $84,60 \pm 7,24\%$; ELIT: $116,2 \pm 39.69\%$).

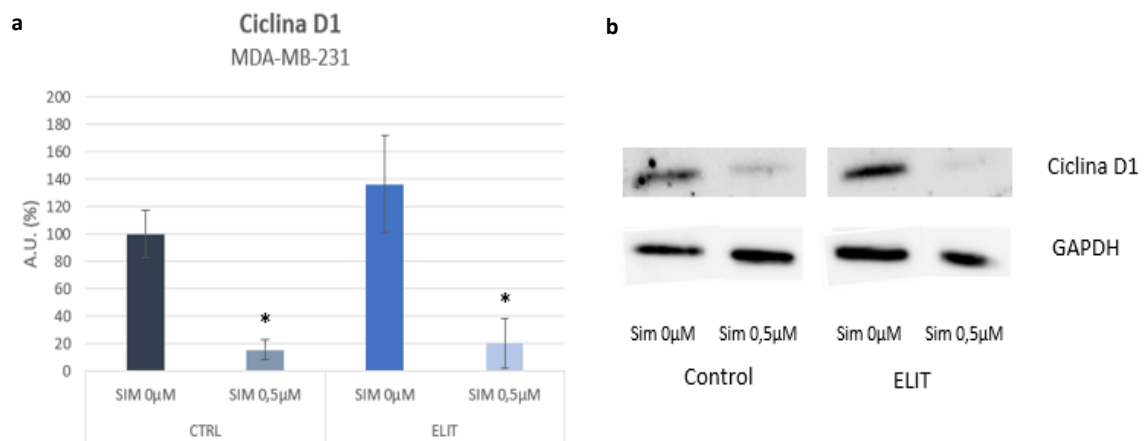


Figura 10. **a** Representación gráfica de los niveles proteicos de la Ciclina D1 en la línea MDA-MB-231 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 0,5 μ M. *: Diferencia estadísticamente significativa respecto a la situación 0 μ M (prueba t-student: p-valor < 0,05). **b** Bandas obtenidas mediante el Western Blot junto a su control de carga, GAPDH.

Western Blot

Para el estudio de las vías anabólicas del colesterol que se ven afectas con los tratamientos de estatinas, además de la vía de síntesis de ácidos grasos, se estudiaron los niveles de proteínas por Western Blot de diferentes complejos implicados en estos procesos.

Primeramente, se observaron los niveles de HMG-CoA reductasa en MCF7 (*Figura 11*). Los datos dejan ver una disminución de aproximadamente un 45% en la situación que imita una inflamación asociada la obesidad (ELIT).

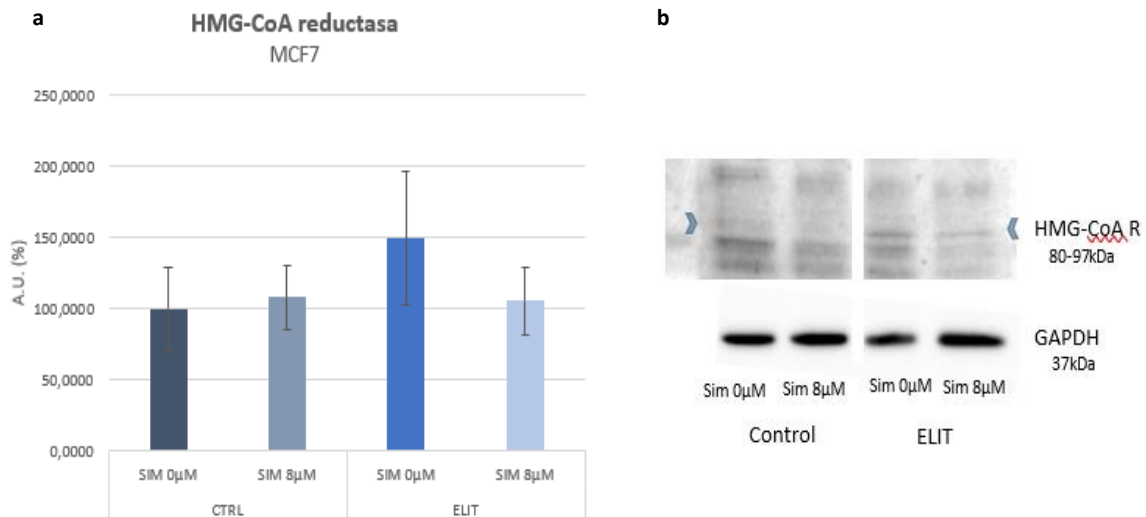


Figura 11. **a** Representación gráfica de los niveles proteicos de HMG-CoA reductasa en la línea MCF7 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 8µM. **b** Bandas obtenidas mediante el Western Blot junto a su control de carga, GAPDH.

