



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ESTUDIO PRECLÍNICO DEL SINERGISMO ASOCIADO A  
TEMOZOLAMIDA CON MIFEPRISTONA EN UN MODELO ORTOTÓPICO  
DE GLIOBLASTOMA**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
MONSERRAT LLAGUNO MUNIVE**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR:  
DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

Ciudad de México

2019  
Noviembre



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cancerología, el proyecto fue financiado por el proyecto CONACyT CB-258823.

Se agradece al CONACyT por la beca 330137 otorgada mediante el Programa de Becas para Estudios de Posgrado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Escuela Superior de Medicina por la Beca Institucional otorgada, por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

# Dedicatorias

*A mi segunda mamá Emilia Llaguno quien fue una mujer maravillosa y siempre me motivo a seguir adelante, le dedico este trabajo por que siempre fué y seguira siendo mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme tantos momentos de felicidad y aprendizajes, a quien prometí esforzarme e investigar nuevos tratamientos para el glioblastoma. Promesa cumplida*

*Les dedico este trabajo a mis padres y mis hermanos, quienes siempre me han brindaron su amor y apoyo incondicional, por sus consejos y por siempre orientarme a tomar las mejores decisiones, por ser ejemplo de superación y por confiar en mi.*

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa y brindarme la oportunidad de desarrollarme como estudiante y ser humano.

Al Instituto Nacional de Cancerología por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A mis padres por apoyarme en todo momento, por su motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos Liz, Sonia, Cesar y Marys que conocen este proyecto tanto como yo, gracias por escucharme, por sus desvelos, su confianza, por apoyarme siempre, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles. Los quiero mucho.

A la Dra. Patricia García López mi tutora principal, por confiar en mi y darme la oportunidad de realizar este proyecto. Por su orientación y experiencia y por ayudarme en mi crecimiento académico. Gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A los miembros del Jurado: Dra. Ana María Salazar y al Dr Mauricio Rodriguez por sus comentarios, observaciones y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Luis Alberto Medina por su aporte en este trabajo, por brindarme las facilidades para realizar los experimentos.

A mis compañeros y amigos, de los laboratorios de Farmacología, Física Médica, Oncología Médica y Epigenética del Instituto Nacional de Cancerología; por todos los momentos, consejos y experiencias compartidas a lo largo de todo este tiempo.

Muchas gracias a todos por su apoyo, les agradezco de todo corazón por estar a mi lado.

# Índice general

Agradecimientos	II
Lista de figuras	VI
Lista de abreviaturas	IX
<b>1 Introducción</b>	<b>3</b>
1.1 <i>Tumores del Sistema Nervioso Central.</i>	3
1.2 <i>Glioblastoma.</i>	4
1.3 <i>Etiología.</i>	5
1.4 <i>Síntomas.</i>	6
1.5 <i>Patología molecular en el desarrollo de glioma.</i>	6
1.6 <i>Diagnóstico y tratamiento.</i>	8
1.6.1 <i>Cirugía.</i>	8
1.6.2 <i>Radioterapia.</i>	9
1.6.3 <i>Quimioterapia.</i>	9
1.7 <i>Resistencia al tratamiento con Temozolamida.</i>	10
1.7.1 <i>Transportadores dependientes de ATP.</i>	12
1.7.2 <i>Evasión de la apoptosis.</i>	13
1.7.3 <i>Mecanismo de MGMT.</i>	14
1.8 <i>Reposicionamiento Farmacológico.</i>	17
1.9 <i>Mifepristona como fármaco de reposicionamiento en cáncer.</i>	18
1.10 <i>Mifepristona como agente quimiosensibilizante.</i>	20
1.11 <i>Relevancia e impacto del proyecto.</i>	22
<b>2 Hipótesis</b>	<b>23</b>
<b>3 Objetivos</b>	<b>24</b>
3.1 <i>Objetivo General</i>	24
3.2 <i>Objetivos Particulares</i>	24

