

50524
4



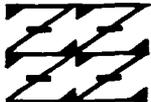
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" Z A R A G O Z A "

EFFECTO DEL ANTIPROGESTAGENO, MIFEPRISTONA,
SOBRE LA CITOTOXIDAD DE CISPLATINO EN
CELULAS HeLa.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
AARON AGUSTIN/ALVAREZ FIGUEROA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO INDIAMOS EN
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR. BIOL. SERGIO PASTEN SANCHEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

GRACIAS A DIOS

Por darme la vida, salud e inteligencia,
para poder salir adelante y luchar fuerte contra
toda adversidad que se ha puesto en mi camino.

A MIS PADRES

Mercedes Figueroa Gordillo

Alvaro Alvarez Ballinas

Quienes sin escatimar esfuerzo alguno
han sacrificado gran parte de su vida
para formarme y educarme.

A mis Profesores, Asesores y a la
Dra. Patricia García
por todo el apoyo que me brindó

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos
ni aún con las riquezas más grandes
del mundo.

Les dedico esta Tesis que es una de las metas
más deseadas y valiosas en mi vida Profesional
y es el resultado de apoyo incondicional
en toda mi Carrera.

Los Ama

Aarón

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

I. ÍNDICE

I. Índice.	1
II. Resumen.	3
III. Introducción.	4
IV. Marco teórico.	6
4.1 Generalidades del cáncer.	6
4.2 Ciclo celular.	7
4.3 Mecanismo de proliferación neoplásica.	8
4.4 Características de una célula tumoral.	9
4.5 Muerte celular programada	10
V. Cáncer cervico uterino.	11
5.1 Características del VPH.	12
5.2 Quimioterapia.	13
5.2.1 Estructura del cisplatino.	14
5.2.2 Mecanismo de acción del cisplatino.	15
VI. Tipos de resistencia a fármacos antineoplásicos.	16
6.3 Resistencia intrínseca.	16
6.4 Resistencia adquirida.	16
6.5 Mecanismo de resistencia al cisplatino.	19
VII. Mifepristona.	21
7.1 Estructura de la mifepristona.	22
7.2 Mecanismo de acción de la mifepristona.	22
7.3 Mifepristona y su uso clínico.	22

TESTIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. Planteamiento del problema.	23
IX. Objetivos.	24
9.1 Objetivo general.	24
9.2 Objetivos específicos.	24
X. Hipótesis.	25
XI. Material, equipo y reactivo.	26
XII. Metodología.	28
XIII. Resultados.	35
XIV. Discusión de resultados.	40
XV. Conclusiones.	43
XVI. Bibliografía.	44

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. RESUMEN

El cisplatino representa uno de los fármacos más importantes en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, los tratamientos clínicos son restringidos por sus serios efectos secundarios. Existen estudios que se han enfocado a la búsqueda de nuevos fármacos capaces de potenciar su efecto antiproliferativo sin incrementar sus efectos colaterales, los resultados no han sido exitosos. En este trabajo se investigó la capacidad del antiprogestageno, mifepristona (MF), para modular el efecto citotóxico del cisplatino en células HeLa. El efecto se determinó midiendo la viabilidad celular empleando un ensayo basado en la biorreducción de las sales de tetrazolium por células metabólicamente activas, además se evaluó la concentración intracelular del cisplatino utilizando un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) previamente validado, y por último se determinó la participación de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los resultados demostraron que la combinación de mifepristona con cisplatino produce un efecto antiproliferativo sinérgico y que dicho efecto puede estar mediado al menos parcialmente por un incremento en la concentración intracelular del cisplatino, así como por la disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Estos datos sugieren que mifepristona puede ser un excelente candidato para ser probado en combinación con otros fármacos antineoplásicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. INTRODUCCION

El cáncer de cuello uterino (CaCU) es un problema de salud importante en países subdesarrollados. La incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix en los Estados Unidos y otros países desarrollados han disminuido notablemente, sin embargo en países en vías de desarrollo han tendido a incrementarse^{1,2}.

Estudios epidemiológicos acerca del CaCU han demostrado que es una enfermedad que se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, infecciones vírales, anticonceptivos. Un factor adicional es la infección por un virus conocido con el nombre de Virus del Papiloma Humano (VPH).

Los tipos vírales que se encuentran con mayor frecuencia son el 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35. De estos los más asociados a neoplasia maligna son el VPH 16 y VPH 18. El tipo 16 es el responsable de aproximadamente un 50% de las infecciones en CaCU, mientras que el VPH 18 alcanza un 18-20%^{3,4}.

Por otro, lado uno de los principales problemas en la quimioterapia del cáncer cérvico-uterino es la resistencia a múltiples fármacos (MDR, del inglés multi drug resistance), este es un fenómeno experimental bien estudiado y juega un papel muy importante en el desarrollo de la resistencia clínica a ciertos agentes antineoplásicos. Varios mecanismos de resistencia se han caracterizado a nivel celular, entre estos se encuentran los denominados MDR-PGP (involucrando una proteína de membrana denominada PGP) y los no relacionados, los cuales están asociados con alteraciones en el metabolismo celular, con la disminución en la inactivación de fármacos, o bien con mecanismos de reparación de las lesiones inducidas por el fármaco.

La PGP transporta de manera activa una amplia variedad de fármacos citotóxicos fuera de la células tumorales, esto lleva a una disminución en la acumulación del fármaco otorgando protección del efecto citotóxico del tratamiento al tumor⁵.

La alteración en el contenido de glutatión celular y sus enzimas asociadas representan otro de los sistemas metabólicos que pueden disminuir la

activación de ciertos fármacos. Algunos de estos mecanismos pueden contribuir o participar en el desarrollo de la resistencia en la quimioterapia antineoplásica en una gran cantidad de cánceres incluyendo el CaCU.

Dentro de la quimioterapia se han venido utilizando una gran variedad de agentes hormonales entre los cuales se encuentran los antiprogestágenos como la mifepristona (MF). La MF es un potente antagonista competitivo de la unión tanto de la progesterona como de los glucocorticoides a sus receptores respectivos. En presencia de progestágenos, la MF actúa como antagonista competitivo de los receptores, pero es un agonista parcial con actividad débil cuando se administra sola⁶. Además, ha demostrado ser un fármaco con actividad antineoplásica en líneas celulares de roedores con resistencia farmacológica inhibiendo la función de la PGP.

La MF interacciona también en líneas celulares de leucemias mieloides (CD34). Se ha reportado que MF incrementa la concentración intracelular de doxorubicina en leucemias mieloides. En células de carcinoma epitelial ovárico expuestas a MF se ha observado un efecto antiproliferativo provocando un arresto de las mismas en las fases G₀/G₁ del ciclo celular reduciendo el número de células en la fase S. MF es un inhibidor del receptor de progesterona que ha demostrado tener actividad en contra de células de cáncer ovárico en líneas *in vitro*⁷.

Por otra parte, el cisplatino y sus derivados representan uno de los grupos de fármacos más importantes en el tratamiento del cáncer. En combinación con otras sustancias, consiguen la curación de pacientes con tumores testiculares y cáncer ovárico y desempeña un papel central en el tratamiento de cáncer de pulmón y CaCU⁸.

Los mecanismos de resistencia que presenta el cisplatino se consideran como procesos multifactoriales, dentro de los cuales están: la disminución del contenido intracelular, incremento del contenido intracelular de glutatión y de la metalotioneina (MT) los cuales se unen al cisplatino impidiendo la formación de aductos del platino⁹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. MARCO TEORICO

Generalidades de Cáncer

El cáncer surge cuando las células de alguna parte del cuerpo comienzan a crecer sin control. Aunque existen muchos tipos de cáncer, todos comienzan debido al crecimiento sin control y sin orden de las células anormales.

Debido a que las células cancerosas continúan creciendo y dividiéndose, son diferentes de las células normales. En lugar de morir, viven más tiempo que las células normales y continúan formando nuevas células anormales. Las células cancerosas a menudo viajan a otras partes del cuerpo donde comienzan a crecer y a reemplazar el tejido normal. Este proceso llamado metástasis, ocurre a medida que las células cancerosas entran al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos de su cuerpo.

Las células cancerosas surgen como consecuencia de daños en el ADN (ácido desoxirribonucleico). Esta sustancia se encuentra en todas las células y dirige sus funciones. En las células normales cuando el ADN se daña el organismo es capaz de reparar dicho daño. En las células cancerosas el ADN no se repara, las personas pueden heredar el ADN dañado, que es responsable de los tipos de cáncer hereditarios¹⁰.

Podemos decir que el cáncer es la consecuencia de unas anomalías genéticas-proteinicas que dan lugar a unas células transformadas, caracterizadas por aberraciones en su diferenciación, un aumento en su proliferación y en su supervivencia, y una capacidad de invadir y metastatizar.

