



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Agentes anti-hormonales como una posible estrategia para quimio radio terapia basada en cisplatino para cáncer cérvico uterino, un estudio *in vitro* e *in vivo*.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. Mariana Segovia Mendoza

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Patricia García López

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SEGOVIA MENDOZA MARIANA** con número de cuenta **510007939** con la tesis titulada: **"AGENTES ANTIHORMONALES COMO UNA POSIBLE ESTRATEGIA PARA QUIMIO RADIO TERAPIA BASADA EN CISPLATINO EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO, UN ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO."** realizada bajo la dirección de: **DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**

Presidente:	DR.	FERNANDO LARREA GALLO
Vocal:	DRA.	MARCELA LIZANO SOBERÓN
Secretario:	DR.	MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Suplente:	DR.	HERIBERTO PRADO GARCÍA
Suplente:	DRA.	MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de septiembre de 2011

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Farmacología de la Unidad de Investigación Básica en Cáncer INCan Instituto Nacional de Cancerología. México, D.F.  
Bajo la dirección de la Dra. Patricia García López.

## ***AGRADECIMIENTOS***

***A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM) y al PROGRAMA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS por brindarme la oportunidad de crecer tanto en lo profesional como en lo personal y en un futuro poder retribuir un poco a las demás personas.***

***AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto. Esta tesis fue apoyada por el proyecto CONACyT No. 1420062 y por el proyecto PAPPIT No. IN-108610***

***AL COMITÉ TUTORAL ASIGNADO (Dr. Fernando Larrea Galló y María Isabel Soto Cruz) por sus valiosas aportaciones para mejorar este proyecto.***

***Al los doctores José Sullivan López y Heriberto Prado García por el apoyo, conocimientos y regaños, así como la ayuda desinteresada y valiosa para mi proyecto de tesis.***

***AL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (INCan) y a todas las personas que lo conforman por brindarme un gran apoyo para la realización de este trabajo, pero también porque aquí crecí en muchos aspectos. Gracias también por sus consejos y amistad, los cuales llevaré conmigo a donde vaya. En especial a ti Josefina García Rojas (Jose) por la valiosa amistad, por las palabras de aliento, por ser el soporte en momentos de debilidad y por darme tu ayuda desinteresada.***

## **GRACIAS...**

.....DIOS: *por iluminarme y darme paciencia sobre todo en los últimos momentos pero también por darme las herramientas necesarias para conseguir el objetivo esperado.*

...Dra. *Patricia García López por el apoyo, paciencia y confianza brindados en estos dos años.*

...Dr. *Luis Alberto Medina por la colaboración a este trabajo, por el tiempo, consejos regaños y enseñanzas.*

.... *Rafael Jurado, Jazmín M. Pérez, Enrique Pérez Cárdenas y Elena Arechaga Ocampo, por compartir conocimientos y ayuda vital para lograr la culminación exitosa de este trabajo. Pero también por su amistad.*

.....Maestro *Oscar Ángeles Zaragoza por los consejos y apoyo personal, así como por la gran aportación a este trabajo sin la cual no se hubiera culminado en la manera esperada.*

..... *A todos los técnicos de radioterapia, de medicina nuclear en especial a Mario Esau Romero Piña por el tiempo, paciencia, enseñanzas y horas de trabajo compartidas.*

.....*A Rocío Morales Bárcenas por las horas de apoyo en el citómetro de flujo.*

...*Héctor Vázquez Becerra por enseñarme de la vida, la parte linda como la que no lo es tanto a base de golpes, caídas y levantadas.*

... *Los compañeros del laboratorio Karla, Majo, Carlos, Itzel Poncho, Vicky, Liz, Edith, Vanesa, Jazmín (pequeña), Montse, Miriam, Fabricio por compartir tantas horas de trabajo, risas, angustias así como inquietudes personales.*

## **DEDICADO A...**

*Mis padres, José Luis Segovía Balmes y Ma. Elena Mendoza Díaz, por creer en mí, ser mi soporte, crecer conmigo e impulsarme siempre para seguir adelante y por apoyarme hasta esta etapa. En especial a mi padre por su ejemplo de fortaleza, paciencia y perseverancia y a mi madre por su enorme calidez, la cual ha cimentado en mí.*

*A mi hermana Regina Segovia Mendoza, la cual ha sido un gran apoyo e inspiración. Así como un ejemplo a seguir porque siempre ha sabido seguir avante en todos los proyectos que se ha planteado y por su enorme cariño.*

*A Carlos Juárez Osornio por el enorme cariño y amor brindado, por los consejos, correcciones, paciencia y por la enseñanza de que siempre el amor verdadero triunfa sobre todo. Por aceptarme y creer en mí.*

*A mis amigos, Paty, Julia, Mariana, Alma, César, Jade, Isaac, Abraham, Abel por escucharme y ayudarme en los momentos difíciles.*

*A Evert Avelino García por el tiempo dedicado y por los momentos y experiencias compartidas.*

<b>1.- RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>3.- ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER.....</b>	<b>15</b>
3.1.1 <i>Definición</i> .....	15
3.1.2 <i>Incidencia</i> .....	15
<b>3.2 CANCER CERVICO UTERINO.....</b>	<b>15</b>
3.2.1 <i>Incidencia</i> .....	16
3.2.2 <i>Clasificación histológica</i> .....	16
3.2.3 <i>Factores de riesgo</i> .....	17
<b>3.3 TRATAMIENTO.....</b>	<b>17</b>
3.3.1 <i>Cirugía</i> .....	17
3.3.2 <i>Quimioterapia</i> .....	17
3.3.3 <i>Radioterapia</i> .....	18
<b>3.4 QUIMIOTERAPIA.....</b>	<b>18</b>
3.4.1 <i>Cisplatino</i> .....	18
3.4.2 <i>Mecanismo de acción</i> .....	19
3.4.3 <i>Resistencia a cisplatino</i> .....	20
3.4.4 <i>Efectos secundarios producidos por el cisplatino</i> .....	22
<b>3.5 RADIOTERAPIA.....</b>	<b>23</b>
3.5.1 <i>Rayos X</i> .....	23
3.5.2 <i>Rayos gamma (<math>\gamma</math>)</i> .....	23
3.5.3 <i>Bases biológicas de la radioterapia</i> .....	24
3.5.4 <i>Mecanismo de acción</i> .....	25
3.5.5 <i>Efectos secundarios de la radiación</i> .....	27
<b>3.6 CICLO CELULAR Y RADIOSENSIBILIDAD.....</b>	<b>29</b>
3.6.1 <i>Inhibición de proteínas Hsp90</i> .....	31
3.6.2 <i>Reactivación de p53</i> .....	31
3.6.3 <i>Inhibición de EGFR</i> .....	32
3.6.4 <i>Inhibición de interleucina 6 (IL-6)</i> .....	33
3.6.5 <i>Inhibición de HIF 1 Y VEGF</i> .....	33
3.6.6 <i>Inhibición de IGF-1R</i> .....	34
3.6.7 <i>Inhibición de PI3K/AKT</i> .....	34
<b>3.7. SUSTANCIAS RADIOSENSIBILIZANTES EN CaCu.....</b>	<b>36</b>
3.7.1 <i>Agentes antineoplásicos como radiosensibilizantes</i> .....	36
<b>3.8 AGENTES ANTIHORMONALES EN CÁNCER.....</b>	<b>37</b>
3.8.1 <i>Mifepristona</i> .....	37
3.8.2 <i>ICI 182,780</i> .....	39
<b>3.9 AGENTES ANTI-HORMONALES COMO POSIBLES RADIOSENSIBILIZANTES</b> .....	<b>40</b>
<b>4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>41</b>



<b>5. HIPOTESIS.....</b>	<b>42</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
6.1 <i>Objetivo General</i> .....	42
6.1.1 <i>Objetivos Particulares</i> .....	42
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
7.1 <i>Estudios in vitro</i> .....	43
7.1.1 <i>Líneas celulares</i> .....	43
7.1.2 <i>Inhibición del crecimiento celular</i> .....	43
7.1.3 <i>Evaluación del efecto radiosensibilizante de los agentes anti-hormonales</i> .....	44
7.1.4 <i>Análisis del ciclo celular</i> .....	44
7.2 <i>Estudios in vivo</i> .....	45
7.2.1 <i>Animales</i> .....	45
7.2.2 <i>Eficiencia terapéutica y toxicidad sistémica</i> .....	45
7.2.3 <i>Análisis Estadístico</i> .....	46
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
8.1 <i>Curvas dosis-respuesta de los tratamientos individuales</i> .....	47
8.2 <i>Inhibición del crecimiento celular</i> .....	51
8.3 <i>Análisis del ciclo celular</i> .....	52
8.4 <i>Eficacia terapéutica</i> .....	57
8.5 <i>Toxicidad sistémica</i> .....	59
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>10. CONCLUSION.....</b>	<b>69</b>
<b>11. PERSPECTIVAS A FUTURO.....</b>	<b>70</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>71</b>
<b>12. ANEXO 1.....</b>	<b>84</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

CaCu	Cáncer cérvico uterino
MF	Mifepristona
ICI	ICI 182,780
HPV	Virus de papiloma humano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
Hsp90	Proteínas de choque térmico
IGFR-1	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
HIF	Factor inducible por hipoxia
VEGF	Factor de crecimiento epidermo vascular
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermoide
PI3k	Cinasa fosfatidil inositol
IL-6	Interleucina 6
NFκβ	Factor nuclear kappa beta
GR	Receptor de glucocorticoides
PR	Receptor de progesterona
ER	Receptor a estrógeno
ERE	Elementos de respuesta a estrógeno
Cis	Cisplatino
Rad	Radiación

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización anatómica de cuello uterino.....	16
Figura 2. Formación de aductos por cisplatino.....	20
Figura 3. Mecanismos de resistencia a cisplatino.....	21
Figura 4. Mecanismos de acción de radiación ionizante.....	26
Figura 5. Daño celular por radicales libres.....	27
Figura 6. Curva concentración respuesta cisplatino y radiación.....	47
Figura 7. Curva concentración respuesta agentes anti-hormonales.....	48
Figura 8. Efecto de la radiación sobre velocidad de crecimiento tumoral.....	49
Figura 9. Porcentaje de sobrevida tratamientos individuales.....	50
Figura 10. Porcentaje de sobrevida combinaciones agentes anti-hormonales.....	51
Figura 11. Histogramas ciclo celular.....	52
Figura 12 Distribución del ciclo celular.....	55
Figura 13. Histogramas pico sub G0 .....	56
Figura 14. Volumen tumoral combinaciones de tratamientos.....	58
Figura 15. Incremento del volumen tumoral.....	59
Figura 16. Porcentaje de peso corporal de tratamientos.....	60

## RESUMEN

Actualmente el cáncer cérvico uterino (CaCu) un problema importante de salud pública a nivel mundial y nacional. La quimioterapia basada en cisplatino con radioterapia ha incrementado el porcentaje de sobrevida en estadios tempranos de la enfermedad; sin embargo, para los estadios avanzados este porcentaje es bajo. Por lo que la búsqueda de nuevos agentes que mejoren la eficacia de la radiación en modelos de CaCu continúa siendo uno de los campos de investigación para esta enfermedad. En el presente trabajo se evaluó el efecto radiosensibilizante de dos agentes anti-hormonales Mifepristona e ICI 182,780 sobre cisplatino y radiación en un modelo *in-vitro e in-vivo* de cáncer cervical.

Para evaluar el efecto radiosensibilizante *in vitro* se utilizó la línea celular HeLa se determinó el porcentaje de sobrevida celular utilizando un ensayo clonogénico así como su distribución del ciclo celular. Para los ensayos *in-vivo* el efecto radiosensibilizante se evaluó en un modelo de xenotransplantes en ratones BALB/c nu/nu siguiendo la velocidad de crecimiento tumoral y peso corporal.

El porcentaje de sobrevida celular disminuyó significativamente después de la aplicación de cisplatino y radiación en presencia de Mifepristona o ICI. Sin embargo, el porcentaje de células en la población G2-M del ciclo celular se observó únicamente con la aplicación de Mifepristona-cisplatino-radiación, mientras que en la combinación con ICI el arresto celular se incrementó en la fase S. En los xenotransplantes desarrollados en los ratones se observó que la incorporación de ambos agentes anti-hormonales al tratamiento de cisplatino-radiación disminuyó significativamente la velocidad de crecimiento de volumen tumoral.

Los agentes anti-hormonales mostraron un efecto radiosensibilizante el cual puede estar mediado por diferentes mecanismos como el arresto de la población celular en la fase G2-M o S. Sin embargo, otros mecanismos podrían estar participando en esta radiosensibilización como la inducción de apoptosis por medio del restablecimiento de p53

o activación de caspasas, participación de las oncoproteínas E6/E7 del Virus del papiloma humano, inhibición de factores de crecimiento y proteínas anti-apoptóticas entre otros.

## **SUMMARY**

Currently, cervical cancer is a major public health problem globally and nationally. Cisplatin-based chemotherapy with radiation therapy has increased survival rates in early stages of the disease, but for advanced stages, this percentage is low. As the search for new agents that improve the effectiveness of radiation on cervical cancer models remains one of the areas of research for this disease. So in the present study evaluated the radiosensitizing effect of two anti-hormonal agents, Mifepristone and ICI 182,780 on cisplatin and radiation in a model *in vitro* and *in vivo* cervical cancer.

To asses the radiosensitizing effect *in vitro* was used HeLa cell line was determined the percentage of cell survival using a clonogenic assay and cell cycle distribution. For test *in vivo* radiosensitizing effect was evaluated in a xenotransplant model in BALB/c nu/nu following the rate of tumor growth and body weight.

The cell survival rate decreased significantly after application of cisplatin and radiation in the presence of Mifepristone or ICI. However, the percentage of cells in the G2-M population of the cell cycle was observed only with the application of Mifepristone-cisplatin-radiation, while ICI in combination with increased cell arrest in S phase. In the developed xenotransplants in mice showed that the incorporation of both anti-hormonal agents for the treatment of cisplatin-radiation significantly decreased the growth rate of volume.

Anti-hormonal agents showed a radiosensitizing effect which may be mediated by different mechanisms such as the arrest of the cell population in G2-M o S phase. However, other mechanisms may be involved in the radiosensitization as the induction of apoptosis via restoration of p53 or activation of caspases, involving E6/E7 oncoproteins of human papilloma virus, inhibition of growth factors and anti-apoptotic proteins among others.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer (1). En México según el instituto nacional de estadística y geografía (INEGI) ocupa el tercer lugar en defunciones en mujeres en edad reproductiva y constituye un problema importante de salud pública (2). Entre los factores de riesgo que contribuyen a desarrollar CaCu se encuentran factores genéticos, biológicos y hormonales (3). Sin embargo, el principal factor de riesgo de esta enfermedad es la infección por el VPH, ya que las oncoproteínas (E6 y E7) del mismo inhiben a dos genes supresores de tumores importantes del huésped: p53 y pRb respectivamente, encargados de controlar la replicación celular, favoreciendo la transformación y malignización de las células (4, 5). Según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, (FIGO) existen 4 tipos de estadios de CaCu cuyo tratamiento va desde una cirugía (conización) hasta la combinación de quimio y radioterapia de acuerdo al grado de avance del CaCu; sin embargo, la mayoría de pacientes con este tipo de cáncer son diagnosticadas en estadios avanzados y la sobrevivida a cinco años se estima alrededor de un 17% (6). Actualmente el empleo de quimio-radioterapia concomitante basada en cisplatino es el tratamiento estándar para esta patología. El cisplatino y sus derivados son fármacos antineoplásicos importantes en la terapia del cáncer cérvico uterino y de otras neoplasias que se usa solo o en combinación (7, 8). Sin embargo, la administración de este fármaco está asociada con serios efectos adversos a nivel renal, neuronal y de médula ósea, principalmente (9); por ello ha adquirido importancia la búsqueda de agentes que en combinación con el cisplatino aumenten su actividad antitumoral y disminuyan los efectos secundarios.

Por otro lado, la administración de radiación también produce efectos secundarios como lo es daño a tejido sano y de replicación constante por lo que se buscan nuevas alternativas entre ellas; nuevos agentes radiosensibilizantes que ayuden a combatir su poca especificidad (10).

En algunos tipos de cánceres hormono dependientes como lo son mama y ovario, se han utilizado agentes anti-hormonales como fármacos quimiosensibilizantes. Sin embargo, su

papel como posibles radiosensibilizantes en diferentes neoplasias, y en especial en carcinoma cervical, ha sido poco estudiado.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar dos agentes anti-hormonales MF e ICI como posibles radiosensibilizantes que incrementen el efecto de la radioterapia combinada con cisplatino.

### **3.- ANTECEDENTES**

#### **3.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER**

##### *3.1.1 Definición*

Se define como una enfermedad multifactorial o conjunto de enfermedades, caracterizada por la transformación y malignización de una célula normal, que posteriormente da lugar a un crecimiento descontrolado de células, dado por un aumento en su proliferación e inhibición de los procesos de muerte celular con su posterior capacidad de diseminación hacia otro tejido u órgano (metástasis) (11).

##### *3.1.2 Incidencia*

En los últimos años el cáncer se ha establecido como una de las principales causas de muerte en el mundo, representando el 13% de las defunciones mundiales. Según datos estadísticos de la Organización Mundial de la Salud del 2011 muestran que el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial (12). Actualmente se registran 7.9 millones de muertes por año por esta patología y se pronostica que para el año 2030 aumentará hasta 11.5 millones.

Por su parte en México esta patología también ocupa uno de las principales causas de incidencia y mortalidad. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reporta que en el año 2008 los tumores malignos ocuparon el segundo lugar en la lista de principales causas de defunción en el país, lo que representa 13.4% del total de defunciones registradas en el año. (13, 14)

#### **3.2 CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

El cáncer cervical o carcinoma del cuello uterino incluye las neoplasias malignas que se desarrollan en la porción inferior del útero y en la parte superior de la vagina (15).



### 3.2.1 Incidencia

Esta patología ocupa a nivel mundial, la segunda causa de muerte en la población femenina (1); sin embargo, a nivel nacional según el INEGI, ocupa la tercera causa de muerte después de mama y ovario, lo que representa un problema grave de salud pública (2). En 2008 la incidencia de cáncer cérvico uterino en México fue de 10.06% en las mujeres mayores de 15 años; sin embargo, en las mujeres de 60 años o más el CaCu tiene una tasa de mortalidad observada de 41.88 casos por cada 100 mil mujeres, lo cual representa un porcentaje elevado de defunciones (13).

### 3.2.2 Clasificación histológica del cáncer cervical

Se identifican diferentes tipos de cáncer cervical de acuerdo a su clasificación histológica:

- Carcinoma escamoso o epidermoide, células localizadas en el exocérvix, (aproximadamente 90% de los casos), generado por el VPH fenotipo 16.
- Adenocarcinoma, células localizadas en el endocérvix (aproximadamente el 10% de los casos, siendo este tipo altamente agresivo), generado por el VPH fenotipo 18.
- Carcinoma adeno-escamoso, poco frecuente (15).

En la figura 1 se muestra la localización anatómica del cuello uterino.

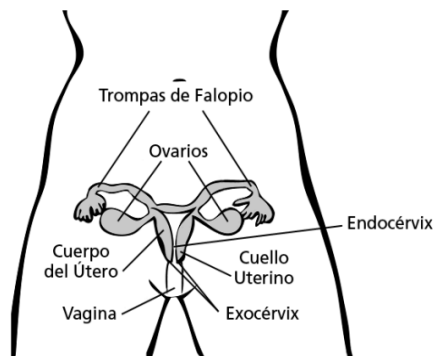


Figura 1. Esquematación de regiones de invasión del cáncer cérvico uterino (16).

### *3.2.3 Factores de riesgo*

Los factores de riesgo de cáncer cervical están relacionados con características tanto del virus como del huésped, incluyen:

- vida sexual sin protección
- uso prolongado de hormonas o anticonceptivos orales
- infección persistente con un VPH de alto riesgo (como VPH 16 o 18);
- inmunosupresión
- uso de nicotina.

El riesgo de desarrollar cáncer depende no sólo del subtipo de VPH, sino también de múltiples factores a los que estén expuestas las mujeres.

## **3.3 TRATAMIENTO**

A continuación se mencionan los principales tratamientos para CaCu, mencionando características generales de la quimioterapia basada en cisplatino y la radioterapia la cual se considera la terapia estándar para dicha patología.

### *3.3.1 Cirugía*

Consiste en la extirpación del tejido anormal, hasta el cérvix completo y/o tejidos adyacentes, cuando no es posible extirpar todo el tejido, se extrae la mayor parte para que tratamientos como la radioterapia o quimioterapia sean más efectivos.

### *3.3.2 Quimioterapia*

Se basa en la administración de agentes químicos, denominados antineoplásicos, para destruir células cancerosas remanentes de cirugía, se aplica en varios ciclos.