En cambio, la línea MDA-MB-231 muestran un aumento de prácticamente el 95% (p-valor = 0,0684) en la condición ELIT cuando se le somete al tratamiento. Mientras que en el grupo control no se muestran cambios en la expresión de esta enzima (Figura 11).

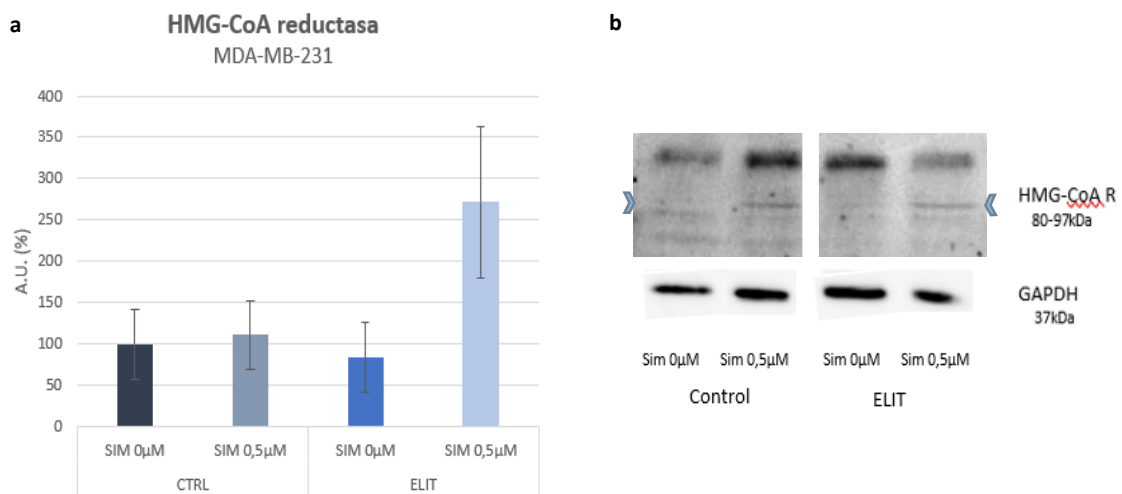


Figura 11. **a** Representación gráfica de los niveles proteicos de HMG-CoA reductasa en la línea MDA-MB-231 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 0,5µM. **b** Bandas obtenidas mediante el Western Blot junto a su control de carga, GAPDH.

En segundo lugar, se analizan los niveles del enzima Escualeno Sintasa que se encuentra por debajo de la HMG-CoA reductasa en la vía de síntesis del colesterol, transformando el farnesilo pirofosfato, que proviene del mevalonato, en escualeno, precursor del colesterol.

En la línea MCF7, si comparamos los dos grupos, control y ELIT, en la condición 0µM aparece un aumento de más del doble, con unos niveles de esta enzima del 100% y del 214% respectivamente. Como se observa en la Figura 12, incrementan significativamente los niveles

de la enzima SQS al tratar las células con Simvastatina 8 μ M, este incremento se ve todavía más marcado en la situación control, que aumenta más de 100 veces el valor que se obtuvo de la situación control 0 μ M. Mientras que, las células que se encuentran en la condición de inflamación (ELIT) aumentan un 800% los niveles de esta enzima respecto a la situación sin tratar. Los datos obtenidos no se han podido someter al análisis estadístico debido a la falta de replicados.