<b>4</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>26</b>
4.1	<i>Animales de Experimentación.</i>	26
4.2	<i>Línea celular.</i>	26
4.3	<i>Desarrollo de tumores de glioma en un modelo ortotópico.</i>	27
4.4	<i>Tratamientos.</i>	27
4.5	<i>Seguimiento del crecimiento tumoral.</i>	28
4.5.1	<i>Imagen molecular.</i>	28
4.5.2	<i>Perdida de peso y sobrevida.</i>	28
4.6	<i>Inmunohistoquímica.</i>	28
4.7	<i>Estudios moleculares.</i>	29
4.8	<i>Estandarización del método cromatográfico por HPLC/MS para la cuantificación de Tz en tejido cerebral.</i>	30
4.8.1	<i>Proceso de extracción.</i>	30
4.8.2	<i>Condiciones cromatográficas.</i>	30
4.8.3	<i>Condiciones del espectrómetro de masas.</i>	31
4.8.4	<i>Determinación de los parámetros de desempeño.</i>	31
4.9	<i>Cuantificación de Tz en tejido cerebral de rata después de la administración de Mifepristona.</i>	32
4.10	<i>Análisis estadístico.</i>	33
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>34</b>
5.1	<i>Modelo ortotópico de glioma en rata.</i>	34
5.2	<i>Efecto terapéutico de Mifepristona como agente Químio-sensibilizante.</i>	35
5.3	<i>Efecto de Mifepristona sobre la proliferación celular.</i>	38
5.4	<i>Apoptosis en el mecanismo químio-sensibilizante de Mifepristona.</i>	40
5.5	<i>Efecto de Mifepristona sobre la expresión de la enzima MGMT.</i>	41
5.6	<i>Participación de Mifepristona y Temozolamida sobre la densidad vascular y VEGFA.</i>	42
5.7	<i>Efecto de Mifepristona y Temozolamida sobre la proteína P-gp.</i>	43
5.8	<i>Método cromatográfico por HPLC-MS para la cuantificación de Tz en cerebro.</i>	45
5.8.1	<i>Determinación de los parámetros de desempeño del método.</i>	45
5.9	<i>Influencia de Mifepristona sobre la concentración de Temozolamida intracerebral.</i>	48
5.10	<i>Efecto terapéutico de Mifepristona en combinación con Temozolamida durante la recurrencia tumoral.</i>	49
5.11	<i>Efecto de Mifepristona en combinación con Temozolamida sobre MGMT durante la recurrencia tumoral.</i>	51

5.12	<i>Participación de Mifepristona y Temozolamida sobre VEGFA durante la recurrencia tumoral.</i>	53
5.13	<i>Efecto de Mifepristona en combinación con Temozolamida sobre la proteína P-gp durante la recurrencia tumoral.</i>	54
<b>6</b>	<b>Discusión</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Conclusión</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Perspectivas.</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>Apéndice</b>	<b>80</b>



# Índice de figuras

1.1	Figura 1. Epidemiología del cancer en el sistema nerviso central a nivel mundial y de México (globocan 2018). . . . .	4
1.2	Figura 2. Esquema del mecanismo de acción de Temozolamida. Imagen modificada de Darkes, et al. 2002 . . . . .	10
1.3	Figura 3. Esquema de los posibles mecanismos de quimioresistencia en glioblastoma. . . . .	11
1.4	Figura 4. Esquema del mecanismo de MGMT . . . . .	14
1.5	Tabla 1. Expresión de MGMT en tejidos sanos (Christmann, Nagel et al. 2010). . . . .	15
5.1	Figura 5. a) Registro de peso corporal de las ratas después de la inoculación intracraneal de células C6 o del vehiculo. Cada punto representa el promedio de $n=6 \pm$ EEM. b) Imágenes Moleculares tomadas con un microPET/CT. La intensidad del color rojo representa la captación de 18-FLT. *Diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$ entre el grupo sham y el grupo inoculado con células C6 . . . . .	35
5.2	Figura 6. Imágenes Moleculares de tumores de glioblastoma tomadas con un equipo microPET/CT. Tomografía computarizada (CT) fusionada con PET. a) Imagenes al inicio del tratamiento (Basal) y a la segunda semana del tratamiento. b) Actividad proliferativa en términos de TLP ( $n=3 \pm$ EEM). . . . .	36
5.3	Figura 7. Seguimiento de peso relativo en el modelo ortotópico de glioma durante el tiempo de evaluación de los diferentes tratamientos. Cada punto representa el promedio de $n=8 \pm$ EEM. *Diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$ Mif/Tz vs los otros grupos (Sin tratamiento, Tz sola y Mif sola). + Diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$ Mif/Tz vs Sham. ‡ Diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$ Mif vs Mif/Tz) . .	37