### 3.3.3 Radioterapia

Es un tratamiento en el que se aplican dosis fraccionadas de radiación externa y dependiendo del grado de avance de la enfermedad, puede combinarse con quimioterapia y/o con radiación interna conocida como braquiterapia (16).

## 3.4 QUIMIOTERAPIA

Es un tratamiento farmacológico, formado a base de agentes conocidos como antineoplásicos, cuyo objetivo es la destrucción y/o reducción de la masa tumoral impidiendo su reproducción. En general su mecanismo de acción es producir una alteración a nivel celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, en la división celular, o en la síntesis de proteínas. Sin embargo, la gran limitante de esta terapia es su alta inespecificidad ya que también daña a células y tejidos sanos que proliferan con rapidez (medula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal), provocando serios efectos adversos (17, 18).

La quimioterapia se administra, por vía intravenosa o de forma oral, en ciclos repetidos tan frecuentemente como sea permitido por la tolerancia de los tejidos sanos. La quimioterapia también se administra de manera simultánea con otros procedimientos o terapias para eliminar remanentes de células metastásicas y disminuir riesgo de recurrencias, incrementando con ello la supervivencia en los pacientes (19).

Existen múltiples fármacos antineoplásicos con diversos mecanismos de acción. Sin embargo, el agente quimioterapéutico estándar más utilizado en el tratamiento contra el CaCu es el cisplatino (*cis*-Diaminodicloroplatino(II)), a continuación se describen algunas generalidades de este fármaco.

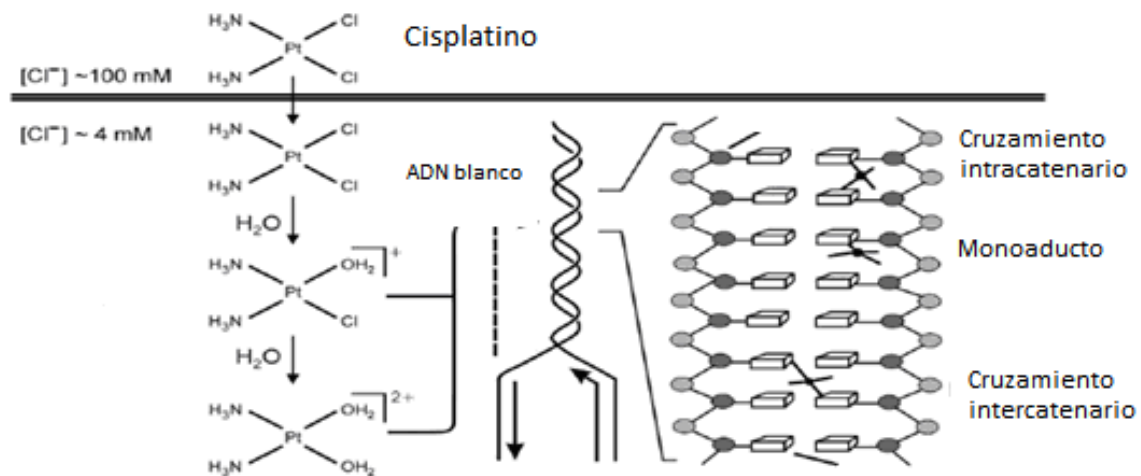
### 3.4.1 Cisplatino

El cisplatino es un agente antineoplásico que fue descubierto en 1965 por Rosenberg. Se ha utilizado en el tratamiento de cáncer cérvico uterino, testicular, ovario, vejiga, cabeza y

cuello. Es un complejo de coordinación con platino, que es hidrosoluble, inorgánico y divalente (20, 21).

### 3.4.2 Mecanismo de acción

El cisplatino penetra en las células por difusión, los átomos de cloruro pueden ser reemplazados por moléculas de agua, dando a la molécula una carga positiva. Estas especies acuo catiónicas pueden reaccionar con sitios nucleofílicos del ADN, ARN y proteínas. Cuando el cisplatino se une al ADN, lo hace en forma preferencial en los anillos de imidazol de la adenina y la guanina en el nitrógeno de la posición 7. Formándose tres tipos de daños: monoadductos, cruzamientos intracatenarios y/o cruzamientos intercatenarios (22, 23), tal y como se muestra en la siguiente figura.



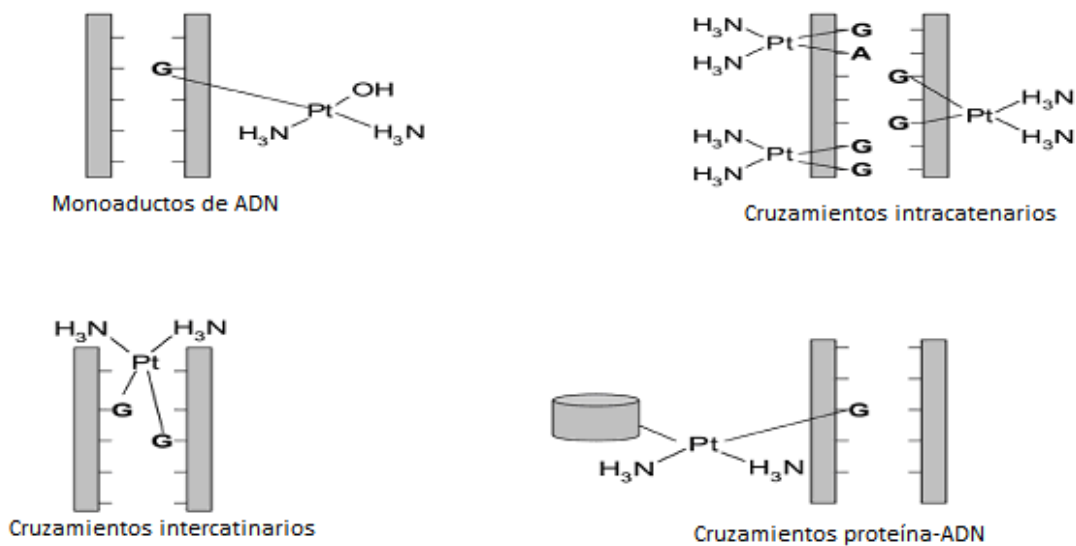


Figura 2. Formación de aductos por el cisplatino (24).

Los aductos de ADN formados con el cisplatino inhiben la replicación, la transcripción y reparación ADN, activando las vías de transducción de señales que desencadenan la muerte celular vía apoptosis (25).

Se cree que los entrecruzamientos intercatenarios son citotóxicos debido al nivel de distorsión que producen en el ADN, sin embargo los entrecruzamientos intracatenarios 1,2 son las lesiones citotóxicas que suceden con más frecuencia (26).

### 3.4.3 Resistencia a cisplatino

La mayoría de tumores sólidos de forma innata o adquirida, generan resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes. Este fenómeno fue descrito experimentalmente y conocido como resistencia a múltiples fármacos o MDR (“*Multidrug Resistance*”), que fue atribuido a una proteína transportadora de la membrana celular llamada glicoproteína-p. Posteriormente se descubrieron otros mecanismos causantes del fenotipo celular multiresistente, como otras proteínas transportadoras, las alteraciones de enzimas como las topoisomerasas, o sistemas detoxificantes conjugados a glutatión (GSH) (24, 27).

La salida del fármaco fuera de la célula es probablemente el mecanismo de resistencia más estudiado y está relacionado con la acción de ciertas proteínas transportadoras, como son: Pgp (*P-glycoprotein*), Mrp (*Multidrug resistance-associated protein*) y Bcrp (*Breast cancer resistance protein*). Las proteínas de resistencia a múltiples fármacos producen resistencia actuando como “bombas de expulsión”, disminuyendo la concentración intracelular de varias sustancias, alterando la distribución intracelular de algunos fármacos y otras alterando la apoptosis (26).

Clasificar las múltiples causas que pueden originar resistencia a la quimioterapia es difícil. El objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es lograr la muerte de la célula tumoral. Para ello es necesario que la mayor cantidad de fármaco activo posible llegue a nivel de su diana molecular en el interior de la célula. Cualquier evento que interrumpa este mecanismo puede generar resistencia.

Los mecanismos moleculares sobre su resistencia, aún no están bien entendidos, sin embargo se han descrito en células de cáncer gástrico, de colon y ovario. Se cree que el fenotipo de resistencia hacia cisplatino difiere del tumor y de muchos factores involucrados (24). Algunos tipos de resistencia a cisplatino se ejemplifican en la figura 3.

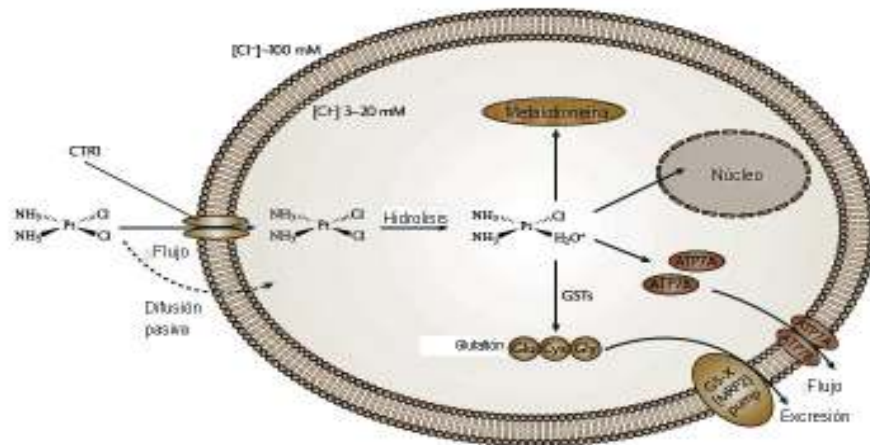


Figura 3. Mecanismos de resistencia tumoral a cisplatino causados por glutatión, metalotioneinas y bombas de expulsión de fármacos (26).

### 3.4.4 Efectos secundarios producidos por cisplatino

A continuación, se describen los principales efectos secundarios causados por el cisplatino (24, 28).

- **Ototoxicidad:** Cerca del 23-54% de los pacientes que reciben la quimioterapia basada en cisplatino presentan daño en las células ciliadas de la cóclea en el oído interno dando como resultado una deficiencia funcional. El principal mecanismo de este problema involucra la producción de especies reactivas de oxígeno en la cóclea, las cuales desencadenan vías de muerte celular, esto es debido principalmente a la activación de la isoforma NADPH oxidasa, NOX3, la cual se expresa únicamente en la membrana del oído interno.
- **Nefrotoxicidad:** Debido a la excreción renal del cisplatino, el riñón acumula una concentración alta de cisplatino en el túbulo proximal y distal de la nefrona, esta acumulación puede causar apoptosis o necrosis dependiendo del tiempo de exposición.
- **Neurotoxicidad:** Los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal son la ubicación principal de los daños de cisplatino en sistema nervioso central. El principal síntoma inducido por cisplatino es caracterizado por un decremento en la velocidad de conducción sensorial, posiblemente actuando como bloqueador del canal de calcio.
- **Mielosupresión:** Las dosis convencionales de cisplatino producen principalmente neutropenia y trombocitopenia en un 20-40%.

Dada la generación de resistencia y de los efectos secundarios provocados por el cisplatino se busca optimizar su uso por medio de la combinación con otras terapias, disminuyendo ambos efectos e incrementando su citotoxicidad. La modalidad terapéutica con la que se combina el cisplatino es la radioterapia, a continuación se describen algunas generalidades.

### 3.5 RADIOTERAPIA

La radioterapia es un tratamiento que utiliza radiaciones ionizantes (rayos x o rayos  $\gamma$ ) para destruir a las células tumorales. Se conceptualiza como energía en tránsito, esta energía viaja a través del espacio, ya sea en forma de partículas (haz de electrones o partículas  $\alpha$ ) o bien, en forma de ondas electromagnéticas (rayos X o  $\gamma$ ) (7).

Los dos tipos principales de radiación aplicada en terapia se describen a continuación:

#### 3.5.1 Rayos X

Son un tipo de radiación electromagnética (transmisión de energía que lleva asociada un campo magnético y un campo eléctrico en su movimiento) que se produce cuando un fotón (incidente) interactúa con un átomo, si el fotón tiene suficiente energía puede expulsar a un electrón del átomo en cuestión, normalmente de la capa K o L. Esto hace que el átomo quede ionizado a causa del desplazamiento electrónico mencionado, dándose como resultado inestabilidad en el átomo. El espacio dejado por el electrón tiende a ser ocupado por un electrón de las capas más externas. Durante este proceso, los electrones que pasan de una capa más energética a una de menor energía emiten un fotón de energía llamado rayo X característico.

#### 3.5.2 Rayos gamma ( $\gamma$ )

Los rayos  $\gamma$  son un tipo de radiación electromagnética, producida generalmente por elementos radioactivos o procesos subatómicos (nucleares), como lo es la des-excitación de un núcleo de un nivel o estado excitado a otro de menor energía y en la desintegración de isótopos radiactivos.

Los rayos  $\gamma$  no son desviados por el campo magnético, lo cual indica que no tienen carga eléctrica; en cambio las partículas  $\alpha$  y  $\beta$  se desvían mostrando que los primeros tienen carga positiva y los segundos negativa.



Los rayos  $\gamma$  se diferencian de los rayos X por su origen o naturaleza debido a que estos últimos se producen de forma extranuclear en las capas electrónicas, o bien por fenómenos de frenado electrónico descritos anteriormente; mientras que los rayos  $\gamma$  son producidos en el interior del núcleo atómico.

Durante la aplicación de la radioterapia se utilizan dosis de radiación fraccionadas diarias o periódicas durante un tiempo determinado.

### *3.5.3 Bases biológicas de la radioterapia*

En ambos casos se transfiere parte de la energía al medio por parte del haz de radiación. Esta cesión de energía implica la ionización de átomos y moléculas del medio y en particular componentes de la célula, desencadenando en ella reacciones químicas que pueden originar cambios directos o indirectos sobre la misma. La mayor parte de los efectos biológicos son consecuencia de la interacción directa o indirecta de la radiación con el núcleo de la célula, provocado rupturas de cadena simple o doble sobre la molécula de ADN (29). De este modo la célula sometida al haz de radiación muere principalmente cuando se encuentra en el proceso de replicación celular conocido como fase S. Por este motivo, las células de los tejidos con un alto índice de recambio celular (mucosa del tracto gastrointestinal o la médula ósea) son las más sensibles a los efectos de la radiación. También se han demostrado efectos sobre otros sistemas celulares fundamentalmente las membranas y los microtúbulos, que podrían actuar como coadyuvantes a la muerte celular e incluso tener un papel predominante en algunos de los efectos secundarios de la radiación como por ejemplo los edemas (30).

#### 3.5.4 Mecanismo de acción

El mecanismo por el cual la radiación daña al ADN puede ser directo o indirecto (31):

- **Interacción Directa:** ocurre cuando la radiación afecta directamente a una macromolécula (ADN) causando rupturas de cadena sencilla o doble. Si el daño provocado sobre la cadena de ADN no se puede reparar la consecuencia será la muerte celular. Si el daño resulta reparable tenemos dos posibilidades: que la reparación sea correcta o que la reparación sea incorrecta lo cual implica que el ADN sufrirá una mutación que se puede transmitir en las siguientes generaciones.
- **Interacción Indirecta:** por medio de la ionización del medio acuoso celular provocando reacciones químicas, el proceso más importante es la radiólisis del agua ya que es el componente más abundante; la radiación interacciona con moléculas de agua y se produce una ruptura del enlace covalente dando lugar a la formación de radicales hidroxilo, peróxido, electrones hidratados; estos radicales libres se unen al ADN ocasionando ruptura de las cadenas.

Por lo anterior, al ser el agua el componente más abundante de las células, el mecanismo de acción indirecto es cuantitativamente más importante que el directo.

En la siguiente figura se muestra el esquema de interacción de la radiación de manera directa e indirecta.

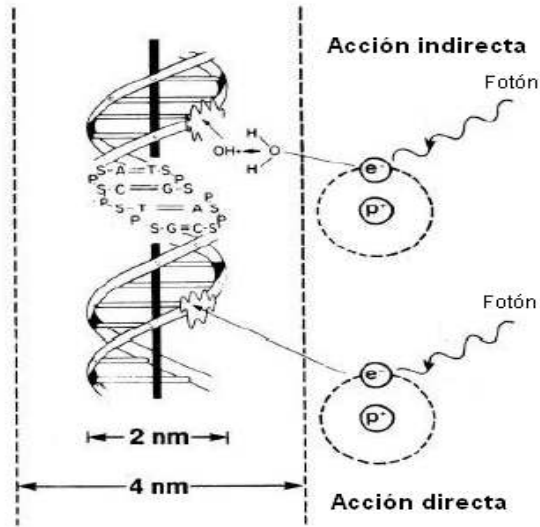


Figura 4. Mecanismos directo e indirecto de la radiación ionizante (32).

Los radicales libres generados en el citoplasma o fuera de él provocan peroxidación de los lípidos que constituyen la membrana. La formación de peróxidos en la membrana da lugar a cambios estructurales que afectan la permeabilidad, los procesos de transporte activo y la hiperpolarización de la membrana por activación inadecuada de los canales de sodio-potasio. Otros organelos que también sufren alteraciones por los radicales libres son las mitocondrias, observándose cambios en la cadena de fosforilación oxidativa y provocando muerte celular inmediata por fallo mitocondrial (31, 33).

En la figura 5 se resumen algunos de los daños ocasionados por la formación de especies reactivas en los diferentes componentes celulares.

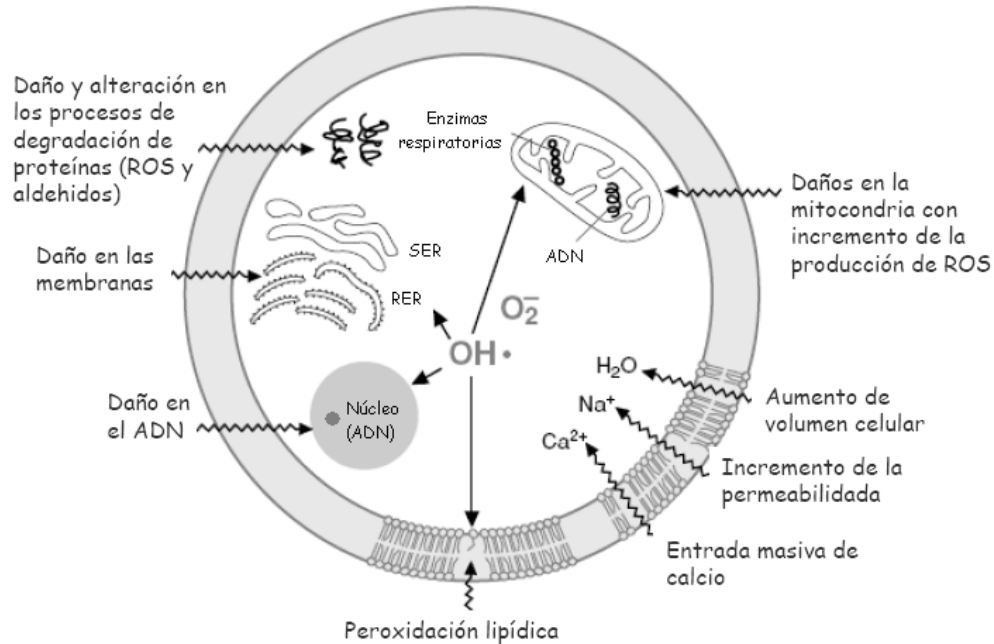


Figura 5 Daño celular a diferentes organelos y componentes celulares causado por radicales libres (34).

### 3.5.5 Efectos secundarios de la radiación

- **Piel:** Entre los efectos precoces está la dermatitis y la alopecia; como tardíos la distrofia, atrofia y ulceración.

- **Sistema hematopoyético:** Las células precursoras o células madre son altamente radiosensibles, dosis moderadas de radiación en un corto periodo de tiempo pueden provocar una disminución en la proliferación y funcionalidad celular. La pérdida de leucocitos tras la irradiación conduce a una falta de resistencia ante los procesos infecciosos. Por otra parte, la disminución en el número de plaquetas puede provocar hemorragias, que aunado a la baja producción de glóbulos rojos provoca anemia.

- **Aparato digestivo:** La parte más radiosensible es el intestino delgado cuya irradiación puede generar una atrofia de las vellosidades generando un síndrome grave de mala absorción. En general la irradiación del aparato digestivo provoca un cuadro inflamatorio produciendo esofagitis, colitis y rectitis.

- **Cristalino:** Cuando el cristalino recibe dosis superiores a 7 Gy en una sola exposición se generan cataratas en el 100% de los casos.

- **Vasos sanguíneos:** En el caso de vasos de pequeño calibre se produce una disminución en la oxigenación de la zona irrigada y por lo tanto atrofia.

- **Testículo y ovario:** Sobre estos órganos puede inducir esterilidad y daño genético. A partir de 2.5 Gy aparece esterilidad temporal, siendo ésta permanente a partir de 6 Gy.

