



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

*“Efecto Radiosensibilizante de Mifepristona en combinación
con Temozolamida en un modelo de xenotransplante de
glioma”.*

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

PRESENTA

MONSERRAT LLAGUNO MUNIVE



MÉXICO, D.F.

2013



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ELIA BORSLA NARANJO RODRÍGUEZ

VOCAL: Profesor: ANDRES NAVARRETE CASTRO

SECRETARIO: Profesor: PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

2° SUPLENTE: Profesor: AURORA LAURA NÚÑEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
CANCEROLOGÍA**

ASESOR DEL TEMA: DR.PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: BIOL. RAFAEL JURADO LEÓN

SUSTENTANTE: MONSERRAT LLAGUNO MUNIVE

**INDICE**

LISTA DE ABREVIATURAS	I
1.- INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	
2.1.- Tumores del Sistema Nervioso Central	2
2.2.- Glioma	3
2.3.- Etiología	4
2.4.- Síntomas	6
2.5.- Patología molecular en el desarrollo de glioma	6
<i>2.5.1.- Angiogénesis</i>	7
<i>2.5.2.- Factor de Crecimiento del endotelio vascular (VEGF)</i>	7
<i>2.5.3.- Influencia hormonal en glioma</i>	8
2.6.- Diagnóstico y tratamiento	9
2.7.- Cirugía	10
2.8.- Radioterapia	10
<i>2.8.1.- Fundamentos biológicos de la radioterapia</i>	10
<i>2.8.2.- Radiosensibilidad</i>	11
2.9.- Quimioterapia	12
<i>2.9.1.- Temozolamida</i>	13
2.10.- Mifepristona	14
3.- HIPÓTESIS	16
4.- OBJETIVOS	
4.1.- Objetivos generales	16
4.2.- Objetivos particulares	16
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1.- Animales de experimentación	17



5.2.- Líneas Celulares	17
5.3.- Desarrollo de tumores de glioma en ratones atímicos.	17
5.4.- Aplicación de la Radiación.	18
5.5.- Evaluación del efecto radiosensibilizante de Mifepristona	19
5.6.- Seguimiento de la actividad metabólica del tumor por Imagen molecular.	19
5.7.- Expresión del gen de VEGF.	
5.7.1.- <i>Extracción del RNA.</i>	20
5.7.2.- <i>RT-PCR en tiempo real</i>	20
5.8.- Análisis Estadístico.	21
6.- RESULTADOS	
6.1.- Determinación del esquema y dosis de Radiación.	22
6.2.- Evaluación del efecto radiosensibilizante de Mifepristona	23
6.3. - Toxicidad sistémica.	24
6.4.- Seguimiento del volumen tumoral por imagen molecular	25
6.5.- Expresión relativa del gen de VEGF por RT-PCR en tiempo real al término de la evaluación de cada tratamiento	27
7.- DISCUSIÓN	29
8.- CONCLUSIÓN	35
9.- PERSPECTIVAS	35
10.- BIBLIOGRAFÍA	36



LISTA DE ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central
BH.	Barrera Hematoencefalica
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
MF	Mifepristona
Tz	Temozolamida
Rad	Radiación
OMS	Organización mundial de la salud
GBM.	Glioblastoma multiforme
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
ECM	Matriz extracelular
TGFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
HIF	Factor inducible de hipoxia
RG	Receptor glucocorticoide
RP	Receptor progestágeno
Hsps	Proteínas de choque térmico
TC	Tomografía Computarizada
RM	Resonancia Magnética
PET	Tomografía de emisión de positrones
Gy	Gray
FDG	18 F-Deoxiglucosa
VOI	Volumen de interés
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
MTIC	Monometil triazenoimidazol carboxamida
INNSZ	Instituto Nacional de Nutrición
ATCC	American Type Culture Collection
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS-EDTA	Bovino-ácido etilendiaminotetraacético



1.-INTRODUCCIÓN.

El cáncer en el sistema nervioso central (SNC) constituye un 3% de muertes por esta enfermedad¹. Siendo el Glioma la neoplasia primaria más frecuente del SNC con un pronóstico de vida menor a 2 años una vez diagnosticado^{1,2}. Este tipo de tumores son altamente agresivos y su tratamiento ha sido un reto debido a su localización en el cerebro, a la dificultad de los fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica (BH) y a la respuesta limitada de las terapias así como la neurotoxicidad de los tratamientos³.

El glioma engloba diversos factores de crecimiento, entre ellos el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es uno de los principales involucrados con el desarrollo tumoral y es el principal regulador de la angiogénesis⁴. Su expresión aumenta durante la progresión de gliomas por lo que la inhibición de VEGF no solo evita el crecimiento e invasión del tumor, si no también mejora el pronóstico para los tumores recurrentes⁵.

El tratamiento estándar es la quimioterapia combinada con radiación; sin embargo, esta terapia no ha sido suficiente para mejorar la sobrevida global llevando a una remisión prolongada de la enfermedad, siendo importante contar con nuevas estrategias que incrementen la eficacia terapéutica. Estudios recientes han demostrado que el agente antihormonal, Mifepristona (MF), aumenta la citotoxicidad de diversos agentes antineoplásicos por un arresto en la fase G2 del ciclo celular, en la cual las células presentan una mayor radiosensibilidad. Por lo que al combinar MF con Radiación y Temozolamida se espera un incremento en el efecto antitumoral⁶.

El presente proyecto consistió en evaluar el efecto radiosensibilizante de MF, un agente antiprogestágeno y antiglucocorticoide sola y combinada con Temozolamida en un modelo de xenotransplante de glioma.



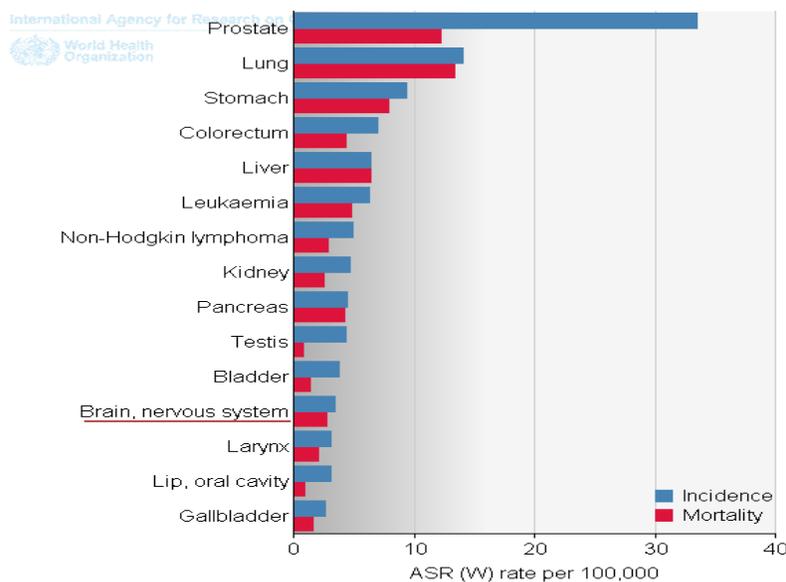
2.- MARCO TEORICO.

2.1.- Tumores del SNC.

Los tumores del SNC son una masa anormal de tejido formado por la proliferación incontrolada de células en el cerebro; se pueden dividir como tumores primarios los cuales derivan de componentes cerebrales (gliomas, meningiomas, meduloblastomas, craneofanangioma) o secundarios en los cuales las células cancerosas de un sitio primario pueden viajar hasta el cerebro⁷.

El cáncer del SNC no es una de las entidades tumorales más frecuentes en la epidemiología nacional. En las mujeres ocupa el 2.0% de los casos totales, por debajo del cáncer de mama y el cáncer Cervicouterino; en el caso de los hombres el porcentaje es de 2.8% lo que lo coloca lejos del cáncer de pulmón y el de próstata (Figura 1)², sin embargo, a pesar de tener la baja incidencia su expectativa de sobrevida es menor a 2 años una vez diagnosticado. En la actualidad, el régimen para tratar este tipo de tumores no ha logrado mejorar estos índices de sobrevida.

A



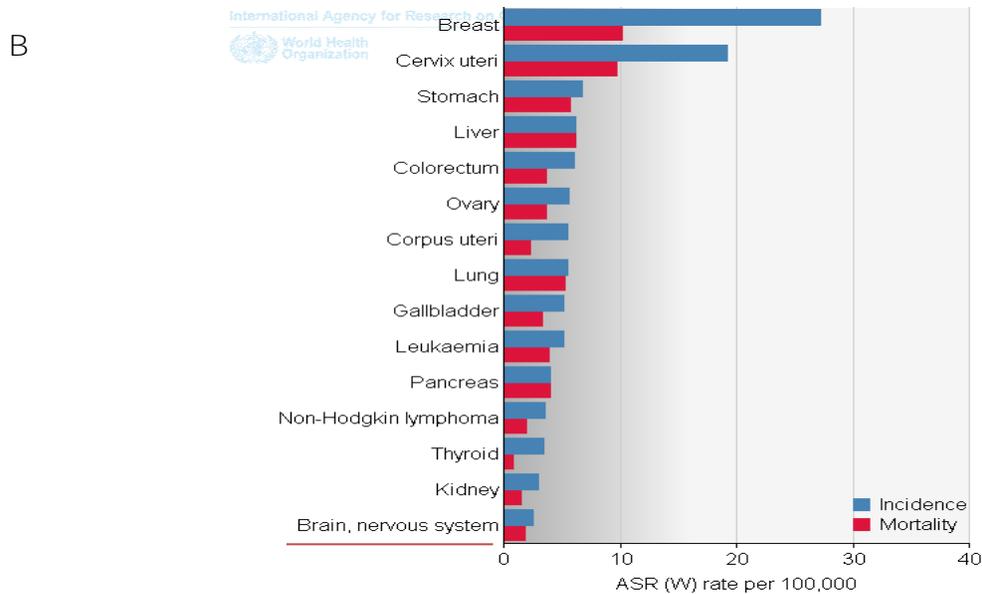


Figura 1. Estadísticas 2008 de la Incidencia y Mortalidad de algunos tipos de cáncer en México. Organización Mundial de la Salud. (A) Estadísticas sexo masculino, (B) Estadísticas sexo femenino².

2.2.- Glioma.