5.4	Figura 8. Tinción de Eosina y Hematoxilina (H&E) y Ki67 en cortes histológicos de los diferentes tratamientos. Cortes histológicos con hematoxilina y eosina (H&E) (a-e). Mitosis (flechas negras), pleomorfismo nuclear (flechas rojas) y necrosis (flechas amarillas). Inmunohistoquímica de ki-67 (f-j). Aumento 40x. . . . .	39
5.5	Figura 9. a) Niveles de proteínas apoptóticas Bcl-2, Bax y cl-caspasa 3 a los 21 días de tratamiento en los diferentes grupos. b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos. n=3 ± DE. *Diferencia estadísticamente significativa p<0.05 . . . . .	40
5.6	Figura 10. a) Niveles de MGMT a los 21 días de tratamiento en los diferentes grupos b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos. n=3 ± DE. *Diferencia estadísticamente significativa p<0.05 . . . . .	41
5.7	Figura 11. Inmunohistoquímica de CD31 en cortes histológicos al término del tratamiento. Aumento de 40x. . . . .	42
5.8	Figura 12. Cuantificación de VEGF a los 21 días con tratamiento en los diferentes grupos n=8 ± DE. *Diferencia estadísticamente significativa p<0.05	43
5.9	Figura 13. a) Niveles de P-gp a los 21 días de tratamiento en los diferentes grupos b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos. n=3 ± DE. *Diferencia estadísticamente significativa p<0.05 . . . . .	44
5.10	Figura 14. a) Cromatograma blanco (matriz biológica), cromatograma de Tz (500 ng/ml) con tiempo de retención 0.67 min y EI (1000 ng/ml) con tiempo de retención de 0.70 min. b) Espectros de masa Tz (137.95 m/z) y EI (124 m/z). . . . .	46
5.11	Figura 15. Curva de calibración de Tz en tejido.. Criterio de aceptación obteniéndose un coeficiente de correlación $r^2 = 0.99$ n=6 ± DE . . . . .	46
5.12	Tabla 2. Repetibilidad intradía de Tz en tejido obtenida en tres diferentes días. Criterio de aceptación % CV ( $\leq 15\%$ ) . . . . .	47
5.13	Tabla 3. Reproducibilidad interdía de Tz en tejido cerebral. Criterio de aceptación %CV ( $\leq 15\%$ ) n=6 ± DE . . . . .	47
5.14	Tabla 4. Exactitud de Tz en tejido cerebral. n= 5 ± DE . . . . .	48
5.15	Figura 16. Cromatogramas y espectro de m/z de las ratas administradas con Tz y Tz/Mif. . . . .	48
5.16	Figura 17. Concentración de Tz presente en tejido cerebral n=8 ± DE. *Diferencia estadísticamente significativa p<0.05 . . . . .	49

5.17	Figura 18. a) Seguimiento del crecimiento tumoral post-tratamiento con un equipo microPET/CT. b) Seguimiento de peso relativo en el modelo ortotópico de glioblastoma durante y después del tratamiento. Cada punto representa el promedio de $n=8 \pm$ EEM. *Diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0.05$ Mif/Tz vs Sham . . . . .	50
5.18	Figura 19. Curvas Kaplan-Meier. Análisis de sobrevida de los diferentes tratamientos. $n=8$ . . . . .	51
5.19	Figura 20. Determinación de la enzima de reparación al ADN (MGMT). a) Comparación de los niveles de MGMT después del tratamiento con Mif/Tz. b) Análisis de densitometría. $n=3 \pm$ DE. S/T=Sin tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0.05$ . . . . .	52
5.20	Figura 21. Determinación de VEGF después del tratamiento. $n=5 \pm$ DE. S/T=Sin tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0.05$ . . . . .	53
5.21	Figura 22. a) Determinación de los niveles de P-gp después del tratamiento. b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos. $n=3 \pm$ DE. S/T=Sin tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa $p \leq 0.05$ . . . . .	54

# Lista de abreviaturas

<b>SNC</b>	Sistema Nerviso Central
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>BH</b>	Barrera Hematoencefálica
<b>IDH</b>	Isocitrato deshidrogenasa
<b>TCGA</b>	Atlas del genoma del Cáncer
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de la investigación para el cáncer
<b>CMVH</b>	Citomegalovirus humano
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>RG</b>	Receptores a glucocorticoides
<b>RP</b>	Receptores a progesterona
<b>RA</b>	Receptores a andrógenos
<b>RE</b>	Receptores a estrógenos
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor transformante beta
<b>TC</b>	Tomografía Computarizada
<b>RM</b>	Resonancia Magnética
<b>PET</b>	Tomografía de emisión de positrones
<b>Tz</b>	Temozolamida
<b>MTIC</b>	Monometil triazenoimidazol carboxamida
<b>AIC</b>	5-aminoimidazol-4-carboxamida
<b>MPTPC)</b>	Poros mitocondrial de permeabilidad transitoria
<b>Apaf</b>	Factor activador de la proteasa apoptótica
<b>IAP</b>	Proteínas inactivadoras de la apoptosis
<b>AIF</b>	Factor inductor de la apoptosis
<b>O6-MGMT</b>	O6-metil guanina ADN-metil transferasa)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Mif</b>	Mifepristona
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>HPLC/MS</b>	Sistema de Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría
de	Masas
<b>E.I</b>	Estandar interno
<b>18-FLT</b>	Fuorotimidina