El tratamiento para CaCu ha pasado por varias etapas, en un principio el paciente recibía únicamente radiación o bien radiación combinada con cirugía para estadios I y IIA<sup>1</sup> y radiación sola para los estadios avanzados, metastásico e incluso en cáncer recurrente (35). Varios estudios aleatorizados demostraron que la combinación concomitante de quimioterapia basada en cisplatino con radioterapia mostró una mejor respuesta que la aplicación de radiación (36). Así mismo este esquema aumentó ligeramente el porcentaje de sobrevida a cinco años, siendo más evidente en estadios tempranos. Para el estadio IB2 y IIB el aumento fue de 72.2 a 90.3% y de 63.7 a 66.7%, respectivamente; sin embargo, para los estadios avanzados no se modifica la sobrevida, reportándose un porcentaje de 41.7 a 41.8% para el estadio III, mientras que para el estadio IVA fue de 16.4 al 17.2% (37, 38).

Actualmente el tratamiento del CaCu depende del diagnóstico y del estadio en que se encuentre.

Pese a la respuesta exitosa que ha tenido la combinación de quimio-radioterapia, el porcentaje de sobrevida para estadios avanzados continua siendo pobre. Además se presentan también efectos secundarios severos, poca especificidad del tratamiento, susceptibilidad a enfermedades, generación de quimio o radio resistencia, entre otras.

Por lo que varios grupos de investigación se han enfocado a la búsqueda de agentes que potencien la muerte celular por radiación.

---

<sup>1</sup> Anexo 1

### 3.6 RADIOSENSIBILIDAD Y CICLO CELULAR

El ciclo celular consta de una serie de eventos que siguen un orden para mantener la dinámica y estabilidad celular. Todo esto se logra a través de un sistema de vigilancia que detecta daños en el ADN y activa puntos de control celular (del inglés *checkpoints*), los cuales mantienen la integridad del mismo.

Debido a que la radiación ionizante provoca daños en el ADN como los mencionados con anterioridad, los puntos de control son esenciales para la supervivencia celular y actualmente algunas de las proteínas que los conforman son blancos moleculares en la terapéutica para sensibilizar a las células a la terapia de radiación (39).

A continuación se mencionan algunas proteínas que se han implicado con la radiación y los puntos de control del ciclo celular:

- **p53:** Es una fosfoproteína que posee sitios de unión ADN-específicos y tiene actividad de factor de transcripción. Cuando una célula es expuesta a radiación ionizante o agentes quimioterapéuticos, los niveles de la proteína p53 se incrementan y posteriormente esta proteína activa la transcripción de diversos genes incluyendo el gen p21, el producto de este gen es un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina y arresta las células en fase G1, este arresto permite reparar el daño al ADN antes de seguir su síntesis o continuar con apoptosis inducida por un daño celular (40).
- **ATM:** La Ataxia-telangiectasia mutada, es una fosfoproteína que forma parte de los puntos de control del ciclo celular en respuesta de daño al ADN principalmente ruptura de cadena doble, se ha ligado al control en la fase G1 (p53, Chk2, and Mdm2), fase S (Chk2), y G2 (Brca1 y hRad17) (41, 42). Es requerida para inducir apoptosis en células que contienen un daño excesivo en el ADN, actúa fosforilando a p53 y a varias proteínas que están involucradas con la apoptosis (43). Además se le ha relacionado con la radiación ionizante debido a que actúa como sensor de daño

y se le asocia con proteínas de reparación de daño al ADN, manera en la cual podría sensibilizar a los tumores a la radiación (44).

- **H2AX:** Proteína que forma parte de la familia de histonas, cuya función es promover el acceso de la cromatina y facilitar el remodelamiento del ADN (45). La subfamilia H2AX, contiene un dominio de fosforilación para proteínas cinasas como ATM, DNA-PKc y Rad, entre otras (46). Se sabe que el primer acontecimiento detectable tras la exposición a las radiaciones ionizantes parece ser la fosforilación de la variante de histona H2AX, (es decir, la formación de  $\gamma$ -H2AX), proceso que depende de la proteína ATM, esta histona fosforilada, es un sensor de la respuesta celular por daño al ADN por varios agentes: fármacos, estrés oxidativo, agentes químicos, pero particularmente por la exposición a radiación ionizante (47). Se le ha relacionado con proteínas de reparación de daño al ADN, entre las que destacan: RAD51, 53BP1, MDC1 y Brca1 (48).

Pese al estudio y la implicación de estas proteínas en la respuesta a la radiación y su posible re-expresión para incrementar la respuesta celular a la radiación se han buscado nuevas dianas moleculares que ayuden a potenciar la radiosensibilidad celular.

La radiosensibilidad tumoral se ha definido como el incremento de la susceptibilidad a la muerte de células por radiación (49).

Se sabe que la radiación, principalmente ionizante puede causar rupturas de macromoléculas, hidrólisis y con ello radicales libres como se menciono anteriormente; sin embargo, también puede tener interacciones con otros blancos moleculares dando como resultado final la citotoxicidad celular.

Algunos de los mecanismos moleculares descritos en la literatura ligados con la radiosensibilidad se mencionan a continuación:

### *3.6.1 Inhibición de proteínas Hsp90*

Las proteínas de choque térmico Hsp90 son unas de las proteínas celulares más abundantes, aunque la mayoría de ellas sirven como chaperonas de varias proteínas de señalización celular (50), están implicadas en el plegamiento y maduración de proteínas regulatorias como: receptores de hormonas esteroideas, factores de transcripción, cinasas, entre otras, algunas de las cuales están involucradas en la progresión del cáncer (51). Cuando existe algún tipo de estrés celular, estas proteínas forman un complejo proteico con co-chaperonas para potenciar la estabilidad proteica y proteger a la célula de apoptosis.

En años recientes se ha visto una relación entre las proteínas Hsp90 y otras proteínas asociadas a la radioresistencia celular (Akt, Ras y ErbB2) (52, 53). Aunque no se ha dilucidado el mecanismo por el cual la inhibición de estas proteínas incrementa la radiosensibilidad, hay evidencia de ello en varias líneas celulares sugiriendo que puede servir como un blanco para la radiosensibilización (54). Estudios recientes han demostrado la relación de las proteínas Hsp90 con varias vías de señalización que permiten la evasión de apoptosis (IGFR-1, AKT), el sustento de la angiogénesis (HIF, VEGF, MET), la invasión tisular y metástasis (MMP2), y con receptores de señales de crecimiento (HER2, KIT, MET) (55). Además se ha visto que interactúan con la proteína cdk1 y la enzima cdc25, ambas involucradas en el punto de control de la población G2. Se ha demostrado también su relación con enzimas reparadoras de daño del ADN, cuestionando que su inhibición potenciaría la radiosensibilización celular (56).

### *3.6.2 Activación de p53*

Como se menciona anteriormente p53 es una fosfoproteína que forma parte de los puntos de control del ciclo celular se le conoce también como gen supresor de tumores, debido a que su función es monitorear daños en el ADN, activar genes para repararlos y mantener la estabilidad celular o en su caso llevar las células a apoptosis.



Se ha visto que líneas tumorales con una mutación o delección en p53 incrementan la resistencia a la radiación ionizante, debido a que presenta una estrecha relación en la activación transcripcional de genes después del daño producido por la radiación ionizante (57).

Existe evidencia que sugiere que el daño al ADN provoca alteraciones en la progresión del ciclo celular, arrojando a las células en fase G1 y G2. Estas diferencias en el arresto celular se han relacionado con la radiosensibilidad, aunque el arresto prolongado del ciclo celular, se ha relacionado con la radioresistencia celular, debido a que la célula incrementa el tiempo para reparar el daño en el ADN (58). Existen estudios que demuestran la importancia del estatus de p53 sobre algunos puntos de control después de la radiación y su relación con la radiosensibilidad celular (59).

### *3.6.3 Inhibición de EGFR*

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1 o HER1), pertenece a la familia de receptores tirosina cinasa ErbB, se encuentra en la membrana celular y tiene un papel importante en el desarrollo, diferenciación y reparación celular, así como migración y apoptosis. Cuando se unen sus ligandos (Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento tumoral alfa (TGF $\alpha$ ), entre otros, el receptor se heterodimeriza y activa cascadas de vías de señalización, que incluyen a STAT, fosfolipasa C, PI3k/AKT, Ras/Raf/Mapk, ERK, dando lugar a la proliferación e invasión celular, así como angiogénesis, induciendo una inhibición y en algunos casos resistencia hacia la apoptosis (60, 61). La sobre expresión del EGFR, se ha observado en muchos tipos de tumores sólidos, y se ha demostrado que altos niveles del mismo se correlaciona con el incremento de la resistencia a la radiación (62). Actualmente se usan anticuerpos monoclonales (Cetuximab), moléculas pequeñas inhibitoras de los receptores tirosina cinasas (canertinib, un inhibidor irreversible pan-erB, (CI-1033; Pfizer), EKB-569 (Wyeth Ayerst), GW572016 (GlaxoSmithKline), y el compuesto pirrolopirimidina, PKI-166 (Novartis), entre otros para inhibir al EGFR como una herramienta terapéutica contra el cáncer y mejorar con ello la radiosensibilidad celular (63). Trabajos recientes han demostrado la activación y

señalización del EGFR mediada por radiación ionizante independiente de ligando, activando mecanismos de proliferación y supervivencia celular vía PI3k/AKT y RAS (64).

#### *3.6.4 Inhibición de interleucina 6*

La interleucina 6 (IL-6), es una citocina, cuya función se le ha asociado con la regulación de la función de las células del sistema inmune, principalmente; así como para la proliferación de células epiteliales (65). Muchos grupos de investigación han observado que la IL-6 puede generar señales antiapoptóticas en las células que puede servir como protección contra los efectos tóxicos de la radiación ionizante (66). En muchos tipos celulares, este efecto protector se ha propuesto que es mediado por la vía PI3k (67), mientras que en otros la expresión radio inducida de la IL-6 es dependiente de la previa activación del factor nuclear kappa beta (NF $\kappa$ β) (68). Además se ha descrito que al inhibir citosinas pro-inflamatorias como lo es la IL-6, se inhibe la vía mitogénica de p38, la cual se relaciona con el aumento en la proliferación celular (69).

#### *3.6.5 Inhibición de HIF-1 Y VEGF*

El factor de hipoxia inducible 1 (HIF-1), es una proteína heterodimérica consta de una subunidad  $\alpha$ -hélice y una estructura  $\beta$ -laminar, que activa la transcripción de muchos genes hipoxia inducibles, (eritropoyetina, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), oxigenasa 1, sintasa de óxido nítrico, enzimas glicolíticas, etc..) (70). Su relación con cáncer y la respuesta a las terapias, específicamente a radiación, es de suma importancia, se sabe que la hipoxia tumoral es debida a la inadecuada oxigenación del tejido por las múltiples desregulaciones metabólicas que sufre el tejido tumoral y ha sido considerada como un problema que genera resistencia a la radiación ionizante (71).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), es uno de los más potentes factores de crecimiento angiogénicos, su expresión esta relacionada con la densidad microvascular en

varios procesos como en el embarazo, desordenes cardiovasculares, artritis y en tumores malignos (72). Se ha relacionado con procesos de proliferación, migración celular, entre otros. VEGF es un potente activador mitógeno, induce la activación de cinasas (ERK y MAPk), así como la activación de la ciclina D1, así mismo se ha visto que induce la activación de la vía del fosfatidil inositol (PI3k), entre muchas otras vías (73). Su expresión se ha relacionado con la inducción de HIF-1, y se ha visto también que su bloqueo por medio de anticuerpos, aumenta la respuesta de células tumorales a la radiación, incrementando su radiosensibilidad (74).

### *3.6.6 Inhibición de IGFR-1*

El receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGFR-1) es un receptor del tipo tirosina cinasa, se ha caracterizado como un receptor que contribuye a la mitogénesis, transformación y adhesión celular, así como protección contra apoptosis. Estas características contribuyen a la proliferación y mantenimiento del fenotipo de transformación celular (75). Se ha descrito que la desregulación de la expresión de IGFR-1 causa apoptosis e inhibición de crecimiento en líneas tumorales (76), además de que la expresión de este receptor se ha relacionado con mal pronóstico en varios tipos de cáncer como: mama, cerebro, pulmón, colon (77).

También se ha demostrado que juega un papel importante en la respuesta a la radiación y que al inhibirlo incrementa la radiosensibilidad celular (78). Se ha descrito también que posee la habilidad de inducir radioresistencia reduciendo la actividad de ATM, la cual es un componente necesario para la inducción de apoptosis en células con daño en ADN (79).

### *3.6.7 Inhibición de PI3k/AKT*

La vía del fosfatidil inositol (PI3k/AKT) es una de las principales vías implicada en la sobrevivencia, crecimiento y proliferación celular (80). El componente principal de esta vía, es la cinasa 3 fosfatidil inositol (PI3k), es una enzima que consiste en dos subunidades,

una catalítica, subunidad P110 y otra regulatoria, subunidad P85. La mayor función de la subunidad catalítica de la PI3k, es que actúa fosforilando fosfolípidos de membrana, conocidos como fosfoinositoles en la posición 3, en el anillo inositol del azúcar; (principalmente el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato).

Por su parte, el proto-oncogen c-akt, codifica una cinasa de serina/treonina de 57kDa, también conocida como cinasa B (81), la cual es activada por la fosforilación de la treonina en posición 308 y la serina en la posición 473. La unión de citocinas a su receptor desencadena la activación de la PI3K, permitiendo que esta fosforile fosfoinositoles de membrana, estos se unen a los dominios de AKT permitiendo su activación por medio de la fosforilación de la serina 473 y treonina 308 (82). La ruta de AKT se caracteriza por tener un papel o una señalización antiapoptóticas, ya que al ser activada por PI3k desregula negativamente muchos blancos moleculares como son Bax, la caspasa 9, factor nuclear kappa B, entre otros (83).

El mecanismo por el cual la vía de señalización PI3K/AKT funciona en respuesta a la radiación, incluye la regulación de proteínas mitocondriales, factores de transcripción, interacción con la maquinaria de transcripción y traducción, así como la interacción con ciertas proteínas que contribuyen a la progresión del ciclo celular, además se le ha relacionado con el entrecruzamiento o *cross-talk* con otras proteínas que forman parte de vías de activación mitógena como la proteína cinasa A y C (84). Además algunos estudios recientes muestran que la activación de la vía PI3k/AKT, favorece la radioresistencia en líneas celulares derivadas de tumores de mama, próstata y cabeza y cuello (85, 86), de hecho se ha reportado por medio de la evaluación inmuno-histoquímica que el estado de fosforilación de AKT puede servir como marcador pronóstico para la respuesta a la terapia de radiación en cánceres de cabeza y cuello, debido a que se ha relacionado la elevada actividad de AKT no solo con la supresión de apoptosis sino con la sensibilidad a la terapia de radiación (87).

### 3.7 SUSTANCIAS RADIOSENSIBILIZANTES EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO

Actualmente existen pocos reportes de compuestos radiosensibilizantes en CaCu, la mayoría de éstos han demostrado su efecto únicamente en líneas celulares. Kim y cols. reportaron que la aplicación de aspirina y radiación en la línea HeLa de cáncer cervical mejoró la respuesta a la apoptosis por medio de la regulación de la expresión de algunos genes involucrados como Bcl-2, caspasa 3, y p53 (88). También se ha estudiado la combinación de sustancias de origen natural como la plumbagina junto con radiación en 3 líneas de CaCu (HeLa, SiHa y C-33) mostrando mayor sensibilidad la línea C-33 a través del incremento en la expresión de proteínas como caspasa-3, Bcl-2, Bax y survivina, aumentando la apoptosis alrededor de 5 veces (89).

Tillmans y cols. en el año 2005 evaluaron la radiosensibilización celular con ácido retinoico en líneas de CaCu demostrando que el mecanismo de radiosensibilización es mediado por la disminución de la expresión de *c-fos* (90). Por otro lado, la Curcumina es un polifenol de origen natural que también ha mostrado un efecto radiosensibilizante en células de cáncer cervical (HeLa y SiHa), cuyo mecanismo esta mediado por el incremento de especies reactivas de oxígeno y la activación de la cinasa extracelular ERK (121).

#### 3.7.1 Agentes antineoplásicos como radiosensibilizantes.

Algunos estudios clínicos han demostrado que la administración de varias antineoplásicos como: misonidazol, hydroxiurea, cisplatino, carboplatino, fluororacilo, paclitaxel, gemcitabina, algunos alcaloides de origen natural como la camptotecina, análogos sintéticos de ésta como topotecan e irinotecan y alcaloides semisintéticos como vinorelvina pueden actuar como radiosensibilizantes en CaCu (91, 92, 93). Pese a la respuesta exitosa que han tenido todas estas sustancias, también se presentan serios efectos secundarios entre los que destacan mielosupresiones, diarrea, alteraciones de tracto gastrointestinal, vejiga y riñón, ente otros y en muchos casos generación de resistencia al tratamiento, dificultando con ello su administración y el seguimiento por el paciente.

Existen estudios clínicos fase II en los que se ha probando la combinación de hidralazina y valproato de magnesio como radiosensibilizantes en la quimio-radioterapia en pacientes con CaCu en estadio IIIB (94). Sin embargo, la búsqueda de agentes que puedan servir como alternativa para incrementar la radiosensibilidad celular sigue ampliándose.

### **3.8 AGENTES ANTI-HORMONALES EN CÁNCER**

Existen reportes en la literatura que entre los fármacos quimiosensibilizantes utilizados para modular la actividad citotóxica de agentes antineoplásicos en cánceres hormono-dependientes, como el de mama y ovario, entre los que se encuentran los antiestrogénicos como el tamoxifen y el ICI 182, 780 (95, 96) y antiprogestágenos como la mifepristona (97).

En el presente proyecto se estudiaron dos agentes anti-hormonales MF e ICI como posibles agentes radiosensibilizantes. A continuación se mencionan algunas propiedades generales de estos fármacos.

#### *3.8.1 Mifepristona (RU 486)*

Es un derivado sintético de la noretindrona, que contiene un sustituto dimetil-aminofenil en la posición 11 $\beta$ . Es un potente antagonista competitivo de la unión tanto de receptores a progesterona como de los glucocorticoides. Su uso principalmente es como fármaco anticonceptivo (98).

La MF se une con gran afinidad a los receptores de glucocorticoides (GR) y a los receptores de progesterona (PR), que se encuentran asociados a proteínas Hsp90 en el citoplasma celular. Se ha descrito que mifepristona actúa por medio de:

- Inducir la liberación de las proteínas Hsp90, activando o estabilizando el complejo: MF-Hsp90, dejándolo en un estado inactivo.

- Inducir dimerización del PR, seguida de su unión a elementos de respuesta a progesterona.

El mecanismo por medio del cual inactiva a los PR aún no se encuentra bien definido, aunque algunos estudios señalan que mifepristona estabiliza el complejo inactivo PR-Hsp90 previniendo su translocación al núcleo y en algunos casos cuando algún complejo llega a translocarse presenta una actividad baja (99).

También se le ha relacionado con:

- Inhibición de transcripción de VEGF (100).
- Inhibición de la IL-6 (101).
- Inhibe la actividad transcripcional de Nfk $\beta$  (102).

En el caso del uso de MF en cáncer muchos estudios han demostrado que inhibe la proliferación de varios tipos de cánceres positivos a receptores a progesterona (103). Además incrementa la actividad citotóxica del cisplatino sobre líneas de cáncer de ovario (104). Sin embargo, su actividad con agentes antineoplásicos en cánceres no hormono-dependientes, como es el caso del CaCu no ha sido explorado ampliamente (105, 106). Se ha demostrado que mifepristona, presenta una acción antiproliferativa en líneas de cáncer de mama negativas a receptores de estrógeno y progesterona (MDA-231), lo que sugiere que la presencia de estos receptores no se requiere en el efecto que produce MF como quimio-sensibilizante (107). Un antecedente directo de nuestro laboratorio de Jurado y cols en 2009 mostró la acción de mifepristona como quimio-sensibilizante del cisplatino en dos líneas de cáncer cervical: HeLa (VPH 18) y CasKi (VPH 16), demostrándose un aumento de la actividad citotóxica del cisplatino mucho mayor en la línea HeLa reportándose además un incremento de la concentración intracelular de cisplatino tanto en células como en un modelo de experimental de xenotrasplante de CaCu (108). Se ha descrito además que esta línea HeLa expresa receptores a glucocorticoides (GR) (109); por lo que es posible que un mecanismo mediado a través de estos receptores, participe en la acción quimiosensibilizante de mifepristona más que la participación de receptores a progesterona

ya que se conoce que la expresión de este receptor en células de cáncer cervical es baja o incluso se considera negativa.

