

LAS ESTATINAS AFECTAN LA VIABILIDAD DE LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA Y LINFOMA HUMANAS *IN VITRO*

Mery Guerrero¹, Camilo Di Giulio², Juan Bautista De Sanctis³

RESUMEN: Se ha propuesto que las estatinas inducen apoptosis sobre células tumorales. Para probar dicha hipótesis, se analizó el efecto de las estatinas atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pravastatina y simvastatina en el rango de concentraciones de 1 pM hasta 100 µM, sobre la viabilidad de las líneas celulares humanas Jurkat E6.1, Jurkat D1.1 (Linfoma T), Daudi (Linfoma B), U937 (leucemia monocítica) y HL-60 (leucemia promielomonocítica) in vitro en cultivos de 48 horas, analizados por la técnica de hidrólisis del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Lovastatina y mevastatina son los más potentes inductores de muerte celular independientemente del tipo celular (Ic 50 entre 12 y 50 µM). Para las otras estatinas se observan diferencias en el Ic50 según la línea celular atorvastatina (38,1 y 48,6 µM Jurkats, 55,3 µM Daudi y 100 µM para las otras líneas), pravastatina (25 µM HL-60, 55,6 y 60,7 µM Jurkats y ≥ 100 µM Daudi y U937), simvastatina (25,1 µM Jurkat D1.1, 50,2 µM Jurkat E6.1, 45,2 µM Daudi y 51,3 µM HL-60, y > 100 µM U937) y para fluvastatina en todos los casos > 100 µM. La disminución de la viabilidad celular se revierte completamente cuando las células son incubadas con 10 µM mevalonato. Se concluye que la lovastatina y mevastatina son las más potentes inductoras de muerte seguida por atorvastatina, pravastatina y simvastatina cuyo efecto depende del tipo de línea celular y la fluvastatina no tiene efectos importantes en la viabilidad de las líneas celulares estudiadas.

Palabras clave: Estatinas, Muerte celular, Atorvastatina, Fluvastatina, Lovastatina, Mevastatina, Pravastatina, Simvastatina.

ABSTRACT: Statins have been proposed to induce apoptosis of tumor cells. In order to test this hypothesis, the effect of atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pravastatin, simvastatin on cell viability was assessed by in vitro culture for 48 hr, at concentrations ranging from 1 pM to 100 µM on human cell lines Jurkat E6.1, Jurkat D1.1 (T cell lymphoma), Daudi (B cell lymphoma), U937 (monocytic leukemia) and HL-60 (pro myelomonocytic leukemia) and analyzed the oxidation of (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Lovastatin and mevastatin are the most potent inductors of cell death independently of the cell type (Ic 50 between 12 and 50 µM). Differences in the Ic50 are observed depending on the cell line: atorvastatin (38.1 and 48.6 µM Jurkats, 55.3 µM Daudi y 100 µM for the others lines), pravastatin (25 µM HL-60, 55.6 y 60.7 µM Jurkats and ≥ 100 µM Daudi and U937), simvastatin (25.1 µM Jurkat D1.1, 50.2 µM Jurkat E6.1, 45.2 µM Daudi and 51,3 µM HL-60, and > 100 µM U937) and for fluvastatin > 100 µM in all cases. The decrease in cell viability is reverted completely when the cells were incubated with 10 µM mevalonate. It is concluded that lovastatin and mevastatin are the most potent inductors of cell death followed by atorvastatin, pravastatin and simvastatin whose effect depends upon the cell type and fluvastatin does not have any important effects on cell viability on the cell lines studied.

Key words: Statins, Cell death, Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Mevastatin, Pravastatin, Simvastatin

Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Los Chaguaramos. Caracas, Venezuela. Código Postal 1053. Fax (0212) 6932815/6932734. Dirección electrónica: <http://www.med.ucev.ve/idi>

Trabajo financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. PI 090060102005 y FONACIT G-2005000389.

¹ Licenciada en Bioanálisis. MSc en Inmunología Básica. Instituto de

Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela

² Médico Cirujano. Profesor Instructor. Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

³ Doctor en Ciencias Fisiológicas. Coordinador de Investigación. Profesor Titular. Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Recibido: 03-05-10.

Aceptado: 01-06-10.