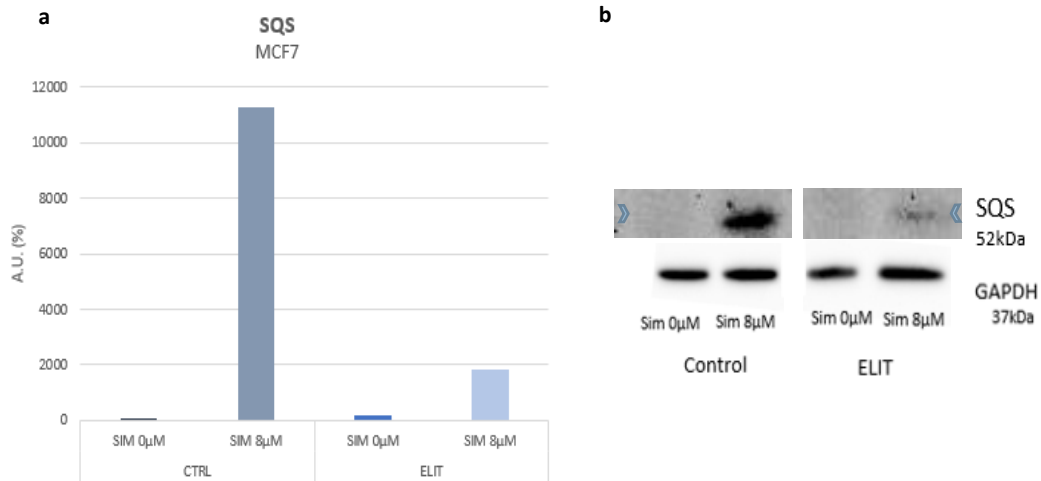


Figura 12. **a** Representación gráfica de los niveles proteicos de Escualeno Sintasa en la línea MCF7 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 8 μ M. **b** Bandas obtenidas mediante el Western Blot junto a su control de carga, GAPDH.

En el caso de MDA-MB-231 se parten de niveles de la enzima distintos, con una diferencia del 21,10% entre la situación control y la ELIT. Sin embargo, en al aplicar el tratamiento, en la condición control no parece haber grandes cambios en la concentración de la Escualeno Sintasa, que sí que ocurren en la situación ELIT con un aumento del 88,49%. De nuevo, al no tener más de un replicado de las muestras no se ha podido realizar el análisis estadístico.

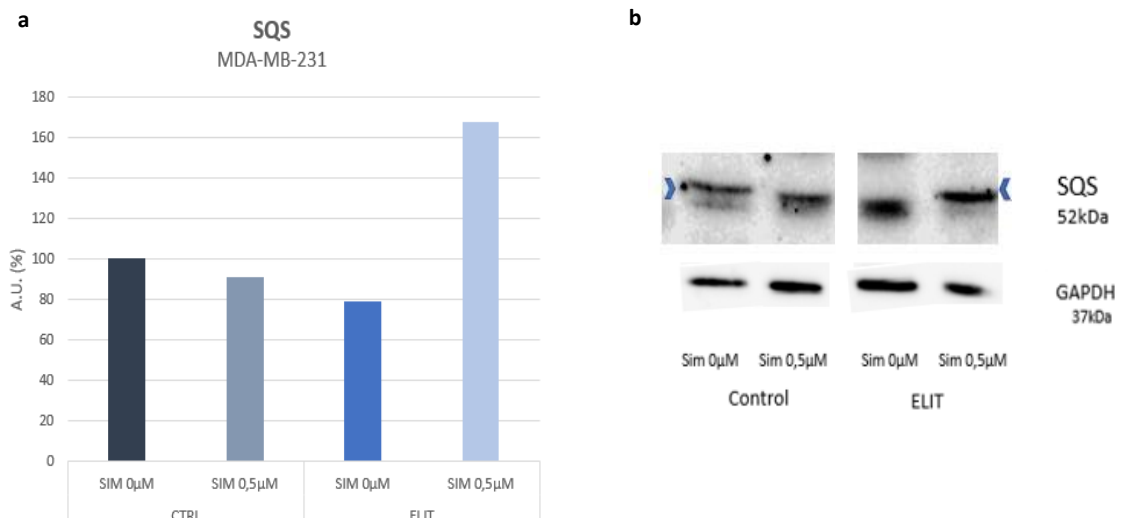


Figura 13. **a** Representación gráfica de los niveles proteicos de Escualeno Sintasa en la línea MDA-MB-231 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 0,5 μ M. **b** Bandas obtenidas mediante el Western Blot junto a su control de carga, GAPDH.