Posteriormente apareció Paracelso, que modificó la teoría de la carcinogénesis afirmó que los tumores se producían por acumulación de agentes exógenos en el organismo. Los datos epidemiológicos demuestran que la mayor parte de los cánceres humanos (del 50 al 80%) se deben a factores exógenos potencialmente previsibles y que los factores genéticos desempeñan un papel poco importante. Las causas conocidas del cáncer en el ser humano son: agentes químicos, radiación, agentes físicos, virus, ciertas infecciones bacterianas y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

parasitarias, y el estrés oxidativo endógeno, capaz de generar formas muy reactivas del oxígeno¹¹.

En situaciones fisiológicas, el organismo es capaz de mantener un equilibrio acorde con las necesidades de cada momento, mediante el cual se regula el estado de diferenciación de cada célula, su tasa de proliferación, su tiempo de supervivencia y su territorialidad. Dado que el cáncer es la consecuencia final del desequilibrio de alguno de estos mecanismos fundamentales de la célula, el estudio de la cinética tumoral debe partir del correcto conocimiento del desarrollo normal.

Ciclo celular

A lo largo de su vida, toda célula pasa por tres estadios: la posibilidad de proliferar continuamente, el mantenimiento sin nuevas divisiones y su muerte final mediante el proceso de la apoptosis.

El mecanismo de proliferación tiene lugar mediante un sistema de etapas acopladas, que se denomina "el ciclo celular". Tras un periodo de reposo, designado como G₀, la célula entra en la etapa G₁, donde se realiza la síntesis de proteínas necesarias para la duplicación del ADN, o fase S, que será el suceso siguiente.

Después de esto, se precisa de un nuevo intervalo de producción de proteínas, que se lleva a cabo en la fase G₂. Finalmente, se produce la división del material genético, en la fase M o mitosis, del que resultaran las nuevas células¹².

Es decir, el ciclo celular es el perfecto acoplamiento de un conjunto de compartimientos fisiológicos de la célula: crecimiento y funciones de diferenciación (G₁), duplicación de un genoma idéntico (S, G₂, M), y realización de procesos especializados y de memoria (G₀) (fig.1)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

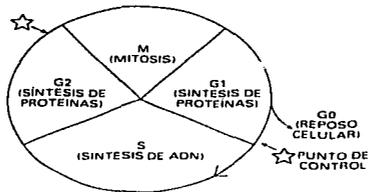


Figura 1. Esquema que representa las fases del ciclo celular. En la fase G₁ la célula se prepara para la síntesis del ADN, en la fase S se lleva a cabo la síntesis del ADN, en la fase G₂ se detecta si se copio bien el ADN, y en la fase M se lleva a cabo la mitosis.

Mecanismos de proliferación neoplásica

Una vez que se conoce cómo se produce el ciclo de la célula normal, es más fácil comprender los mecanismos de proliferación neoplásica. De hecho, todo tumor no es más que la consecuencia final de la alteración de la regulación del ciclo celular en alguno de sus puntos:

- 1.- Puede existir una estimulación excesiva de la proliferación, si existe un aporte anómalo de factores de crecimiento o una alteración de las múltiples señales intracelulares.
- 2.- La alteración de los mecanismos de control, mediada por la proteína de producto del gen del retinoblastoma (Rb) o por la proteína p53, puede favorecer el crecimiento celular desordenado y la posibilidad de una transformación maligna.
- 3.- Cualquier desajuste en la formación o actuación del complejo sistema de ciclinas y cinasas podría tener como resultado la formación de una población celular cuantitativa o cualitativamente anómala¹² (fig. 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

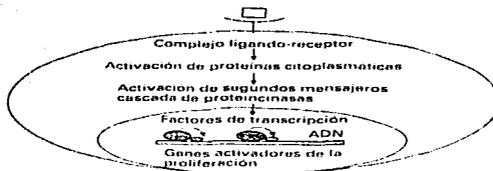


Figura 2. Secuencias de la proliferación celular.

Los tumores malignos son cancerosos, las células cancerosas pueden invadir y dañar tejidos y órganos que estén cerca del tumor. Las células cancerosas pueden también desprenderse de un tumor maligno y entrar en el torrente de la sangre o en el sistema linfático. Así es como el cáncer de cérvix puede diseminarse a otras partes del cuerpo, como a los ganglios linfáticos, al recto, a la vejiga, a los huesos de la columna vertebral o a los pulmones.

Cabe mencionar que los tumores son heterogéneos, es decir, están compuestos por sub-poblaciones celulares con diferentes propiedades biológicas. Una consecuencia de este hecho es su particular tendencia a la metastatización, que depende, no sólo del microambiente, sino de una sub-población especial de células neoplásicas de características agresivas¹².

El término tumor se aplicó para definir la presencia de una masa inflamatoria, siendo uno de los signos cardinales de la inflamación, actualmente tiene como sinónimo "neoplasia", en el sentido de expresar la existencia de una proliferación celular excesiva y anormal de un tejido.

Características de una célula tumoral

Incontrol: significa que no obedece a las leyes que modulan el crecimiento de los tejidos normales. Sin embargo, las neoplasias pueden estar muy organizadas

aunque de una forma totalmente autónoma, sin relación con la homeostasis general del organismo.

Agresividad: bien por su propia presencia como "masa", comprimiendo los tejidos vecinos en el caso de los tumores benignos o destruyendo los tejidos en los que asienta, como ocurre en el caso de los tumores malignos.

Sin final previsible: las neoplasias, en su mayoría, crecen indefinidamente hasta que son destruidas por la radiación o la quimioterapia, son extirpadas quirúrgicamente o producen la muerte del paciente.

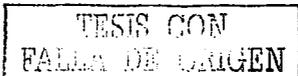
Sin finalidad: aparentemente no tiene ninguna utilidad para el organismo; muy al contrario, se comporta como un "parásito" ya que se nutre a expensas del organismo sin que él aporte nada a su funcionamiento normal.

Irreversibilidad: la regresión espontánea de las neoplasias es la excepción, ya que la inmensa mayoría de ellas tienen un crecimiento progresivo e irreversible¹³.

Dicho de otro modo: en la célula normal está reprimida la información para adquirir resistencia, mientras que en la célula neoplásica el aumento de las mutaciones favorece su expresión. Esta última puede manifestarse con cambios genómicos submicroscópicos o con cambios visibles, como son los cromosomas dobles minúsculos.

Muerte celular programada

En condiciones fisiológicas las células están expuestas a numerosos mutágenos, incluyendo radiaciones, sustancias químicas y virus. Cuando una célula acumula varias mutaciones y comienza a experimentar transformación maligna, se ponen en marcha diversos mecanismos de control, entre los cuales



ocupa un lugar destacado la activación de la muerte celular programada, conocida como apoptosis.

El bloqueo de la apoptosis puede ser causado por la delección del gen que codifica para la proteína p53, tal como ocurre en la gran mayoría de los tumores sólidos, por la expresión aumentada de factores inhibidores de la apoptosis, como la proteína Bcl-2. El oncogén Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2 gene) es considerado como un supresor generalizado de la muerte celular. Muchos tipos de células epiteliales y neuronas tienen la proteína Bcl-2 que se localiza intracelularmente en la membrana mitocondrial, el núcleo y el retículo endoplásmico con actividad antiapoptótica^{14,15}. Cuando esta sobreexpresada disminuye la sensibilidad a fármacos citotóxicos^{16,17}.

Dado que la proteína Bcl-2 parece bloquear principalmente la apoptosis inducida por gama-radiación y drogas quimioterapéuticas, se supone que interrumpe una vía final común para la muerte celular programada, incrementando notablemente la resistencia a daños en el ADN. El oncogén Bcl-2 que es conocido como un miembro de la familia antiapoptótica. Se ha reportado que altos niveles de esta proteína inhiben la apoptosis inducida por cisplatino en células HeLa¹⁸ y altos niveles de esta proteína le confiere sensibilidad a cisplatino en células de cáncer de ovario¹⁹.

En términos generales la apoptosis es un mecanismo que forma parte de la vida de las células y componente de la diferenciación celular y del desarrollo de los organismos multicelulares, funcionando como un mecanismo esencial del mantenimiento del recambio celular en los tejidos de los organismos. Las células mueren por apoptosis en el desarrollo embrionario durante la morfogénesis y en el animal adulto durante el recambio de tejidos o al final de una respuesta inmune.

V. CÁNCER CÉRVICO UTERINO

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la 5ª neoplasia más frecuente en todo el mundo, representando la causa más común de mortalidad en mujeres de países en desarrollo. En México, el CaCU constituye la primer causa de muerte,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

caracterizada por una prevalencia del 22.5% con 41,326 casos y 21,554 muertes de acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias en México²⁰.

Se han identificado varios factores de riesgo en el desarrollo del CaCU. De las infecciones transmitidas sexualmente, el virus del papiloma humano (HPV), es probablemente el factor etiológico más importante del riesgo del carcinoma cervical²¹. El ADN del virus se encuentra integrado en más del 90% de las lesiones invasoras²².