INTRODUCCIÓN

Las estatinas fueron diseñados como inhibidores de la enzima hidroximetil glutaril CoA reductasa; sin embargo, sus efectos farmacológicos van más allá de la simple inhibición enzimática⁽¹⁾. Uno de los efectos farmacológicos más importantes es la reducción en la proliferación y viabilidad de células tumorales y control de la metástasis⁽²⁻⁴⁾. Yachim y col.⁽⁵⁾ fueron los primeros en demostrar el incremento de la biosíntesis de colesterol en líneas de leucemia humana y en consecuencia varios trabajos han demostrado el efecto pro inductor de muerte de las diferentes estatinas^(2-4,6-7). La inducción de muerte celular es principalmente dependiente de la actividad mitocondrial^(2-4,6-8). Sin embargo, la farmacocinética y farmacodinamia de las diferentes estatinas es disímil⁽⁹⁻¹⁰⁾ y en la literatura hay pocos trabajos donde se compare el efecto de las diferentes estatinas sobre una variedad de células tumorales. Las concentraciones plasmáticas máximas de las estatinas son entre 0,5 a 5 μM ⁽⁹⁻¹⁰⁾. Con el propósito de analizar el efecto de diferentes estatinas sobre la viabilidad celular, teniendo en cuenta su diversas estructuras y metabolismos, decidimos hacer un estudio de varias células inmortalizadas de diferente origen, linfoma T (Jurkat E 6.1 y D1.1), linfoma B (Daudi), leucemia monocítica (U937) y leucemia pre pro mielomonocítica (HL-60).

MÉTODOS

Las estatinas: lovastatina, mevastatina y simvastatina y el mevalonato fueron activados por hidrólisis ácida según protocolo descrito de la casa comercial *Sigma Chemical Corporation* donde se adquirió. La atorvastatina se adquirió a Sigma Chemical y la fluvastatina a la casa comercial Calbiochem. Las otras estatinas fueron disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO). La concentración máxima de DMSO en el cultivo fue de 0,1 % que no causa efecto sobre la viabilidad celular.

Las líneas celulares fueron obtenidas de la organización americana de cultivo celular (*American Type Tissue Culture Collection*) y fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con 10 % de suero bovino inactivado por calor y 100 U/mL de penicilina/streptomycin y glutamina. Las líneas celulares Jurkat E6.1 y D1.1 son dos clones proveniente del mismo donante con expresión de CD3 en ambos casos de 40 % y de CD154 de 0,1 % en un caso y 100 % en el otro. La línea celular Daudi es un linfoma de Burkitt indiferenciado, IgD CD40 positivo,

U937 es una línea inmadura de monocitos que expresa CD33 y no expresa CD14 ni CD16, y la células HL-60 son de células prepromielocítica (puede diferenciarse a monocitos, polimorfo nucleares o megacariocitos) y expresa CD33 y CD154. Las células fueron mantenidas a razón de 1×10^5 células/mL en frascos de cultivo. Para los experimentos se incubaron en placas de 96 pozos fondo plano a razón 5×10^4 células por pozo. El protocolo incluye: control medio completo, estatinas a diferentes concentraciones, de 1 pM a 100 μM y estatinas a diferentes concentraciones co incubadas con 10 μM de mevalonato. Los cultivos fueron realizados por 48 horas. Cada ensayo se montó por triplicado, se realizaron 10 ensayos por línea celular.

La viabilidad celular fue determinada por el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) como fue descrito por Mosmann⁽¹¹⁾ y modificada por nuestro laboratorio⁽¹²⁾. El ensayo del MTT se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolio, MTT, por las células viables. Las deshidrogenadas usando NADH o NADPH como coenzimas pueden convertir la forma amarilla de la sal del MTT (soluble en agua) a cristales insolubles de formazan de color púrpura. Después de las 48 horas de incubación con las estatinas, las células fueron incubadas por 4 horas con 50 μl de MTT (0,4 mg/mL en PBS). Posteriormente, las placas son centrifugadas a 1 000 x g por diez minutos, las células lavadas con PBS, centrifugadas y los cristales de formazan son resuspendidos en DMSO. La solución de formazan fue leída espectrofotométricamente a 570 nm. Se realiza con cada ensayo una curva patrón con diferentes concentraciones de células incubadas con MTT. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de viabilidad. La reducción en un 50 % del número de células en relación con los controles (IC_{50}) fue determinada de las curvas dosis respuesta usando el programa Graph Pad Prism 4.0.

RESULTADOS

El efecto de las diferentes estatinas sobre la viabilidad celular se resume en la Tabla 1 donde se expresan los diferentes IC_{50} para las diversas líneas celulares empleadas. En dicha tabla se observa las diferencias entre los grupos. La estatina más eficiente es mevastatina seguido por lovastatina, simvastatina, pravastatina, atorvastatina. No se pudo determinar el IC_{50} de fluvastatina en el rango ensayado.