Por último, se analizaron, en ambas líneas, los niveles proteicos de la enzima ácido graso sintasa que es una de las primeras enzimas implicadas en la vía de síntesis de ácidos grasos de la célula. Como muestra la *Figura 14*, los niveles de esta enzima, en MCF7 se ven muy reducidos cuando se las somete a una condición de estrés inflamatorio (ELIT), además, se ven disminuidos con el tratamiento Simvastatina en ambas condiciones. En el escenario control, esta disminución es del 17,28%, mientras que en ELIT es del 5,19%.

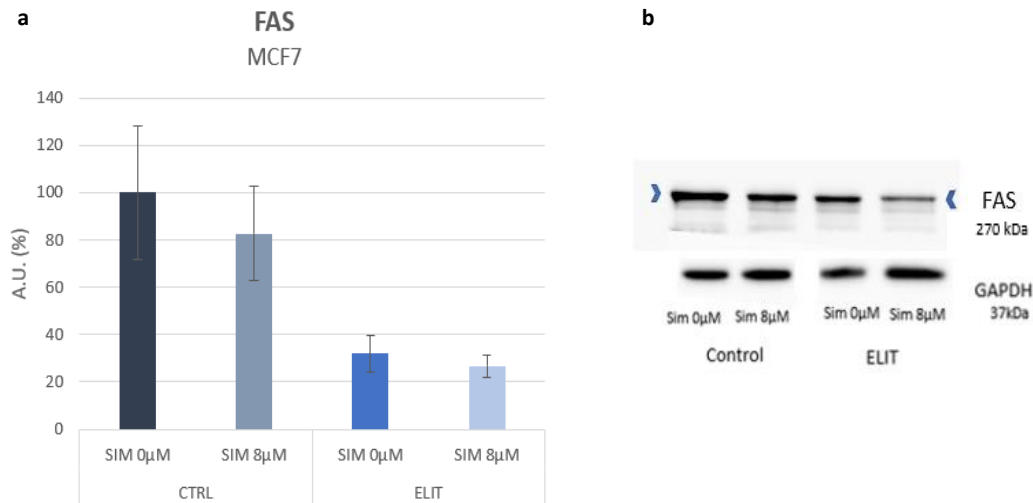


Figura 14. **a** Representación gráfica de los niveles proteicos de la enzima ácido graso sintasa en la línea MCF7 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 8 μ M. **b** Bandas obtenidas mediante el Western Blot junto a su control de carga, GAPDH.

La línea MDA-MB-231, representada en la *Figura 15*, muestra un patrón similar en las condiciones a las que no se les ha aplicado el tratamiento y una disminución más pronunciada de esta enzima al someterlas al tratamiento con la estatina, especialmente en la situación ELIT que muestra una disminución estadísticamente significativa con una diferencia del 27,35% (p-valor = 0,0298)