Glioma es la neoplasia primaria más frecuente del SNC con aproximadamente un 30 a 45% y se origina a partir de células gliales⁸. La glía cumple funciones de sostén y nutrición de las neuronas como el desarrollo y homeostasia cerebral, procesos de aprendizaje y regeneración⁹.

Se han utilizado diferentes sistemas para clasificar este tipo de neoplasias, ya sea por el grado de agresividad, pronóstico a largo plazo, velocidad de proliferación celular, entre otros. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado los gliomas en cuatro grados basándose en criterios morfológicos determinados por el linaje celular y grado de malignidad (tabla 1).¹⁰

Tabla 1. Clasificación del Glioma según la OMS¹⁰.

	GRADO I Astrocitoma Pilocítico	GRADO II Astrocitoma de bajo grado	GRADO III Astrocitoma anaplásico	GRADO IV Glioblastoma multiforme (GBM)
Tratamiento	Cirugía y Radioterapia	Cirugía Radioterapia	Radioterapia y quimioterapia (Temozolamida)	Radioterapia y quimioterapia (Temozolamida)
Características Generales	Son los tumores más frecuentes de la infancia. supervivencia del 90% a los cinco años una vez iniciado el tratamiento	Afecta preferentemente a jóvenes entre 20-30 años	Tumor con alta tasa de mitosis,	La mediana de supervivencia 9-12 meses para los glioblastomas Tumor con alta tasa de mitosis

Como se puede apreciar en la Tabla 1 la malignidad de los gliomas va del grado I al IV y depende de características funcionales como la proliferación celular, la presencia de mitosis o signos de apoptosis, la presencia de neoproliferación vascular y áreas de necrosis. Las lesiones gliales de grado I son considerados benignos siempre y cuando una cirugía de resección total sea posible. Los tumores de grado III y IV son considerados como gliomas malignos y son los tumores cerebrales no-metastásicos más frecuentes en la edad adulta. La principal característica de estas neoplasias son las zonas de necrosis consecuencia de una alta tasa de proliferación celular, además de una extensa neoformación vascular¹⁰.

2.3.- Etiología.

Las causas que dan origen a la mayoría de los gliomas malignos no han sido bien identificadas, sin embargo, son factores de riesgo la exposición a radiaciones ionizantes, daño o trauma en la cabeza, sustancias químicas, ocupaciones con exposiciones prolongadas a pesticidas, herbicidas y fertilizantes.

La radiación ionizante representa el factor de riesgo exógeno más importante para el desarrollo de tumores cerebrales en los niños; algunos estudios



han mostrado un aumento en la incidencia de tumores del SNC en niños que habían recibido irradiación en cuero cabelludo como tratamiento de la tiña capitis¹¹.

Aunque muchas sustancias químicas pueden inducir tumores cerebrales en animales de experimentación aún no se ha encontrado asociaciones definitivas en el ser humano. Por ejemplo, los compuestos N-nitroso que suelen encontrarse en los alimentos son neurocancerígenos en animales de experimentación¹². Tampoco existen pruebas contundentes que relacionen la exposición laboral a sustancias químicas industriales con el desarrollo de tumores cerebrales en humanos, como pueden ser los disolventes orgánicos, formaldehído, fenoles, compuestos policíclicos aromáticos y los pesticidas, los cuales son capaces de producir tumores cerebrales en animales¹³.

Los virus pueden inducir tumores cerebrales en animales de experimentación, sin embargo, no se dispone de datos concluyentes sobre los virus como causa de tumores cerebrales en humanos. Aproximadamente el 5% de los pacientes con gliomas malignos tienen un historial familiar con gliomas. Algunos de estos casos están asociados con síndromes genéticos tales como neurofibromatosis tipo-1 y 2, síndrome de Lifraumeni, y síndrome de Turcot'. Sin embargo, aún no han sido identificadas las causas genéticas¹⁴.

En cuanto a la edad existe un aumento moderado de tumores cerebrales en la infancia, alrededor de los 10 años, donde predomina el Meduloblastoma y otro mayor en la edad adulta, a partir de los 40 años, donde predomina el Glioblastoma y con respecto a la raza las población no hispana tienen mayor prevalencia de gliomas de alto grado que hispanos, afroamericanos, japoneses, chinos y filipinos¹⁵.



Otros factores que se han analizado son los antecedentes de traumatismo, fármacos, alergias, consumo de alcohol o tabaco. Sin embargo, ninguno de estos factores se ha asociado de manera concluyente con los tumores cerebrales¹⁶.

2.4.- Síntomas.

Los síntomas dependen de la parte del cerebro involucrada, siendo el síntoma más común el dolor de cabeza, que afectan a casi la mitad de todos los pacientes con un tumor cerebral. Otros síntomas pueden ser convulsiones, pérdida de memoria, debilidad física, pérdida del control muscular, síntomas visuales, problemas de lenguaje, deterioro cognitivo y cambios de personalidad; estos pueden empeorar o cambiar a medida que el tumor crece y destruye las células del cerebro, comprime las zonas involucradas y causa inflamación¹⁷.

2.5.- Patología molecular en el desarrollo de glioma.

Entre las alteraciones más frecuentes en los gliomas de bajo grado se encuentran las mutaciones que afectan a p53 y la sobreexpresión del factor de crecimiento α derivado de las plaquetas (PDGF-A) y su receptor¹⁸. En cuanto al astrocitoma anaplásico (OMS grado III) su progresión se ha asociado a la alteración de los genes supresores de tumores (Rb y p16CDKNaA)^{18,19}.

El GBM (OMS grado IV) presenta amplificaciones de MDM2, un gen que codifica un inhibidor de p53, además presentan genes del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutados lo que conduce a un aumento en la actividad del receptor de tirosina cinasa y a la activación de las vías Ras y PI-3 que estimulan el crecimiento de las células tumorales^{20,21}. Como consecuencia de estas alteraciones, las señales que regulan negativamente el ciclo celular se encuentran interrumpidas, teniendo así un papel importante en su invasión. Otro de los factores involucrado en el desarrollo de tumores de glioma es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), a continuación se describe su relación con la angiogénesis.



2.5.1.- Angiogénesis.

Para que un tumor pueda superar un determinado tamaño debe conseguir un aporte vascular. La angiogénesis es el desarrollo de una nueva vasculatura a partir de una preexistente, correspondiendo éste a un proceso fisiológico presente principalmente en el desarrollo embrionario²². En la vida adulta se manifiesta en algunos órganos específicos, como el ovario en el caso de la mujer, manteniendo en todos los tejidos el potencial de manifestarse en relación a ciertos estímulos como son la hipoxia o la inflamación. Este proceso está regulado por un balance entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos liberados tanto por la célula endotelial como por su entorno (células musculares, estroma y células hematológicas)²³.

La angiogénesis se inicia cuando el equilibrio homeostático entre los estímulos pro-angiogénicos y anti-angiogénicos se interrumpe en favor de los primeros, dando lugar a la activación de factores pro-angiogénicos. Estos estímulos son secretadas principalmente por células de glioma, células endoteliales y microglia, además existen otros estímulos como la matriz extracelular (ECM) e hipoxia. Hay una diversidad de moléculas que tienen propiedades pro-angiogénicas como el VEGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TGF α), el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), entre otros²⁴.

2.5.2.- VEGF.

Este factor responde a varios estímulos tales como hipoxia/isquemia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1), a distintos factores de crecimiento (EGF, TGF- α y - β , KGF, factor de crecimiento insulínico tipo 1, PDGF), a oncogenes activados, estrógeno y óxido nítrico. Cuando su regulación es inadecuada, este factor contribuye al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis, además de participar en distintas condiciones como la artritis reumatoide, diabetes mellitus, entre otros²².



El proceso de señalización que resulta en la angiogénesis se encuentra mediado por uniones de alta afinidad de los VEGFs con receptores específicos de actividad tirosina cinasa. Todas las isoformas del VEGF son capaces de unirse a alguno de estos tres receptores: VEGFR-1 (también conocido como Flt-1), VEGFR-2 (KDR o Flk-1) y/o VEGFR-3 (Flt-4)²⁵.

Se considera que VEGF es el mediador más importante de la neovascularización en los gliomas y su expresión aumenta durante la progresión de gliomas. Su expresión está relacionada con la densidad vascular, la proliferación celular, el grado de malignidad y la severidad de edema cerebral; la presencia de VEGF y de sus receptores en gliomas de bajo grado está asociada con el grado de recurrencia y sobrevida²⁶.

Uno de los primeros eventos en el desarrollo de un glioma es un aumento en la expresión de factores de crecimiento, de sus receptores o de ambos, lo que ocasiona una estimulación autócrina y parácrina. La activación de la angiogénesis puede ser el paso crucial en el desarrollo de una neoplasia benigna a una maligna. Esta hipótesis se ha manejado en gliomas de bajo grado que progresan a glioblastoma multiforme. Además, los gliomas malignos requieren la angiogénesis para establecer una fuente de nutrientes y oxígeno. Uno de los principales estimulantes para la expresión de factores angiogénicos es la hipoxia, que induce la síntesis de VEGF mediante el factor inducible de hipoxia 1(HIF-1)²⁷.

Por su importancia en la fisiopatología, las estrategias terapéuticas contra el VEGF están basadas en la inhibición de la expresión del VEGF, la interferencia de vías de señalización, el uso de anticuerpos contra VEGF y sus receptores (VEGFR)²².

2.5.3.- Influencia hormonal en glioma.

Las hormonas esteroides pueden ser agrupadas en cinco grupos por el receptor al que se unen: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos,



estrógenos, y progestágenos. Se ha observado que las hormonas esteroideas tienen cierta influencia en el desarrollo y evolución de tumores cerebrales²⁸. En el caso de Glioma se ha reportado un aumento en la expresión de receptores a glucocorticoides y progestágenos. Los resultados de estos estudios se contradicen, en algunos se menciona que la expresión del receptor a glucocorticoide (RG) es mayor en comparación con los receptores progestágenos (RP). Sin embargo, en otros se demostró que los RP tienen un mayor índice de expresión con respecto a los RG^{29.30.31}.