Características y detección del VPH

Una de las características del VPH, es que para replicar se requiere de células que estén en procesos de diferenciación, por lo que su cultivo hasta el momento es limitado. Por lo tanto, su diagnóstico y tipificación se basa en el cultivo colposcópico, cambios citológicos vistos en la prueba del papanicolaou (células coilocíticas)^{3,4}.

Tratamiento al cáncer cervical

La selección del tratamiento para cáncer cervical depende del lugar y tamaño del tumor, de la extensión de la enfermedad, la edad y salud en general de la mujer, y de otros factores. La estadificación (estadios, fases, o etapas de una enfermedad) es un intento cuidadoso de descubrir si el cáncer se ha diseminado y, si es así, cuáles son las partes del cuerpo afectadas.

Existen varios métodos para el tratamiento del cáncer. Con mayor frecuencia, el tratamiento para el cáncer de cérvix incluye la cirugía y la radioterapia. Algunas veces se usa la quimioterapia. Las pacientes son tratadas a menudo por un equipo de especialistas²³.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas. Con más frecuencia, se usa cuando el cáncer del cuello del útero se ha diseminado a otras partes del cuerpo. Puede utilizarse un solo fármaco o una combinación de fármacos.

Los fármacos anticancerosos usados para tratar el cáncer cervical pueden aplicarse por vía intravenosa o pueden administrarse por vía oral. En cualquier caso, la quimioterapia es un tratamiento sistémico, lo cual significa que los fármacos fluyen por el cuerpo en el torrente sanguíneo.

La quimioterapia se administra en ciclos: un período de tratamiento seguido de un período de recuperación, luego otro período de tratamiento y así sucesivamente. La mayoría de los pacientes reciben la quimioterapia como pacientes ambulatorias (en el hospital, en el consultorio del médico o en casa), dependiendo del tipo de fármacos administrados y de la salud general de la mujer; sin embargo, ella podría necesitar permanecer en el hospital durante su tratamiento.

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen principalmente de los fármacos y de las dosis que reciba cada paciente. Además, como con otros tipos de tratamiento, los efectos secundarios varían de persona a persona.

Generalmente, los fármacos contra el cáncer afectan las células que se dividen con rapidez. En estas se incluyen las células de la sangre. Cuando las células de la sangre son afectadas por los fármacos contra el cáncer, las pacientes tienen más probabilidad de contraer infecciones²⁴.

Existen una gran cantidad de fármacos antineoplásicos utilizados en el CaCU dentro de los cuales se encuentran: metotrexato, etoposido, taxol, doxorubicina, cisplatino, derivados del cisplatino entre otros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CISPLATINO

Estructura del cisplatino

El cisplatino, o *cis*-diaminodicloroplatino-II (CDDP), es el prototipo de los análogos del platino. Su potencial antineoplásico fue descubierto por Rosenberg, en 1964, durante un experimento sobre los efectos de los campos eléctricos en la división celular de (*E. Coli*).

El cisplatino es una molécula plana, neutra orientada en posición *cis*, que consta de un átomo de platino unidos, mediante enlaces covalentes, a dos átomos de cloro y a dos grupos amino (fig. 3).

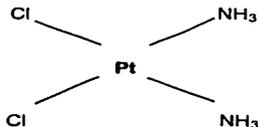


Figura 3. Estructura del cisplatino

La citotoxicidad de la molécula se relaciona con la orientación de los átomos de cloro, de forma que sólo el isómero *cis* tiene actividad citotóxica en bajas cantidades. Los ensayos revelan una marcada toxicidad del isómero *cis* el cual es mucho mayor anticancerígeno que el *trans*.

Mecanismo de acción del cisplatino

El cisplatino como tal es inactivo. Tras atravesar la membrana plasmática, por difusión pasiva, se activa en el medio intracelular al ser sustituidos los iones cloro por iones hidroxilo²⁵ (fig. 4).

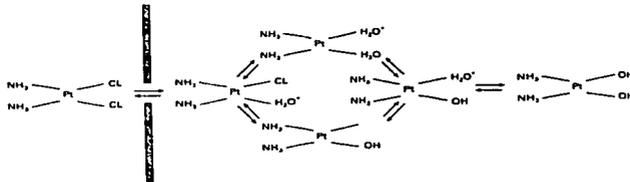


Figura 4. Hidroxilación del cisplatino. El cisplatino atraviesa la membrana plasmática sustituyendo sus iones cloro por iones hidroxilo para posteriormente formar aductos con el ADN.

Puede formar enlaces covalentes con una variedad de macromoléculas incluyendo el ADN. Hay evidencias que implican al ADN como blanco citotóxico del cisplatino. Por ejemplo, en un estudio inicial Rosenberg y colegas demostraron que el cisplatino inhibe la división celular en una bacteria. Esto sugiere que el cisplatino interfiere con la replicación del ADN sin afectar al ARN y la síntesis de proteínas. La citotoxicidad de la molécula acuosa es el resultado de la formación de puentes intracatenarios en el ADN²⁶.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La cantidad de CDDP que se une al ADN depende de su contenido en guanina y citosina (el 60% de los enlaces se localizan en la posición N-7 de la guanina). Otro mecanismo es la formación de enlaces intercatenarios, tales como d(GpG)Pt, d(ApG)Pt y d(GpNpG)Pt^{26,27}. El resultado final es la alteración de la configuración tridimensional del ADN, y la inhibición de la replicación y la transcripción del mismo. El CDDP también se une a diferentes proteínas nucleares y citoplásmicas, pudiendo alterar el transporte transmembrana de aminoácidos esenciales, la función del canal de calcio, la respiración mitocondrial y el transporte de fosfatos. El CDDP es un agente específico de la fase S del ciclo celular^{28,29}.

V. TIPOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

En la resistencia farmacológica existen dos formas: la **resistencia adquirida**, en el cual un fármaco inicialmente es beneficioso pero termina su eficacia a través del tiempo y la **resistencia intrínseca**, en el cual el fármaco es ineficaz desde el principio.

El tipo de resistencia farmacológica más comúnmente estudiada en los últimos años es la resistencia con fenotipo MDR, la cual se puede presentar en una variedad de compuestos que no tienen entre sí analogías estructurales ni funcionales. Este fenómeno suele ocurrir con fármacos naturales (antraciclinas, alcaloides de la vinca, taxol, derivados del podofilo, mitomicina).

Un aspecto común a todo tipo de MDR es la disminución de la acumulación intracelular de los fármacos. Este fenómeno se normaliza cuando se someten estas células a los antagonistas del calcio y de la calmodulina.

Otro aspecto importante de la MDR es la presencia de altos niveles de una proteína llamada p-glicoproteína (PGP) de aproximadamente 170 Kda²⁷. Fueron Juliano y Ling quienes en 1976 demostraron que una línea celular derivada de un cáncer ovárico del hámster chino, que presentaba resistencia, incorporaba

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

colchicina en menor cantidad que sus células progenitoras quimiosensibles, a la vez que contenía una concentración alta de aquella proteína²⁸.

Datos experimentales sugieren que la PGP actúa como un transportador activo dependiente de ATP. La PGP transporta de manera activa una amplia variedad de fármacos citotóxicos fuera de las células tumorales, esto lleva a una disminución en la acumulación del fármaco otorgando protección del efecto citotóxico del tratamiento al tumor.

Una gran mayoría de agentes antineoplásicos aislados de productos naturales, como antraciclinas, epipodofilotoxinas y taxanos son sustratos para la PGP²⁹⁻³². Diversos experimentos han demostrado que la PGP tiene capacidad para fijar fármacos y que esta propiedad desempeña probablemente un papel en la disminución de la incorporación celular de estos fármacos.

PGP funciona removiendo sustratos de la membrana plasmática³³. Se localiza en la mayoría de los tejidos humanos: hígado, intestino delgado y grueso, páncreas, riñón, pulmón, glándulas suprarrenales, células hematopoyéticas, mama, útero, próstata, piel, etc. Generalmente, son células epiteliales implicadas en funciones excretoras o secretoras, células endoteliales de capilares sanguíneos en áreas de barrera sangre-tejido y células trofoblásticas de la placenta. Esta distribución sugiere que esta glucoproteína puede actuar en el transporte de membrana de productos tóxicos y metabolitos fisiológicos.

Con respecto a la resistencia farmacológica se pueden clasificar: 1) neoplasias hematológicas, con nula expresión del gen MDR-1 y muy sensibles a la quimioterapia en el momento del diagnóstico, con posterior expresión del gen y resistencia al tratamiento en las recaídas; 2) tumores que no expresan el gen y son moderadamente sensibles a los citostáticos en el momento del diagnóstico, con un porcentaje del 30-50% de expresión en las recaídas (mama, ovario, sarcoma, carcinoma); y 3) los tumores que expresan el MDR-1 desde el principio y también son refractarios al tratamiento de entrada.

El gen MDR-1 no confiere resistencia para los compuestos de platino (cisplatino y carboplatino), los antimetabolitos (metotrexato, fluoruracilo,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

citarabina), los alquilantes (ciclofosfamida, carmustina) y la bleomicina ya que no son sustratos de la PGP³⁴.