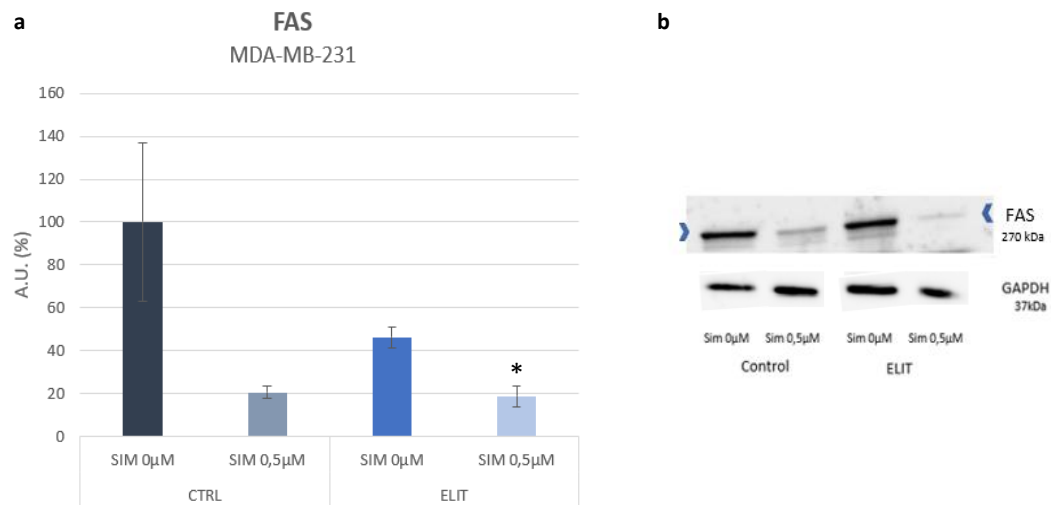


Figura 15. **a** Representación gráfica de los niveles proteicos de la enzima ácido graso sintasa en la línea MDA-MB-231 tras 48 horas del tratamiento con Simvastatina 0,5 μ M. *: Diferencia estadísticamente significativa respecto a la situación 0 μ M (prueba t-student: p-valor < 0,05). **b** Bandas obtenidas mediante el Western Blot junto a su control de carga, GAPDH.

Discusión

Los datos obtenidos de MCF7 revelan que la disminución de la viabilidad se ve afectada principalmente por el tratamiento con el cóctel inflamatorio ELIT y no tanto por el tratamiento con estatinas ya que sufre una disminución de más del 50% en su viabilidad en la situación ELIT. Algunos estudios muestran un aumento de la proliferación de esta línea hormonodependiente cuando es tratada con estrógenos debido a la presencia ER³⁸⁻⁴⁰. Sin embargo, la disminución de la viabilidad que se observa en este experimento probablemente se deba a una activación de las vías proapoptóticas debido a la parte inflamatoria del tratamiento. En cambio, la línea MDA-MB-231 se ve sobre todo afectada por el tratamiento con Simvastatina que a bajas concentraciones disminuye en picado su viabilidad celular, siendo de un 0% cuando supera concentraciones de 4 μ M. Estos resultados podrían relacionarse con estudios que muestran que esta línea es más dependiente de colesterol, ya que se ha visto que presenta una mayor capacidad de captación de lípidos exógenos, así como un mayor metabolismo de lípidos comparado con la línea MCF7 ya que, la línea triple negativa se caracteriza por su elevada motilidad, proceso que requiere una alta energía^{41,42}.

El análisis del ciclo celular muestra que, en caso de MCF7, se produce una parada de las células en la fase G0/G1 del ciclo que parece provocada principalmente por el efecto del cóctel inflamatorio sobre esta línea, aunque se ve potenciada con la adición de Simvastatina. Este resultado concuerda con los estudios sobre la acción de las estatinas sobre el ciclo celular al intervenir, entre otras cosas, en la disminución de precursores del ciclo como la Ciclina D1 y la CDK4/6^{30,32}. Otros puntos de actuación de las estatinas en el ciclo celular, y que son de interés para próximos estudios son, la inhibición de p21Cip1/WAF1 y p27Kip1, así como la inhibición de su proteólisis y la inhibición del factor de transcripción E2F que bloquea la entrada a la fase S.

Los resultados del ciclo para MDA-MB-231 línea celular muestran una apoptosis celular por el gran porcentaje de células que se paran en la fase sub G0/G1 tras la adición de Simvastatina al 0,5 μ M. Estos resultados podrían no ser los efectos reales del tratamiento ya que el porcentaje de apoptosis es demasiado elevado, sin embargo, podrían reforzar la hipótesis de las estatinas como posible tratamiento anticancerígeno ya que consigue reducir la viabilidad de las células de cáncer triple negativas. Una vez más, se puede relacionar el impacto del tratamiento en esta línea MDA-MB-231 con la dependencia del colesterol que requiere para la progresión del cáncer y los procesos migratorios.