El RG es una proteína de 777 aminoácidos y pertenece a la familia de receptores nucleares. Este receptor tiene una estructura modular que incluye un dominio de activación funcional, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión al ligando, en ausencia de ligando, el receptor se mantiene usualmente en el citoplasma como un complejo unido a proteínas tales como la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) y la proteína FKBP52, cuando ocurre la unión del ligando a su receptor se manifiesta un cambio conformacional que permite la disociación de este complejo con la translocación nuclear del RG. La unión de este complejo lleva a la inhibición de la transcripción de genes diversos, que codifican para proteínas pro-inflamatorias. Entre esas proteínas se encuentran numerosas citocinas, el factor de necrosis tumoral α , factores quimiotácticos y moléculas de adhesión que favorecen el desarrollo e invasión tumoral³². En este sentido el bloqueo de este tipo de receptores se ha vuelto una estrategia terapéutica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

2.6.- Diagnóstico y tratamiento.

El diagnóstico de los tumores de glioma ha sido simplificado por los avances que se han tenido en neurobiología, dentro de las pruebas radiológicas que se aplican están la Tomografía computarizada (TC), Resonancia Magnética (RM), Tomografía por emisión de positrones (PET), siendo estas pruebas determinantes para diagnosticar el grado del tumor y así dar el tratamiento más adecuado⁸. El tratamiento varía de acuerdo con el tipo de célula, grado del tumor y



localización. Dentro de las opciones de tratamiento tenemos: cirugía, radioterapia y quimioterapia, las cuales se describirán a continuación.

2.7.- Cirugía.

La cirugía persigue tres objetivos principales: 1) establecer el tipo histológico del tumor, 2) reducción de los síntomas debido a la disminución de la masa tumoral y 3) mejorar la eficacia terapéutica de la radioterapia y quimioterapia³³. Sin embargo, debemos considerar que la extracción de los tumores cerebrales, generalmente es incompleta ya que está limitada por el daño neurológico y la localización del tumor.

2.8.- Radioterapia.

Actualmente, se ha determinado por medio de estudios que la dosis de irradiación no debe sobrepasar los 60 Gray (Gy) con un fraccionamiento máximo 2 Gy por sesión. Este esquema de radiación permite limitar la neurotoxicidad retardada que puede presentarse meses después del tratamiento con severas secuelas neurocognitivas³⁴.

La radioterapia es un tratamiento que utiliza radiaciones ionizantes, las interacciones de las partículas ionizantes con los medio biológicos consisten esencialmente en colisiones de éstas con los electrones del medio. Dependiendo de la energía transmitida al electrón, la molécula a la que pertenece sufre una ionización, una excitación electrónica o una ganancia de energía³⁵.

2.8.1.- Fundamentos biológicos de la radioterapia.

Las radiaciones ionizantes provocan en el material biológico cambios químicos principalmente a través del rompimiento de enlaces covalentes y de la formación de radicales libres. Sin embargo, se ha reportado que el daño molecular producido en el ADN es el que tiene la mayor trascendencia biológica³⁶.

La lesión al ADN puede ser de manera directa o indirecta (Figura 2)³⁷. En el mecanismo de acción directo, la primera molécula que absorbe la radiación es el ADN, quedando así sus átomos ionizados y dañados. En el mecanismo de acción indirecto, el agua absorbe la radiación, la ionización del agua crea radicales libres, especies químicas altamente reactivas y estos a su vez llegan a reaccionar con el ADN dando lugar a cambios químicos, este fenómeno se conoce como radiolisis. Dado que el 80% de una célula está compuesto de agua el mecanismo de acción indirecto es más frecuente que el directo^{38, 39}.

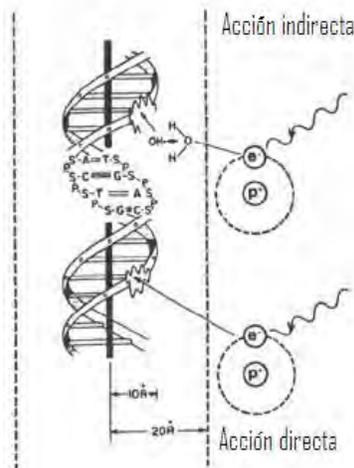


Figura 2. Mecanismos de la radiación sobre el ADN³⁷.

2.8.2.- Radiosensibilidad.

La incorporación de la radioterapia en el tratamiento de glioma ha sido muy importante, sin embargo, la progresión de este tipo de cáncer requiere el abordaje de nuevas estrategias terapéuticas, la investigación de agentes radiosensibilizantes podría aumentar la eficacia terapéutica de radiación por lo que se ha convertido en una estrategia prometedora para el glioma.

En términos generales, se aplica el nombre de agentes radiosensibilizantes a unas sustancias que aumentan los efectos citotóxicos de las radiaciones ionizantes cuando se administran a la vez. Se han descrito ciertos mecanismos por los que algunos fármacos puedan interaccionar con la radiación y dar lugar a



una radiosensibilización, algunos de los cuales se mencionan a continuación: 1) modificación del daño radioinducido, 2) inhibición de la reparación y 3) inhibición de la repoblación³⁷

Los daños celulares provocados por la radiación que no fueron reparados eventualmente conducen a la muerte celular, las células tumorales para compensar esto requieren una mayor utilización de los procesos de reparación. Por lo tanto la inhibición de cualquiera de las proteínas necesarias para la reparación del daño debe conducir a una sensibilización. VEGF es un factor de crecimiento que se ha visto que su inhibición aumenta la sensibilidad de las células a la radiación⁴⁰.

2.9.- Quimioterapia.

Los tratamientos comunes de quimioterapia han fracasado en detener el crecimiento del glioma debido a las bajas concentraciones que se alcanzan de los fármacos dentro del SNC, aun así se encuentran Carmustina, Lomustina, Procarbacin y Temozolomida, siendo este último el tratamiento de primera línea para este tipo de neoplasias⁴¹. La quimioterapia se puede combinar con radioterapia u otros tratamientos. El objetivo de estas combinaciones es mejorar el control local, disminuir el riesgo de metástasis y aumentar la supervivencia sin aumentar significativamente la toxicidad^{42, 42}.

Se ha observado que uno de los problemas de la quimioterapia en glioma se debe a la dificultad que presentan los fármacos para atravesar la BH, debido a que es una barrera que presenta una alta selectividad bioquímica y expresa proteínas MDR1/P-gp (multidrug resistance), los cuales extraen mediante bombeo las sustancias químicas que pueden resultar dañinas para el cerebro dificultando así su permanencia⁴⁴.



De manera experimental se han desarrollado nuevas terapias contra el glioma dentro de las cuales se encuentran las Vacunas y tratamientos virales, terapia molecular dirigida y terapia con células madre⁴⁵.

2.9.1.- Temozolamida.

La Temozolamida es un agente alquilante cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la replicación del DNA. Es un profármaco que se transforma espontáneamente en el organismo en monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), su metabolito activo. Se cree que la citotoxicidad del MTIC se debe principalmente a la alquilación de la guanina en la posición O6, teniendo una alquilación adicional en la posición N7 (Figura 3)⁴⁶. Temozolamida tiene una biodisponibilidad oral prácticamente completa y atraviesa la BH. Su biodisponibilidad céfalo-raquídea equivale al 30% de la plasmática⁴².

Temozolamida sola tiene un efecto modesto sobre el glioma de alto grado, siendo su combinación con radiación ionizante la terapia de elección para este tipo de tumores. La eficacia de esta combinación se ha demostrado en varios estudios preclínicos, los pacientes que recibieron radioterapia más Temozolamida mostraron una mejora de 14.6 meses comparado con 12 meses de sobrevida en pacientes que no recibieron temozolamida^{43, 47}.

A partir de estos resultados se han utilizado diversos agentes antineoplásicos (por ejemplo Tamoxifen⁴⁸) para incrementar la radiosensibilización en glioma. Sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios, mostrando una mayor toxicidad sistémica. En este trabajo proponemos el uso de MF como un posible agente radiosensibilizante.

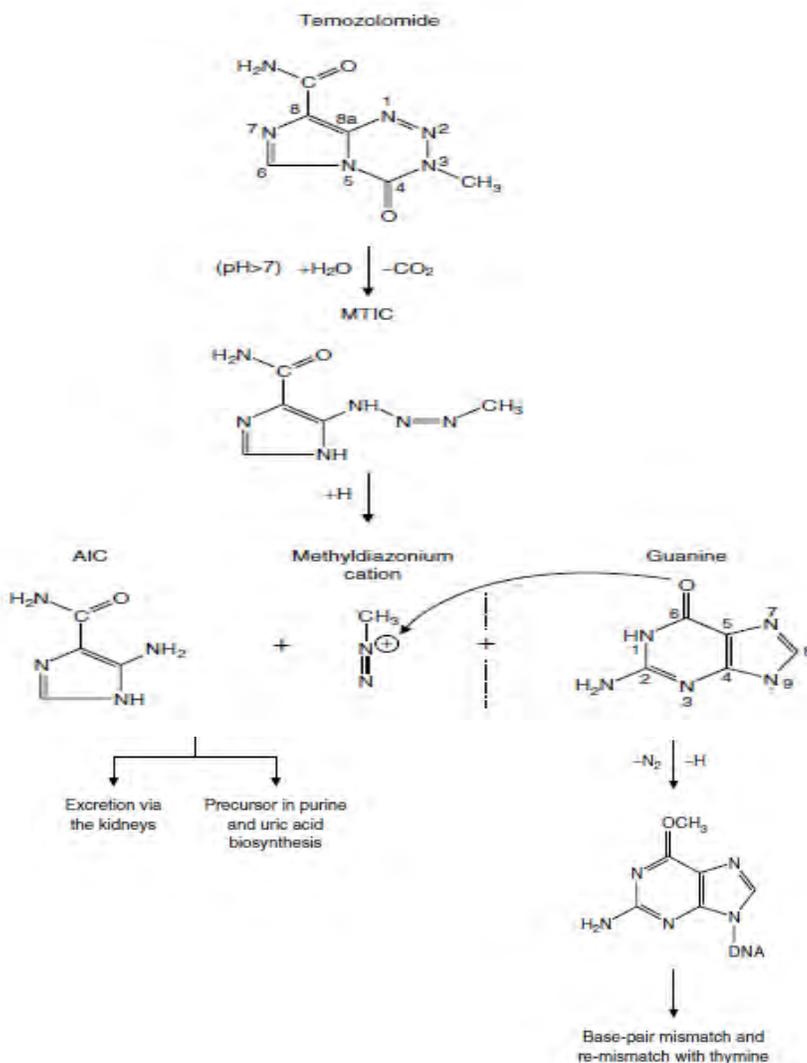


Figura 3. Metabolismo de Temozolamida⁴⁶.