Actualmente se sabe que la PGP utiliza la hidrólisis del ATP como un combustible para la eliminación de fármacos antineoplásicos³⁵⁻³⁷. Posee varios epitopos o puntos de unión para diferentes sustancias, por lo que puede provocar su resistencia de forma simultánea. Este hecho ha estimulado la investigación de sustancias que se unan a la PGP con gran afinidad para que, al bloquearla mediante un mecanismo de inhibición competitiva, impidan la expulsión de los fármacos al espacio extracelular.

La PGP contiene 1280 aminoácidos, con 12 segmentos hidrofóbicos que actúan como regiones transmembrana y dos sitios de unión a moléculas de ATP²⁷ (fig. 5).

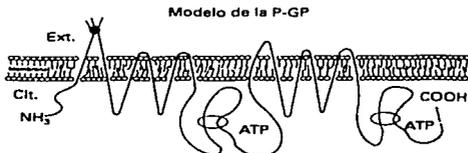


Figura 5. Modelo PGP. Contiene 1280 aminoácidos, con 12 segmentos hidrofóbicos que actúan como regiones transmembrana y dos sitios de unión a moléculas de ATP.

El marcaje simultáneo de la PGP y del contenido de ADN de una población celular demuestra que, aquélla es expresada con mayor intensidad por las células que se encuentran en las fases de síntesis de ADN y de G₂-mitosis respecto a las células localizadas en fase Go/G₁³⁸⁻⁴⁰.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mecanismos de resistencia al cisplatino

La resistencia tiene un significado clínico importante. Cuando las células inician la resistencia a cisplatino las dosis tienen que ser incrementadas, grandes dosis puede producir daños tales como deterioro en el riñón y médula ósea, vómitos, sorderas, etc.

La disminución celular por la acumulación de Platino es un mecanismo aparente de resistencia que es frecuentemente encontrado en cultivos *in vitro*^{41,44-51}.

Los mecanismos de resistencia a cisplatino incluyen disminución en la concentración intracelular de cisplatino, incremento en el mecanismo de reparación del ADN, inactivación por metalotioneina, inactivación por conjugación con el glutatión, reparo en los aductos platino-ADN (fig.6).

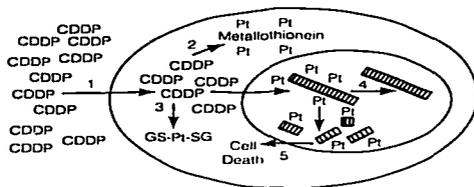


Figura 6. Mecanismos de resistencia al cisplatino, 1) disminución de la acumulación del cisplatino, 2) inactivación por metalotioneína, 3) inactivación por glutatión, 4) aumento en la reparación de los aductos ADN-platino y 5) tolerancia al daño ADN-platino el cual influye en la muerte celular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Disminución en la concentración intracelular si el cisplatino no se acumula en la célula, este no puede llegar al núcleo para encontrar al ADN, unirse al ADN, y causar muerte celular. Por lo que beneficia a la célula con cáncer ya que mantiene al cisplatino fuera de la célula o remueve el cisplatino de la célula. La disminución de la acumulación de cisplatino por células cancerosas parece ser la mejor forma de adquirir resistencia^{52,53}.

Macromoléculas que contienen sulfuros La capacidad de las células resistentes a cisplatino limitan el daño al ADN el cual puede ocurrir por inactivación celular. Las proteínas ricas en sulfhidrilos como la metalotioneina (MT) y el tiol glutation han sido implicados en este proceso. Se cree que la MT esta involucrada con la detoxificación de iones metálicos pesados en la célula.

El efecto de los niveles de MT sobre la sensibilidad de cisplatino han sido examinados por la sobreexpresión de MT en células transfectadas de ratones C127. El resultado sobre la resistencia fue poco observable en comparación a las células control.

La inactivación de cisplatino y de otros fármacos que contienen platino puede también ocurrir a través de la conjugación con glutation (GSH). GSH es el tiol celular más abundante y puede estar presente en concentraciones intracelulares de 10 mM. El producto de reacción de la GSH con el cisplatino es el complejo GS-Pt⁵⁴. Esta reacción ocurre a una velocidad relativamente baja *in vitro*. Además se ha visto que esta reacción ocurre en cultivos celulares tratados con cisplatino y tetraplatino⁵⁴⁻⁵⁶. GSH también puede disminuir la formación de monoadductos platino-ADN *in vitro*⁵⁷. En presencia de cisplatino, GSH forma complejos 2:1 (GSH:platino) que es entonces eliminado de la célula. Como con MT los niveles de GSH son incrementados en algunas células pero no en todas las células resistentes a cisplatino, por lo que sugiere que hay otros mecanismos de resistencia celular.

Reparación del ADN otra forma en que las células pueden iniciar la resistencia a cisplatino es que tienen la capacidad para remover los aductos cisplatino-ADN y

reparar así las lesiones inducidas por el cisplatino al ADN. El aumento en la reparación de los aductos platino-ADN ha demostrado estar asociado con la resistencia a cisplatino en cáncer de ovario⁵⁸⁻⁶¹ y en líneas de leucemia de ratón⁶².

VII. MIFEPRISTONA

Estructura de la mifepristona

La MF fue sintetizada en 1980. Tiene una estructura similar a progesterona y derivados de la progesterona. La diferencia radica en la posición 11 β del anillo, tal sustitución resulta tener una alta afinidad a los receptores de progesterona y cortisol⁶³. Los antiprogéstágenos como tales bloquean la acción de la progesterona a nivel celular a través de la unión del receptor de progesterona.

Estructuralmente lo importante de esta molécula es la sustitución de un grupo dimetilfenilamino en la posición 11 β del anillo esterooidal, pero el radical localizado en el C17 es donde radica su importancia. En el C17 disminuye la unión a los receptores de progesterona, y la actividad antigluco corticoide. La epimerización en el C13 disminuye su actividad como antiprogéstágeno⁶⁴ (fig. 7).

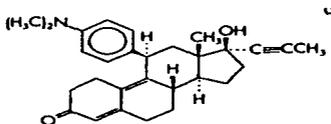


Figura 7. Estructura de la Mifepristona

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mecanismo de acción

La MF su une a receptores de hormonas antagonistas, a nivel molecular lo más importante es su afinidad de unión a los receptores de progesterona y la interacción del grupo dimetilfenilamino en la posición 11 β con una región específica de la unión del receptor⁶⁵.

MF y su utilización en el cáncer

La MF es un antiprogestágeno que ha mostrado tener actividad como agente antineoplásico a través de la inhibición de la PGP. También tiene actividad antiproliferativa en tumores de pulmón y en cáncer de ovario⁷. En células de carcinoma epitelial ovárico expuestas a MF se ha observado un efecto antiproliferativo provocando un arresto de las mismas en las fases G₀/G₁ del ciclo celular reduciendo el número de células en la fase S.

La utilización de MF en la quimioterapia del cáncer de ovario, pulmón etc, es reciente. Obteniéndose efectos antiproliferativos a dichos tumores. Además, también se ha utilizado como un abortivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para modular o contrarrestar efectivamente la resistencia a fármacos desarrollada en la quimioterapia del CaCU, debemos ser capaces de identificar y conocer los mecanismos de resistencia involucrados que operan en un tumor. Los ensayos *in vitro* nos permiten investigar de manera accesible y sencilla los mecanismos participantes en este problema y nos dan la oportunidad de diseñar una estrategia terapéutica adecuada para suprimirlos.

El cisplatino y sus derivados representan uno de los fármacos más importantes y más utilizados en el tratamiento del cáncer incluyendo el CaCU. Sin embargo, el tratamiento clínico del cisplatino muchas veces está restringido por los serios efectos colaterales como la nefrotoxicidad y neurotoxicidad. Frecuentemente, la quimioterapia se basa en la administración de un solo fármaco o en combinación con otros fármacos. Varios estudios han dirigido la búsqueda de fármacos capaces de potenciar el efecto antiproliferativo del cisplatino sin incrementar sus efectos colaterales. Actualmente se están realizando estudios de la combinación de agentes antineoplásicos con agentes no antineoplásicos con la finalidad de incrementar el efecto terapéutico pero no sus efectos secundarios.