Viendo los resultados obtenidos por citometría de flujo de esta última línea se estudiaron los niveles proteicos de la Ciclina D1, implicada en la regulación del ciclo, actuando como subunidad

reguladora de la quinasa dependiente de ciclina CDK4/CDK6 promoviendo el cambio de la fase G1 hacia la fase S del ciclo. Se ha estudiado el papel de esta clina en el cáncer de mama que se encuentra sobreexpresada y desregulada en muchos casos, conduciendo a la proliferación descontrolada⁴³⁻⁴⁵. Esto ha convertido a la Ciclina D1 y las CDKs en posible objetivo terapéutico contra el cáncer. Los datos obtenidos a partir de Western Blot sobre los niveles de proteína Ciclina D1 en MDA-MB-231 revelan que las muestras tratadas con Simvastatina redujeron los niveles de Ciclina D1 lo que explica que estas células no avanzaran de la fase subG0/G1.

Como se ha mencionado anteriormente, las estatinas actúan como inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa, enzima principal en la vía del mevalonato que conduce a la biosíntesis del colesterol endógeno⁴⁶. Analizando los resultados obtenidos durante el experimento ninguna de las dos líneas celulares muestra diferencias estadísticamente significativas en los niveles de esta enzima, esto no quiere decir que las estatinas no estén inhibiendo esta enzima clave para la producción de colesterol. Pasamos a estudiar la siguiente enzima clave implicada en el proceso anabólico de la vía del colesterol que es la escualeno sintasa. Como observamos en la *Figura 16*, la actividad esta enzima es posterior a la producción de mevalonato por parte de la HMG-CoA reductasa, por lo tanto, si esta enzima se encuentra inhibida por el tratamiento con estatinas, la SQS debería ver disminuido su nivel. Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran los efectos que esperábamos ver por lo que deberían realizarse más estudios para comprobar si este efecto presentaría una significancia estadística.

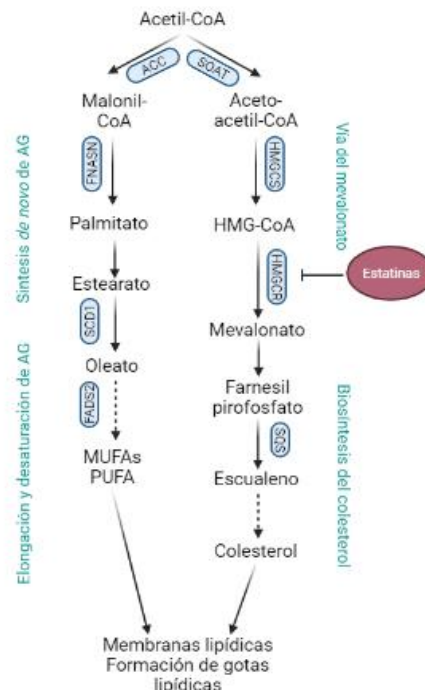


Figura 16. Vías del metabolismo lipídico a partir de Aetil-CoA que puede incorporarse en dos rutas anabólicas: la vía del mevalonato y biosíntesis del colesterol (derecha) o la síntesis *de novo* de ácidos grasos y su elongación.

El acetil-CoA, además de poder avanzar hacia la vía del mevalonato, puede dirigirse hacia la síntesis *de novo* de ácidos grasos esenciales para síntesis de las membranas celulares y sustratos energéticos necesarios para la rápida proliferación de las células tumorales y la constante adaptación a condiciones adversas como la falta de nutrientes y oxígeno. Se ha observado que una posible resistencia a las terapias contra el cáncer puede deberse a la capacidad de estas células a reprogramar su metabolismo de lípidos⁴⁷. Es por esto, que se estudiaron los niveles presentes de la enzima ácido graso sintasa en ambas líneas. Una de las hipótesis, por lo tanto, es que las líneas tumorales puedan modificar su metabolismo para evitar la muerte, por lo que quizás al inhibir la vía de síntesis de colesterol, el acetil-CoA se redirija hacia la síntesis de ácidos grasos. Los resultados obtenidos a partir de Western Blot nos muestran que, en el caso de la línea receptor de hormonas positivo, hay niveles similares de la enzima FAS si comparamos el tratamiento vehículo con el tratamiento Simvastatina 8µM por lo que el acetil-CoA podría estar dirigido hacia la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, la línea MDA-MB-231 muestra niveles más reducidos de la enzima cuando es tratada con Simvastatina, hecho que podría deberse a la dependencia del colesterol que presenta y que le podría estar dificultando redirigir el metabolismo del acetil-CoA hacia formación de ácidos grasos. Estos resultados son prometedores para el estudio de tratamientos en las células tumorales triple negativas.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las estatinas podrían tener un efecto negativo para las líneas tumorales triples negativas, como MDA-MB-231 tanto en situación de inflamación asociada a la obesidad como en una situación normal. Estas líneas tan dependientes del colesterol sufren una mayor disminución de viabilidad al suministrar un tratamiento con estatinas que inhiben la síntesis de este por su acción sobre la HMG-CoA reductasa. En cambio, la línea MCF7, que no depende tanto del colesterol, no se ve tan afectada por este tratamiento ya que parece remodelar su metabolismo lipídico y dirigirlo hacia la síntesis de ácidos grasos, lo que les ayuda a la supervivencia celular, pero sí ven más afectada su viabilidad en entornos de estrés e inflamación asociada la obesidad. Así pues, este estudio presenta unos datos preliminares para estudiar el uso de estatinas como posible tratamiento coadyuvante a los tratamientos anticancerígenos en las líneas triple negativas por sus efectos proapoptóticos.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias al apoyo de la Asociación Feim Camí per Viure (Santa María del camí) y al proyecto Fundraising Investigación en Cáncer de Mama (InCam) de la Fundació Universitat empresa de les Illes Balears (FUEIB).