### 3.8.2 ICI 182, 780

Es un esteroide análogo del 17- $\beta$ -estradiol, se le ha denominado como antiestrogénico puro; es decir que carece de actividad agonista además de que posee cuatro veces más afinidad por los receptores a estrógeno que otros antiestrogénicos, como lo es tamoxifen (110, 111). Su uso actualmente es como antiproliferativo y quimiosensibilizante en cánceres hormono dependientes, principalmente mama (112).

Inhibe de manera competitiva la unión del estradiol a los ER, los cuales se encuentran en membrana plasmática (GPR30), citosol y núcleo, principalmente, los dos últimos receptores se encuentran inactivos gracias a la acción de las proteínas Hsp90, en condiciones normales cuando el estrógeno o estradiol, se unen a su receptor nuclear, forman homodímeros que se unen al ADN con gran afinidad en sitios denominados: elementos de respuesta a estrógenos (ERE'S); los dímeros formados con anterioridad estimulan o inhiben la transcripción de genes. Sin embargo, el estradiol puede actuar de manera no clásica; es decir, puede unirse también a su receptor membranaral el cual es un receptor de la familia de las proteínas G y generar una serie de cascadas de señalización que incluyen vías mitogénicas como PI3k, MAPk y señalización por Ca<sup>+2</sup>.

El ICI actúa a través de varios mecanismos:

- Se une con gran afinidad al receptor nuclear de estrógenos disociando las proteínas Hsp90, promoviendo su degradación.
- Reduce la dimerización y la localización nuclear del complejo ICI-ER, reduciendo con ello la unión hacia los ERE'S, evitando la transcripción de genes.
- Se ha descrito también que inhibe la expresión del IGF-1 y por lo tanto inhibe vías mitogénicas (113).



El efecto citotóxico de este antiestrogénico en combinación con algunos antineoplásicos ha sido demostrado en cánceres hormono-dependientes principalmente mama, disminuyendo la proliferación celular y aumentando la citotoxicidad de los mismos (114, 115). Existen también antecedentes de que la combinación de ICI con cisplatino produce un efecto sinérgico incrementando la citotoxicidad celular en una línea de cáncer de ovario (A 2780) negativa a receptores a estrógeno (116).

Un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, demostró un efecto citotóxico mayor al combinar ICI y cisplatino en tres líneas de cáncer cervical: HeLa (VPH 18), SiHa y CasKi (VPH 16). El efecto fue superior en células HeLa, disminuyendo la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de cisplatino aproximadamente 20 veces cuando se combina con ICI en comparación a la aplicación de cisplatino solo (105). En el mismo trabajo se observó que la misma combinación arrestó a las células en la población G2-M del ciclo celular, siendo estadísticamente más marcado para la línea HeLa. Cabe mencionar que dicha fase, se ha descrito como la fase más radiosensible del ciclo celular (117, 118).

### **3.9 AGENTES ANTI-HORMONALES COMO POSIBLES RADIO-SENSIBILIZANTES.**

Existen pocos estudios que han señalado la posibilidad de que algunos agentes anti-hormonales pudieran tener propiedades radiosensibilizantes. Un estudio realizado en el año 2000 por de Kamradt y cols. demostró que Mifepristona incrementó la radiosensibilidad celular en una línea de cáncer cervical (C4-1) fenotipo VPH 18 favoreciendo la apoptosis por medio del restablecimiento de la expresión de p53 mediante la modulación de las oncoproteínas virales E6/E7 (106).

Se ha descrito también que algunas isoflavonas derivadas de plantas como la genisteína la cual presenta un bloqueo del receptor estrogénico (119), tiene una acción radiosensibilizante sobre una línea de cáncer cervical (CaSki) debido al incremento en la población G2-M del ciclo celular (120).

#### **4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente el CaCu en nuestro país ocupa el segundo lugar en defunciones en mujeres en edad reproductiva y constituye un problema importante de salud pública. Varios estudios han demostrado que la combinación de quimio-terapia basada en cisplatino con radioterapia incrementa el porcentaje de sobrevida en estadios tempranos de la enfermedad; sin embargo, para los estadios avanzados la mortalidad es elevada.

En la actualidad se estudian nuevos fármacos que incrementan la radiosensibilidad tumoral en CaCu y por lo tanto la eficacia de los tratamientos. A pesar de tener resultados prometedores con algunos radiosensibilizantes como por ejemplo hidroxiurea, gemcitabina, taxanos etc., la gran mayoría de estos agentes también incrementan los efectos secundarios; por lo que la búsqueda de nuevos agentes que mejoren la terapia de radiación en modelos de CaCu, continúa siendo uno de los campos de investigación en el tratamiento del cáncer cervical.

Por otro lado, algunos agentes anti-hormonales como tamoxifeno, raloxifeno, medroxi-progesterona, mifepristona e ICI 182,780, han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas como mama, ovario, próstata, endometrio. Sin embargo, en cáncer cervical su aplicación no ha sido ampliamente estudiada debido a que se ha reportado baja expresión de receptores hormonales en esta patología dando pie a pensar que no tienen un papel importante. No obstante, algunos de los mecanismos descritos en la literatura de los agentes anti-hormonales como la activación de caspasas (121), inhibición de factores de crecimiento y proteínas anti-apoptóticas (100, 113), inducción de apoptosis por medio del reestablecimiento de p53 (106), así como su función como citostáticos en otros tipos de cáncer podrían favorecer la respuesta de las células de cáncer cervical a la radiación, participando con ello en el incremento de la radiosensibilidad celular.

## **5. HIPÓTESIS**

Al combinar agentes anti-hormonales con el antineoplásico cisplatino y radiación se incrementará la citotoxicidad en una línea celular de cáncer de cérvix (HeLa) y disminuirá la velocidad de crecimiento de xenotransplantes de cáncer cervical, sin aumento en la toxicidad sistémica.

## **6. OBJETIVOS**

### *6.1 Objetivo general*

Evaluar el efecto radiosensibilizante de agentes anti-hormonales en combinación con cisplatino y radiación en células de cáncer cervical, sobre un modelo *in vitro* (línea celular HeLa) y un modelo *in vivo* (ratones nu/nu).

#### 6.1.1 Objetivos particulares

- 1.- Realizar curvas concentración-respuesta de los tratamientos individuales (cisplatino, radiación, agentes anti-hormonales) *in vitro*.
- 2.- Evaluar el efecto radiosensibilizante de los agentes anti-hormonales (ICI o MF) con Cisplatino-Radiación en células HeLa. (porcentaje de supervivencia celular y su distribución del ciclo celular).
- 3.- Evaluar la respuesta radiosensibilizante de los tratamientos en xenotrasplantes de células HeLa desarrollados en ratones atímicos.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Estudios *in vitro*

#### 7.1.1 Líneas celulares:

La línea celular de cáncer cervical humano (HeLa) fue obtenida de la ATCC (Rockville, USA) y mantenida en monocapa en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA). suplementado con el 10% de suero fetal bovino (SFB) e incubada a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 7.1.2 Inhibición del crecimiento celular:

Las células se sembraron en medio DMEM suplementado con 10% SFB a una densidad de  $5 \times 10^5$  células en cajas de 25cm<sup>2</sup>. A las 24 hrs, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 μM durante 24 hrs), radiación (0.5, 0.75, 1.0 y 2.0 Gy\* con una fuente de Co<sup>60</sup> (Theraton Phoenix, USA), y agentes anti-hormonales MF e ICI (1, 10, y 20μM durante 72 hrs), el grupo control fue expuesto únicamente al vehículo (etanol). Al final del tratamiento, las células fueron sometidas a un ensayo clonogénico el cual consiste en tripsinizar y resembrar las células en cajas de 25 cm<sup>2</sup>, posteriormente se incubaron por dos semanas a 37°C con una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>, al término de este periodo las colonias formadas fueron fijadas con formol al 10%, teñidas con cristal violeta y contadas con un contador de colonias (Bantex). Finalmente se determinó el porcentaje de sobrevivencia celular de acuerdo a la técnica de Munchi et al (122), calculando la eficiencia de sembrado y el factor de sobrevivencia de cada tratamiento utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Eficiencia de sembrado} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Número de células sembradas}} \times 100$$

$$\text{Factor de sobrevivencia} = \frac{\text{Eficiencia del grupo tratado}}{\text{Eficiencia del grupo control}} \times 100$$

Después de obtener el factor de sobrevivencia (% de sobrevivencia) se construyeron curvas de concentración-respuesta y se determinaron las dosis adecuadas para los ensayos de las combinaciones planteados en el segundo objetivo.

### 7.1.3 Evaluación del efecto radiosensibilizante de los agentes anti-hormonales

Para evaluar el efecto radiosensibilizante de ICI o MF con la combinación de cisplatino-radiación en células HeLa, se formaron los grupos descritos en la siguiente tabla.

Tabla 1. Grupos experimentales

<b>GRUPOS</b>
1.- Control
2.- Cisplatino (Cis)
3.- Radiación (Rad)
4.- Mifepristona (MF)
5.- ICI 182,780 (ICI)
6.- Cis + Rad
7.- MF + Cis
8.- ICI + Cis
9.- MF + Rad
10.- ICI + Rad
11.- MF + Cis +Rad
12.- ICI + Cis + Rad

Para el tratamiento con ICI o MF, las células fueron expuestas por 3 días a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , al término de este periodo se expusieron a cisplatino por 24 horas a una concentración de 0.33  $\mu\text{M}$  y posteriormente fueron irradiadas con una fuente de  $\text{Co}^{60}$  a una tasa de dosis de 0.75Gy. Después de la exposición simultánea o individual a los diferentes tratamientos, las células fueron sometidas a un ensayo clonogénico descrito anteriormente.

### 7.1.4 Análisis del ciclo celular:

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células HeLa en cajas de  $25\text{cm}^2$  y fueron sincronizadas removiendo el SBF del medio. Se formaron los mismos grupos descritos en la tabla anterior y las células fueron expuestas a los mismos tratamientos. A las 24 hrs después de la aplicación de la radiación, las células se despegaron y lavaron con buffer de fosfatos pH 7.2 posteriormente fueron fijadas con etanol al 70% (v/v). Las muestras se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Para el análisis del ciclo celular las células fueron lavadas con PBS pH

7.2, centrifugadas, los botones fueron teñidos con una solución de yoduro de propidio (1µg/ml), ARNasa (10µg/ml) y Triton X-100 al 0.1% (v/v). La solución fue incubada en oscuridad a temperatura ambiente por 20 minutos. El contenido de ADN en las diferentes fases del ciclo celular fue determinado usando un citómetro FACsCalibur (Becton Dickinson). Un total de 30,000 eventos fueron adquiridos por el software Flow-Jo (Tree Star Inc) Versión 9.3.2 para el análisis de las distintas fases del ciclo celular.

## **7.2 Estudio *in vivo***

### **7.2.1 Animales:**

Se utilizaron ratones hembra nu/nu (Harlan, USA) entre 6-8 semanas de edad, mantenidos en condiciones libres de patógenos y alimentados *ad libitum*. El protocolo para el cuidado y uso de los animales fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cancerología de México.

### **7.2.2 Eficacia terapéutica y toxicidad sistémica:**

Los ratones fueron inoculados por vía subcutánea con  $6 \times 10^6$  células HeLa en las extremidades posteriores, una vez que el volumen tumoral alcanzó un tamaño aproximado de 7x7mm, se dividieron aleatoriamente y se administraron los diferentes tratamientos siguiendo el esquema mencionado en la siguiente Tabla.

Tabla 2. Descripción de tratamientos y esquema de administración de los grupos experimentales en animales.

GRUPO	TRATAMIENTO	ESQUEMA DE ADMINISTRACIÓN
1	Control	Vehículo
2	Cisplatino (Cis)	3 mg/kg /semana x 3 semanas
3	Radiación (Rad)	Dosis total 10 Gy (0.5 Gy/día x 20 días)
4	Mifepristona (MF)	2 mg/kg/día/semana x 3 días x 3 semanas
5	ICI 182,780 (ICI)	100 mg/kg/día/semana x 3 días x 3 semanas
6	Cis + Rad	Esquema combinado de tratamiento individuales
7	MF + Cis	Esquema combinado de tratamiento individuales
8	ICI + Cis	Esquema combinado de tratamiento individuales
9	MF + Rad	Esquema combinado de tratamiento individuales
10	ICI + Rad	Esquema combinado de tratamiento individuales
11	MF + Cis + Rad	Esquema combinado de tratamiento individuales
12	ICI + Cis + Rad	Esquema combinado de tratamiento individuales

La eficacia terapéutica fue evaluada por la medición semanal de crecimiento del tumor utilizando un vernier digital midiendo el largo por el ancho y el volumen tumoral se determinó usando la siguiente fórmula ( $0.532 * L^2 * a$ ) (123), el volumen tumoral fue evaluado durante 10 semanas. Para la evaluación de la toxicidad sistémica se registró el peso corporal durante el mismo periodo.

### 7.2.3 Análisis Estadístico

Para evaluar la diferencia entre los tratamientos individuales y combinados se les realizó un análisis de varianza seguido de una prueba de Tuckey. Una  $p < 0.05$  indicó una diferencia estadísticamente significativa.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Curvas concentración-respuesta de los tratamientos individuales (cisplatino, radiación y agentes anti-hormonales)

En la figura 6 se muestran las curvas concentración-respuesta de radiación y cisplatino en células HeLa. En ambas figuras se observa una disminución del porcentaje de supervivencia en función del incremento de la dosis de ambos agentes.

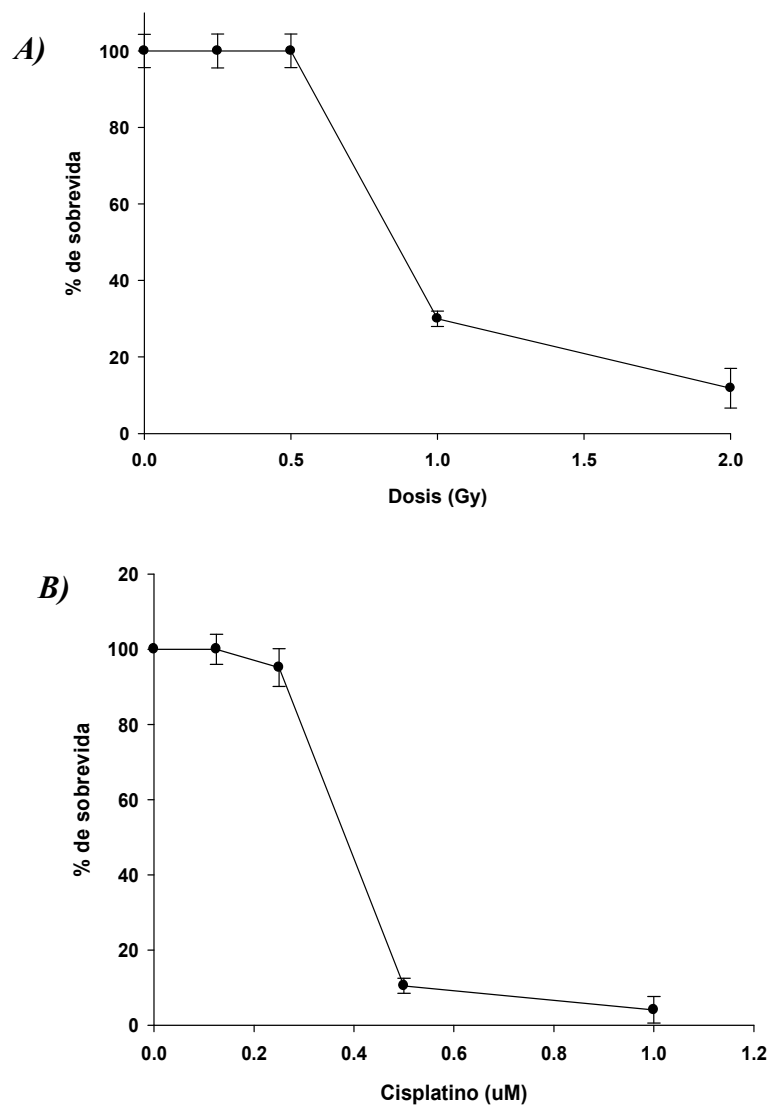


Figura 6. Curva concentración-respuesta en células HeLa expuestas a: A) radiación gamma (0.5, 0.75, 1, 2 Gy) B) Cisplatino (0.125, 0.5, 1 $\mu$ M). Cada punto representa el promedio de tres experimentos  $\pm$  Desviación Estándar (DE).



En la figura 7 se muestran las curvas concentración-respuesta de los agentes anti-hormonales (MF e ICI) en células HeLa, expuestas a diferentes concentraciones. Con ambos agentes se observa que la concentración de 10  $\mu\text{M}$  produce un efecto citotóxico del 15% sobre el porcentaje de sobrevivencia celular.

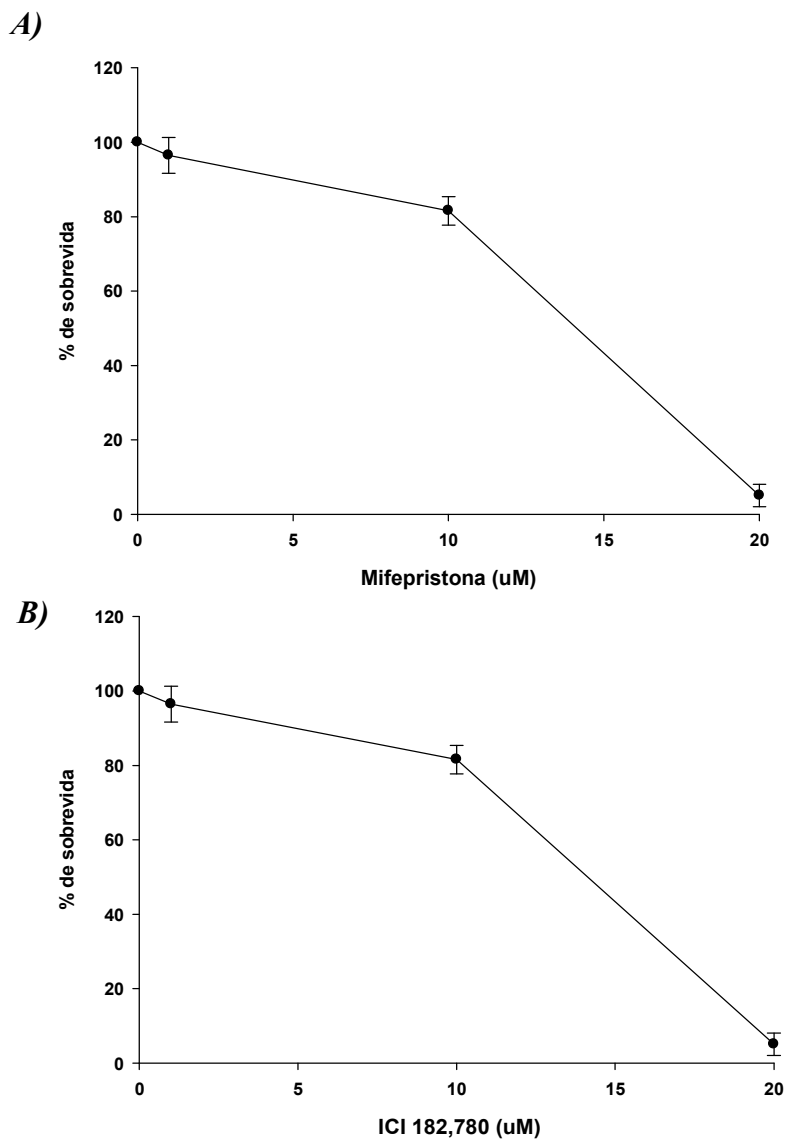


Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia de células HeLa expuestas durante 72hrs A) MF B) ICI a las concentraciones de 1, 10, 20 $\mu\text{M}$  utilizando un ensayo clonogénico. Cada punto representa el promedio de tres experimentos  $\pm$  Desviación Estándar (DE)

Para determinar la dosis de radiación a utilizar en los tratamientos combinados de anti-hormonales-cisplatino-radiación en ratones, se realizó una curva dosis-respuesta en un modelo experimental de xenotransplantes en ratones atómicos, los resultados se muestran en la figura 8.