<b>Ci</b>	Curie
<b>H&amp;E</b>	Eosina y Hematoxilina
<b>TLP</b>	Total lesion proliferation

# Resumen

---

El glioblastoma es la neoplasia más agresiva del Sistema Nervioso Central, su tratamiento estándar es resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia a base de Temozolamida; sin embargo, los pacientes presentan una resistencia al tratamiento dando como resultado una rápida progresión y recurrencia tumoral. El objetivo del presente proyecto fue evaluar si Mifepristona, un agente antihormonal, incrementa el efecto de Temozolamida en glioblastoma así como los mecanismos involucrados. El efecto de Mif/Tz se evaluó en ratas wistar las cuales se sometieron a una cirugía estereotáxica intracraneal para inocular las células C6 de glioblastoma. La proliferación celular se evaluó usando un equipo microPET/CT y como radiomarcador 18-FLT observándose una disminución en la proliferación de las células tumorales a los 21 días de tratamiento, correlacionando con los resultados obtenidos con el marcador Ki-67. Además se evaluó la enzima involucrada con la reparación al daño al ADN (MGMT) observándose una disminución en los niveles de la proteína, el incremento de apoptosis fue determinada por la cuantificación de los niveles de proteínas pro-apoptóticas (Bax y caspasa 3) y anti-apoptóticas (Bcl-2). También se observó un incremento en la cuantificación de Tz intracraneal por una disminución en los niveles de la proteína P-gp. En el estudio se observó una recurrencia tumoral en el grupo Mif/Tz a la séptima semana, a pesar de que hubo un incremento en los niveles de las proteínas relacionadas con apoptosis, VEGF, MGMT, P-gp regresando a los niveles de los controles, el 30% de los animales lograron sobrevivir por más de 12 semanas post-cirugía. En conclusión nuestros resultados sugieren que Mifepristona podría actuar como un agente quimiosensibilizante para Temozolamida durante la quimioterapia en pacientes con glioblastoma.

# Abstract

---

Glioblastoma is the most common primary central nervous system tumor. The standard treatment for glioblastoma is surgery followed by chemo-radiotherapy. A major limitation on patient improvement is the high resistance of tumors to drug treatment, likely responsible for their subsequent recurrence and rapid progression. Therefore, alternatives to standard therapy are necessary. The aim of the present study was to evaluate whether mifepristone, an antihormonal agent, has a synergistic effect with temozolomide (used in standard therapy for gliomas). Whereas the mechanism of temozolomide involves damage to tumor DNA leading to apoptosis, tumor resistance is associated with DNA damage repair through the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) enzyme. Mifepristone/Temozolomide treatment, herein examined in Wistar rats after orthotopically implanting C6 glioma cells, markedly reduced proliferation at 21 days with treatment. This was evidenced by a decreased level of the following parameters: a proliferation marker (Ki-67), a tumor growth marker (18 F-fluorothymidine uptake, determined by PET/CT images), and the MGMT enzyme. Increased apoptosis was detected by the relative expression of related proteins, (Bcl-2, Bax, and caspase-3). Also, it was observed and increasing of intracerebral concentration of Temozolamide by a decreased level log P-gp protein. Thus, greater apoptosis of tumor cells caused by their diminished capacity to repair DNA probably contributed significantly to the enhanced activity of temozolomide. Also in the study we observed a tumoral recurrence in Mif/Tz group at 7-week post-surgery in rats administered with Mif/Tz, however, the 30% animals survival more of 12 weeks post-surgery. even though the apoptosis, angiogenesis, DNA repair mechanisms, as well as the level of P-gp protein, increased. The results suggest that mifepristone could act as a chemo-sensitizing agent for temozolomide during chemotherapy for glioblastoma.