Por otro lado, se han descrito varios fenómenos de resistencia al cisplatino, que hacen que la célula tumoral permanezca menos expuesta al fármaco. Con la finalidad de obtener un mayor efecto citotóxico del cisplatino, se propone la combinación de dicho fármaco antineoplásico con un fármaco no antineoplásico como mifepristona (ya que MF actúa inhibiendo la actividad de la PGP como también un aumento del efecto citotóxico de doxorubicina y taxol), con el objetivo de lograr un efecto de sinergismo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- 1.- Evaluar el efecto de mifepristona sobre la actividad de cisplatino en una línea celular de cáncer cervico uterino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar el efecto de mifepristona sobre la citotoxicidad del agente antineoplásico, cisplatino, en células Hela.
- 2.- Determinar el efecto de mifepristona sobre la concentración intracelular de cisplatino en células Hela.
- 3.- Determinar la participación de una proteína antiapoptótica (Bcl-2) en la modulación del efecto del cisplatino por mifepristona en células Hela.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. HIPOTESIS

Se ha reportado que MF actúa inhibiendo la actividad de la PGP, produciendo un aumento del efecto citotóxico de ciertos fármacos como doxorubicina, taxol, adriamicina. Sin embargo, es posible que MF pueda incrementar la actividad antiproliferativa de agentes antineoplásicos a través de vías apoptóticas. Por lo tanto, al aplicar un fármaco que no es sustrato de PGP como el cisplatino, se incrementara el efecto citotóxico del mismo en una línea celular de CaCU.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XI. MATERIAL.

- Placas de cultivo de 96 pozos.
- Cajas de cultivo de 75 cm².
- Pipetor. Drummon.
- Pipetas graduadas (2, 5 y 10 mL).
- Vasos de precipitado (10, 50, 100 y 500 mL).
- Probetas (50, 100 y 500 mL).
- Hematocitómetro. Sigma.
- Cajas petri.
- Pipeta multicanal.
- Pipetas graduadas (5 y 10 mL). Gilson.
- Pipetas automáticas (5, 10, 200, 500 µL).

EQUIPO

- Lector de ELISA. Labsystems Multiskan MS.
- HPLC. Waters.
- Campana de flujo laminar.
- Bomba de vacío. Gast mod. DOA-P104-AA.
- Microscopio.
- Centrifuga. Beckman.
- Refrigerador (-20° C). Revco mod. REF 1617A14.
- Incubador.
- Balanza analítica. Scientech SA- 210.
- Cámara de transferencia.
- Cámara de electroforesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REACTIVO.

- Medio RPMI 1640. Gipco lot. 1143815.
- PBS (bufer de fosfatos salinos). Sigma lot 20K8205
- 2-mercaptoetanol. Merck.
- EDTA.
- Mifepristona. Sigma.
- Cisplatino .Sigma lot 59H3657.
- Etanol.
- Kit de XTT. Roche.
- Cristal violeta.
- Ácido acetico al 33%.
- Acrilamida.
- PSA (persulfato de amonio).
- TEMED grado molecular. Gibco BRL lot 98P6566.
- TBS (tris buffer salino).
- Albumina.
- Buffer de lisis y de corrida.
- Proteinasa K.
- Ácido bicinconilico. Sigma.
- Derivatizante DDTC (Dietil-ditrocarbamato).
- Buffers pH 6 y 8.
- Buffer de transferencia.
- Fijador.
- Revelador.
- SDS. Quality Biological.
- Reactivos de quimioluminiscencia. Biosciences.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XII. METODOLOGIA

Fármacos. Mifepristona fue preparada con metanol (solución Stock 1×10^{-3} M). El cisplatino fue disuelto en agua destilada (solución Stock 1 mg/mL), ambas soluciones se almacenaron a -70°C hasta ser utilizados.

Línea celular. La línea celular utilizada fue HeLa (línea celular epitelial de carcinoma de cervix), fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC) se cultivó de manera rutinaria en medio RPMI con suero fetal bovino al 10% incubadas a 37°C y 5% de CO_2 .

Evaluación de la inhibición del crecimiento celular.

Protocolo de la combinación de MF y cisplatino. Las células en confluencia se despegaron y se contaron con la ayuda de un hemocitómetro. Se sembraron 1500 células/pozo en placas de 96 pozos. A las 24 hrs se retiró el medio y se adicionó medio fresco conteniendo mifepristona (1×10^{-5} M), a las células control se les adicionó medio fresco conteniendo el vehículo (etanol). Después de 72 hrs. las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino (0-330 μM) durante 4 hrs. Posteriormente se retiró el medio y se agregó medio fresco dejándolas en incubación durante 48 hrs.

Ensayos de inhibición de crecimiento o viabilidad celular.

Ensayo XTT. Este ensayo se basa en la ruptura de una sal de tetrazolio (XTT) para convertirse en formazán, un colorante naranja, formado por las células metabólicamente activas.

El formazán es soluble en soluciones acuosas, su aumento muestra una relación directamente proporcional al aumento de las deshidrogenasas

mitocondriales en la muestra y por lo tanto al aumento de las células viables. Puede cuantificarse espectrofotométricamente ya que muestra un máximo de absorbancia entre 450 y 500 nm.

Después del periodo de incubación, se añadió al medio RPMI el reactivo XTT a una concentración final de 0.3 mg/mL y se incubó por 4 horas a 37°C y 5% CO₂. La absorbancia de la muestra fue leída en un lector de ELISA a 492 nm. A partir de las curvas de inhibición de crecimiento se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) que es la concentración necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de la población celular.

Determinación del efecto de sinergismo.

Para verificar si el efecto de la combinación de MF y cisplatino resulta una interacción sinérgica o aditiva se determinó el índice de combinación (IC) por el método isoblograma⁶⁶ descrita anteriormente aplicando la siguiente ecuación: $IC = Ac/Ae + Bc/Be$. Donde Ac y Bc representan las dosis de los fármacos utilizados en combinación, Ae y Be son las dosis de los fármacos usadas individualmente. Si el IC resulta ser menor a 1 indica un efecto de sinergismo, si es igual a 1 indica un efecto de adición y si es mayor a 1 indica un efecto de antagonismo.

Determinación intracelular de cisplatino

Se utilizaron células HeLa en proliferación las cuales fueron sembradas en cajas de 75 cm² e incubadas a 37°C y 5% CO₂ a las 24 hrs se retiró el medio y se adicionó medio fresco conteniendo MF (1x10⁻⁵M) por 72 hrs. Una segunda caja se utilizó como control y se le adicionó el vehículo (etanol). Transcurrido el tiempo las células fueron expuestas a una concentración de cisplatino 330 µM por 4 hrs. Posteriormente se procedió a realizar la extracción del cisplatino a partir de las células tratadas utilizando la siguiente metodología: las células se lavaron con PBS y se desprendieron con PBS-EDTA, se centrifugaron

obteniéndose un pellet de células, al cual se les adicionó 500 μ L de buffer de lisis y 10 μ L de proteinasa K. El pellet se dejo en incubación a 55° C y 500 rpm. por 24 hrs. La determinación intracelular de cisplatino fue realizada mediante HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) utilizando la siguiente metodología: una vez lisadas las células, se les adicionó una solución derivatizante dietilditiocarbamato (DDTC) al 10% con NaOH, esto con la finalidad de incrementar la detección de aductos. Los aductos formados fueron extraídos con cloroformo y el cisplatino fue cuantificado por HPLC utilizando una curva estándar.

Identificación de la proteína bcl-2 por western-blot.

Despues del protocolo de combinación de cisplatino y MF descrito anteriormente, las células fueron sometidas a una extracción de proteínas totales.

Extracción de proteínas.

Las células expuestas al protocolo de combinación descrito anteriormente se centrifugaron y al pellet obtenido se le adicionó 200 μ L de buffer de lisis y 2 μ L de inhibidores de proteasas. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante (proteínas) se transfirió a un tubo limpio y se guardaron a -70°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas (método ácido bicinconínico).

Se realizó una curva estándar con una solución de albúmina a varias concentraciones (0-15 μ g/mL), utilizando como control la solución de lisis. Posteriormente se preparó una solución de sulfato de cobre (200 μ L) y 10 mL de ácido bicinconínico. Esta solución fue adicionada a la curva estándar de albúmina y a las proteínas que se cuantificaron. La solución se dejó por 2 hrs y se procedió a leerlas en un lector de Elisa a 540 nm.

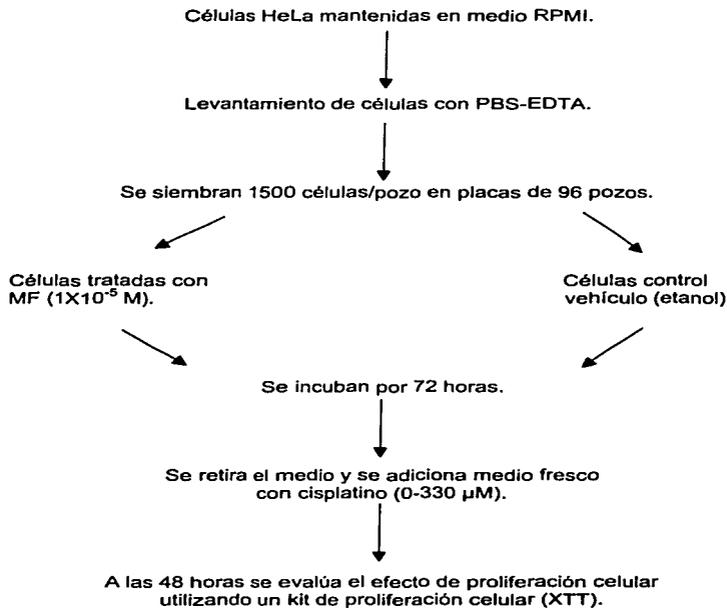
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Realización del western-blot.