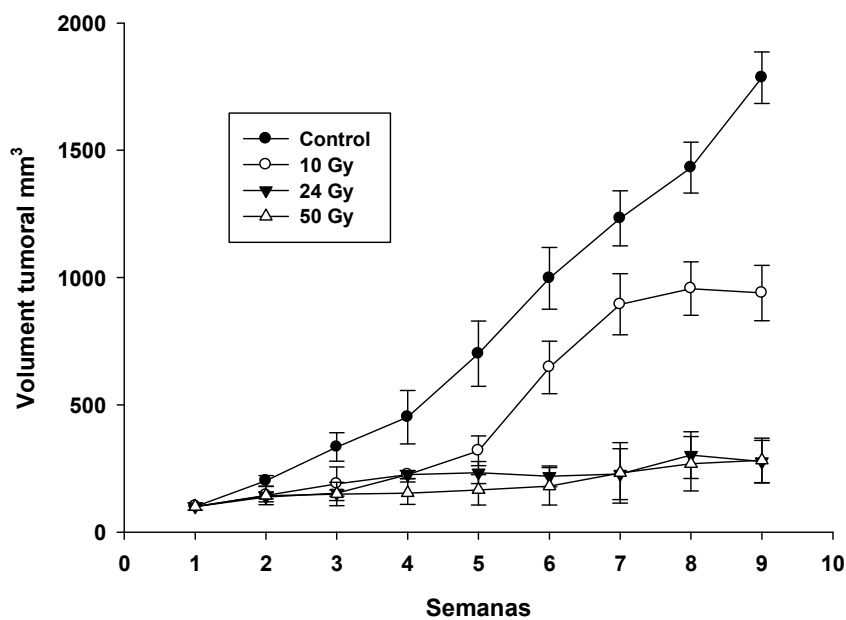


Figura 8. Efecto de la radiación sobre la velocidad de crecimiento tumoral en ratones atómicos. Los tumores fueron evaluados durante nueve semanas. Cada punto representa el promedio de cuatro animales  $\pm$  Error Estándar (EE).

Con los resultados anteriores se determinaron las concentraciones para las combinaciones propuestas tanto para los ensayos *in-vitro* como *in-vivo*, las cuales se resumen en la siguiente Tabla.

Tabla 3. Concentraciones para los estudios de combinación *in vitro* e *in vivo*.

Agente	<i>In-vitro</i>
Mifepristona	10 Mm
ICI	10 $\mu$ M
Cisplatino	0.33 $\mu$ M
Radiación	0.75 Gy
	<i>In vivo</i>
Radiación	10 Gy

## 8.2 Inhibición del crecimiento celular

En la figura 9, se observa que la aplicación de los tratamientos individuales de cisplatino, radiación, MF e ICI a las dosis mencionadas en la Tabla 3 no presentaron una disminución significativa en el porcentaje de sobrevida celular con respecto al control, aunque los agentes anti-hormonales presentan una tendencia a disminuir dicho porcentaje.

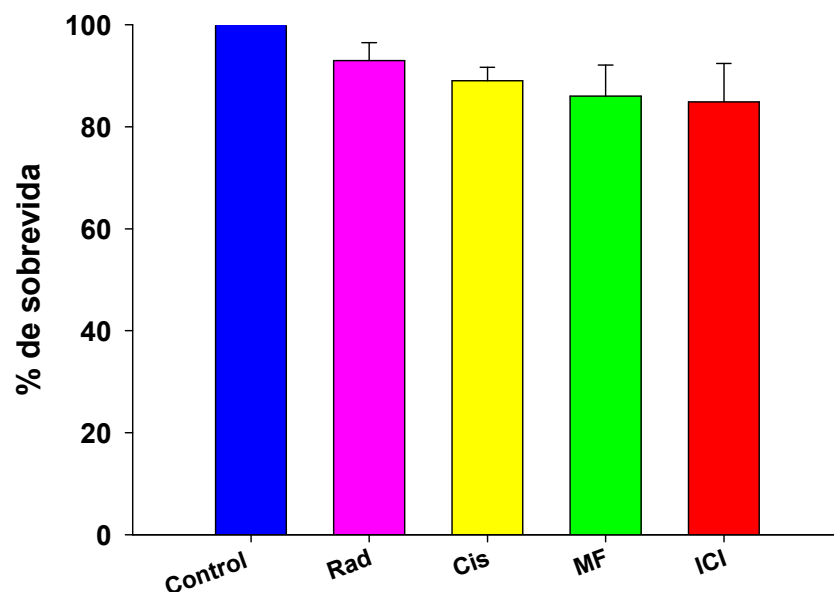


Figura 9. Porcentaje de sobrevida en células HeLa expuestas a los tratamientos individuales. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos individuales realizados cada uno por triplicado  $\pm$  DE.

Al combinar los agentes anti-hormonales MF e ICI con radiación o cisplatino, el porcentaje de sobrevida celular disminuyó significativamente con respecto al grupo control o a los tratamientos individuales. Sin embargo, cuando se aplicaron en combinación con cisplatino más radiación, la disminución en el porcentaje de sobrevida fue significativamente mayor con respecto a las combinaciones de los mismos ya sea con radiación o con cisplatino, al tratamiento de cisplatino más radiación y al control. figura 10.

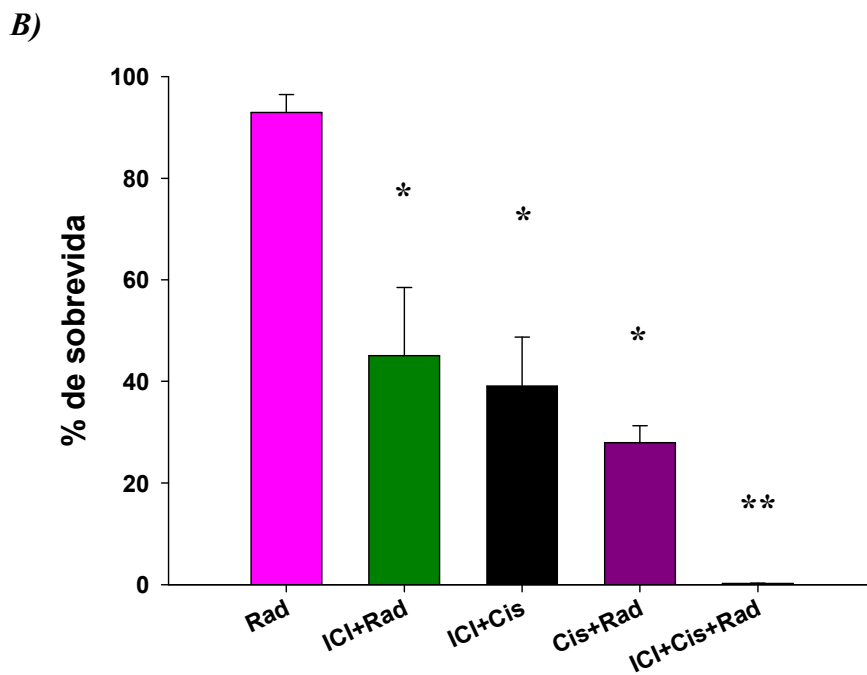
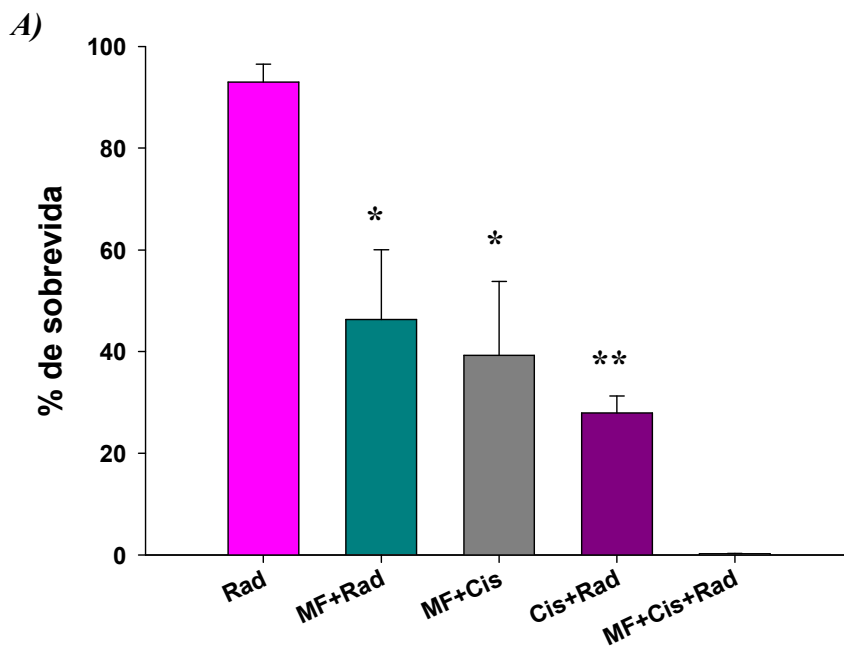


Figura 10. Porcentaje de sobrevida después de los tratamientos combinados. A) Combinaciones con Mifepristona: (MF+Rad, MF+Cis, MF+Cis+Rad). B) Combinaciones con ICI (ICI+Rad, ICI+Cis, ICI+Cis+Rad) en comparación con el grupo de Radiación y Cis+Rad. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos individuales realizados cada uno por triplicado  $\pm$  DE. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de Radiación ( $p < 0.05$ ). \*\* Diferencia significativa con respecto al grupo de radiación y sus combinaciones ( $p < 0.001$ ).

### 8.3 Análisis del ciclo celular

Los histogramas representativos de la comparación del perfil del ciclo celular se muestran en la siguiente figura. Se grafica número de células *versus* contenido de ADN del grupo control, el tratamiento estándar (cisplatino+radiación) y las triples combinaciones de agentes anti-hormonales MF o ICI con cisplatino y radiación.

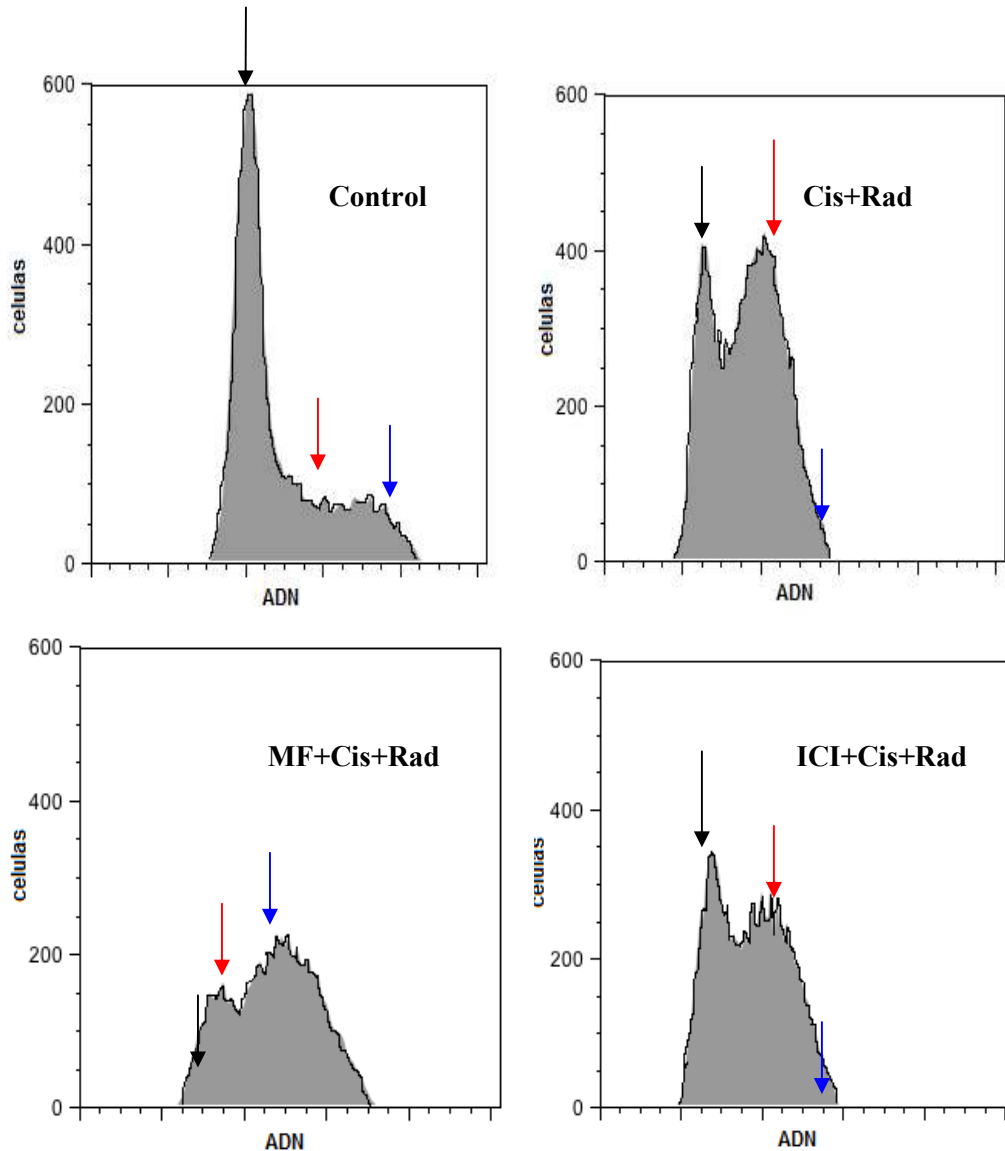


Figura 11. Histogramas representativos del perfil del ciclo celular para el grupo control, el grupo de cisplatino-radiación y las triples combinaciones con los agentes anti-hormonales. Las flechas negras indican la población de células que se encuentran en la fase G0-G1, las flechas rojas en la fase S y las azules en la fase G2-M.

La distribución del ciclo celular de las células HeLa con los tratamientos individuales se muestra en la Tabla 4. Las células no tratadas (control) muestran una acumulación en la población G0-G1 con un disminución paralela en la fase S y en la población G2-M. Sin embargo, la aplicación de los tratamientos individuales presenta una tendencia a disminuir en la población G0-G1 la cual no alcanzó significancia estadística; mientras que en la fase S se observó un aumento y en la población G2-M una disminución, siendo estas significativas.

Tabla 4. Porcentaje de las diferentes fases del ciclo celular de células HeLa para los tratamientos individuales

<b>Grupos</b>	<b>% G0-G1</b>	<b>% S</b>	<b>% G2-M</b>
Control	59.3±1.5	31.3±0.6	9±0.8
ICI	45.5 ±3.5	49.5±2.1 *	6.5±1.9
MF	43.3±5	52±3.5 *	2.6±2.4 *
Cis	32.3±3.2 *	70±2.6 *	0.7±0.6 *
Radio	39.5±11	63.5±7.8 *	0±0.1 *

\* Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control  $p < 0.05$ . Los datos se expresan como el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$ DE.

Cuando se aplicó MF en combinación con el tratamiento de cisplatino y radiación (MF+Cis+Rad) se observó un claro arresto significativo en la población G2-M y una disminución en la fase S comparándolo contra el tratamiento de la terapia estándar (cisplatino más radiación) y contra la combinaciones de MF con cisplatino y con radiación. Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de distribución de las diferentes fases del ciclo celular para las combinaciones con mifepristona

<b>Grupos</b>	<b>% G0-G1</b>	<b>% S</b>	<b>% G2-M</b>
Cis + Rad	23.7±8	89±4.6	0.8±1.3
MF + Cis	18.5±3.5	82±4.9	9.1±0.1
MF + Rad	31.7±5.1	71.5±6.4	1.8±2.5
MF +Cis + Rad	19.5±2.1	24±7*	62±2.8 *

\* Diferencia estadísticamente significativa de MF+Cis+Rad vs Cis+Rad, MF+Cis, MF+Rad (p<0.05). Los datos se expresan como el promedio de tres experimentos independientes ±DE.

Contrario a lo que se observó en los tratamientos combinados con MF, la aplicación con el tratamiento de ICI+Cis+Rad no mostró ningún cambio significativo en la población G2-M pero si presentó un aumento en la fase S, teniendo un comportamiento parecido al tratamiento de cisplatino-radiación Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de distribución de las diferentes fases del ciclo celular para las combinaciones con ICI

<b>Grupos</b>	<b>% G0-G1</b>	<b>% S</b>	<b>% G2-M</b>
Cis + Rad	23.7±8	89±4.6	0.8±1.3
ICI + Cis	43.3±4.2	56±10.6	4.3±4
ICI + Rad	47.7±7.6	45.7±7.2	7.8±0.4
ICI + Cis + Rad	26±8.5 *	69.7±7.2 **	2.5±0.9

\* Diferencia estadísticamente significativa de ICI+Cis+Rad vs ICI+Cis, ICI+Rad. \*\* ICI+Cis+Rad vs Cis+Rad, ICI+Rad (p<0.05). Los datos se expresan como el promedio de tres experimentos independientes ±DE.

En la figura 11 se muestra la comparación de la distribución de las distintas fases del ciclo celular de las combinaciones de los agentes anti-hormonales (MF o ICI) con cisplatino y radiación contra el tratamiento de cisplatino+radiación (tomado como estándar del tratamiento de CaCu) y la comparación contra el grupo control.

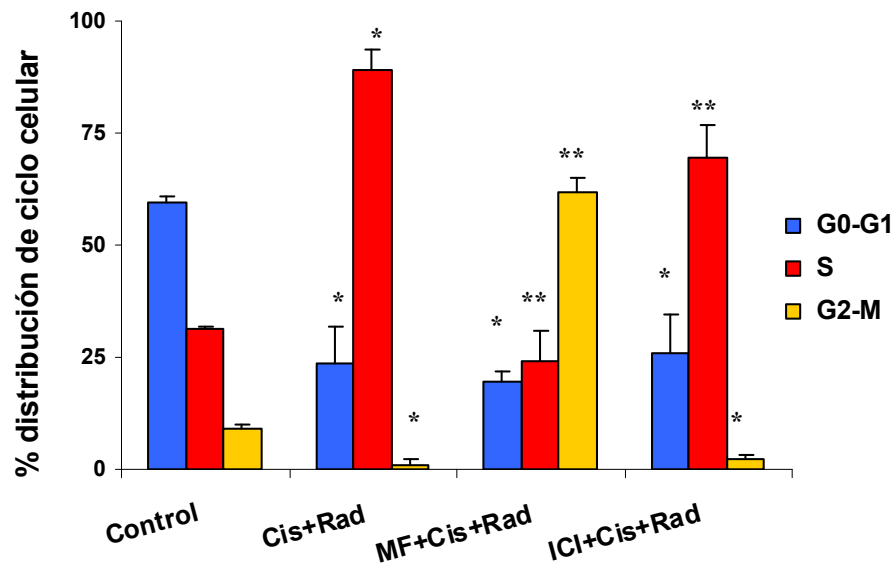


Figura. 12 Distribución del ciclo celular para el grupo control, cisplatino+radiación y su combinación con MF o ICI. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. \* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control. \*\* Diferencia significativa respecto al grupo control y al grupo de Cis+Rad ( $p < 0.05$ ). Los datos se expresan como el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DE.

En la figura 13 se muestran los histogramas que presentaron el pico sub-G0, el cual es característico de muerte celular, se observa que los tratamientos que mostraron dicho pico son únicamente aquellos que corresponden a las combinaciones con ICI, el mayor incremento se observa en el tratamiento con ICI+Cis+Rad.



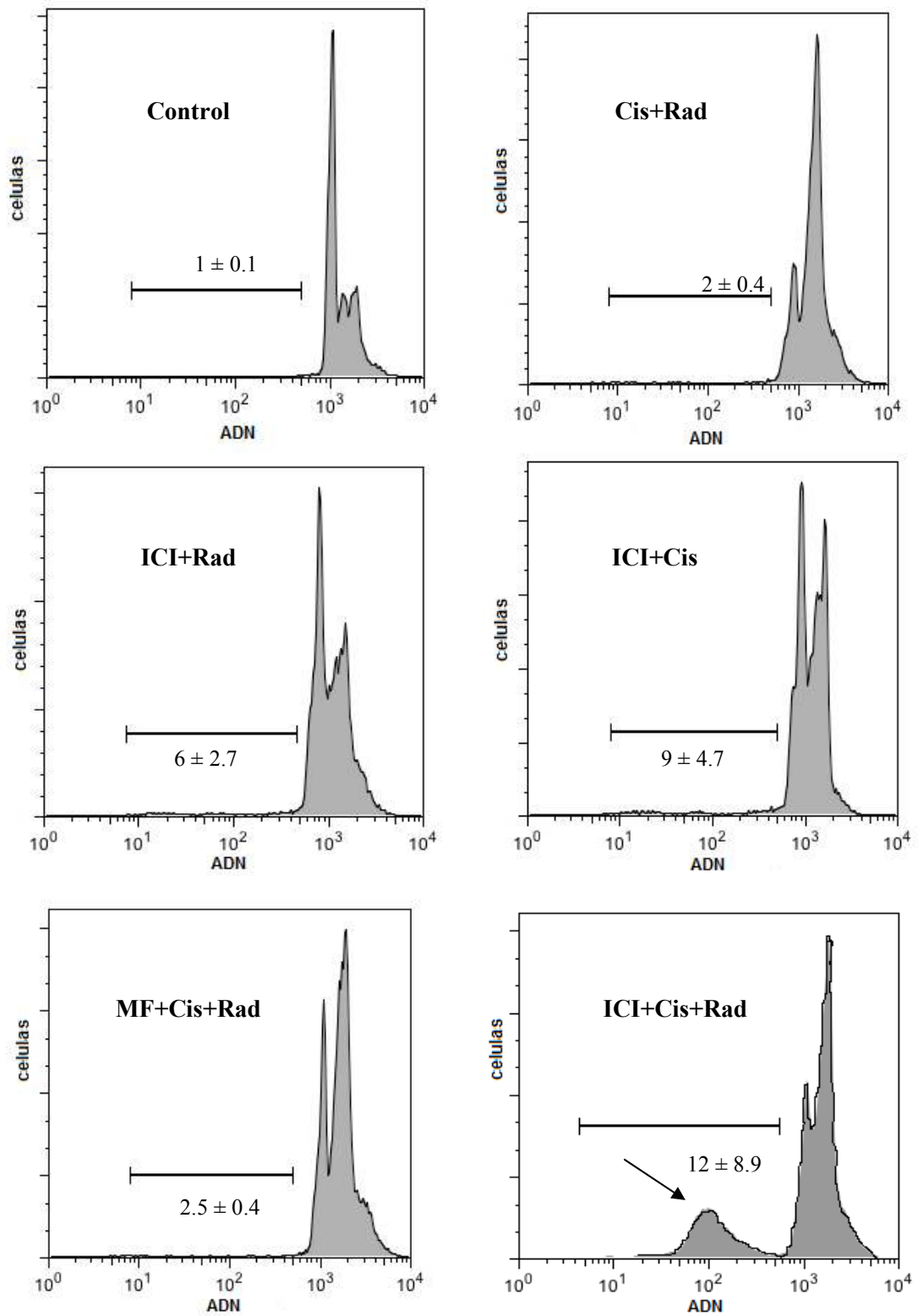


Figura 13. Histogramas representativos del pico sub-G<sub>0</sub>. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DE.