Bibliografía

1. Lacey, J. V., Devesa, S. S. & Brinton, L. A. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environ Mol Mutagen* **39**, 82–88 (2002).
2. Globocan 2018 Latest global cancer data – IARC. <https://www.iarc.who.int/infographics/globocan-2018-latest-global-cancer-data/>.
3. OMS Cáncer de mama. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
4. Menopausia | GEICAM - Investigación en cáncer de mama. <https://www.geicam.org/cancer-de-mama-old/tengo-cancer-de-mama/cancer-de-mama-y-menopausia>.
5. Age standardized (World) incidence rates, breast, all ages. doi:10.8.
6. Definición de HER2 - Diccionario de cáncer del NCI - NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/her2>.
7. Shaw, G. Types of Breast Cancer: Triple Negative, ER-Positive, HER2-Positive. <https://www.webmd.com/breast-cancer/breast-cancer-types-er-positive-her2-positive> (2023).
8. Cáncer de mama triple negativo | CDC. <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/triple-negative.htm>.
9. Cáncer de mama triple negativo | CDC. <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/triple-negative.htm>.
10. Cáncer de Mama. <https://www.roche.com.co/es/informacion-sobre-salud/biotecnologia-/oncologia/CancerDeMama.html>.
11. Herrera-Covarrubias, D. *et al.* Obesity as a risk factor in the development of cancer. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* **32**, 766–776 (2015).
12. La obesidad y el cáncer | CDC. <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/obesity/index.htm>.
13. Schmidt, S., Monk, J. M., Robinson, L. E. & Mourtzakis, M. The integrative role of leptin, oestrogen and the insulin family in obesity-associated breast cancer: potential effects of exercise. *Obesity Reviews* **16**, 473 (2015).
14. Hill, J. O., Wyatt, H. R. & Peters, J. C. Obesity. *Our World in Data* **126**, 126–132 (2017).
15. Instituto Nacional de Estadística. Determinantes de salud. https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=INESeccion_C&cid=1259926457058&p=%5C&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout¶m1=PYSDetalle¶m3=1259924822888 (2020).
16. Ministerio de Sanidad, C. y B. Social. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en España en el informe “The heavy burden of obesity” (OCDE 2019) y en otras fuentes de datos. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/nutricion/observatorio/Resumen_resultados_informe_OCD-NAOS.pdf (2019).
17. Roberts, D. L., Dive, C. & Renehan, A. G. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu Rev Med* **61**, 301–316 (2010).