# Capítulo 1

## Introducción

---

### 1.1. *Tumores del Sistema Nervioso Central.*

El cáncer en el sistema nervioso central (SNC) constituye un 3% de muertes por esta enfermedad, siendo el Glioma la neoplasia primaria más frecuente del SNC con un pronóstico de vida de 14 a 15 meses una vez diagnosticado (Johnson and O'Neill 2012, Thakkar, et al. 2014). Surge a partir de las células gliales. La glía cumple funciones de sostén y nutrición de las neuronas como el desarrollo y homeostasia cerebral, procesos de aprendizaje y regeneración (Jakel and Dimou 2017).

El cáncer del SNC no es una de las entidades tumorales más frecuentes en la epidemiología nacional. En las mujeres ocupa el 2.4% de los casos totales y en el caso de los hombres el porcentaje es de 3.8%; sin embargo, a pesar de tener baja incidencia su mortalidad es del 100% (globocan 2018)

La clasificación de los tumores del sistema nervioso central mas actualizada es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS); la cual fue revisada y modificada en el 2016, este sistema ha clasificado los gliomas de acuerdo a sus similitudes microscópicas de las células gliales precursoras, tipo histológico y marcadores de citodiferenciación (Louis, et al. 2016) Dentro de esta clasificación se encuentran los astrocitomas difusos (grado II y grado III) caracterizados por un crecimiento infiltrante a los alrededores del parénquima del sistema nervioso central, por otra parte se encuentran los astrocitomas pilocíticos, ependinomas y glioblastomas (Wesseling 2016, Louis, et al. 2014))



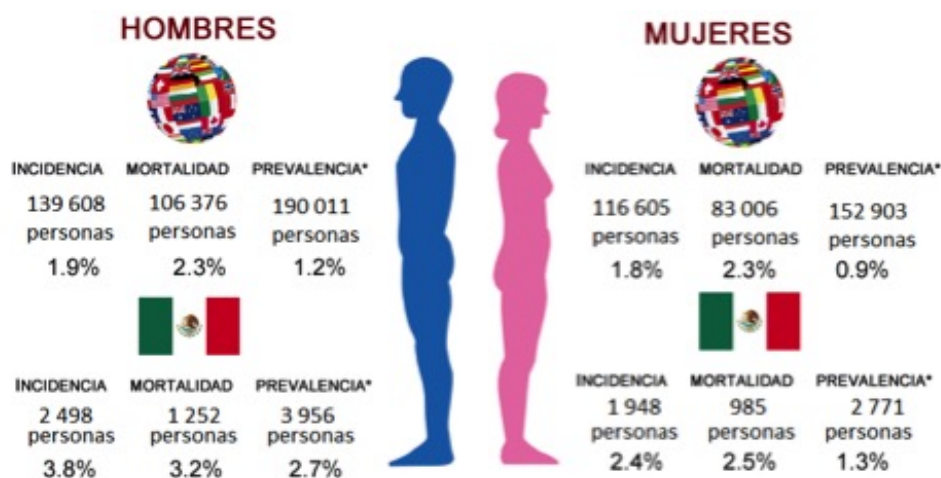


Figura 1. Epidemiología del cáncer en el sistema nervioso central a nivel mundial y de México (globocan 2018).

## 1.2. *Glioblastoma.*

El glioblastoma es un tumor muy infiltrante haciendo imposible la resección quirúrgica total, por lo que su tratamiento ha sido un reto debido a su localización en el cerebro, a la dificultad de los fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y a la respuesta limitada de las terapias así como la neurotoxicidad de los tratamientos (Ozdemir-Kaynak, et al. 2018). El glioblastoma puede desarrollarse a partir de un astrocitoma de bajo grado que va sufriendo transformación anaplásica e ir evolucionando hasta un glioblastoma secundario; o directamente presentarse como un glioblastoma primario o de “novo” (Ohgaki and Kleihues 2013).

Existe otra clasificación basada en el estado de IDH, separando los glioblastomas en dos; (1) los isocitrato deshidrogenasa (IDH) silvestres (90 % de los casos) los cuales predominan en pacientes mayores de 55 años. (2) Los IDH mutados corresponden a los glioblastomas secundarios y se presentan de manera preferente en jóvenes. Se ha visto que los pacientes que presentan glioblastoma secundario e IDH mutado tienen un mejor pronóstico que aquellos pacientes con IDH silvestre (Ohgaki and Kleihues 2013).