100 µg de proteínas de cada una de las células tratadas fueron separadas en gel de acrilamida al 15% y transferidas a una membrana PVDF (la cual fue previamente permeabilizada en metanol) en una cámara de transferencia por 30 minutos. La membrana fue bloqueada en una solución con TBS 1X (0.1 Trizma base, 0.15M de NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) e incubada toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal bcl-2 (1:300) posteriormente fue lavada con TBS y se adicionó el anticuerpo secundario monoclonal anti ratón (1:600) por 2 hrs. Posteriormente fueron lavadas con TBS. La proteína se identificó por quimioluminiscencia. La proteína bcl-2 tiene un peso molecular de 28 Kda. En todos los ensayos se utilizó un marcador de peso con rango de 14-220 Kda.

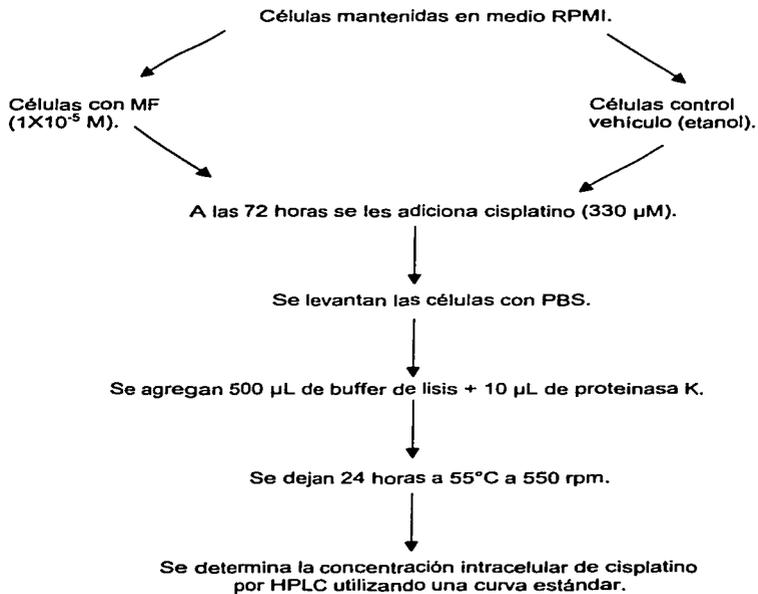
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ENSAYOS DE TOXICIDAD



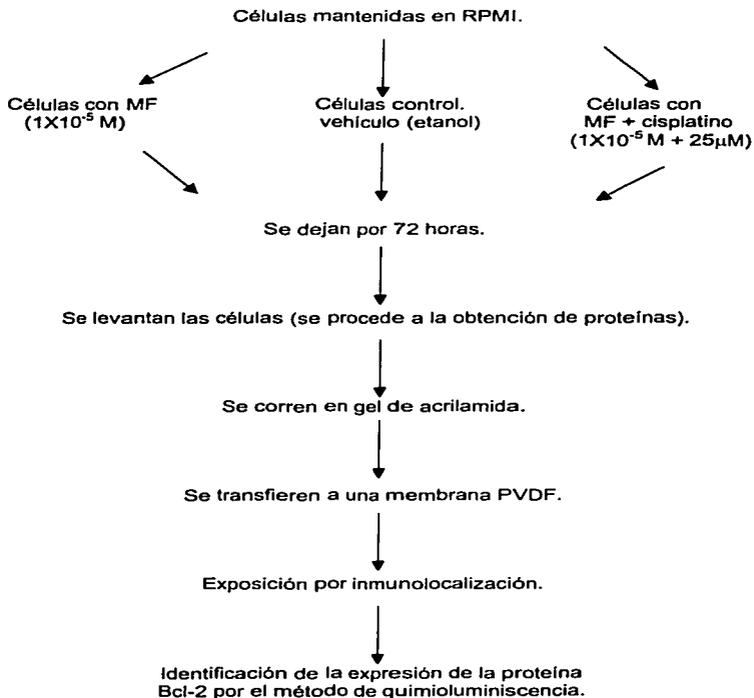
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CISPLATINO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXPRESIÓN DE LA PROTEINA Bcl-2.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XIII. RESULTADOS

Efecto de MF sobre la citotoxicidad celular en célula HeLa expuestas a cisplatino.

La citotoxicidad se expresa como el porcentaje de inhibición de la viabilidad de las células HeLa tratadas con cisplatino (0-330 μ M), o cisplatino en combinación con el pretratamiento con MF. Nuestros resultados demostraron que MF potencia el efecto citotóxico del cisplatino. Cuando determinamos el efecto de MF solo, observamos un 37% en la inhibición de la viabilidad celular. A partir de las curvas individuales del porcentaje de inhibición de la viabilidad se obtuvieron la CI_{50} las cuales fueron de 34.2 y 14.2 para cisplatino y cisplatino con el pretratamiento con MF respectivamente. Observando una potencia relativa de aproximadamente de 2.5 veces en la combinación de los fármacos con respecto a la aplicación de cisplatino solo.

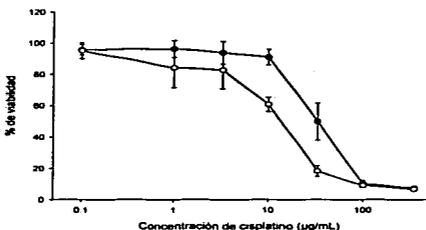


Figura 8. Curvas de viabilidad de la aplicación de cisplatino solo (*) o en combinación con el pretratamiento de MF (1×10^{-5} M) durante 3 días (o). Cada punto representa el promedio de triplicados en al menos tres experimentos independientes \pm e.e.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto de la combinación de MF con cisplatino en células HeLa.

Para verificar si la combinación de MF con cisplatino presenta una interacción sinérgica o aditiva, se determinó el índice de combinación (IC) utilizando la ecuación descrita en metodología. El IC obtenido demostró una actividad sinérgica de MF sobre la actividad del cisplatino a las dosis de 10, 33 y 100 μM . Los datos se resumen en la tabla 1.

Cisplatino μM Ac	Mifepristona μM Bc	EFEECTO %	Cisplatino μM Ae	Mifepristona μM Be	Índice de combinación IC
0.0	10	94.21	2.58	1.56	6.4
0.1	10	95.17	2.58	1.17	8.5
1.0	10	84.23	7.73	8.59	1.29
3.3	10	82.96	10.31	9.77	1.3
10	10	60.76	24.49	31.25	0.72S
33	10	18.31	87.66	100	0.46S
100	10	9.19	137.93	100	0.81S
330	10	6.91	166.29	100	2

Determinación del índice de combinación (IC) por el método isoblograma empleando la siguiente ecuación: $IC = A_c/A_e + B_c/B_e$. Donde A_c y B_c representan las dosis de los fármacos utilizados en combinación, A_e y B_e son las dosis de los fármacos utilizados individualmente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Determinación de la concentración intracelular de cisplatino .

Al determinar la concentración intracelular de cisplatino se observa que hay un aumento en la concentración total del mismo en células HeLa cuando se aplica el pretratamiento con MF (1×10^{-5} M) comparada con el tratamiento de cisplatino solo.

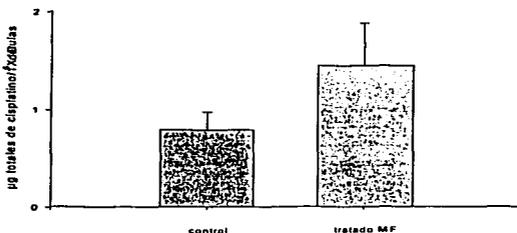


Figura 9. Células HeLa cultivadas por 72 hrs en ausencia (control) y presencia de MF (1×10^{-5} M), ambas tratadas con cisplatino ($33 \mu\text{M}$) por 4 hrs. La determinación de la concentración intracelular de cisplatino fue realizado por HPLC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para determinar la concentración intracelular de cisplatino se utilizó un equipo de HPLC. En la figura 10 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos de una muestra control de células HeLa tratadas bajo las mismas condiciones a) sin cisplatino, b) representa una muestra a la cual se le adicionó una cantidad conocida de cisplatino obteniéndose un tiempo de retención de 5.85 minutos y c) representa una muestra de cisplatino que fue previamente tratado con MF

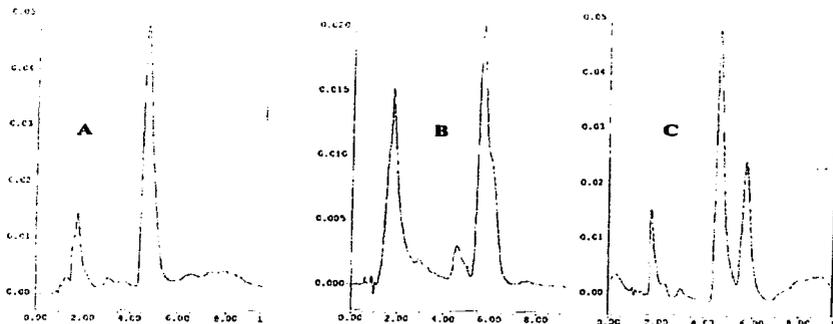


Figura 10. Cromatogramas típicos de a) células HeLa control (sin cisplatino), b) estándar de cisplatino y c) células HeLa tratadas con cisplatino con el pretratamiento con MF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2

La proteína antiapoptótica bcl-2 fue evaluada cuando a las células se les adicionó MF, cisplatino y MF con cisplatino y células que no recibieron ningún tratamiento (control). Los resultados muestran que la células que no recibieron ningún tratamiento la proteína Bcl-2 se encuentra presente, a las células que se les adicionó MF la cantidad de proteína se mantiene constante, cuando se les adicionó cisplatino la cantidad de proteína disminuye y cuando se les da un pretratamiento con MF y la adición de cisplatino la proteína no se encuentra presente, sin embargo todas las células expresan β -actina (fig. 11).