#### 8.4 Eficacia terapéutica

La eficacia terapéutica se evaluó siguiendo la velocidad de crecimiento tumoral, de los tumores de CaCu desarrollados en ratones atímicos, durante diez semanas después de los diferentes esquemas de combinación. figura 14.

Se observa que la velocidad de crecimiento tumoral para ambos agentes (MF o ICI) aplicados de manera individual, no presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Para la combinación de estos agentes con radiación, la velocidad del crecimiento del volumen tumoral siguió una tendencia parecida al grupo de radiación o cisplatino aplicados de manera individual, los cuales mostraron una disminución en la velocidad de crecimiento con respecto al grupo control. No se observó diferencia significativa en comparación con los agentes anti-hormonales aplicados de manera individual y su respectiva combinación con radiación. Las combinaciones de MF o ICI con cisplatino mostraron una disminución significativa con respecto a sus correspondientes grupos individuales; sin embargo, no se observó diferencia cuando se comparó con el grupo de cisplatino+radiación.

Cuando se aplicaron los tres tratamientos combinados (MF o ICI + Cis+Rad), no se observó crecimiento de los tumores en ambos grupos, mostrando una clara diferencia significativa contra el grupo control, los tratamientos individuales, las combinaciones de agentes anti-hormonales con cisplatino o con radiación y contra el grupo de la terapia estándar (Cis+Rad).

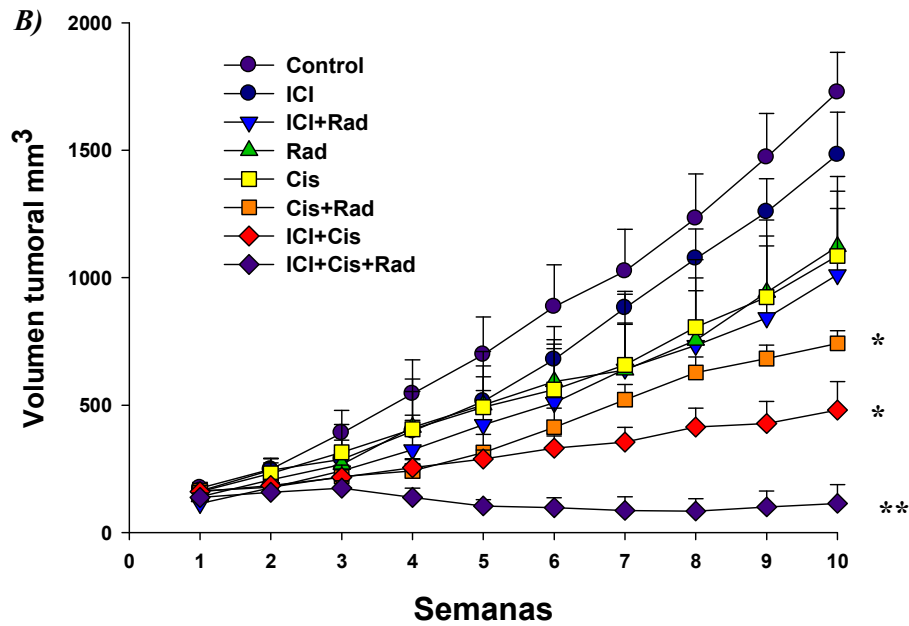
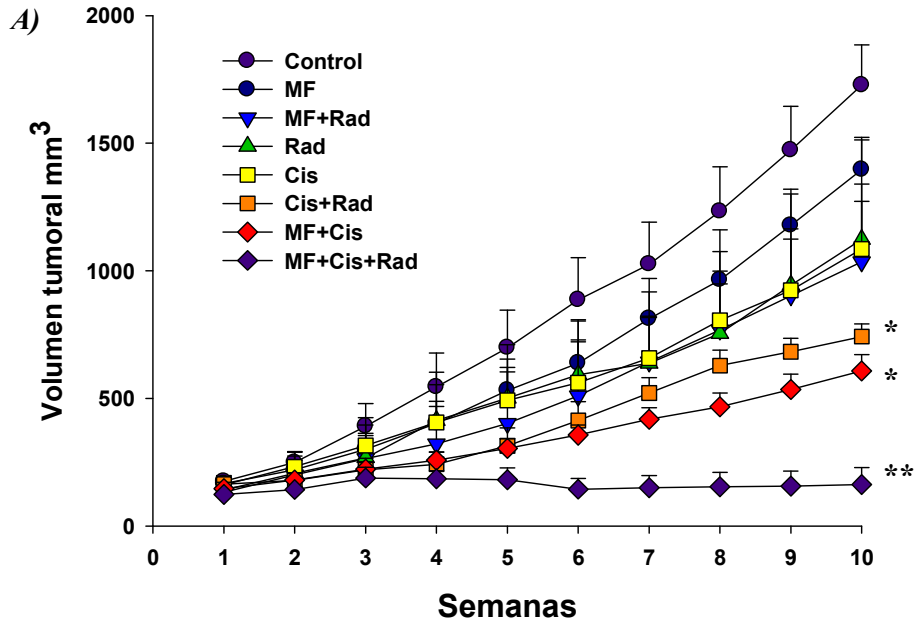


Figura 14. Volumen tumoral en ratones atímicos evaluados durante diez semanas con los diferentes tratamientos. A) Tratamientos con Mifepristona (MF+Rad, MF+Cis, MF+Cis+Rad), B) Tratamientos con ICI (ICI+Rad, ICI+Cis, ICI+Cis+Rad). Cada punto representa el promedio de 5 animales  $\pm$  EE.

\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los grupos individuales y combinaciones (Control, Rad, Cis, MF, ICI, MF+Rad, ICI+Rad) ( $p < 0.05$ ).

\*\* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los grupos individuales y a las combinaciones (Control, Rad, Cis, MF, ICI, MF+Rad, ICI+Rad, MF+Cis, ICI+Cis y Cis+Rad) ( $p < 0.001$ ).

El incremento del volumen tumoral al inicio y final del tratamiento con cisplatino+radiación solo o combinado con MF o ICI, se muestra en la figura 15. Se observa que para el grupo control el crecimiento del tumor fue de 10 veces su volumen inicial; mientras que para el grupo que recibió únicamente cisplatino+radiación este incremento fue de 4.5 veces; sin embargo, en los ratones que recibieron de manera adicional MF o ICI, su volumen tumoral inicial y final no se modificó, incluso se presentó una ligera disminución en el grupo que recibió ICI.

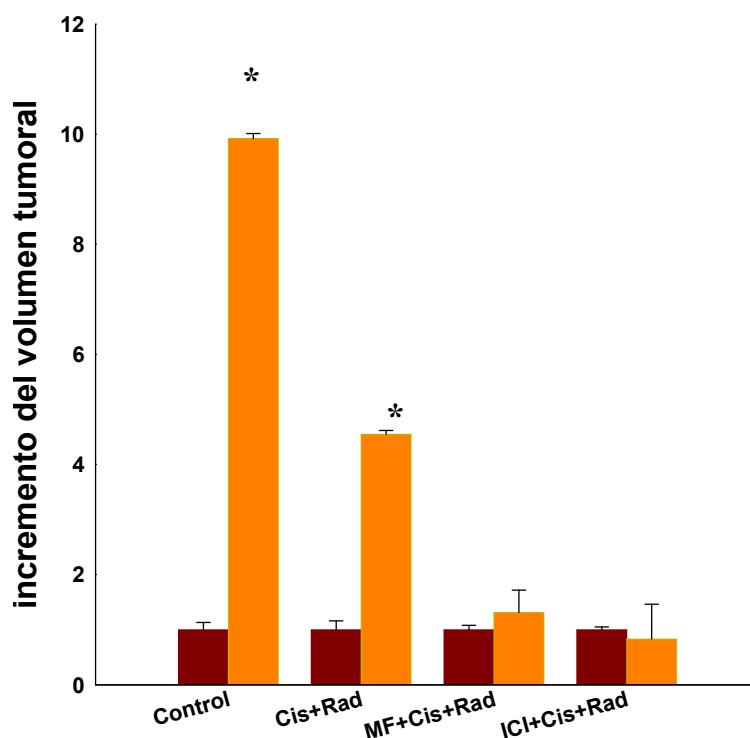


Figura 15. Incremento del volumen tumoral de los xenotransplantes al inicio y final de los tratamientos.  
 \* Diferencia estadísticamente significativa con respecto a su volumen inicial. Cada punto representa el promedio de 5 animales  $\pm$  EE.

### 8.5 Toxicidad sistémica

La evaluación de la toxicidad sistémica de los tratamientos (representada por el cambio en el porcentaje de peso corporal) a lo largo del periodo de evaluación, se muestra en la figura 16. Se observa que la aunque la combinación de ICI con cisplatino-radiación parece disminuir el peso corporal alrededor de la semana 6, al final del tratamiento no se presentó una disminución en el peso con un valor superior al 20%, sugiriendo que las combinaciones

planteadas en este trabajo no tienen una toxicidad elevada en cuanto a pérdida de peso se refiere.

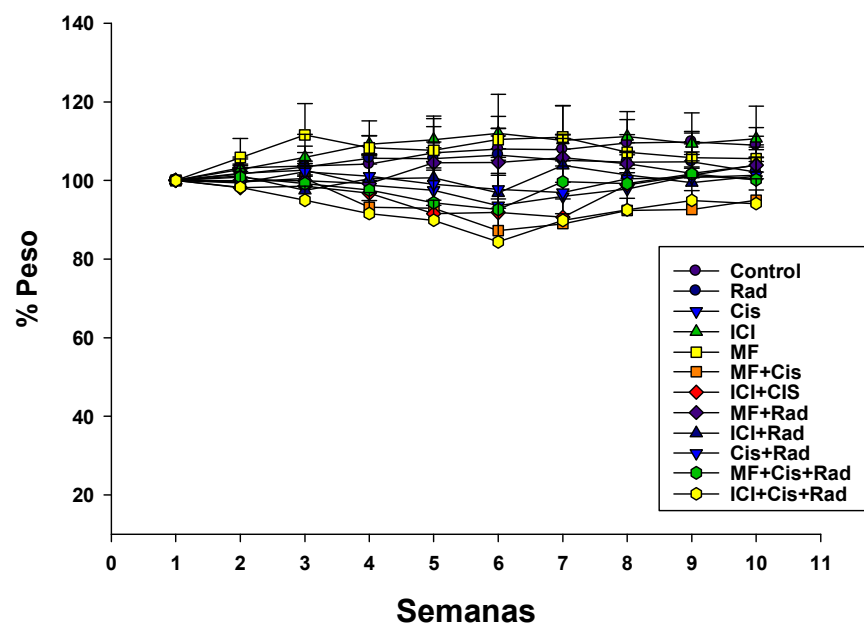


Figura 16. Porcentaje de peso corporal de ratones atímicos sometidos a los diferentes tratamientos  $\pm$  D.E.

## 9. DISCUSIÓN

Actualmente el tratamiento de elección para el cáncer cervical avanzado es la combinación de cisplatino y radioterapia. Sin embargo, este tratamiento genera desarrollo de resistencia y efectos secundarios severos (124). Pese a lo anterior este tratamiento ha mostrado ser el más eficaz en estadios tempranos con un porcentaje de sobrevida de un 90%, mientras que para estadios avanzados el porcentaje de sobrevida ha sido de un 17%, así que en los últimos años se han realizado diversos estudios con la finalidad de incrementar la respuesta en pacientes en estadios avanzados. Una de las razones de la falta de respuesta al tratamiento es que se ha observado que los tumores cervicales en estadios avanzados contienen células radioresistentes que se asocian con el decremento del control local y supervivencia del tumor, por lo que la búsqueda de nuevos agentes que mejoren la respuesta biológica de la radiación ha sido uno de las líneas de investigación con mayor atención en los últimos años.

Un factor importante ligado a la falta de respuesta de los tumores cervicales hacia la radiación, es la inactivación funcional de p53 por las oncoproteínas virales del HPV particularmente E6, dando lugar al fenotipo celular radioresistente debido a la reducción significativa de la apoptosis celular (125). Además de la elevada presencia de alteraciones en la vasculatura celular y de condiciones hipóxicas favorecidas por el microambiente tumoral (126).

En el presente estudio nos planteamos investigar si dos agentes anti-hormonales MF e ICI presentan un efecto radiosensibilizante en una línea celular de CaCu (HeLa) y en un modelo *in vivo*.

Las dosis individuales de radiación o cisplatino que se utilizaron en estos ensayos no presentaron más allá de un 25% de muerte; mientras que las dosis utilizadas de cada uno de los agentes anti-hormonales fue de 10  $\mu$ M, la cual representa la dosis que ha demostrado un efecto quimiosensibilizante sobre cisplatino en estudios previos realizados en otras líneas celulares y sobre líneas de CaCu (116, 127, 128, 129). En este trabajo estas dosis tampoco presento un efecto significativo cuando se aplicaron individualmente.

Los resultados del ensayo clonogénico sugieren que ambos anti-hormonales tienen un efecto radiosensibilizante *per se* en esta línea celular; la disminución en el porcentaje de sobrevivencia celular fue casi en un 100% cuando se aplicaron los agentes anti-hormonales en combinación con cisplatino y radiación, lo que sugiere una participación importante de los mecanismos de cisplatino en la radiosensibilización con agentes anti-hormonales. Además, también se encontró que con el esquema de concentraciones utilizado se presentó un efecto quimiosensibilizante con cisplatino, lo cual se ha descrito ya en estudios previos.

Existen pocos reportes sobre el uso de estos agentes anti-hormonales y su combinación con radiación en cáncer cervical. Kamradt y cols. en el año 2000 reportaron que la administración de MF a la concentración de  $1\mu\text{M}$  30 min antes de la radiación incrementó la radiosensibilidad celular en una línea de CaCu (C4-1) fenotipo VPH 18 favoreciendo la apoptosis por el restablecimiento de la expresión de p53 a través de la modulación de las oncoproteínas virales E6/E7. Se sabe que la expresión de éstas es controlada por la región regulatoria *upstream* (URR) del VPH la cual contiene elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE's) que pueden ser inhibidos por la acción de MF (106).

En nuestro trabajo el periodo de exposición celular con MF, antes de la radiación, fue mayor al evaluado en el trabajo de Kamradt et al, ambos estudios sustentan que la presencia de MF juega un papel importante en la radiosensibilización celular. Por lo que, uno de los mecanismos involucrados pudiera ser un mecanismo sinérgico mediado por p53.

De acuerdo con Tillmans et al, y Nair y cols, quienes sustentan que p53 muestra una participación importante en la radiosensibilización celular de líneas de CaCu (88, 90), también existen otros trabajos los cuales han observado que la radiosensibilización se puede producir por mecanismos independientes a p53 como el incremento de expresión de proteínas ATM y  $\gamma\text{H2X}$ , las cuales están implicadas en la respuesta de daño al ADN (130).

Algunos otros mecanismos moleculares propuestos que podrían participar en la radiosensibilización por mifepristona en células de cáncer cervical se mencionan a continuación:

Se ha descrito que MF inhibe el factor de transcripción de las Hsp90 (131), la disminución de estas proteínas está involucrado con el aumento de la radiosensibilidad en diversas líneas tumorales ya que dichas proteínas participan en múltiples vías de señalización que están involucradas con la reparación de daño del ADN, activación de puntos de control del ciclo celular, proliferación, sobrevivencia y apoptosis, entre otras (132, 133). Así mismo dichas proteínas se han relacionado con la activación de HIF-1 y VEGF (134, 135, 136), mismos que se han descrito como los causantes de la falta de la respuesta al tratamiento para muchos tipos de cánceres, favoreciendo la radioresistencia y las condiciones de progresión y metástasis; por lo que su inhibición se ha relacionado con el aumento de la radiosensibilidad en varias líneas tumorales y su respuesta a la radiación (137, 138, 139). Por otro lado se ha observado que MF inhibe proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e induce la activación de proteínas pro-apoptóticas (Bax) (140), por lo que se relaciona con el aumento de apoptosis celular, así mismo se ha relacionado con el estrés del retículo endoplásmico y la activación de caspasas 3, 8 y 9, mismas que inducen muerte celular y se relacionan con una mejor respuesta a la radiación (141), al mismo tiempo que podrían ser mecanismos que potencien la actividad citotóxica del cisplatino.

Otro de los mecanismos que pudiera estar presente en la contribución del incremento en la radiosensibilidad celular se explica debido a que se ha observado que MF actúa inhibiendo la expresión de la IL-6, la cual es una citosina inflamatoria y generalmente se encuentra expresada en varios tipos de cáncer debido a la inflamación constante (142), además se ha relacionado a esta citosina con el aumento de radioresistencia debido a que inhibe la apoptosis e induce sobrevivencia celular ya que potencializa la sobre regulación de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl2, específicamente a Bcl-XL (143), y también se le ha involucrado con la inducción de la expresión de VEGF, mismo que presenta estrecha relación con el aumento de radioresistencia (144).

En el caso del uso del antiestrogénico ICI 182,780 como radiosensibilizante en CaCu no se han encontrado reportes a la fecha. Algunos estudios realizados con células MCF-7 de cáncer de mama han reportado que la presencia del ICI parece no alterar la sensibilidad de las células a la radiación (145); sin embargo, nuestros resultados demostraron que este antiestrogénico tiene un efecto sobre la sensibilización a la radiación en la línea tumoral HeLa probada en nuestros experimentos.



Se ha descrito también que algunas isoflavonas derivadas de plantas como la genisteína, presentan una actividad antiestrogénica inhibiendo el crecimiento y supervivencia de células MCF-7 por medio del bloqueo de receptores tirosina cinasa como IGFR-1 (119), también muestran un efecto radiosensibilizante e inductor de apoptosis sobre la línea de cáncer cervical CaSki en combinación con radiación gamma. Uno de los mecanismos involucrados reportado en dicho estudio fue el arresto de las células en la población G2-M del ciclo celular, y la inhibición en la expresión de NFκβ y AKT (120); estos resultados sugieren que probablemente el ICI podría presentar su efecto radiosensibilizante en CaCu a través de mecanismos moleculares similares, lo cual debemos probar en futuros estudios.

Algunos mecanismos involucrados en el efecto de radiosensibilidad celular e ICI es la participación del IGFR-1 (146). Se ha demostrado que cuando el antiestrogénico ICI inhibe este receptor se bloquean vías de señalización que presentan una estrecha relación con la radiosensibilidad celular como la vía PI3k/AKT y las Ras/Raf/MAPKs las cuales son vías mitogénicas que están involucradas con la proliferación celular y la inhibición de apoptosis (147). Además existen antecedentes en la literatura que sustentan que el IGFR-1 es una diana importante para la radiosensibilización ya que se ha visto que al inhibirlo se produce una re-sensibilización a la radiación (148). Se ha relacionado también la vía PI3k/AKT y la activación directa del IGFR-1 con sensibilidad a la radiación en células de leucemia (149).

Por lo que en el presente trabajo además de evaluar el porcentaje de sobrevivencia celular en la línea HeLa, también se evaluó la distribución de las células en el ciclo celular después de la exposición a cisplatino-radiación con o sin los agentes anti-hormonales.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que con la aplicación de los tratamientos individuales, el porcentaje de células se incrementa en la fase S comparados contra el grupo control.