Investigadores del Atlas del genoma del Cáncer (TCGA) establecieron cuatro subtipos de glioblastoma basándose en características demográficas (edad) y en aspectos genómicos, de citodiferenciación, aspectos terapéuticos y pronóstico de supervivencia, con esta propuesta de clasificación los autores pretenden dar un tratamiento más personalizado (Verhaak, et al. 2010).

### **1.3. Etiología.**

Las causas que dan origen al glioblastoma no han sido bien identificadas; sin embargo, se ha reportado que la exposición a radiaciones ionizantes, daño o trauma en la cabeza, sustancias químicas, ocupaciones con exposiciones prolongadas a pesticidas, herbicidas y fertilizantes son factores de riesgo (Urbanska, et al. 2014, Benke, et al. 2017). La Agencia Internacional de la Investigación para el cáncer (IARC) establece como único factor que causa tumores en el SNC a las radiaciones ionizantes (Cogliano, et al. 2011). Se ha visto que en aquellos pacientes que son tratados con radioterapia para algún tumor primario del SNC tienen un incremento del 50 % de desarrollar un tumor secundario (Berrington de Gonzalez, et al. 2011).

Aproximadamente el 1 % de los pacientes con gliomas malignos tienen un historial familiar con gliomas (Schwartzbaum, et al. 2006). Algunos de estos casos están asociados con síndromes genéticos tales como neurofibromatosis tipo-1 y 2, síndrome de Li-Fraumeni, y síndrome de Turcot (Houben, et al. 2005).

En cuanto a la exposición a sustancias químicas industriales (disolventes orgánicos, formaldehído, fenoles, compuestos policíclicos aromáticos y los pesticidas) no existen pruebas contundentes que las relacionen con el desarrollo de tumores cerebrales en humanos. (Benke, et al. 2017).

En el caso de los virus como el citomegalovirus humano (CMVH), se ha relacionado con el desarrollo de glioblastoma. CMVH induce encefalitis congénita y cambios en múltiples órganos en humanos inmunocomprometidos, causa desregulación en vías de señalización (PDGFR, AKT, STAT3) así como alteraciones en células gliales (Cobbs, et al. 2002, Cobbs 2011)

En cuanto a la edad existe un aumento moderado de tumores cerebrales en la infancia, alrededor de los 10 años, donde predomina el Meduloblastoma, a partir de los 40 años 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 filipinos (Mariana, et al 2009). En el caso de mujeres postmenopáusicas se ha observado que tienen una mayor tendencia a desarrollar glioblastoma.(Kabat, et al. 2010, Posti, et al. 2015)

#### **1.4. *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 náuseas, 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 inflamación (Gutin and Posner 2000, Posti, et al. 2015).

#### **1.5. *Patología molecular en el desarrollo de glioma.***

La biología de los gliomas malignos se asocia con el balance de la expresión de las proteínas que controlan de manera positiva o negativa el ciclo celular, la proliferación, la motilidad, la neoformación vascular y el reconocimiento del sistema inmune. La frecuencia de las alteraciones genéticas que están presentes en glioblastoma son diferentes así como la edad de los pacientes en la que se presentan. Mientras que los glioblastoma primario suelen aparecer en edades más tardías, alrededor de los 60-70 años, los glioblastomas secundarios suelen presentarse en edades más tempranas, 40-50 años. En la génesis del glioblastoma existen alteraciones moleculares a nivel de genes supresores de tumores, oncogenes y genes reparadores de ADN (Demuth and Berens 2004, Ranjit, et al. 2015).

Estudios reportados en el atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) han identificado principalmente tres vías involucradas en la patogénesis del glioma: (RTK)/RAS/ (PI3K), p53 y retinoblastoma (Wang, et al. 2015). Sin embargo, se han estudiado otras vías de señalización como la vía proangiogénica la cual es importante para la gliomagénesis. 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 (grado IV).

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 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el cual se considera que es el mediador más importante en la angiogénesis, sus receptores están sobre-expresados en los gliomas y su expresión está relacionada con la densidad vascular y la proliferación celular; se ha reportado que la angiogénesis está correlacionada con el grado de malignidad y el pronóstico de esta enfermedad (Machein and Plate 2000, Kaur, et al. 2005). A la fecha se han utilizado varias estrategias para inhibir la expresión de VEGF una de ellas es el uso de Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado; un estudio fase III en el cual se evaluó la combinación de este anticuerpo con quimio-radioterapia, mostró una supervivencia del 65 % de pacientes con glioma grado IV a los 16 meses en comparación con el 50 % de los pacientes con la terapia convencional; sin embargo, la supervivencia global en ambos tratamientos no fue mayor de 2 años (Lee, et al. 2012) .