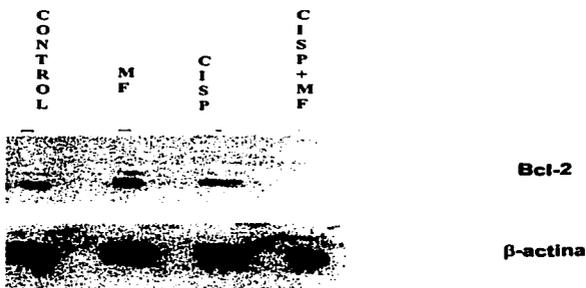


Fig. 11. Análisis de un Western-blot con Bcl-2 y β -actina en células HeLa control, con MF, cisplatino y cisplatino con el pretratamiento con MF.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XIV. Discusión de resultados

En este estudio se muestran los resultados de la interacción farmacológica entre el antiprogestágeno mifepristona y el antineoplásico cisplatino en células HeLa.

El cisplatino y sus derivados representan uno de los fármacos más importantes en el tratamiento al cáncer, es ampliamente utilizado para potenciar el efecto citotóxico en una amplia variedad de tumores incluyendo el testicular, el de ovario y el carcinoma cervical⁸. Sin embargo, los tratamientos clínicos del cisplatino son restringidos por sus serios efectos secundarios; probablemente es el antineoplásico más nefrotóxico y neurotóxico. Esto ha motivado a la identificación o búsqueda de nuevos agentes para ser utilizados en combinación con cisplatino con el propósito de incrementar la actividad antitumoral y disminuir los eventos secundarios.

Las pruebas *in vitro* a nivel de laboratorio para evaluar la quimiosensibilidad de antineoplásicos, son quizás las más utilizadas para llevar a cabo ensayos de combinación de fármacos. En este trabajo, por ensayos *in vitro*, se demuestra que el antiprogestágeno mifepristona en combinación con cisplatino es capaz de incrementar el efecto antiproliferativo de este último en una línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa).

De acuerdo con los reportes de Rocereto y colaboradores⁷ realizados en células de cáncer de ovario, mifepristona incrementa el efecto citotóxico de taxol y tamoxifen provocando un arresto de las células en las fases G₀/G₁ del ciclo celular reduciendo el número de células en la fase S⁹. Dicho efecto es debido a la participación de la proteína PGP, la cual funciona como una bomba excretora de fármacos en células tumorales⁵.

En la presente tesis se decidió utilizar el antineoplásico cisplatino debido a que no es un sustrato de la proteína PGP.

Aunque no se conoce bien el mecanismo del cisplatino se cree que actúa con una gran cantidad de macromoléculas incluyendo al ADN como blanco citotóxico²⁶. Esto sugiere que el cisplatino interfiere en la replicación del ADN sin afectar al ARN y la síntesis de proteínas. El cisplatino es un agente específico de la fase S del ciclo celular^{28,29} por lo que, este al unirse al ADN forma aductos alterando la conformación del mismo y así la inhibición de la replicación celular^{26,27}. Sin embargo para que se lleve a cabo dichos procesos es necesario que se alcancen concentraciones adecuadas de cisplatino a nivel intracelular. Se ha descrito que la disminución de la acumulación intracelular de cisplatino es el fenómeno más frecuentemente observado que explica tanto la falta de respuesta como la resistencia al cisplatino^{52,53}. Así que, como segundo objetivo determinamos la concentración intracelular del cisplatino en células pretratadas con mifepristona; los resultados nos muestran que hay un incremento del cisplatino intracelular de aproximadamente 2.1 veces con respecto a las células control (únicamente tratadas con cisplatino)

Para la determinación de la concentración de cisplatino se utiliza un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) validado previamente. En los cromatogramas obtenidos podemos observar el tiempo de retención de 5.8 minutos para el cisplatino, no observándose ningún pico que interfiera con este tiempo de retención en el cromatograma control (sin cisplatino). Por lo tanto, podemos decir que el método para determinar cisplatino en células tumorales es específico.

El aumento del cisplatino intracelular en las células previamente tratadas con mifepristona probablemente es el responsable de la sensibilización al efecto antiproliferativo del cisplatino. Proponemos entonces que mifepristona puede estar controlando un aumento en la entrada de cisplatino a las células tumorales o bien disminuyendo la salida del mismo; además es probable que mifepristona también disminuya la inactivación metabólica del cisplatino o bien aumente la actividad de vías apoptóticas.

Existen reportes que indican que uno de los mecanismos moleculares por el cual la mayoría de los fármacos antineoplásicos actúan es induciendo

distintas vías apoptóticas en las células tumorales tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*. Algunas de estas vías involucradas directa o indirectamente en el proceso apoptótico son: p53, Bax, Bcl-2 y caspasas⁶⁷⁻⁷⁰.

Recientemente se ha descrito que uno de los mecanismos por el cual el cisplatino ejerce su efecto citotóxico es involucrando la vía apoptótica de Bcl-2. La proteína Bcl-2 es una proteína antiapoptótica localizada en la mitocondria de la célula, la cual ejerce en la célula tumoral un efecto protector a la apoptosis.

Se ha demostrado que el cisplatino inhibe la expresión de la proteína Bcl-2 en células HeLa, induciendo a la célula tumoral a la apoptosis^{17,18}. En este trabajo nos dimos a la tarea de investigar la respuesta de la combinación de los fármacos utilizados (mifepristona y cisplatino) sobre la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los resultados obtenidos nos demuestran que cuando aplicamos únicamente mifepristona, la expresión de la proteína no cambia; cuando aplicamos cisplatino observamos una ligera disminución de la expresión de la proteína, datos que concuerdan con los reportes ya publicados¹⁹. Sin embargo cuando aplicamos la combinación de mifepristona y cisplatino, observamos que la expresión de la proteína Bcl-2 disminuye a tal grado que no se observó la banda correspondiente. Por lo tanto, esto nos lleva a proponer que el efecto antiproliferativo sinérgico observado por la combinación de mifepristona y cisplatino puede ser debido al aumento en la disminución de la expresión de la proteína Bcl-2.

Finalmente podemos mencionar que con el trabajo experimental realizado en esta tesis demostramos que la combinación de mifepristona y cisplatino producen un efecto antiproliferativo sinérgico y que dicho efecto puede estar mediado al menos parcialmente por un aumento en la concentración intracelular de cisplatino; así como por el aumento en la disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Estos datos sugieren que mifepristona puede ser un excelente candidato para ser probado en combinación, no solo con cisplatino, sino además con otros fármacos antineoplásicos.

XV. Conclusiones

1.- En células HeLa se observa un efecto antiproliferativo sinérgico con la combinación de mifepristona (10 μM) y cisplatino a las dosis de 10, 33 y 100 μM .

2.- El pretratamiento de mifepristona en células HeLa produce un aumento de la concentración intracelular de cisplatino.

3.- La combinación de cisplatino y mifepristona revela una disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, mayor que la disminución en la expresión de la proteína observada con la aplicación de los fármacos de manera individual.

XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Parkin DM, Laora E, and Muir CS, Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancer in 1980. *Int J Cancer*, 1988; 41:184-197.
- 2.- Brinton LA and Hoover RN, *Epidemiology of gynecologic cancer in Practice of Gynecologic oncologic*. Philadelphia 1992, pp 3-26.
- 3.- Bosh X, Muñoz N, De Sanjosé S, et al. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer*, 1992; 52:750-758.
- 4.- Walboors J, Jacobs M, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer. *J. Pathol*, 1999;189:12-19.
- 5.- German UA, Postan I, Gottesman MM:P-glycoproteins: mediators of multidrug resistance. *Cell Biology* 1993;4:63-76.
- 6.- Cynthia L. Williams and George M. Staneel. *Estrogens and progestins*. USA 1996. pp 1430.
- 7.- Rose FV, Barnea ER. *Oncogene* 1996;12:999-1003.
- 8.- M. Arroyo, J. de Castro, J. de Feliu. *Fármacos antitumorales: cisplatino y sus derivados*. *Oncología clínica*. 2ª edición, editorial interamericana. España 1998. pp 397,398.
- 9.- Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cisplatin metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cell. *J. Biol Chem* 1993;268:20116.
- 10.- M. Gonzáles Barón, J. de Castro. *Concepto de oncología medica*. *Oncología Clínica*. 2ª edición, editorial interamericana. España 1998. pp 8,9.