Para el ICI se ha reportado que tras su administración a una concentración de 1μM por 48 horas en células de cáncer de mama MCF-7 positivas a receptores de estrógeno, se produce un incremento en la fase G1 (150). Diversos estudios explican que este fenómeno se debe a la disminución en la expresión del gen de la ciclina D1 y el complejo Cdk2-E los cuales son proteínas necesarias para la progresión hacia la fase S (151). También se ha observado en

las mismas células que la inhibición de las proteínas del ciclo celular varía en función del tiempo de tratamiento con dicho agente. Se ha reportado también que ICI incrementa la expresión de inhibidores de ciclinas: p27<sup>kip1</sup> y p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, contribuyendo con ello al arresto en dicha fase (152).

Existen reportes que demuestran que MF a concentraciones micromolares incrementa el porcentaje de células en la fase G1 en una línea de cáncer de mama que no expresa el PR (MDA-MB-231) (153). Otros autores han estudiado su participación a una concentración de 20µM sobre líneas de cáncer de ovario y han observado que después de 72 horas de exposición MF reduce la síntesis de ADN, arrojando a las células en la transición de la fase G1 a la S, además de que incrementa la expresión de inhibidores del ciclo celular como p27<sup>kip1</sup> y p21<sup>cip1</sup>, disminuyendo la actividad de la ciclina E y Cdk2 (128).

Lo anterior sugiere que para ambos agentes anti-hormonales el efecto citostático que se presenta se debe a un arresto en la población G0-G1 del ciclo celular. Sin embargo, el incremento en dicha fase no se observó en los resultados presentados, en los cuales con la aplicación de ambos agentes se incrementaron de manera estadísticamente significativa el porcentaje de células en la fase S con respecto al control sugiriendo que las células pueden estar metabólicamente activas después de un periodo de exposición prolongado, el cual fue de 120 horas para ambos agentes, lo anterior se podría explicar a que posiblemente las células tuvieron un incremento en la población G0-G1 por un tiempo por cierto intervalo de tiempo y finalmente hubo una progresión hacia la fase S, además de que es una línea diferente no dependiente de hormonas.

El incremento observado en la fase S tras la aplicación de cisplatino y radiación de manera independiente se sustenta con reportes previos donde se ha descrito el incremento de la misma, debido a la presencia de aductos y al nivel de daño provocado en el ADN para líneas de cáncer de ovario (A2780) (154, 155), líneas de osteosarcoma (GK41) (156), y en células de cáncer de colon. (157). También se ha reportado que cuando una célula es expuesta a radiación ionizante, los niveles de la proteína p53 se incrementan y posteriormente esta proteína activa un gran número de genes, incluyendo el gen p21, el cual tiene una participación importante como regulador del ciclo celular, arrojando a las células

en la fase S (158). Este fenómeno se ha observado tras la exposición tanto a dosis elevadas como dosis muy bajas de radiación, debido al decremento en la expresión de la ciclina D1 y de cdk4 (159).

Es importante destacar que a pesar de que la mayoría de combinaciones evaluadas en este trabajo incrementaron el porcentaje celular en la fase S, la combinación de cisplatino con radiación mostró un incremento mayor. Dicha combinación es la que actualmente se usa en clínica para tratar el CaCu debido a que ha mostrado tener un efecto sinérgico e inductor de apoptosis no solo para dicha patología sino también se ha visto en otros tipos de cáncer (160). El efecto observado con este puede deberse a un mecanismo mediado por p53.

En un estudio de García y cols. en el cual se reportó que al combinar ICI a una concentración 10 $\mu$ M con cisplatino a una concentración 63 $\mu$ M sobre la línea de cáncer cervical HeLa se incrementó el porcentaje de células en la población G2-M (105), lo cual no se observó en este trabajo, debido probablemente a la concentración de cisplatino a la que fueron expuestas, ya que se ha reportado que el perfil del ciclo celular para un mismo fármaco varía de acuerdo a su concentración (161). Una propuesta es que quizás al estar arrestadas en fase S están tratando de reparar el daño producido. Los resultados aquí mostrados concuerdan con un reporte del año 2000 de Ercoli et al, en donde al combinar ICI (1 $\mu$ M) y cisplatino (1 $\mu$ g/ml) sobre una línea de cáncer de ovario negativa a receptores a estrógeno se produce un efecto sinérgico mediado por un bloqueo en la fase S con la consecuente inducción de apoptosis celular, esto quizá por las concentraciones bajas utilizadas (116). Por su parte se ha reportado que al combinar MF con cisplatino sobre una línea de cáncer de ovario (OvCa) se presentó un incremento el porcentaje de células entre G1 y S, actuando por medio de la inhibición de la Cdk-2 (162), también se ha descrito que actúa por medio de la desregulación del factor E2F1 (121). Nuestros resultados concuerdan con este fenómeno, donde se observó que dicha combinación fue una de las que presentó un incremento de la fase S en mayor proporción parecido al encontrado en la combinación de cisplatino más radiación, sugiriendo la potenciación del efecto producido por cisplatino.

De manera individual ninguno de los dos agentes ha sido estudiado a profundidad en combinación con radiación sobre algún tipo de patología, se sugiere que el efecto

encontrado se deba a una serie de interacciones de mecanismos regulados por vía no genómica.

Finalmente el efecto sobre el ciclo celular de las triples combinaciones con los agentes anti-hormonales en combinación con cisplatino y radiación tuvieron un comportamiento diferente. La combinación de ICI+cisplatino+radiación provocó un incremento sobre el porcentaje de las células en la fase S, mostrando una disminución drástica sobre el porcentaje celular de la población G2-M, la disminución sobre esta última se puede correlacionar con una posible inducción de apoptosis.

Por otra parte la combinación de MF+cisplatino+radiación presentó un arresto significativo en la población G2-M del ciclo celular indicando que el efecto inhibitor sobre la proliferación celular de dicha combinación se debe precisamente a alteraciones en el ciclo celular que son imposibles de reparar y muy probablemente la célula muere apoptosis. Se ha descrito que el bloqueo en la población G2-M es un punto crucial en células que presentan algún tipo de daño, ya que células provenientes de este bloqueo pueden progresar con el ciclo o activar vías apoptóticas, provocando la muerte celular dependiendo si este daño puede ser reparado o no (163, 164).

En el presente trabajo se evaluó también la velocidad del crecimiento del volumen tumoral con respecto al tiempo. Se observó que los agentes anti-hormonales en combinación con cisplatino y radiación mostraron un efecto de radiosensibilización en xenotrasplantes, correlacionando estos resultados con los estudios *in vitro*.

Nuestros resultados *in vivo* demuestran también un efecto quimiosensibilizante al estar combinados con cisplatino, resultados que sustentan lo reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo (108).

Existen muy pocos trabajos acerca de la evaluación de sustancias radiosensibilizadoras para cáncer cervical y su evaluación sobre modelos tumorales. El estudio de Bisht *et al.* en el 2003 reportó que la combinación de dosis bajas de geldamicina y su análogo 17-alilamino-17-demetoxi (17-AAG) en combinación con radiación incrementaron la citotoxicidad de la radiación en xenotrasplantes con la línea HeLa, dicho efecto debido a que ambos agentes

inducen la degradación de las proteínas de choque térmico Hsp90 dando lugar a la desregulación de múltiples vías que intervienen en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Además se observó una desregulación de proteínas como Akt, ERK, Gltu-1, Her-2/neu y VEGF (165). Otro estudio de Shen y cols. en el 2006 evaluó xenotransplantes de cáncer cervical y la participación del IGFR-1, el cual se sabe que es un receptor implicado en procesos de progresión mitogénica, señales antiapoptóticas y metástasis y que además está sobre expresado en CaCu. En dicho estudio se inhibió al IGFR-1 observándose que cuando este se inhibe también se presenta una inhibición en la velocidad del crecimiento tumoral mediado por este mecanismo (166). Esto se correlaciona y sustenta algunos de los mecanismos propuestos por los agentes anti-hormonales descritos con anterioridad y su efecto como radiosensibilizadores debido a la desregulación de proteínas implicadas en varios procesos celulares.

El uso de los agentes anti-hormonales como radiosensibilizantes evaluados en el presente trabajo tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, proponen nuevas alternativas preclínicas en el tratamiento del CaCu. Sin embargo, es necesario caracterizar estos resultados en otras líneas y modelos experimentales de cáncer cervical, adicionalmente caracterizar los mecanismos moleculares participantes en tales efectos.

## 10. CONCLUSIÓN

De acuerdo a la hipótesis planteada, se puede concluir que los agentes anti-hormonales Mifepristona e ICI 182,780 presentaron una acción radiosensibilizante sobre la línea celular HeLa y sobre un modelo de xenotransplante.

La amplia búsqueda de efectos citotóxicos y radiosensibilizantes producidos por los fármacos sobre el ciclo celular es un paso clave para determinar su eficacia en la aplicación clínica. En este trabajo se mostró el efecto de dos anti-hormonales sobre la radiosensibilización y la distribución del ciclo celular en una línea de CaCu y sus combinaciones con cisplatino, radiación y con ambos.

Uno de los mecanismos propuestos es el arresto en la población G2-M, la cual se ha descrito como la fase más radiosensible; sin embargo, esta hipótesis se presentó únicamente con la combinación de mifepristona, cisplatino y radiación, no así para el caso de las combinaciones con ICI; en los cuales se presentó un incremento de la población celular de la fase S; además la presencia del incremento de la población celular en la fase Sub-G0 sugiere la participación de proteínas implicadas en la vía apoptótica.

Los resultados en el modelo experimental mostraron que estos agentes antihormonales también presentaron un efecto radiosensibilizante; sin embargo, este se observó únicamente cuando se administraron en combinación con cisplatino.

Ninguna de las combinaciones evaluadas presentó toxicidad sistémica evaluada por la pérdida de peso corporal.

## **11.- PERSPECTIVAS A FUTURO**

- Dilucidar mecanismo de acción del efecto radiosensibilizante por medio de la expresión de proteínas implicadas en ciclo celular o en la inducción de muerte celular.
- Evaluar efecto de estos dos agentes sobre líneas de cáncer cervical con fenotipos diferentes a VPH 18.
- Evaluar el efecto de estos agentes anti-hormonales en células de tumores primarios de pacientes con cáncer cervical que presenten radioresistencia.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp> (Globocan 2011). Consultado el día 20 de febrero de 2011).
- 2.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales. [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/estadisticas/2011/cancer.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/estadisticas/2011/cancer.doc)). Consultado el día 4 de febrero 2011.
- 3.- Chun S, Lambert P. Prevention and treatment of cervical cancer in mice using estrogen receptor antagonists. *PNAS* 46:19467-19472, 2009.
- 4.- von Knebel D. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European Journal of Cancer* 38: 286-295, 2002.
- 5.- Thomas M, Pim D, Bankis L. The role E6-p53 in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18:7690-7700, 1999.
- 6.- [www.cancer.org](http://www.cancer.org). (American Cancer Society) Consultado el día 21 de marzo del 2011
- 7.- Varaj H. Antihormonal agents on the citotoxicity increase of anticancer drugs in cervical cancer. Editorial Nova Science Publishers. Inc. Huappage N.Y. ISBN 1-60021-299. 61-88, 2007.
- 8.- Organización Mundial de la Salud 2005.
- 9.- Gandara D. Cisplatin chemoprotection and rescue: pharmacologic modulation of toxicity. *Semin Oncol* 18: 49-55, 1999.
- 10.- Cetina L, Wegman T, García A. Candelaria M. Dueñas A. Radiosensibilizantes en cáncer cérvico uterino. *Cancerología* 1: 4-29, 2006.
- 11.- Kroemer G., Pouyssegur J. Tumor cell metabolismo: Cancer's achilles' heel. *Cell Pres* 13: 472-482, 2008
- 12.- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). *Cáncer*. Nota descriptiva No. 297 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>). Consultado el día 18 de febrero del 2011.
- 13.- [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../2010/cancer10.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../2010/cancer10.doc)). Consultado el día 15 mayo 2011.
- 14.- Secretaría de Salud [SSA] (2008). Programa de Acción específico 2007-2012. Cáncer de mama. <http://www.spps.gob.mx/programas-y-proyectos/cancer-de-mama.html>. Consultado el día 15 mayo 2011.
- 15.- National Cancer Institute of U.S.A ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Consultado el día 26 de mayo 2011.



- 16.- Gunderson & Tepper. Clinical Raiation Oncology. Churcill Livingstone, 2003.
- 17.- Compendio de cáncer. 2001 (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm>). Consultado el día 5 de marzo 2011.
- 18.- Hardman G. Joel, Limbirol E. Lee, Ruddon W. Raymond y Gilman Goodman Alfred. Las bases biológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill. Interamericana. 9ª edición, vol II. 1996.
- 19.- Bland K.I., Menck H.R., Scott-Conner C.E., et al.; “The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States”, Cancer 83:1262-1273, 1998.
- 20.- Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature 205 (4972): pp. 698–699, 1965.
- 21.- Felicitos Santos Garza, Elva Karina González Álvarez, Jesus Gerardo Molina, Ototoxicidad por cisplatino. Artículo de revisión. Medicina Universitaria 4:230-232, 2002.
- 22.- Banfi B, et al. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. J Biol Chem. 44:46065–72, 2004.
- 23.-Ikari A, et al. Sodium-dependent glucose transporter reduces peroxynitrite and cell injury caused by cisplatin in renal tubular epithelial cells. Biochem Biophys Acta 2:109–17, 2005.
- 24.- Rabik C, Dolan M. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer Treat Rev. 33, 9– 23, 2007.
- 25.- Placencia C. Carmen y Esteve A. Albert. Actividad *in vitro* de Oxoplatino y otros fármacos y demostración de la reversión de la resistencia a 5- fluorouracilo. Tesis Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. 2002.
- 26.- Kelland Lloyd. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nature Rev Cancer. 574 – 584, 2007.
- 27.- Morales A. José. “Quimioterapia antineoplásica”. Biocáncer 1, 2004.
- 28.- O’Leary S, Klis S, Grott J. Perilymphatic application of cisplatin over several days in albino guinea pigs: dose-dependency of electrophysiological and morphological effects. Res 154: 135-145, 2001.
- 29.- Tubiana M. Introduction to Radiobiology. Ed. Taylor & Francis. 1990.
- 30.- Rickards J. Las radiaciones II. El manejo de las radiaciones nucleares. Fondo de cultura económica. 2005.
- 31.- Horwich A. The future of radiotherapy. Radiother Oncol 19: 353-356, 1990.

- 32.- <http://proteccionradiologica.wordpress.com/category/8-radiobiologia>. Consultado el día 15 de junio de 2011.
- 33.- Ramos A, Heryás A., Montero A., Morera R., Sancho S., Córdoba S., Corona J., Rodríguez I. La oncología radioterápica moderna: situación actual. *Psico-oncología* 1: 13-30, 2004.
34. <http://www.google.com.mx/imgres?q=effect+of+free+radicals+in+cell+membranes&um=1&hl=es&sa=N&tbm=isch&tbid=y95eBH3mmxdyKM:&imgrefurl>. Consultado el día 23 de marzo del 2009.
- 35.- National Institutes of Health Consensus Development Conference statement on cervical cancer. *Gynecol Oncol* 66:351-361, 1997.
- 36.- Hami L, Grigsby P, Gordon W Jr, Alberts DS: Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 18:1606-1613, 2000.
- 37.- Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL, Walker JL, Gersell D: A comparison of weekly cisplatin during therapy versus irradiation alone each followed by adjuvant hysterectomy in bulky stage IB cervical carcinoma: a randomized trial of the Gynecology Oncology Group. *New Engl J Med* 340:1154-1161, 1999.
- 38.- FIGO. 25th. Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynecol Obstet*.
- 39.- Ramos A, Heryás A., Montero A., Morera R., Sancho S., Córdoba S., Corona J., Rodríguez I. La oncología radioterápica moderna: situación actual. *Psicooncología* 1: 13-30, 2004.
- 40.- Polyak K, Xia Y, Zweler J. A model for p53 induced apoptosis. *Nature* 389: 300-305, 1997.
- 41.- Fernet m, Mégnin F, Hall J, Favaudon V. Control of the G2/M checkpoint after exposure to low doses of ionizing radiation: Implications for hyper radiosensitivity. *DNA Repair*. 1:48-57, 2010.
- 42.- Xu B, Tae S, Lim D, Kastan M. Two molecularly distinct G2/M checkpoint are induced by ionizing irradiation. *Molecular and cellular biology*. P.p. 1049-1059, 2002.
- 43.- Herzog K, Chong M, Kapsetaki M, Morgan J, Mckinnon P. Requirement of ATM in ionizing radiation induced cell death in the developing central nervous system. *Science* 280: 1089-1091, 1998.
- 44.- Sarcaria J, Eshleman J. ATM as a target for novel radiosensitizers. *Semin Radiat Oncol* 4: 316-327, 2001.

- 45.- Bassing C, Chua K, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow S, Fleming J, Monroe B, Vlasakova K. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *PNAS* 99: 8173-8178, 2002.
- 46.-Abraham, R. *Genes Dev* 15: 2177-2196, 2001.
- 47.- Mah L, Osta A, Karagiannis T.  $\gamma$ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24: 679-686. 2010.
- 48.- Stiff T, O'Driscoll M. H2AX after exposure to after exposure to ionizing radiation ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate. *Cancer Res* 64: 2390-2396, 2004.
- 49.- Mosby's Medical Dictionary. Elsevier. 8<sup>th</sup> Edition, 2009.
- 50.- Neckers L, Schulte T, Mimnaugh E. Geldamycin as a potencial anti-cancer agent: nits molecular target and biochemical activity. *Invest New Drugs* 17: 361-73, 2000.
- 51.- Wegele H, Müller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90. A relay team from protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 1-44, 2004.
- 52.- Zhan M, Han Z. Phosphatidylinositide 3 kinase/AKT in radiation responses. 19: 915-923, 2004.
- 53.- Anjali K, Gupta V, Badanauskas J, Cerniglia J, Cheng Y, McKenna G. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Research* 61: 4278-4282, 2001.
- 54.- Bull E, Dote H, Kristin J. Enhanced tumor cell radiosensitivity and abrogation of G2 and S phase arrest by the Hsp90 inhibitor 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldamycin. *Clinical Cancer Research* 10: 8077-8084, 2004.
- 55.- Neckers L. Heat shok protein 90: the cancer chaperone. *Jorunal of Bioscience* 32: 517-530, 2007.
- 56.- Dungey F, Keith W, Chalmers A. Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90. *Molecular Cancer Therapy* 8: 2243-2254, 2009.
- 57.- Siles E, Villalobos M, Valenzuela M, Núñez M, Gordon A, Mc Millan T, Pedraza V, Ruiz JM. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumor cell lines. *British Journal of Cancer* 73: 581-588,1996.
- 58.- Kastan M, Onyekwere O, Sidransky D. Participation of p53 protein in cellular response to DNA damage. *Cancer Research* 51: 6304-6311, 1991.
- 59.- Wang X, Wang Y, Tsang N, Kelsey Y, Liber H. Altered p53 status correlation with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Research* 55: 12-15, 1995.
- 60.- Fernández J, Pérez V. El receptor del egf (EGFR). Una diana terapéutica para el tratamiento de cáncer y sus inhibidores. *Bio Cancer Research Journal*, 2006.

- 61.- Herbst RS, Bunn P. Jr. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 9: 5813-5824, 2003.
- 62.- Satoru S, Kiyota P, Akihisa D, Mihara P, Mariko S, Tomoki K, Hiroaki N, Koh-I H. Enhancement of radiosensitivity in head and neck cancer cells by ZD 1839 (IRESSA), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *American Journal of Clinical Oncology* 26: e150-e156, 2003.
- 63.- Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19:6560-6565, 2000.
- 64.- Dent P, Yacoub A, Contessa J. Stress and radiation induce activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiation Research* 159:283-300. 2003.
- 65.- Legue F, Guitton N, Brouazin V, Collet-Durel K. IL-6 a key cytokine in in vitro and in vivo response of Sertoli cells to external gamma irradiation. *Cytokine* 16:232-238, 2001.
- 66.- Miyamoto Y, Hosotani R, Doi R, Wada M, Tsuji S, Kawaguchi M, Nakajima S, Kobayashi H, Imamura M. Interleukin 6 inhibits radiation induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Anticancer Research* 21: 2449-2456, 2001.
- 67.- Chung T, Yu J, Kong A, Spiotto T, Lin M. Interleukin 6 activates phosphatidylinositol 3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 42:1-7, 2000.
- 68.- Zhou D, Chen Yu, Brown S, Yu Z, Mattson P, Thompson J. Effects of NF $\kappa$ B activation and TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression in vivo. *Int. J. Radiation Biology* 77:763-772, 2000.
- 69.- Johnson G, Lapadat. Mitogen activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912, 2002.
- 70.- Forythe J, Jiang B, Narayan V, Agani F, Leung S. Activation of Vascular endothelial growth factor gene transcription by Hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*, 4604-4613, 1996.
- 71.- Gray LH, Conger A, Ebert M, Hornsey S, Scott O. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *British Journal of Radiology* 26: 638-648, 1953.
- 72.- Masui T, Hosotani R, Doi R, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Kobayashi H, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Imamura M. Expression of IL-6 receptor in pancreatic cancer: involvement in VEGF induction. *Anticancer Research* 22:4093-100, 2002.
- 73.- Zachary I, Glick G. Signal transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular Research* 49: 568-581, 2001.
- 74.- Gorski D, Beckett M, Jaskowiak N. Blockade of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Research* 59: 3374-3378, 1999.
- 75.- Baserga R, Prisco M, Yuan T. IGF-1 receptor signaling in health and disease. *Landes Bioscience* 120-140, 2002.