2.10.- Mifepristona.

MF es un potente antagonista competitivo de la unión de los glucocorticoides y progestágenos a sus receptores citosólicos⁴⁹. Se ha utilizado como un agente abortivo, regulador del ciclo menstrual, endometriosis, síndrome de Cushing⁵⁰, en el cáncer de mama⁵¹, ovario⁵², próstata⁵³ y gliomas⁵⁴. Como se mencionó anteriormente la terapia dirigida contra receptores glucocorticoides y progestágenos para diversos tipos de cáncer ha sido una estrategia prometedora. Por lo tanto en este proyecto se planteó utilizar un agente anti-glucocorticoide y



anti- progestágeno, como MF evaluando su posible efecto adyuvante en el tratamiento estándar de glioma.

El mecanismo por el cual Mifepristona inactiva al receptor de progesterona es complejo y no está aun bien definido, puede actuar mediante la estabilización del complejo RP-Hsp90 evitando la unión del receptor con su agonista y por lo tanto inhibir la transcripción del DNA⁵⁵. Estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado que el agente antihormonal MF presenta un efecto radiosensibilizante sobre un modelo de cáncer cervical, uno de los mecanismos propuestos es el arresto en la fase G2-M, se ha descrito que esta fase del ciclo celular las células presentan mayor radiosensibilidad. Además, se ha comprobado un efecto quimiosensibilizante de MF en combinación Cisplatino en un modelo de cáncer cervico-uterino⁵⁶.

Pinski y cols reportaron que el antagonista de los receptores de progesterona y glucocorticoides MF, disminuye la velocidad de crecimiento del tumor en xenotransplantes de la línea celular de glioma U87MG, se sugirió que el efecto antiproliferativo se debió a la inhibición del receptor glucocorticoide⁵⁴. Hasta el momento existen pocos estudios que señalen a los agentes antihormonales como posibles agentes radiosensibilizantes, algunos de sus mecanismos como la inhibición de factores de crecimiento como VEGF y la inducción de apoptosis podrían favorecer un efecto radiosensibilizante. Debido a que MF ha mostrado tener un efecto quimio y/o radiosensibilizante en el presente proyecto se planteó evaluar la actividad radiosensibilizante de MF en un modelo de glioma.



3.- HIPÓTESIS.

Al combinar Mifepristona con Radiación y Temozolamida se incrementará el efecto antitumoral en un modelo de xenotransplante de glioma.

4.- OBJETIVOS.

4.1.- OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto radiosensibilizante de Mifepristona en combinación con Temozolamida y Radiación en un modelo de xenotransplante de glioma.

4.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Evaluar el efecto antitumoral de la combinación Mifepristona-Temozolamida-Radiación en un modelo de xenotransplante de glioma.
- 2.- Determinar la expresión de VEGF en tumores de glioma después del tratamiento de Mifepristona-Temozolamida-Radiación.



5.- MATERIALES Y METODOS.

5.1 Animales de Experimentación.

Se utilizaron 65 ratones hembras *nu/nu* entre 6-8 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos del Instituto Nacional de Nutrición (INNSZ), mantenidos en condiciones libres de patógenos, con agua y alimentado *ad libitum*, con un fotoperiodo día/noche 12-12 horas, la temperatura y humedad fueron las adecuadas. Los estudios en animales se realizaron de acuerdo a las reglas para el cuidado y el uso de animales de experimentación aprobado por el Comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología de México (010-17)-(IBICB601-10).

5.2.- Líneas celulares.

La línea celular de glioma C6 fue obtenida de American Type Culture Collection, ATCC (Rockville, U.S.A). Estas células se cultivaron en condiciones de esterilidad en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Gibco, Grand Island, NY. U.S.A) suplementado con el 5% de suero fetal bovino e incubada a 37° con una atmosfera de 5% de CO₂.

5.3.- Desarrollo de tumores de glioma en ratones atímicos.

Las células se proliferaron en cajas de cultivo de 75 cm², se mantuvieron en medio DMEM suplementado con el 5% de suero fetal bovino, las cajas de cultivo se revisaron diario para verificar el porcentaje de confluencia hasta obtener entre 70-80%. Las células se despegaron con Suero fetal bovino-ácido etilendiaminotetraacético (PBS-EDTA) posteriormente, se centrifugaron y se llevó acabo el conteo de células por medio de un hemocitómetro. Una vez contadas la células se resuspendieron en un volumen de 100 µl de medio de cultivo y se inocularon a la concentración de 1x10⁶ por vía subdérmica en el lomo del ratón.

Después de la inoculación, el tumor de los ratones se midió cada semana y se determinó el volumen tumoral utilizando la siguiente formula⁵⁷:



$$VT: D \times d^2 \times \left(\frac{\pi}{6}\right)$$

Donde

VT: Volumen del tumor (mm³)

D: Diámetro mayor (mm)

d: Diámetro menor (mm)

Para la evaluación de la toxicidad sistémica se registró el peso corporal durante el mismo periodo.

5.4.- Aplicación de la Radiación.

Determinación del esquema y dosis de Radiación. Cuando los tumores de los ratones alcanzaron un volumen de aproximadamente 50 mm³ los ratones se aleatorizaron en dos grupos (A y B) y se aplicaron las dosis de 0, 5, 10 y 15 Gy (dosis totales) fraccionadas en 1 Gy/diario para el grupo A y 2 Gy/diario para el grupo B. Con los resultados obtenidos se determinó el mejor esquema de radiación.

Durante la Radiación los animales fueron anestesiados con isoflurano/oxígeno utilizando una unidad de inhalación para roedores (Bickford, Wales Center, NY) y la irradiación se aplicó con un equipo de ortovoltaje (D3225, Gulmay Medical Ltd, UK). El haz de radiación se delimitó al tumor mediante el uso de diferentes colimadores de plomo, los cuales se iba cambiando dependiendo del tamaño del tumor⁵⁷.



5.5.- Evaluación del efecto radiosensibilizante de Mifepristona.

Esquema de Tratamiento. Una vez alcanzado el volumen tumoral aproximadamente de 50 mm³ los ratones se dividieron aleatoriamente en 5 grupos (n=5). Al grupo control (grupo A) se le administró el vehículo. Al grupo B se le aplicó Radiación sola, al grupo C se le administró Temozolamida y Radiación, al siguiente grupo (D) se aplicó Radiación y MF y por último el grupo E recibió Radiación combinada con Temozolamida y MF. Las dosis de cada tratamiento se muestran en la siguiente Tabla 2:

Grupo	Tratamiento	Esquema de tratamiento
1	Control	Vehículo
2	Rad	1 Gy/día x 10 días
3	Rad+Tz	Radiación 1 Gy/día x 10 días y Tz 10 mg/kg x 3 días i.p
4	Rad+MF	Radiación (mismo esquema) y MF 12.5 mg/kg x 3 días s.d
5	Rad+MF+Tz	Rad 1 Gy/día x 10 días Tz 10mg/kg x 3 días i.p MF 12.5 mg/kg x 3 días s.d

Cada ciclo de quimioterapia consistió en 3 días consecutivos tanto de MF como Temozolamida hasta completar 3 ciclos, durante este tiempo se evaluó la respuesta del tratamiento midiendo el tamaño tumoral, así como la toxicidad mediante el seguimiento del peso de los ratones cada semana.

5.6.- Seguimiento de la actividad metabólica del tumor por Imagen molecular.

Al inicio y final de los tratamientos se realizaron estudios de imagen molecular utilizando un microPET/CT (Albira, España) y como radiofármaco 18 F-Deoxiglucosa (FDG), administrando 200 µCi por vía i.v. El estudio se inició 30 minutos después de la administración del radiofármaco para permitir una biodistribución adecuada del FDG en el organismo. Durante el estudio los ratones fueron anestesiados con el sistema de isoflurano/oxígeno mencionado



anteriormente. A partir de estos estudios se cuantificó la captación de glucosa en el tumor para determinar su actividad metabólica.

5.7.- Expresión del gen de VEGF.

5.7.1.- Extracción del RNA.

Al final del estudio los animales fueron sacrificados y los tumores se utilizaron para la extracción del RNA siguiendo la metodología descrita por el proveedor la cual se menciona brevemente a continuación. Para la extracción se utilizó Trizol (Invitrogen Life Technologies), las muestras de cada tumor se incubaron a temperatura ambiente y les adicionó cloroformo al término de la incubación las muestras se centrifugaron y se separó la fase acuosa a la cual se le agregó isopropanol al 100 % se agito y se centrifugó una vez más obteniéndose un pellet (RNA) el cual se lavó con 500 μ l de etanol al 100 %, posteriormente se centrifugaron las muestras a 4° C, se evaporó el etanol y el pellet se resuspendió con agua libre de RNasas. Finalmente se cuantificó la concentración de RNA con espectroscopía UV a una longitud de onda de 260 nm.

5.7.2.- Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) en tiempo real.

Se utilizaron 200 ng de RNA para llevar a cabo la reacción de RT-PCR usando el kit TaqMan® RNA-to-CT™ (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 10 μ l, las condiciones que se usaron fueron las siguientes: pre-incubación a 60 °C durante 15 minutos y 94 °C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos (amplificación) a 94 °C durante 15 s y 60 °C durante 60s. Los productos de PCR se midieron mediante la emisión de fluorescencia. Los Primers para VEGF A y (GAPDH) (control endógeno) fueron obtenidos de Applied Biosystem. El análisis de la expresión de los genes es el promedio de 3-5 muestras independientes. El RT-PCR se realizó en un termociclador Spectrum 48 (ESCO).



5.8.- Análisis Estadístico.

Los resultados se reportan como el promedio \pm error estándar de la media. Para determinar una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía seguida de una prueba de Bonferroni realizando comparaciones múltiples entre los grupos. Se utilizó el programa SPSS y un valor de $p < 0.05$ indicó diferencia significativa.