Tabla 1

Ic50 (µM) de las diferentes estatinas

Estatina	JURKAT E 6.1	JURKAT D1.1	Daudi	U937	HL60
Atorvastatina	38,1	48,6	55,3	100	100
Fluvastatin	>100	>100	>100	>100	>100
Lovastatin	36,2	49,8	40,2	12,9	55,4
Mevastatin	21,2	12,6	48,6	20,8	19,1
Pravastatin	55,6	60,7	100	>100	25,0
Simvastatin	50,2	25,1	45,2	>100	52,3

La Tabla 1 ilustra el efecto de las diferentes estatinas sobre la viabilidad de las diferentes líneas celulares. Los valores de Ic50 fueron calculados para cada fármaco en base a curvas de 12 puntos de concentraciones crecientes desde 1 pM hasta 100 µM (0, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 75, 100 µM). Los valores obtenidos son graficados y analizados por la curva matemática no lineal del programa Graph Pad Prism 4 para determinar los Ic50.

A pesar de que las células Jurkat provienen del mismo linaje, hay diferencias importantes en el Ic50 sobre todo cuando las células son tratadas con simvastatina. En el caso de U937 y HL60, estas últimas parecen ser más susceptibles al efecto de la estatina, excepto por lovastatina. Finalmente, las células más resistentes al tratamiento con estatinas son las células Daudi.

En la Figura 1 se ilustra el porcentaje de viabilidad de las diferentes líneas celulares, analizado por el

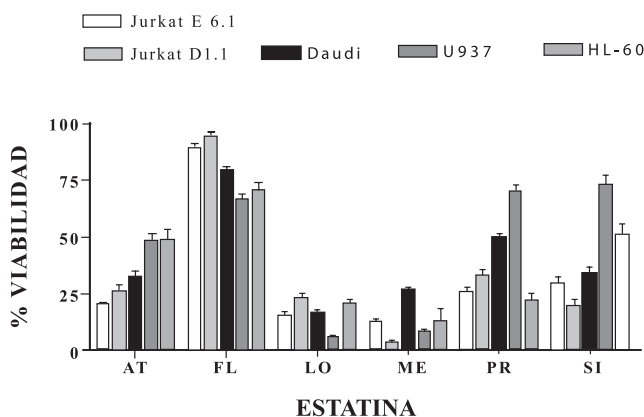


Figura 1. Representa el % viabilidad obtenido por la técnica MTT para cada línea celular con las diferentes estatinas a una concentración única de 100 µM en cada caso.

ensayo de MTT, en la concentración más alta de cada una de las estatinas (100 µM). Se observa claramente el efecto de las diferentes estatinas sobre la viabilidad celular de las líneas celulares estudiadas. El efecto de las estatinas sobre la disminución de la viabilidad se puede resumir en mevastatina>lovastatina>simvastatin a>pravastatina=atorvastatina. La fluvastatina no inhibe significativamente la viabilidad celular en la dosis más alta. La concentración de 100 µM corresponde a por lo menos 20 veces la concentración plasmática terapéutica que se observa con dosis de 40 mg vía oral.

Cuando el mevalonato, producto de la reacción de la enzima hidroximetil glutaril coA reductasa, es añadido al cultivo con las estatinas, se observa un incremento en los IC 50 que está representado en la Tabla 2. Mevastatina,

Tabla 2

Ic50 (µM) de las diferentes estatinas en presencia de 10 µM Mevalonato

Estatina	JURKAT E 6.1	JURKAT D1.1	Daudi	U937	HL60
Atorvastatina	70,6	> 100	> 100	> 100	> 100
Fluvastatin	>100	>100	>100	>100	>100
Lovastatin	85,3	> 100	> 100	55,2	> 100
Mevastatin	> 100	60,3	> 100	44,8	46,3
Pravastatin	> 100	> 100	> 100	>100	61,7
Simvastatin	> 100	55,9	> 100	>100	> 100

En la Tabla 2 se representa el efecto potenciador del mevalonato en todas las curvas correspondientes a las estatinas usadas y representadas en la Tabla 1. En todas las estatinas excepto en la fluvastatina, el mevalonato revierte el efecto inhibitor de la viabilidad celular ilustrado en la Tabla 1.