18. Zhang, H., Wang, M. & Xu, Y. Understanding the mechanisms underlying obesity in remodeling the breast tumor immune microenvironment: from the perspective of inflammation. *Cancer Biol Med* **20**, 268 (2023).
19. E. Goldberg, J. & L. Schwertfeger, K. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Curr Drug Targets* **11**, 1133–1146 (2010).
20. MacCiò, A. & Madeddu, C. Obesity, Inflammation, and Postmenopausal Breast Cancer: Therapeutic Implications. *The Scientific World Journal* **11**, 2020 (2011).
21. Choi, J., Cha, Y. J. & Koo, J. S. Adipocyte biology in breast cancer: From silent bystander to active facilitator. *Prog Lipid Res* **69**, 11–20 (2018).
22. Kawano, M. *et al.* Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**, 83–85 (1988).
23. Owen, K. L., Brockwell, N. K. & Parker, B. S. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
24. Zhang, G. J. & Adachi, I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res* **19**, 1427–1432 (1999).
25. Martinez-Bernabe, T. *et al.* Estrogen receptor beta (Er β) maintains mitochondrial network regulating invasiveness in an obesity-related inflammation condition in breast cancer. *Antioxidants* **10**, 1371 (2021).
26. Estatinas: MedlinePlus. <https://medlineplus.gov/spanish/statins.html>.
27. Wong, W. W. L., Dimitroulakos, J., Minden, M. D. & 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 **16**, 508–519 (2002).
28. NG, V., A, K., M, K. & C, K. Statins and cancer. *Anticancer Agents Med Chem* **14**, 6–8 (2014).
29. Beckwitt, C. H., Brufsky, A., Oltvai, Z. N. & Wells, A. Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality. *Breast Cancer Res* **20**, (2018).
30. Beckwitt, C. H., Brufsky, A., Oltvai, Z. N. & Wells, A. Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality. *Breast Cancer Res* **20**, (2018).
31. Vogel, V. G. Can statin therapy reduce the risk of breast cancer? *Journal of Clinical Oncology* **23**, 8553–8555 (2005).
32. Gazzero, P. *et al.* Pharmacological Actions of Statins: A Critical Appraisal in the Management of Cancer. *Pharmacol Rev* **64**, 102–146 (2012).
33. MDA-MB-231 - CRM-HTB-26 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crm-htb-26>.
34. Cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424).
35. Cell line profile.
36. MCF7 - HTB-22 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-22>.
37. Pons, D. G. *et al.* The presence of Estrogen Receptor β modulates the response of breast cancer cells to therapeutic agents. *Int J Biochem Cell Biol* **66**, 85–94 (2015).

38. Yang, Y. C. S. H. *et al.* Effect of Estrogen on Heteronemin-Induced Anti-proliferative Effect in Breast Cancer Cells With Different Estrogen Receptor Status. *Front Cell Dev Biol* **9**, (2021).
39. Martinez-Bernabe, T. *et al.* Estrogen Receptor Beta (ER β) Maintains Mitochondrial Network Regulating Invasiveness in an Obesity-Related Inflammation Condition in Breast Cancer. *Antioxidants (Basel)* **10**, (2021).
40. Pacheco-Velázquez, S. C. *et al.* 17- β Estradiol up-regulates energy metabolic pathways, cellular proliferation and tumor invasiveness in ER+ breast cancer spheroids. *Front Oncol* **12**, 1018137 (2022).
41. Antalis, C. J., Uchida, A., Buhman, K. K. & Siddiqui, R. A. Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification. *Clin Exp Metastasis* **28**, 733–741 (2011).
42. Rotheneder, M. & Kostner, G. M. Effects of low- and high-density lipoproteins on the proliferation of human breast cancer cells in vitro: differences between hormone-dependent and hormone-independent cell lines. *Int J Cancer* **43**, 875–879 (1989).
43. Barnes, D. M. & Gillett, C. E. Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **52**, 1–15 (1998).
44. Velasco-Velázquez, M. A. *et al.* Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. *Future Oncol* **7**, 753–765 (2011).
45. Casimiro, M. C., Crosariol, M., Loro, E., Li, Z. & Pestell, R. G. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer* **3**, 649–657 (2012).
46. Sirtori, C. R. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res* **88**, 3–11 (2014).
47. Bacci, M., Lorito, N., Smiriglia, A. & Morandi, A. Fat and Furious: Lipid Metabolism in Antitumoral Therapy Response and Resistance. *Trends Cancer* **7**, 198–213 (2021).
48. Ramos, P. M. Del concepto de estatinas de alta potencia a los efectos extralipídicos de las estatinas. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* **15**, 22–27 (2015).