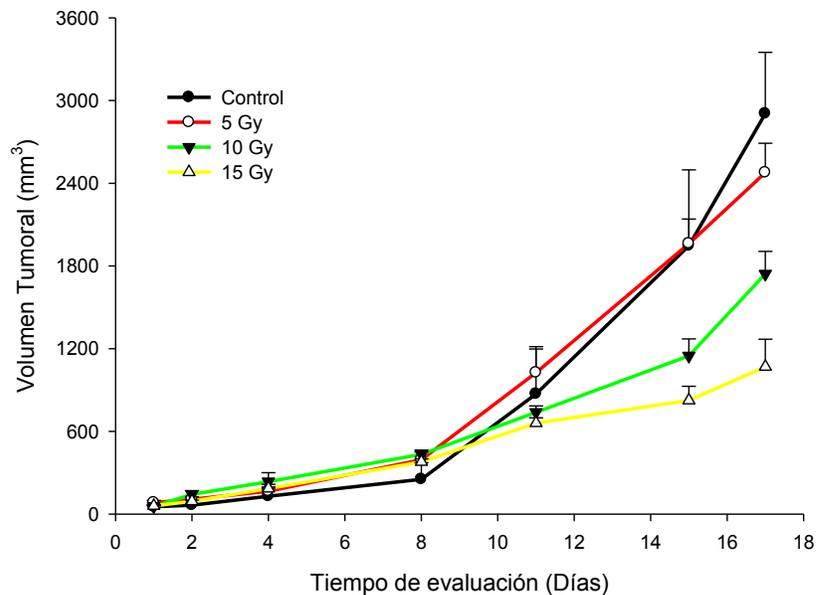
6.- RESULTADOS.

6.1.- Determinación del esquema y dosis de Radiación.

Para la determinación del esquema y dosis de Radiación se siguió el volumen tumoral con respecto al tiempo de evaluación (figura 4) en dos esquemas de radiación (A y B) 1 Gy/diario para el grupo A y 2 Gy/diario para el grupo B. La velocidad de crecimiento tumoral se logró controlar de manera dosis dependiente, al aplicar la dosis de 5 Gy no se observó una disminución en el crecimiento del tumor con respecto al control, sin embargo, al ir aumentando la dosis de Radiación se logró una disminución en la velocidad de crecimiento del tumor. A pesar de aplicar una dosis fraccionada mayor en el esquema B los resultados obtenidos en el análisis estadístico no mostraron una diferencia significativa entre los dos esquemas. A partir de los datos obtenidos se estableció que la DE_{50} fue de 10 Gy, a partir de estos resultados se decidió aplicar el esquema de 1 Gy/diario con una dosis total de 10 Gy para los tratamientos combinados con MF y Temozolamida.

A

1 Gy/día





B

2 Gy/día

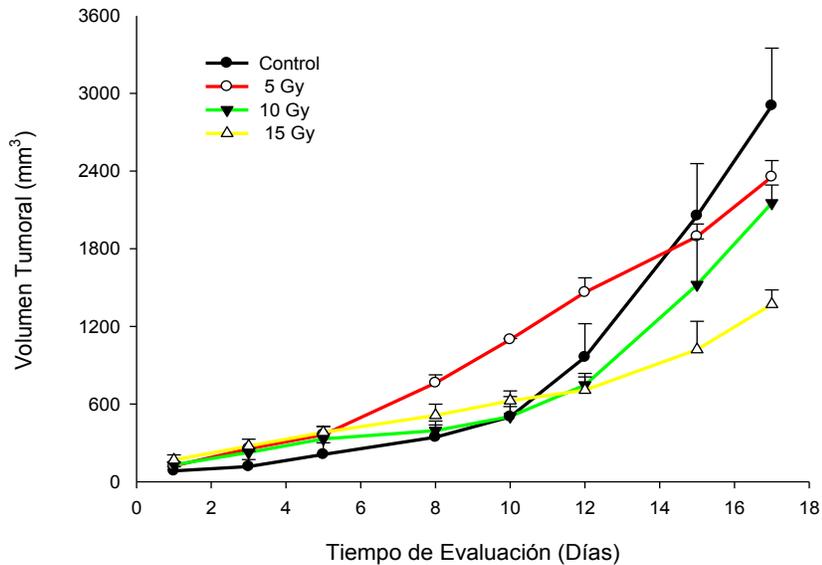


Figura 4. Seguimiento del volumen tumoral en ratones atímicos después de la aplicación de dos esquemas de radiación. A) Dosis fraccionadas 1 Gy diario. B) Dosis fraccionada 2 Gy diario. Cada punto representa el promedio de 5 animales \pm EEM. $p < 0.05$.

6.2.- Evaluación del efecto radiosensibilizante de MF.

La evaluación del efecto antitumoral con la aplicación de la Radiación sola o combinada con MF o Temozolamida se presenta en la Figura 5. Al aplicar Radiación se presentó una disminución en la velocidad de crecimiento del tumor con respecto al control. El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia estadística con algún tratamiento durante los primeros días, sin embargo, a partir del día 15 se observó una diferencia en el volumen tumoral del grupo control con respecto a los demás tratamientos. Cuando se aplica la radiación combinada con MF y Temozolamida se observa una clara disminución en el crecimiento tumoral con respecto al tratamiento estándar Radiación + Temozolamida y Radiación sola. No hubo diferencia cuando se comparó contra Radiación + MF.

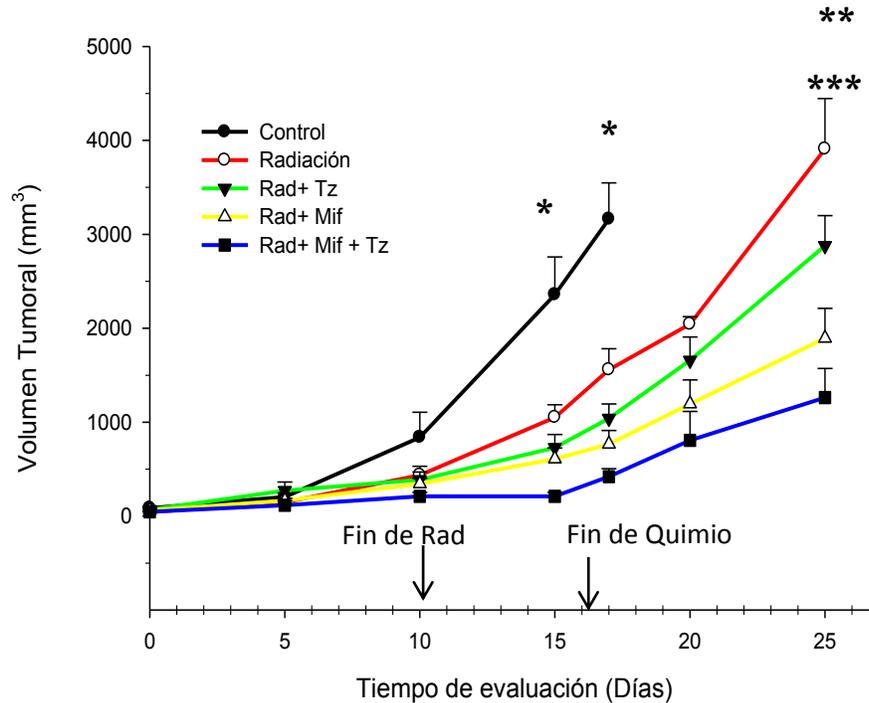


Figura 5. Seguimiento del volumen tumoral en ratones atómicos durante el tiempo de evaluación de los diferentes tratamientos. Cada punto representa el promedio (n=5) \pm EEM.

*Diferencia estadísticamente significativa control vs los diferentes tratamientos.

** Diferencia estadísticamente significativa Rad+Mif+Tz vs Rad y Rad+Tz.

*** Diferencia estadísticamente significativa Rad+Mif vs Rad p<0.05

6.3. - Toxicidad sistémica.

La evaluación de la toxicidad sistémica de cada uno de los tratamientos se puede observar en la figura 6 donde se representa el cambio en el peso corporal del ratón a lo largo del periodo de evaluación. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

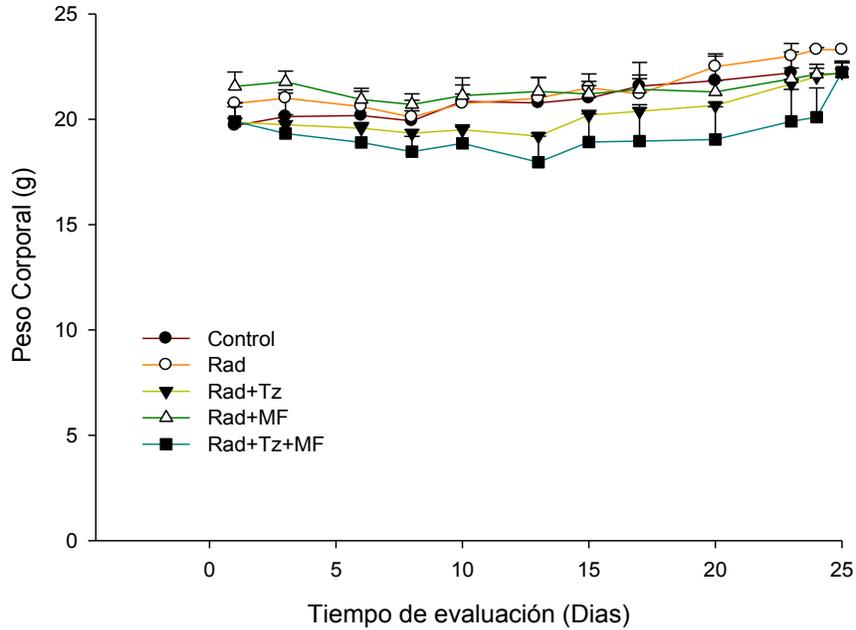


Figura 6. Seguimiento del peso corporal de ratones atímicos en los diferentes tratamientos. Cada punto representa el promedio ($n=5$) \pm EEM. $P<0.05$

6.4.- Seguimiento del volumen tumoral por imagen molecular.