- 11.- A. Berrocal, e. Noguérón, C. Camps. Principios de la carcinogénesis. Oncología Clínica. Interamericana. España 1998. pp 11.
- 12.- J. de Castro, M. González Barón. Cinética de la celula tumoral. Oncología Clínica. 2ª edición, editorial interamericana. España 1998. pp 21,22.
- 13.- J. Larrauri. Anatomía Patológica. Oncología clínica. 2ª edición, editorial interamericana. España 1998. pp 201.
- 14.- Zamzami N, Brenner C, Marzo I, et al. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl2-like oncoproteins. Oncogene 1998;16:2265.
- 15.- Murphy KM, Ranganathan V, et al. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug induced apoptosis of human tumor cells. Cell death differ 2000;7:102.
- 16.- Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. Drugs 2000;59:1.
- 17.- Mayo MW, Wang CY, et al. Modulates apoptosis by transcriptionally protooncogene. EMBO 1999;18:3990.
- 18.- Reed JC. Bcl-2 family proteins: Role in dysregulation of apoptosis and chemoresistance in cancer, in apoptosis and cancer. 1997, 64-69 pp.
- 19.- Beale PJ, Rogers P, Boxall F, et al. Bcl-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. Br J Cancer 2000;82:436-440.
- 20.- JGH Editores. Compendio del registro histopatológico de neoplasias en México. México; 1999:13-17.

- 21.- Boshart M, Zur Hausen H. Human papillomavirus: physical state of DNA and identification tandem duplication. *J virol*:1986 jun;58(3):963-966.
- 22.- Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Viurs res.* 2002 nov; 89(2):213-228.
- 23.- L. García-Sancho Martín, L García-Sancho Téllez. Principios de cirugía oncológica. *Oncología clínica. 2ª edición, editorial interamericana. España 1998. pp 305.*
- 24.- E. Espinosa, P. Zamora, A. Ordóñez. Principios de quimioterapia. *Oncología clínica. 2ª edición, editorial interamericana. España 1998. pp 445.*
- 25.- Plooy ACM et al. The quantitative detection of various Pt-DNA-adducts in chinese hamster ovary cells treated with cisplatin: application of immunochemical techniques. *Carcinogenesis* 1985;6:561.
- 26.- Fichtinger-Schepman MJ, et al. Adducts of antitumor drug cisplatin with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry.* 1985;24:707.
- 27.- A. Ordóñez, J. de Castro, B. de las Heras. Mecanismos de resistencia al tratamiento antineoplásico. *Oncología clínica. 2ª edición, editorial interamericana. España 1998. pp565-569.*
- 28.- Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life* 2000; 57:1229.
- 29.- Donaldson KI, Goolsby GI, et al. Cytotoxicity of the anticancer agents cisplatin and taxol during cell proliferation and the cell cycle. *Int J Cancer* 1994;57:847.

- 30.- Preis P. *Oncogene*. 1987 jan 23;99(2):37-49.
- 31.- Yu DK. The contributions of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. 1999;39(12):1203-1211.
- 32.- Zubercava O. And Babusikava O. The multidrug resistance in human leukemias, Cancer Research Institute, pp 53-59.
- 33.- Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase. *Trends Biochem* 1992;17:18-21.
- 34.- Yusuke Tanigawara. Role of P-glycoprotein in drug disposition, Department of Hospital Pharmacy. Tokio, Japan 1999.
- 35.- Cole SP, Bhardwaj G, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistance protein. *Am J Pathol* 1996;148:1237-1247.
- 36.- Gottesman MM, Passtian I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
- 37.- Bellamy wt. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:161-183.
- 38.- Lucena MA, Pelegrina A, Revelles F et al. Influencia de la adriamicina sobre la expresión de la glicoproteína P-170 en línea celular MCF-7. Efecto sobre la diferenciación, la proliferación y la adaptación celular. Portugal 1993.

- 39.- O`Valle F, Lopez Hidalgo JL, et al. Modifications in P-glycoprotein expression during the cell cycle in tumor cell lines with nonamplified multidrug resistance phenotype. *Cell Proliferation* 1995.
- 40.- Ramachandran C, Mead D, Wellham L. Cell cycle and expression of drug resistance MDR-1, GST pi and topoisomerase II genes. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1993;34:312.
- 41.- Hromas RA, North JA, Burns CP. Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 1987; 36:197.
- 42.- Pierre A, Leonce S, Pérez V, Atasi G. Circumvention of P-glicoprotein-mediated multidrug resistance: kinetics of uptake and efflux sensitive and resistant cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42:454-460.
- 43.- Soues S, Lavalf, Charcosset. Mechanism of resistance to combinations of vincristine, etoposido and doxorubicin in chinese hamster ovary cell.
- 44.- Waud WR. Differential uptake of cisplatin by sensitive and resistant murine L1210 leukemia cells. *Cancer Res* 1987;47:6549.
- 45.- Richon Vm, Schulte N, Eastman A. Multiple mechanisms of resistance to cisplatin. *Cancer Res* 1987;47:2056.
- 46.- Teicher BA, Holden SA, Kelley MJ, et al. Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cisplatin. *Cancer Res* 1987;47:388.
- 47.- Andrews PA, Velury S, Mann Sc, Howell SB. Cisplatin accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1988;48:68.

- 48.- Kraker AJ, Moore CW. Accumulation of cisplatin and platinum analogues by platinum-resistant murine leukemia cells in vitro. *Cancer Res* 1988;48:9.
- 49.- Kuppen PJK, Schuitemaker H, et al. Cisplatin resistant sublines derived from two human ovarian tumor cell lines. *Cancer Res* 1988;48:3355.
- 50.- Kelland LR, Mistry P, et al. Mechanism-related circumvention of acquired cisplatin resistance using two pairs of human ovarian carcinoma
- 51.- Jonhson SW, Perz RP, et al. Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 1994;47:689.
- 52.- Pill P., Lippard, S.J. in *Encyclopedia of cancer*, J.R. Bertino, Ed. Academic Pres: San Diego, CA, 1997, vol.1. pp.392-410.
- 53.- Chu, G. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269, pp. 787-790.
- 54.- Dedon PC, Borch RF. Characterization of the reactions of platinum antitumor agents with biologic and nonbiologic sulfur-containing nucleophiles. *Biochem Pharmacol* 1987;36:1955.
- 55.- Mistry P, Loh SY, Kelland LR, Harrap KR. Effect of buthionine sulfoximine on Pt II and PtIV drug accumulation and the formation of glutathione conjugates in human ovarian-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1993;55-848.
- 56.- Eastman A. Cross-linking of glutathione to DNA cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interac* 1987;61:241.
- 57.- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochemic* 1983;52:711.

- 58.- Masuda H, Ozols RF, Lai G-M, et al. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1988;48:5713.
- 59.- Lai G-M, Hamilton TC. Enhanced DNA repair and resistance to cisplatin in human ovarian cell. *Biochem Pharmacol* 1988;37:4597.
- 60.- Masuda H, Tanaka T, Madsuda H, et al. Increased removal of DNA-bound platinum in human ovarian cancer cell line resistant to cisplatin. *Cancer Res* 1990;50:1853.
- 61.- Parker RJ, Eastman A, et al. Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *J Clin Invest* 1991;87:772.
- 62.- Eastman A, Cross-linking of glutathione to DNA cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interact* 1987;61:241.
- 63.- Garcia, T., B. Benhamou, D. Golfo, et al. 1992. Switching agonistic, antagonistic, and mixed transcriptional responses to 11 β -substituted progestins by mutation of the progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 6:2071-2078.
- 64.- Ann N Y. RU 486 (mifepristone). A short overview of its mechanisms of action and clinical uses. 1997 sep. 26;828:47:58.
- 65.- Fardel O, Courtois A, Drenou B, Lamy T. Inhibitions of P-glicoprotein activity in human leukemic cell by mifepristone. *Anticancer drugs.* 1996;7(6):671-677.

- 66.- Chou TC, Motzer RJ, Youzhi Tong, Bosl GJ. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1517.
- 67.- Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281:1322.
- 68.- Li P, Nijhawan D, Budihardjo L. Cytochrome c and dATP-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91:479.
- 69.- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N. Caspase 9, Bcl-XL interacts with apaf-1 and inhibitions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:4386.
- 70.- Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell.* 1998;94:695.