es sin embargo, la única estatina que tiene un efecto moderado sobre la viabilidad de tres tipos celulares.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se plantea abordar el estudio de la posible relación entre diferentes estructuras de las estatinas y la inducción de muerte celular en líneas inmortalizadas. Cabe destacar que la concentración máxima de las diferentes estatinas con dosis orales de 40 mg vía oral correspondería a un máximo de 10 µM como concentración farmacológica efectiva (9). Como se observa claramente en la Tabla 1, solo mevastatina

es capaz de generar una disminución en la viabilidad celular en la mayoría de las células estudiadas a diferencia de las otras estatinas. Lovastatina tiene un comportamiento semejante, pero no tan eficiente y luego simvastatina, pravastatina, atorvastatina tienen menor efecto. Finalmente, la fluvastatina a las dosis ensayadas no afecta la viabilidad celular.

También es interesante analizar el efecto de las diferentes estatinas sobre células provenientes de un solo linaje. Es probable que las estatinas induzcan una respuesta diferente entre células tumorales primarias o las metastásicas según lo sugieren varios autores como lo exponen Hindler y col. ⁽²⁾.

Dado que efecto de las estatinas se revierte con mevalonato, se podría sugerir que las células tumorales *in vitro* pudieran tener la capacidad de escapar de la inhibición de las estatinas. Varios investigadores han sugerido que las estatinas pudieran tener un efecto sinérgico con otros fármacos antineoplásicos sobre la viabilidad celular ⁽²⁻⁴⁾; sin embargo, en muchos casos los mecanismos de acción no están dilucidados del todo. A la par, conocen estudios detallados a gran escala, controlados doble ciego, que permita establecer el posible papel de dichas drogas como coadyuvante en el tratamiento antineoplásico. Se presume que estos fármacos pudieran tener un efecto más amplio debido a que las estatinas, dependiendo de las dosis, pueden: 1) inducir una disminución del crecimiento tumoral, por inhibición de la activación de Ras y Rho y la activación de p21 y p27 inhibitoras de la proliferación celular, 2) la activación de caspasa 3, 7, 8, y 9 junto con una disminución de bcl-2, 3) la inhibición de E-selectina y metaloproteína 9 en metástasis. Los resultados aquí presentados permitieran sugerir que dependiendo de la estatina, la dosis, los metabolitos y el tipo tumoral se podría observar algunos de los efectos propuestos por estos fármacos. Por ello, se concluye que estudios ulteriores son necesarios para poder evaluar el papel de las estatinas en el tratamiento antineoplásico.

REFERENCIAS

1. Singh V, Deedwania P. Expanding roles for atorvastatin. *Drugs Today (Barc)*. 2008;44(6):455-471.

2. Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD. The role of statins in cancer therapy. *Oncologist*. 2006;11(3):306-315.
3. Sassano A, Platanius LC. Statins in tumor suppression. *Cancer Lett*. 2008;260:11-19.
4. Fritz G. Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(5):626-638.
5. Yachnin S, Golomb HM, West EJ, Saffold C. Increased cholesterol biosynthesis in leukemic cells from patients with hairy cell leukemia. *Blood*. 1983;61(1):50-60.
6. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: The statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*. 2002;16(4):508-519.
7. Schmidmaier R, Simsek M, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Synergistic antimyeloma effects of zoledronate and simvastatin. *Anticancer Drugs*. 2006;17(6):621-629.
8. Shibata MA, Ito Y, Morimoto J, Otsuki Y. Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: A p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism. *Carcinogenesis*. 2004;25(10):1887-1898.
9. Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(7):463-474.
10. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther*. 2006;112(1):71-105.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
12. Suárez AI, Chavez K, Mateu E, Compagnone RS, Muñoz A, Sojo F, et al. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat Prod Commun*. 2009;4(11):1547-1550.
13. Cuthbert JA, Lipsky PE. Sterol metabolism and lymphocyte responsiveness: Inhibition of endogenous sterol synthesis prevents mitogen-induced human T cell proliferation. *J Immunol*. 1981;126(6):2093-2099.
14. Yachnin S. Mevalonic acid as an initiator of cell growth. Studies using human lymphocytes and inhibitors of endogenous mevalonate biosynthesis. *Oncodev Biol Med*. 1982;3(2-3):111-123.
15. Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD. The role of statins in cancer therapy. *Oncologist*. 2006;11(3):306-315.

CORRESPONDENCIA: Dr. Juan B. De Sanctis. Instituto de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Teléfono 212-