La influencia hormonal es otro de los factores que se han estudiado en el desarrollo del glioma; se ha reportado un aumento en la expresión de receptores a glucocorticoides y progestágenos en pacientes con glioma. Los receptores a glucocorticoides (RG) juegan un papel importante en la proliferación celular, se sabe que en meningiomas la expresión de receptores a progesterona (RP) y andrógenos (RA) es mayor a comparación con la expresión de receptores a glucocorticoides (RG) y estrógenos (RE) provocando un incremento en la infiltración del tumor (Pina-Medina, et al. 2016).

Diversos estudios donde han descrito que las mujeres presentan una menor incidencia y una mayor supervivencia que los hombres (Hatch, et al. 2005, Ostrom, et al. 2018). Se ha reportado que los estrógenos benefician la supervivencia en glioblastoma, Barone et al demostró que los estrógenos incrementan la supervivencia en un modelo ortotópico de glioma (Barone, et al. 2009), por el contrario los andrógenos promueven la tumorigénesis del

glioblastoma debido a inhibición del factor transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Yu, Jiang et al. 2015); sin embargo, Yang reporta que la diferencia en la sobrevida no esta mediada únicamente por factores hormonales, estas diferencias también se deben a la interacción entre las células de glioma y el microambiente tumoral, ellos evaluaron el transcriptoma de diferentes pacientes de glioblastoma y observaron que existe diferencias entre mujeres y hombres en vías génicas que se correlacionan con la sobrevida; en el caso de los hombres la vía que más se correlaciona con la sobrevida es la de división celular lo que podría sugerir que los fármacos que bloquen la progresión del ciclo celular sean más efectivos en hombres que en mujeres. En el caso de las mujeres los genes que se correlacionaban más con la sobrevida son los que regulan la invasividad, lo que sugiere que los fármacos dirigidos a integrinas funcionarían mejor para las mujeres (Yang, et al. 2019).

## **1.6. *Diagnóstico y tratamiento.***

El diagnóstico de los tumores de glioma se realiza utilizando pruebas radiológicas como la Tomografía computarizada (TC), Resonancia Magnética (RM), Tomografía por emisión de positrones (PET), siendo estas pruebas importantes ya que proporcionan información importante para la planeación del tratamiento (Ahmed, et al. 2014).

El tratamiento actual de los gliomas malignos, se basa en la resección quirúrgica, con 60 Grays (Gy) de radioterapia (2 Gy diario) y quimioterapia basada en Temozolamida a una dosis de 75 mg/m<sup>2</sup> por 4 semanas, seguido de una dosis de 150-200 mg/m<sup>2</sup> por 5 días cada 28 días por 6 ciclos (Stupp, et al. 2005).

### **1.6.1. *Cirugía.***

La cirugía tiene 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 quimioterapia (Sanai and Berger 2009). La media de sobrevida para aquellos pacientes a los cuales solo se les realiza cirugía es significativamente mayor (1 año mas de sobrevida) comparada con los pacientes a los que solo se les realiza biopsia o resección parcial (Brown, et al. 2016). 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.

### 1.6.2. Radioterapia.

La dosis máxima de radiación son 60 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 neurocognitivas (Tanaka, et al. 2005).. La eficacia de la radioterapia en pacientes con glioma ha sido reportada en diferentes ensayos clínicos, en aquellos pacientes a los que solo se les aplica la radioterapia (12 meses) tienen una menor sobrevida comparada con los pacientes que recibieron Temozolamida/Radiación (14.6 meses) (Stupp, et al. 2005), siendo esta combinación con quimioterapia la terapia de elección para este tipo de tumores.

### 1.6.3. Quimioterapia.

La Temozolamida es un agente alquilante cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la replicación del ADN. Es un profármaco susceptible a un ataque nucleofílico por el agua y a un pH menor a 7 se transforma espontáneamente en monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), esta molécula rápidamente se degrada al 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) y al catión metildiazonio, este catión sufre un ataque nucleofílico por la guanina causando una transferencia del grupo metilo y así formar un aducto en la base del DNA. Se ha reportado que la citotoxicidad del temozolamida se debe principalmente a la alquilación de la guanina en la posición O<sup>6</sup>, teniendo una alquilación adicional en la posición N<sup>7</sup> (Darkes, et al. 2002) (Figura 2). Temozolamida tiene una biodisponibilidad oral prácticamente completa (90 %) y atraviesa la BH. Su biodisponibilidad céfalo-raquídea equivale al 30 % de la plasmática (Hart, Grant et al. 2008).