En la figura 7 se muestran las imágenes moleculares al inicio y al término de la evaluación de los grupos de Radiación y de su combinación con Temozolamida y MF. En cada tratamiento se aprecian diferentes intensidades de color en el tumor, que representa la captación del radiofármaco FDG, donde una menor intensidad de color refleja una menor actividad metabólica. Como se observa en las imágenes existe un cambio en la actividad metabólica al inicio y al día 25 de la evaluación en cada uno de los tratamientos y entre ellos, además, se aprecia una disminución en la combinación de Radiación + Temozolamida + MF con respecto al control, al tratamiento convencional y a la Radiación sola.

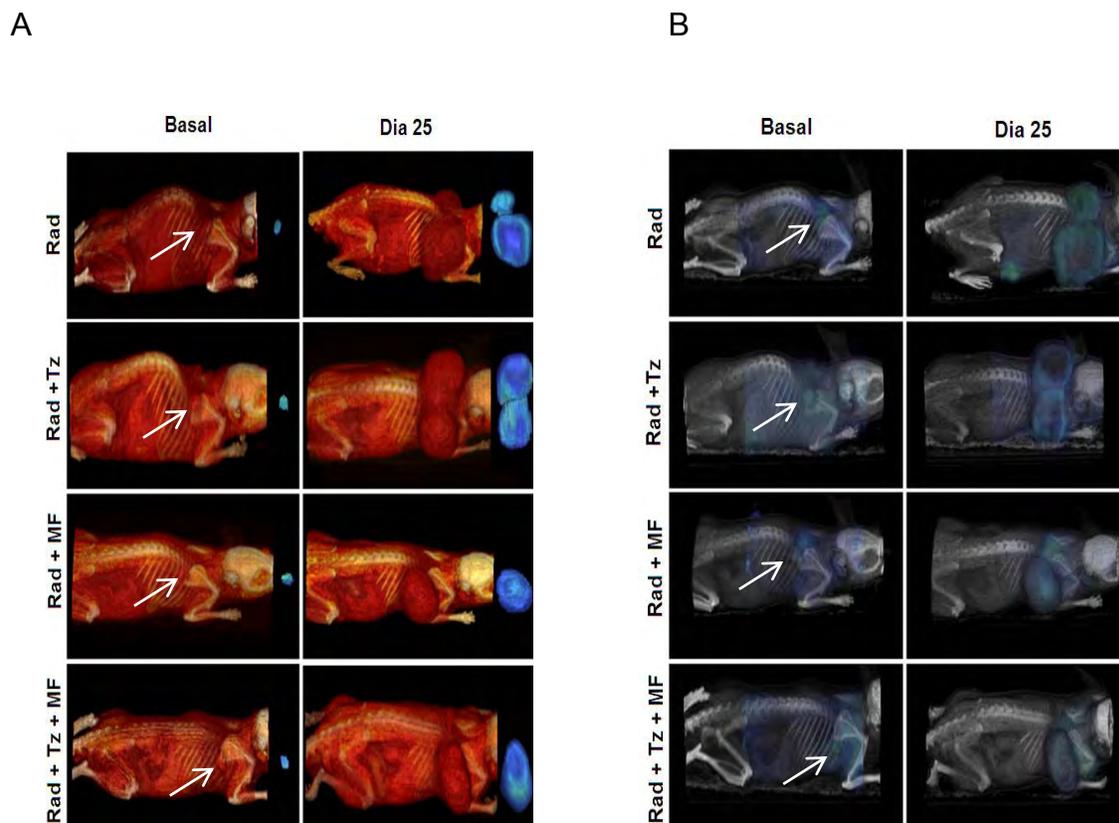


Figura 7. Imágenes Moleculares microPET/CT. A) Tomografía computarizada (CT), B) CT fusionada con PET. Los datos son representados por el promedio (n=2).

A partir de las imágenes moleculares se determinó el volumen metabólico del tumor en los diferentes tratamientos representado como VOI (volumen de interés) representado en la Figura 8. Para cada tratamiento se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el inicio y final de la evaluación. Además, se aprecia una diferencia significativa entre Radiación y las combinaciones con Temozolamida y MF.

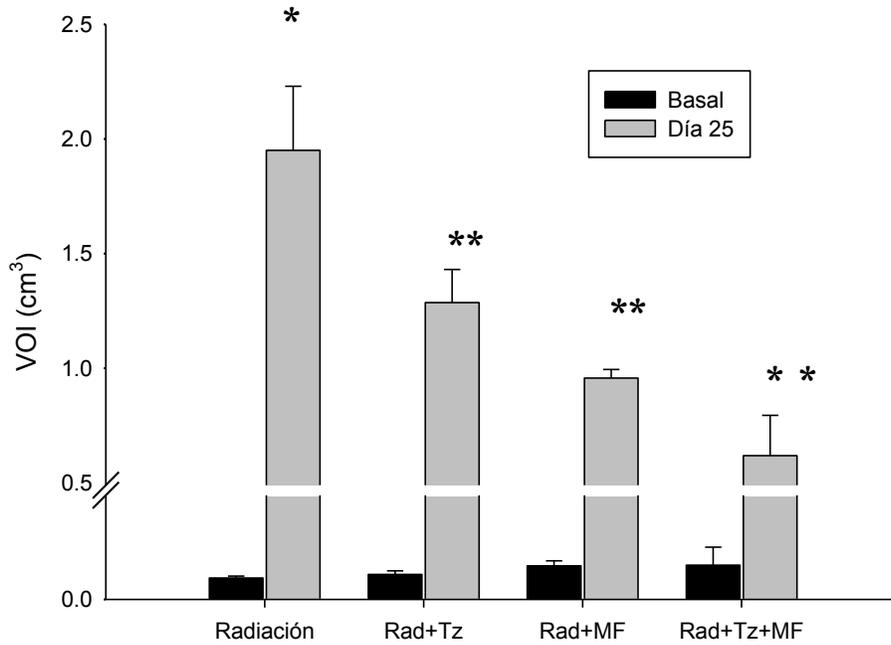


Figura 8. Volumen de interés (VOI, Volumen of interest) que representa la actividad metabólica de los tumores en los diferentes tratamientos. Los datos son representados por el promedio (n=2) \pm EEM.

* Diferencia estadísticamente significativa entre basal vs día 25.

** Diferencia estadísticamente significativa Rad vs Rad+Tz, Rad+Mif y Rad+Mif+Tz. P<0.05

6.5.- Expresión relativa del gen de VEGF por RT-PCR en tiempo real al término de la evaluación de cada tratamiento.

En la Figura 9 se muestra la comparación en la expresión de VEGF en el tejido tumoral después de cada tratamiento. Se puede apreciar una reducción de la expresión de VEGF en todos los tratamientos con respecto al control no habiendo diferencia estadística entre los tratamientos.

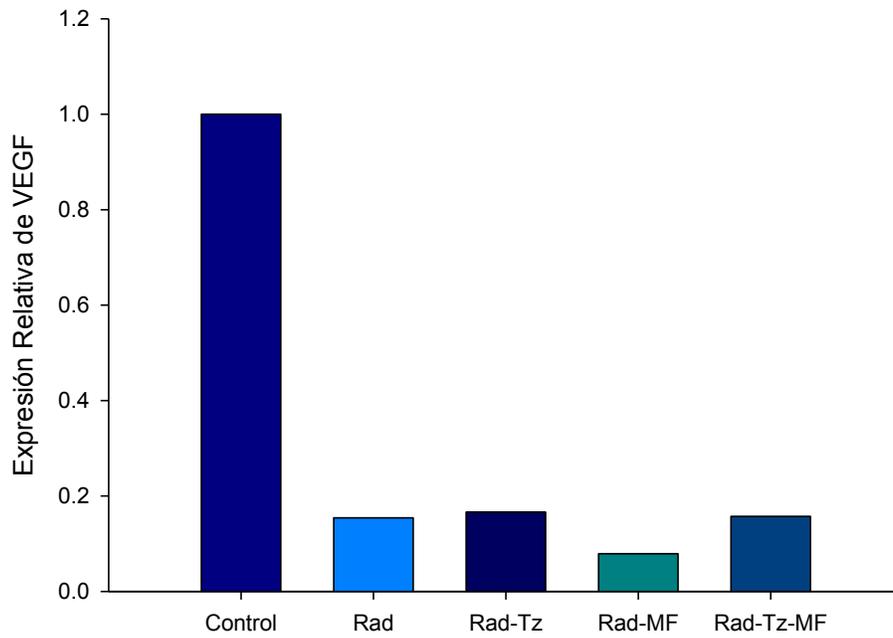


Figura 9. Expresión relativa del gen de VEGF por RT-PCR en tiempo real al término de la evaluación de cada tratamiento. Los datos son representados por el promedio (3-5).



7.- DISCUSIÓN.

Durante muchos años, los intentos de mejorar el pronóstico de los pacientes con glioma han incluido cambios en los esquemas de tratamiento. Debido a que la Radiación por sí sola no demostraba un aumento significativo en la supervivencia se comenzó a aplicar con quimioterapia basada en nitrosureas; sin embargo, su eficacia siguió siendo baja⁵⁸. Posteriormente, se sustituyeron las nitrosureas con agentes alquilantes principalmente Temozolamida mostrando una mejora en la sobrevivencia de 14.6 meses comparado con 12 meses en pacientes que no la recibieron^{43,47}. A pesar del aumento en la supervivencia, el índice de mortalidad sigue siendo alto ya que aproximadamente el 90% de los pacientes experimentan una recurrencia⁵⁹ por lo que se requiere buscar nuevas alternativas de tratamiento que permitan una mayor eficacia

La radioterapia es un tratamiento que ha aumentado la supervivencia en diferentes tipos de cáncer, desafortunadamente su eficacia en el glioma está limitada debido a que puede dañar tejido neurovascular sano que rodea al tumor, por lo tanto, para minimizar este efecto la dosis máxima no puede ser mayor a 60 Gy. Por lo cual el aumentar la sensibilidad celular a la radioterapia es una estrategia prometedora para mejorar la respuesta al tratamiento para este tipo de cáncer.

En el presente trabajo se investigó el posible efecto radiosensibilizante de MF en xenotransplantes de glioma; a pesar de que existen pocos estudios donde se aplican agentes radiosensibilizantes para el tratamiento de cáncer en el SNC, estos han tenido una baja respuesta (por ejemplo, el Tamoxifen)⁴⁸.