- 76.- Morrione A, Romano G, Navarro M, Reiss K, Valentinis B, Dews M, Eves E. Insulin-like growth factor I receptor signaling in differentiation of neuronal H19-7 Cells. *Cancer Research* 60:2263-2272, 2000.
- 77.- Yavari K, Taghikhani M, Ghannadi M, Seyed A, Namin M, Hosein M, Jabbary A, Madani H, mirzaei H. SiRNA-mediated IGF-1R inhibition sensitizes human colon cancer SW480 cells to radiation. *Acta Oncológica*, 49: 70–75, 2010.
- 78.- Turner B, Haffty B, Narayanan L. Insulin-like growth factor receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Research* 57:3079-3083, 1997.
- 79.- Jeffrey M, Kwang W, Cao C, Lu Bo. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 5:1183-1189, 2006.
- 80.- Bellacosa A, Testa J, Staal S, Tsichlis P. A retroviral oncogene encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254: 274-277, 1991.
- 81.- Chan T, Rittenhouse S, Tsichlis P. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annual Review Biochemical* 68: 965-1014, 1999.
- 82.- Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci* 96:4240–5, 1999.
- 83.- Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci* 98:10983–5, 2001.
- 84.- Rosenzweig KE, Youmell MB, Palayoor ST, Price BD. Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmanin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay. *Clinical Cancer Research* 3:1149–56, 1997.
- 85.- Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to radiation. *Cancer Research* 61:3986–97, 2001.
- 86.- Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clinical Cancer Research* 8:885–92, 2002.
- 87.- Banfi B. NOX 3, a superoxide generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 44: 46065-72, 2004.
- 88.- Kim K, Seol J, Jeon G, Nam M. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl2 and caspase 3 in human cervical cancer. *Cancer letters* 28, 189, 157-166, 2003.

- 89.- Nair S, Nair R, Srinivas P, Srinivas G, Pillai. Radiosensitizing Effects of Plumbagin in Cervical Cancer Cells Is Through Modulation of Apoptotic Pathway. *Molecular Carcinogenesis*. 47, 22-33, 2008.
- 90.- Tillmans T, Kamelle A, Guruswamy S, Gould N, Rutledge T, Benbrook D. Sensitization of cervical cancer cell lines to low-dose radiation by retinoic acid does not require functional p53. *Gynecologic Oncology*. 97 142-150, 2005.
- 91.- Serkies, K., Jassem J. Chemotherapy in the primary treatment of cervical carcinoma. *Critical Review Oncology and Hematology*. 54: 197-208, 2005
- 92.- Candelaria M, Garcia-Arias A, Cetina L and Dueñas-Gonzalez. Radiosensitizers in cervical cancer. Cisplatin and beyond. *Annual of Radiation Oncology* 1.15, 2006.
- 93.- Rao GG, Rogers P, Drake RD, Nguyen P, Coleman RL: Phase I clinical trial of weekly paclitaxel, weekly carboplatin, and concurrent radiotherapy for primary cervical cancer. *Gynecology Oncology*, 96:168-172, 2005.
- 94.- Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E: Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer*, 4:38, 2005.
- 95.- De Vicenzo R. Modulatory effects of tamoxifen and ICI 182,780 on adriamycin resistance in MCF-7 human breast-cancer cell. *International Journal of Cancer* 68: 340-348, 1996.
- 96.- Drucker L. Tamoxifen enhances apoptotic effect of cisplatin on primary endometrial cell cultures. *Anticancer Research* 23: 1549-1554, 2003.
- 97.-Freeburg E, Goyeneche A, Seidel E, Telleria C. Resistance to cisplatin does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to mifepristone cytotoxicity. *Cancer Cell International* 9: 2009.
- 98.- Spitz I, Bardin W, Benton L, Robbins A. Early pregnancy termination with mifepristone and misoprostol in the United States. *The new England Journal of medicine*. 338:18 1241-1247, 1998.
- 99.- Baulieu E. Contraception and other applications of RU 486, and anti-progesterone at the receptor. *Science*. 245, 1989.
- 100.- Chilov D, Kukk E, Taira S. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor. *Clinical Journal of Biology and Chemistry* 272, 1997.
- 101.- Mojtabehi Z, Khademi B, Hashemi S, Abtahi S, Ghasemi M, Fattahi M, Ghaderi A. Serum interleukin-6 concentration, but not interleukin-18 is associated with head and neck squamous cell carcinoma progression. *Pathology and Oncology Research* 1: 7-10, 2010.
- 102.- D'Acquisto F, May M, and Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NFκB): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *molecular interventions*. 22-35, 2002.

- 103.- El Etreby MF, Liang Y, Wrenn RW, *et al*: Additive effect of mifepristone and tamoxifen on apoptotic pathways in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 51: 149-168, 1998.
- 104.- Qin T, Wan L. Enhanced sensitivity of ovarian cell line to cisplatin induced by mifepristone and its mechanism. *Academical Journal of the first medical college of PLA*. 4: 344-346, 2002.
- 105.- García P, Rodríguez M, Pérez E, Cerbón M, Mohar A. Synergistic effect of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 533-540, 2004.
- 106.- Kamradt M, Mohideen N, Vaughan A. RU486 increases radiosensitivity and restores apoptosis through modulation of HPV E6/E7 in dexamethasone treated cervical carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 77, 177-182, 2000.
- 107.- Liang Y, Hou M, Kallab AM, Barrelett J, El Etreby F, Schoenlein PV. Induction of antiproliferation and apoptosis in estrogen receptor negative MDA-231 human breast cancer cells by mifepristone and 4-hydroxytamoxifen combination therapy: a role for TGF-beta 1. *International Journal of Oncology* 23:2, 369-380, 2003.
- 108.- Jurado F, López A, Alvarez A, García P. Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: An in vitro and in vivo study. *Oncology Reports* 22: 1237-1245, 2009.
- 109.- Lu YS, Lien HC, Yeh PY. Effects of glucocorticoids on the growth and chemosensitivity of carcinoma cells are heterogeneous and require high concentration of functional glucocorticoid receptors. *World Journal of Gastroenterology* 11: 6373-6380, 2005.
- 110.- Mc Gregor. *Pharmacol Rev* 50: 151-196, 1998.
- 111.- Howell. *Br J Cancer* 74: 300-308, 1996.
- 112.- McKeage K, Curran M, Ploker G. Fulvestrant: a review of its use in hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women with disease progression following anti-estrogen therapy. *Drugs*. 64: 633-648, 2004.
- 113.-Chan TW, Pollak M, Huynh H. Inhibition of insulin-like growth factor signaling pathways in mammary gland by pure anti-estrogen ICI 182,780. *Clinical Cancer Research* 7:2545, 2001.
- 114.- Curran M, Plosker M, Greg L. Fulvestrant: A review of its use in hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women with disease progression following Antiestrogen Therapy. *Drugs* 64: 633-648, 2004.
- 115.- Howell A, DeFriend D, Blamy W, Robertson J, Walton P. Response to a specific antioestrogen (ICI 182, 780) in tamoxifen resistant breast cancer. *The Lancet* 345: 20-30, 1995.
- 116.- Ercoli A, Battaglia A, Rasaglio G, Fattorossi A, Alimonti A, Petrucci F, Caroli S, Mancuso S, Scambia G. Activity of cisplatin and ICI 182,780 on estrogen receptor negative

ovarian cancer cells: cell cycle and cell replication rate perturbation, chromatin texture alteration and apoptosis induction. *International Journal of Cancer* 1:85, 98-103, 2000.

117.-Homback N, Shen R, Shidnia H, Kaiser H. Synergistic cytotoxic and antitumor effects of irradiation and taxol on human HeLa cervix carcinoma and mouse B16 melanoma cells. *In vivo*. 8(5):819-23, 1994.

118.- Liu C, Chang H, Chen I, Chen C, Hsu M, Ful S, Chen Y. Costunolide causes mitotic arrest and enhances radiosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Radiation Oncology* 6: 2-8, 2011.

119.- Chen W, Wong M. Genistein enhances insulin-like growth factor signaling pathway in human breast cancer (MCF-7) cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(5):2351–2359, 2004.

120.- Jang-In S, Shim J, Kim K, Choi H, Kim J, Lee H, Kim B, Park S, Park O, and Yoon D. Sensitization of the apoptotic effect of  $\gamma$ -irradiation in genistein-pretreated CaSki cervical cancer cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:3, 523–531, 2008.

121.-Goyeneche A, Carón R, Telleria C. Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*. 13(11): 3370–3379, 2007.

122.- Fuhrman C, Kilgore J, LaCoursiere Y., Lee C, Milash B, Soisson A, Zempolich K. Radiosensitization of cervical cancer cells via double-strand DNA break repair inhibition. *Gynecologic Oncology* 110, 93–98, 2008.

123.- Medina L, Herrera-Penilla B, Castro-Morales M, García-López P, Jurado R, Pérez-Cárdenas E, Chanona-Vilchis J, Brandan M. Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *Journal of Experimental & Clin Can Res* 27:57, 2008.

124.-Tratamiento del Cáncer Capítulo 166. Merck Sharp & Dohme de España, S.A, 2005.

125.- Shwarts J, Russel K. The effect of functional inactivation of TP53 by HPV-E6 transormation on the induction of chromosome aberrations by gamma rays in human tumor cells. *Radiation Research* 151, 385-390, 1999.

126.- Nagy V, Brie I, Todor N, Tudoran O, Ordenau C, Virag P, Tarta O, Rus M, Balacescu O. Expression of VEGF, BEGFR, EGFR, COX-2 and MVD in cervical carcinoma, in relation with the response to radio-chemotherapy. *Rom Jounal Morphl Embryol* 52(1): 53-59, 2011.

127.- Chemosensitivity Vol 1. In vitro assays. *Methods in molecular medicine* vol.110 Edited by Rosaly D. Blumenthal. Humana Press. Pp. 21-27.

128.- Goyeneche A, Seidel E, Telleria C. Growth inhibition induced by antiprogestins RU-38486, ORG-31710, and CDB-2914 in ovarian cancer cells involves inhibition of cyclin dependent kinase 2. *Investigation New Drugs*, 2011.



- 129.-De Vincenzo R, Scambia G, Benedetti P, Fattorossi A, Bonanno G, Ferlini C, Isola G, Pernisco S, Mancuso S. Modulatory effect of tamoxifen and ICI 182,780 on adriamycin resistance in MCF-7 human breast-cancer cells. *International Journal of Cancer* 4:68(3):340-8, 1996.
- 130.- Fuhrman C, Kilgore J, LaCoursiere Y, Lee C, Milash B, Soisson A, Zempolich K. Radiosensitization of cervical cancer cells via double-strand DNA break repair inhibition. *Gynecologic Oncology* 110, 93–98, 2008.
- 131.- Wakedkar S, Perivasamy S, Sánchez E. Inhibition of heat shock transcription factor by GR. *Molecular Endocrinology* 8: 1396-410, 2001.
- 132.- Neckers L, Schulte T, Mimnaug E. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: Its molecular target and biochemical activity. *Investigation New Drugs* 17: 361-373, 2002.
- 133.- Bull E, Dote H, Brady K. Enhanced tumor cell radiosensitivity and abrogation of G2 and S phase arrest by the Hsp90 inhibitor 17 (dimethylamioethylamino) 17 demethoxygeldanamycim. *Clinical Cancer Research*: 10: 8077-8084, 2004.
- 134.- Liu Y, Semenza G. Rack1 vs Hsp90. *Cell Cycle* 6: 656-659, 2007.
- 135.- Trisciuglio D, Gabellini C, Desider M, Ziparo E, Zupi G, Del Bufal D. Bcl-2 regulates HIF-1 $\alpha$  proteína stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone Hsp90. *Plos One*, 2007.
- 136.- Bohonowych J, Gopal U. Hsp90 as a Gatekeeper of tumor angiogenesis: Clinical promise and potencial pitfalls. *Journal of Oncology*, 2010.
- 137.- Rankin E, Giaccia A. The role of hypoxia inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death and differentiation* 15: 678-685, 2008.
- 138.- Moellier B, Cao Y, Li C, Mark L. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals and stress granules. *Cancer Cell* 5: 429-441, 2004.
- 139.- Gorski D, Beckett M, Jasdowiak N, Calvin D, Mauceri H, Salloum R, Seetharan S, Koons A, Weichselbaum R. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Research* 59: 3374-3378, 1999.
- 140.- Han S, Sidell N. RU 486 induced growth inhibition of human endometrial cells involves the nuclear factor kappa B signaling pathway. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 88: 713-719, 2003.
- 141.- Gaddy V, Barret J, Delk J. Mifepristone induced growth arrest caspase activation and apoptosis of estrogen receptor expressing, antiestrogen resistant breast cancer cell. *Clin Cancer Research* 10: 5215-5225, 2004.
- 142.- Markowska J. Tumor markers in cervical cancer. *Ginekol Pol.* 9:715-718, 2007) (Mojitahedi Z, Khademi B, Hashemi S, Abtahi S, Ghasemi M, Fattahi M, Ghaderi A. Serum interleukine-6 concentration, but not interleukine-18 is associated with head and

neck squamous cell carcinoma progresión. *Pathology and Oncology Research* 1: 7-10, 2010.

143.- Miyamoto Y, Hosotani R, Doi R, Wada M, Ida J, Tsuji S, Kawaguchi M, Nakajima S, Kobayashi H, Masui T, Imamura, M. Interleukin-6 inhibits radiation induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Anticancer Research* 2449-2456, 2001.

144.- Masui T, Hosotani R, Doi R, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Kobayashi H, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Imamura M. Expression of IL-6 receptor in pancreatic cancer: involvement in VEGF induction. *Anticancer Research* 22: 4093-100, 2002.

145.- Noyes W, Mulcahy R, Craig B, Kinsella T. Effect of a pure anti-estrogen, ICI 182,780, on the in vitro radiosensitivity of MCF-7 breast carcinoma cells. *Radiation Oncology and Investigation*. 3: 232-237, 1995.

146.- Chan T, Pollak M, Huynh H. Inhibition of insulin-like growth factor signaling pathways in mammary gland by pure antiestrogen ICI 182, 780. *Clinical Cancer Research* 8: 2545-2554. 2001.

147.- Chen H, Yan G, Gishizky M. Identification of structural characteristics that contribute to a difference in anti-apoptotic function between human insulin and insulin-like growth factor I receptors. *Cell Growth Differ*. 9: 939-947, 1998.

148.- Yavari K, Taghikhani M, Ghannadi M, Seyed A, Namin M, Hosein M, Jabbary A, Madani H, mirzaei H. SiRNA-mediated IGF-1R inhibition sensitizes human colon cancer SW480 cells to radiation. *Acta Oncológica*, 49: 70–75, 2010.

149.- Cataldi A, Zauli G, Di Pietro R, Castorina S, Rana R. Involvement of the pathway phosphatidylinositol-3-kinase/AKT-1 in the establishment of the survival response to ionizing radiation. *Cell Signal* 13:369–75, 2001.

150.- McGowan E, Alling N, Jackson Martinello-Wilks R. Evaluation of cell cycle arrest in estrogen responsive MCF-7 breast cancer cells: pitfalls of the MTS assay. *PLOS ONE* 6(6): e20623, 2011.

151.- Carroll J, Prall O, Musgrove E, and Sutherland R. A pure estrogen antagonist inhibits cyclin E-Cdk2 activity in MCF-7 breast cancer cells and induces accumulation of p130-E2F4 complexes characteristic of quiescence. *The Journal of Biological Chemistry* 275:49. 38221–38229, 2000.

152.- Watts C, Brady A, Sarcevic B, DeFazio A, Musgrove E, Sutherland R. Anti-estrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation. *Molecular Endocrinology* 9(12): 1804-1813, 1995.

153.- Lin V, Tan M. Demonstration of mixed properties of RU486 in progesterone receptor (PR)-transfected MDA-MB-231 cells: a model for studying the functions of progesterone analogues. *British Journal of Cancer* 85(12),1978–1986, 2001.

- 154.- Vaisman A, Varchenko M, Said I, Chaney S. Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity. *Cytometry* 27:54–64, 1997.
- 155.- Sekiuchi I, Suzuki M, Tamada T, Shinomiva N, Tsura S, Murata M. Effects of cisplatin on cell cycle kinetics, morphological change, and cleavage pattern of DNA in two human ovarian carcinoma cell lines. *Oncology* 53(1):19-26, 1996.
- 156.- Lewis K, Lilly K, Reynolds E, Sullivan W, Kaufmann S, Cliby W. ATR contributes to cell cycle arrest and survival after cisplatin but not oxaliplatin. *Molecular Cancer Therapy*. 8(4): 855–863, 2009.
- 157.- Volland C, Bord A, Péleraux A. Repression of cell cycle related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cell. *Molecular Cancer Therapy* 5:2149-2157, 2006.
- 158.- Sheen J and Dickson R. Overexpression of c-Myc Alters G1/S arrest following ionizing radiation. *Molecular and Cellular Biology* p. 1819–1833, 2002.
- 159.- Gupta S, Koru-Sengul T, Arnold S, Devi G, Mohiuddin M, Ahmed M. Low-dose fractionated radiation potentiates the effects of cisplatin independent of the hyper-radiation sensitivity in human lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapy*. 10; 292, 2011.
- 160.- Sakaue-Sawano A, Kobayashi T, Ohtawa K, Miyawaki A. Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear missegregation, or endoreplication. *Bio Med Central Cell Biology* 12:2, 2011.
- 161.- Pushkarev, Starenki, Saenko, Yamashita, Kovzun, Popadiuk, Pushkarev, Tronko. Effects of low and high concentrations of antitumour drug taxol in anaplastic thyroid cancer cells. *Experimental Oncology* 31:1 16-21, 2009.
- 162.- Freeburg and McKay. Effect of mifepristone used alone or with cisplatin chemotherapy on human ovary cancer cell growth, 2008.
- 163.- Ormerod M, Orr R, Peacock J. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin—a flow cytometric study. *British Journal of Cancer* 69(1):93-100, 1994.
- 164.- Sorenso C, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA doublestrand breaks. *Cancer Research* 15;48(16):4484-4488, 1988.
- 165.- Kheem S, Bisht C, Bradbury M, Mattson D, Kaushal A, Sowers A, Markovina S, Ortiz K, Sieck L, Isaacs J, Brechbiel M, Mitchell J, Neckers L, Gius D. Geldanamycin and 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the *in vitro* and *in vivo* radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity. *Cancer Research* 63, 8984–8995, 2003.

166.- Shen M, Hsu Y, Hsu K, Chen Y, Tang M, and Chou C. Insulin-like growth factor 1 is a potent stimulator of cervical cancer cell invasiveness and proliferation that is modulated by avb3 integrin signaling. *Carcinogenesis* 27 (5) 962–971, 2006.

## 12. ANEXO 1

Descripción y esquematización de estadios de cáncer cérvico uterino según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

<b>Estadio I</b>	El carcinoma está estrictamente confinado al cérvix.
<b>IA</b>	Carcinoma invasivo diagnosticado por microscopía, con una profundidad de invasión $\leq 5.0\text{ mm}$ y una extensión $\leq 7.0\text{ mm}$ .
<b>IA1</b>	Invasión del estroma $\leq 3.0\text{ mm}$ en profundidad y extensión horizontal $\leq 7.0\text{ mm}$ .
<b>IA2</b>	Invasión a la membrana basal, no $> 5.0\text{ mm}$
<b>IB</b>	Lesiones clínicamente visibles mayores que en la etapa <b>Ia</b> .
<b>IB1</b>	Lesión clínicamente visible $\leq 4.0\text{ cm}$ en dimensiones más grandes
<b>IB2</b>	Lesión clínicamente visible $> 4.0\text{ cm}$ en dimensiones más grandes
<b>Estadio II</b>	Tumor que se extiende fuera del cérvix sin afectar la pared pélvica. Puede afectar la vagina, pero no su tercio inferior.
<b>IIA</b>	Sin invasión al parametrio.
<b>IIB</b>	Con obvia invasión al parametrio.
<b>Estadio III</b>	El tumor afecta pared pélvica y/o comprende la tercera parte inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis (el riñón no funciona).