La primera etapa del presente trabajo se determinó la dosis adecuada y el mejor esquema de radiación para los tratamientos combinados. La eficacia del tratamiento de radiación depende de varios factores, entre ellos: el tipo de célula, la dosis fraccionada, la dosis total y la duración del tratamiento. Dada la diversidad



de estos factores, la radioterapia no siempre tiene el efecto deseado debido al desarrollo de células resistentes y en ciertos casos con mayor capacidad proliferativa⁶⁰.

La primera etapa del trabajo consistió en evaluar el efecto de la radiación a dosis totales de 0, 5, 10 y 15 Gy aplicando la radiación bajo dos esquemas (1Gy/día o 2Gy/día hasta completar la dosis total. A pesar de no observar una diferencia significativa en los dos esquemas de Radiación y obtener una DE₅₀ similar, la dosis y el esquema de radiación para los estudios de la combinación con Mifepristona y Temozolamida fue de 10 Gy fraccionando la aplicación a 1Gy/día, con esta dosis se observaron menos efectos secundarios (entre ellos la necrosis). Una de las desventajas al aplicar una dosis mayor en cada fracción es el daño provocado al tejido sano por lo que al aplicar dosis menores se logra controlar el tamaño del tumor evitando daño al tejido sano. Además, se tomó en cuenta que con la aplicación de Radiación sola no se debe de presentar un efecto terapéutico significativo que no permita observar el efecto de la combinación de tratamientos.

Efecto terapéutico de la combinación Mifepristona-Temozolamida-Radiación en un modelo de xenotransplante de glioma.

Además de su uso como un agente anticonceptivo, MF también ha sido eficaz en el tratamiento para endometriosis, inhibición del crecimiento tanto *in vivo* como *in vitro* en meningioma⁶¹, así como en células de cáncer de mama⁵¹, ovario⁵² y próstata⁵³ entre otros.

En el caso de glioma, en un estudio previo se reportó que MF disminuyó el volumen del tumor en ratones atímicos con xenotransplantes de células de glioma humanas U87MG, inhibiendo el efecto estimulador del glucocorticoide Dexametasona sobre la proliferación de las células, sugiriendo que el efecto



antiproliferativo de MF se debe a la inhibición de la unión de los glucocorticoides a sus receptores⁵⁴.

Estudios recientes han demostrado que la MF aumenta la citotoxicidad de diversos agentes antineoplásicos, ya sea debido a un arresto en la fase G2 del ciclo celular en la cual las células presentan una mayor radiosensibilidad o por la inhibición de proteínas que regulan el ciclo celular, la proliferación celular y la apoptosis. La inhibición de cualquiera de las proteínas necesarias para la reparación del daño debe conducir a una sensibilización celular. Otro mecanismo es la inhibición de VEGF el cual es un factor de crecimiento y se ha visto que su inhibición aumenta la sensibilidad de las células a la radiación. En este sentido, MF podría ser un adyuvante en el tratamiento de glioma aumentando la sensibilidad de las células tumorales.

En el presente proyecto la combinación de MF y Radioterapia demostró una disminución del crecimiento tumoral con diferencia significativa con respecto al control y a la radioterapia sola, lo que sugiere un efecto radiosensibilizante de MF sobre las células tumorales como se muestra en la Figura 5. Además, se observó que al aplicar la triple combinación, el volumen tumoral fue menor comparado con los otros tratamientos, mostrando que la estrategia de esta combinación parece mejorar los resultados del tratamiento convencional para el glioma a nivel experimental.

El efecto terapéutico se evaluó también, por imagen molecular (Figura 7), observando resultados similares a los obtenidos con la medición del volumen tumoral utilizando un vernier calibrado; lo que indica una correlación entre lo observado y su actividad metabólica al aplicar MF al tratamiento de Radiación-Temozalamida.

Algunos de los mecanismos propuestos por los cuales MF puede mostrar un efecto radiosensibilizante se mencionan a continuación.



Uno de los factores celulares que más intervienen en la radiosensibilidad es la fase del ciclo celular en que se encuentran las células en el momento de la irradiación. Se ha reportado que la radiosensibilidad de las células cambia según avanza en el ciclo celular, siendo las células más sensibles al final de la fase G2-M mientras la fase G1 y S son más resistentes a las radiaciones⁶².

La alteración del ciclo celular por la radiación se debe a que ésta provoca bloqueos en los puntos de control (ATM, Chk2/Chk1) los cuales son mecanismos moleculares que verifican que se cumplen las condiciones necesarias para permitir que la célula pueda pasar de una fase del ciclo celular a otra⁶³.

Se ha demostrado que MF induce un arresto en la fase G1 del ciclo celular en células del cáncer de mama y de ovario a través de la inhibición de la actividad de Cdk2 la cual se asocia con la disminución del factor de transcripción E2F1 relacionado con la proliferación celular⁶⁴.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que MF fue capaz de incrementar el efecto de la Radio-Quimioterapia basada en cisplatino en una línea celular de cáncer cervical (HeLa) incrementándose el porcentaje de células en la fase G2-M del ciclo celular⁶. La Mayoría de células tumorales carecen de la capacidad para bloquear el ciclo celular en G1, sin embargo, mantienen la capacidad de bloqueo en la fase G2 del ciclo celular siendo crucial en la sensibilidad celular a la radioterapia.

Además, hacia el final de un tratamiento con radioterapia, las células más resistentes pueden iniciar un crecimiento acelerado con lo que una parte importante del efecto de la radiación se pierde. La administración de un citostático durante esta fase de repoblación acelerada puede inhibir el crecimiento tumoral y resultar en un aumento significativo de la eficacia antitumoral de la radiación.



Otros mecanismos que pueden estar implicados en la radiosensibilidad es la inhibición de las proteínas Hsp90, las cuales tienen funciones vitales como la regulación del ciclo celular, la proliferación celular y la apoptosis, entre otras. La familia de las Hsp90 se relaciona funcionalmente con los receptores de las hormonas esteroideas regulando su actividad biológica; por lo que su inhibición da lugar a la pérdida de la función de protección celular aumentando la sensibilidad de las células tumorales^{65, 66}.

Por otra parte, se ha observado que MF aumenta la sensibilidad de las células debido a la regulación de la expresión de Bcl-2 y Bax (proteínas que participan en el proceso de la apoptosis). Se ha encontrado que en células de cáncer de ovario el uso de MF inhibe Bcl-2, además se ha observado que activa la expresión de Bax (proteína pro-apoptótica), por lo tanto la relación Bcl-2/Bax es clave en la susceptibilidad celular; así mismo, en células de cáncer de mama se le ha relacionado con la activación de caspasas 3, 8 y 9, las cuales son mediadores esenciales en el proceso de apoptosis^{67, 68}.

Otro posible mecanismo por el cual MF puede tener un efecto radiosensibilizante es mediante la inhibición de la expresión del VEGF, el cual es un factor importante en la angiogénesis. La angiogénesis es un evento clave en la patología de los tumores de glioma y es necesaria para la progresión de esta neoplasia altamente agresiva debido a que las células tumorales requieren la angiogénesis para establecer una fuente de nutrientes y oxígeno.

En la angiogénesis los vasos formados presentan un flujo sanguíneo alterado y una permeabilidad alta provocando un suministro de oxígeno y nutrientes desbalanceado, creando zonas de hipoxia que son resistentes a la radiación. Se sabe que se obtiene un mejor resultado a la radioterapia cuando hay presencia de oxígeno provocando así un mayor daño a las células tumorales por la inhibición del VEGF, resultando en una estrategia atractiva de tratamiento para glioma.



Varios estudios han demostrado que MF participa en la inhibición de la expresión del VEGF. En la línea celular PC-3 de cáncer de próstata se observó que MF puede inhibir la secreción del VEGF a través del bloqueo del RG. Se sabe que las formas sintéticas y las naturales de la progesterona inducen expresión y secreción de VEGF en células de cáncer de mama en una manera dependiente de RP, observando en un estudio realizado por Hyder y Cols; que este efecto es bloqueado por MF, aumentando así el interés por estudiar la inhibición de VEGF en células de glioma⁶⁵.

En este trabajo se determinó la expresión del VEGF en tumores de glioma después de cada tratamiento. Nuestros resultados mostraron que la aplicación de Radiación sola inhibió de manera significativa la expresión del VEGF (Figura 9), sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales utilizadas no fue posible mostrar la participación de MF sobre la inhibición de la expresión de VEGF en los xenotrasplantes de Glioma al final del estudio. Es probable que la evaluación de la expresión de este factor en un curso temporal nos permita observar la participación de MF con el tratamiento de Radiación-Temozolamida sobre la angiogénesis.



8.- CONCLUSIÓN.

MF demostró un efecto Radiosensibilizante en un modelo de xenotransplante de glioma. Además, los resultados sugieren que la combinación de MF, Temozolamida y Radiación es eficaz en el tratamiento de glioma debido a que mostró una mejora en la disminución del crecimiento tumoral sin observarse toxicidad sistémica evaluada por la pérdida de peso de los animales experimentales.

9.- PERSPECTIVAS.

Es necesario estudiar los mecanismos moleculares que puedan estar participando en la radiosensibilidad de Mifepristona, así como continuar los estudios preclínicos que nos permitan proponer a Mifepristona para su inclusión en el tratamiento actual de glioma.



10.-BIBLIOGRAFÍA.

1. - <http://globocan.iarc.fr/>. [Consultado 2012-07-13]
- 2.- López, M., Sotelo, J. (2000). Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surg Neurol.* 53(2),157-62.
3. – Ries, L., Eisner, M., Kosary, C., *et al.* (2005). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2002. Bethesda, MD: NCI. Consultado en <http://seer.cancer.gov>.
4. - Machein, M., Plate, K. (2000). VEGF in brain tumors. *J Neurooncol*, 50(1-2),109-20.
- 5.- Baumgarten, L., Brucker, D., Tirniceru,A., *et al.* (2011). Bevacizumab Has Differential and Dose-Dependent Effects on Glioma Blood Vessels and Tumor Cells. *Clin Cancer Res*, 17, 6192-6205.
- 6.- Segovia, M. (2011). Agentes antihormonales como posible estrategia para quimio-radio-terapia basada en cisplatino para cáncer cervico uterino, un estudio *in vitro e in vivo*. Tesis de Maestría 2011. Instituto Nacional de Cancerología.
7. - Candece, L., Richard, A., Wei, L. (2010). The Pathobiology of Glioma Tumors. *Annu Rev Pathol*, 5, 35-50.
- 8.- Ortiz, U. (2004) Tumores cerebrales: radiocirugía estereotáxica o radioterapia intraoperatoria. *Oncología* [online]. 27, 38-41.
- 9.- <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num3/art36/index.html>. Consultado 2012-07-20



- 10.- Louis, N., Ohgaki, H., Wiestler, O., *et al.* (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2):97-109.
11. – Wrensch, M., Minn, Y., Chew. T., *et al.* (2002). Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the Literature. *Neuro-Oncol*, 4 (4), 278–99.
- 12.- Preston, S., Mack, W. Neoplasms of the nervous system. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2 ed. New York: Oxford University 1231-1281. 1996
- 13.- Thomas, T., Waxweiler, R. (1986). Brain tumors and occupational risk factors. *Scand. J. Work Environ. Health* 12, 1-15.
- 14.- Bondy, M., Wiencke, J., Wrensch, M., *et al.* (1994). Genetics of primary brain tumors: A review. *J. Neurooncol.* 18, 69-81.
- 15.- Sinning, M. (2009). Gliomas de alto Grado. *Rev. Hosp. Clin. Univ.* 20,215-220.
- 16.- Bondy, M., Scheurer, M., Malmer, B., *et al.* (2008). Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium, *Cancer*, 1953–1968.
- 17.- Packer, R., MacDonald, T., Vezina, G. (2008). Tumores del sistema Nervioso Central, *Clínicas Pediátricas de Norteamérica* 55, 121-145.
18. – Mason, W., Cairncross, J. (2008). The expanding impact of molecular biology on the diagnosis and treatment of gliomas. *Neurol*, 71, 365–73.
- 19.- Louis, D. (2006) Molecular pathology of malignant gliomas. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1:97–117.



- 20.- Soni, D., King, J., Kaye, A., *et al.* (2005). Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge. *J Clin Neurosci*, 12, 1–5.
- 21.- Hulleman E, Helin K. (2005). Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res*, 94, 1–27.
- 22.- Tate, M., Aghi, M. (2009). Biology of angiogenesis and invasion in glioma, *Neurother*, 3, 447– 457.
- 23.- Martínez, J., Herrera, L. (2006). Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología*, 83-96.
24. – Mischel, P., Cloughesy, T. (2003). Target molecular therapy of GBM. *Brain Pathol*, 13, 52-61.
- 25.- Priscilla, K., Tracy T. (2009). VEGF Inhibitors in Brain Tumors, *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 7, 753-768.
- 26.- Nam, D., Park, K, Suh, Y. *et al.* (2004). Expression of VEGF and brain specific angiogenesis inhibitor-1 in glioblastoma: prognostic significance. *Oncol Rep*, 11(4), 863-869.
- 27.- Lamszus, K., Heese, O., Westphal, M. (2004). Angiogenesis-related growth factors in brain tumors. *Cancer Treat Res*, 117, 169-190.
- 28.- Carroll, R., Zhang, J., Dashner, K. *et al.* (1995). Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*, 37, 496–503.
- 29.- Paoletti, P., Butti, G., Zibera, C., *et al.* (1990). Characteristics and biological role of steroid hormone receptors in neuroepithelial tumors. *J Neurosurg* 73, 736–42.



- 30.- Stojković, R., Jovanèvić, M., Šantel, D. *et al.* (1990). Sex steroid receptors in intracranial tumors. *Cancer*, 65, 1968–70.
- 31.- Brentani, M., Lopes, M., Martins, V. *et al.* (1984). Steroid receptors in intracranial tumors. *Clin Neuropharmacol*, 7, 347–50.
- 32.- Cosío, B., Torrego, A., Adcock, I. (2005). Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol*, 41(1), 34-41.
- 33.- Sanai, N., Berger, M. (2009). Operative Techniques for gliomas and the value of extent of resection. *Neurother*, 6, 478-86.
- 34.- Tanaka, M., Ino, Y., Nakagawa, K., *et al.* (2005). High-dose conformal radiotherapy for supratentorial malignant glioma: a historical comparison. *Lancet Oncol*, 6, 953-960.
- 35.- Rachel, A., Edward, R., *Essential Nuclear Medicine Physics*, 2 ed, 2006 151-158, capitulo 11 Radiation biology
- 36.- Radford, I. (1986). Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after x-irradiation of mammalian cell. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 49, 611-620.
- 37.- Serra, B. (2001). www.tdx.cat/bitstream/10803/4379/3/jbs3de6.pdf. Consultado 5/08/2012
- 38.- Brenner, D., Ward, J. (1992). Constraints on energy deposition and target size of multiply damage sites associated with DNA double.strand breaks, *Int J Radiat Biol*, 61, 737-748.



- 39.- Horwich, A. (1990). The future of radiotherapy. *Radioter Oncol*, 19, 353-356.
- 40.- Priscilla, K., Tracy T. (2009). VEGF Inhibitors in Brain Tumors, *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 7, 753-768.
- 41.- Hart, M., Grant, R., Garside, R., et al. (2008). Chemotherapeutic wafers for high grade glioma (Review). *The Cochrane Library* 3: CD007294
- 42.- Hart, M., Grant, R., Garside, R., et al. (2009). Temozolomide for High Grade Glioma.(Reviews). *The Cochrane Library*, 3, 1-23.
- 43.- Chamberlain, M. (2006). Treatment options for glioblastoma. *Neurosurg Focus*, 20 (4):E19.
- 44.- Anthony, R., Demeule, M., Laplante, A., et al. (2001). Multidrug resistance in brain tumors: Roles of the blood–brain barrier. *Cancer and Metastasis Reviews*, 20, 13–25.
- 45.- Joohee, S., Howard, A., Fine, M. (2010). Malignant Gliomas: New Translational Therapies. *Mt Sinai J Med*, 77, 655–666.
- 46.- Malcolm, J., Darkes, G., Blair, J. (2002). Temozolomide: A Review of its Use in the Treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and Other Advanced Cancers. *Am J Cancer*, 1 (1), 55-80.
- 47.- Bent, M. (2006). Adjuvant treatment of high grade gliomas. *Ann Oncol*, 17, 186-190.
- 48.- Donson, A., Weil, M., Foreman, N. (1990). Tamoxifen radiosensitization in human glioblastoma cell lines. *J Neurosurg*, 90, 533–6.



- 49.- Junhui, Z., Francis, T., David, S. (2006). Differential interaction of RU486 with the progesterone and glucocorticoid receptors, *J. Mol Endocrinol*, 37, 163–173.
- 50.- Johanssen, S., Allolio, B. (2007). REVIEW. Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome, *J. Endocrinol*, Vol. 157, págs. 561–569. 2007
- 51.- Klijn, J. (1989). Antiprogestins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer, *Cancer Res*, 49, 2851-2856.
- 52.- Goyeneche, A., Carón, R., Telleria, C. (2007). Mifepristone Inhibits Ovarian Cancer Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Clin. Cancer Res*, 13, 3370–3379.
- 53.- Gabaglia, C. R., Delaney, A., Gee, J., *et al.* (2010). Treatment combining RU486 and Ad5IL-12 vector attenuates the growth of experimentally formed prostate tumors and induces changes in the sentinel lymph nodes of mice. *J. Tran. Med*, 8,. 1-10.
- 54.- Pinski, J., Halmos, G., Shirahige, Y., *et al.* (1993). Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 77, 1388–92.
- 55.- Cadepond, F., Ulmann, A., Baulieu, E. (1997). RU486 (MIFEPRISTONE): Mechanisms of Action and Clinical Uses., *Ann. Rev. Med*, 48, 129–56.
- 56.- Jurado, R., López, A., Garcia, P., *et al.* (2009). Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: An *in vitro* and *in vivo* study, *Oncol report*, 22, 1237-1245.
- 57.- Medina, A., Herrera, B., Castro, M., *et al.* (2008). Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *J. Exp. Clin. Cancer Res*, 27-57.



- 58.- Walker, M., Green, S., Byar, D. *et al.* (1980). Randomized comparison of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N. Engl. J. Med.* 303,1323-1329.
- 59.- Stupp, R., Dietrich, P. (2002). Promising survival for patients with diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolamide followed by adjuvant temozolamide. *J. Clin. Oncol*, 5, 1375-1382.
- 60.- Núñez, M. Efectos biológicos de las radiaciones – Dosimetría. [En línea]. [Consultado noviembre 4 del 2012].
http://www.alasbimn.net/comites/tecnologos/material/Efectos_biologicos_de_las_radiaciones.pdf.
- 61.- Lamberts, S., Tanghe, H., Avezaat, C., *et al.*(1992). Mifepristone (RU 486) treatment of meningiomas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 55, 486-490.
- 62.-<http://www.biocancer.com/journal/1385/44-ciclo-celular-y-radiosensibilidad>
[Consultado noviembre 4 del 2012].
- 63.- Ramos, A., Heryas, A., Montero, A., *et al.* (2004). La oncología radioterápica moderna situación actual. *Psicooncología*, 1, 13-30.
- 64.- Freburg, E. (2008). Effect of Mifepristone used alone or with cisplatin chemotherapy on human ovary cancer cell growth, University of south Dakota.
- 65.- Bull, E., Dote, H., Kristin J., *et al.* (2004). Enhanced tumor cell radiosensitivity and abrogation of G2 and S phase arrest by the Hsp90 inhibitor inhibitor 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldamycin. *Clin Cancer Res*, 10, 8077-8084.



66.- Wakedkar, S., Perivasamy, S. (2001). Inhibition of heat shock transcription factor by GR. *Mol. Endocrinol*, 8, 1396-1410.

67.- Han, S., Sidell N. (2003). RU486 induced growth inhibition of human endometrial cell involves the nuclear factor kappa B signaling pathway, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 713-719.

68.- Gaddy, B., Barret, J., Delk, J. (2004). Mifepristone induced growth arrest caspase activation and apoptosis of estrogen receptor expressing antiestrogen resistant breast cancer cell. *Clin Cancer Res*, 10, 5215-5225.

69.- Hyder, S., Chiappetta, C., Stancel, G. (2001). Pharmacological and endogenous progestins induce vascular endothelial growth factor expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer*, 92, 469-473.