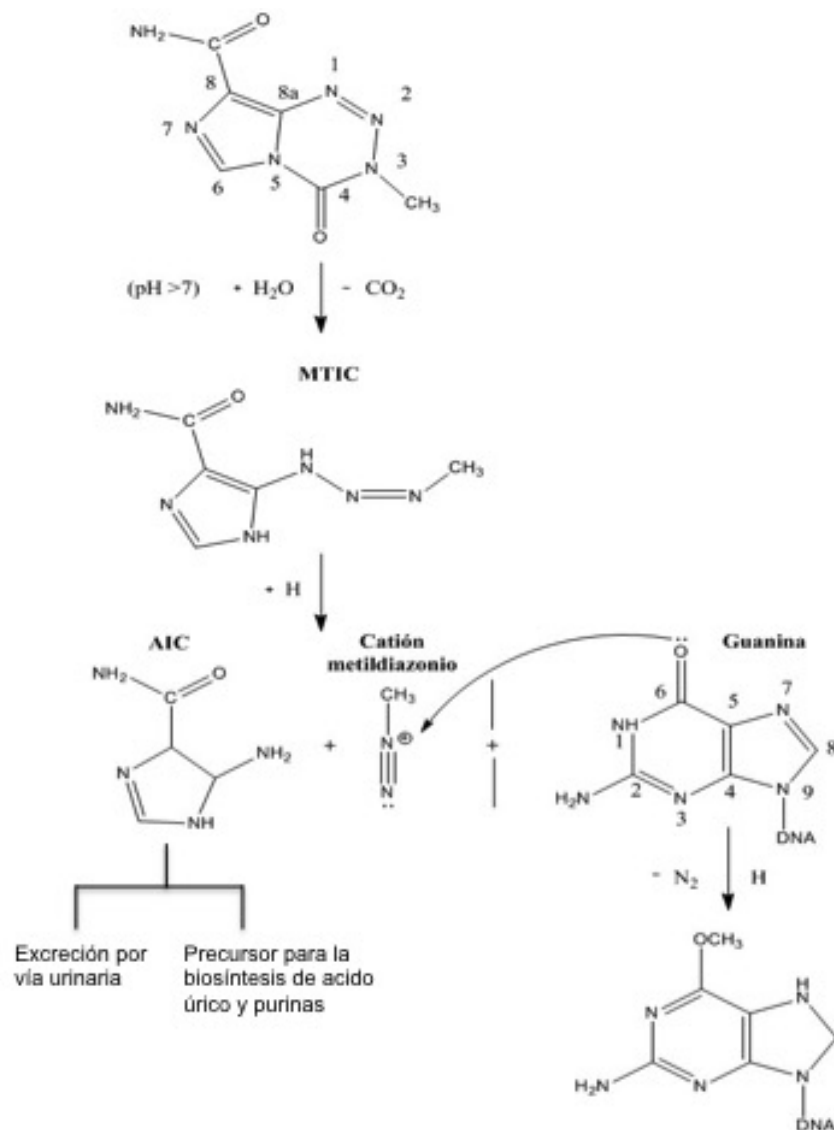


Figura 2. Esquema del mecanismo de acción de Temozolamida. Imagen modificada de Darkes, et al. 2002

### 1.7. Resistencia al tratamiento con Temozolamida.

La quimioterapia es uno de los métodos para el tratamiento de los tumores malignos; sin embargo, las células cancerosas generan resistencia a los fármacos, existen diferentes mecanismos por los cuales las células llegan a generar resistencia al tratamiento, ya sea por una baja acumulación del fármaco en el sitio de interés, alta expresión de bombas dependientes de ATP, alteraciones en vías de señalización, incremento en la reparación al

daño del ADN, evasión de apoptosis, entre otras. En el caso del gliomastoma uno de los principales factores que contribuyen a la quimioresistencia es la dificultad de los agentes antineoplásicos para atravesar la barrera hematoencefálica debido a sus propiedades físico-químicas, a la naturaleza de esta membrana y a la presencia de proteínas transportadoras dependientes de ATP (transportadores ABC) las cuales expulsan los fármacos de la célula disminuyendo su concentración intratumoral; es por ello que el bloqueo de este tipo de proteínas puede ser útil en el tratamiento de glioblastoma (Figura 3) (Louis 2006, Schaich, et al. 2009, Agarwal, et al. 2013)

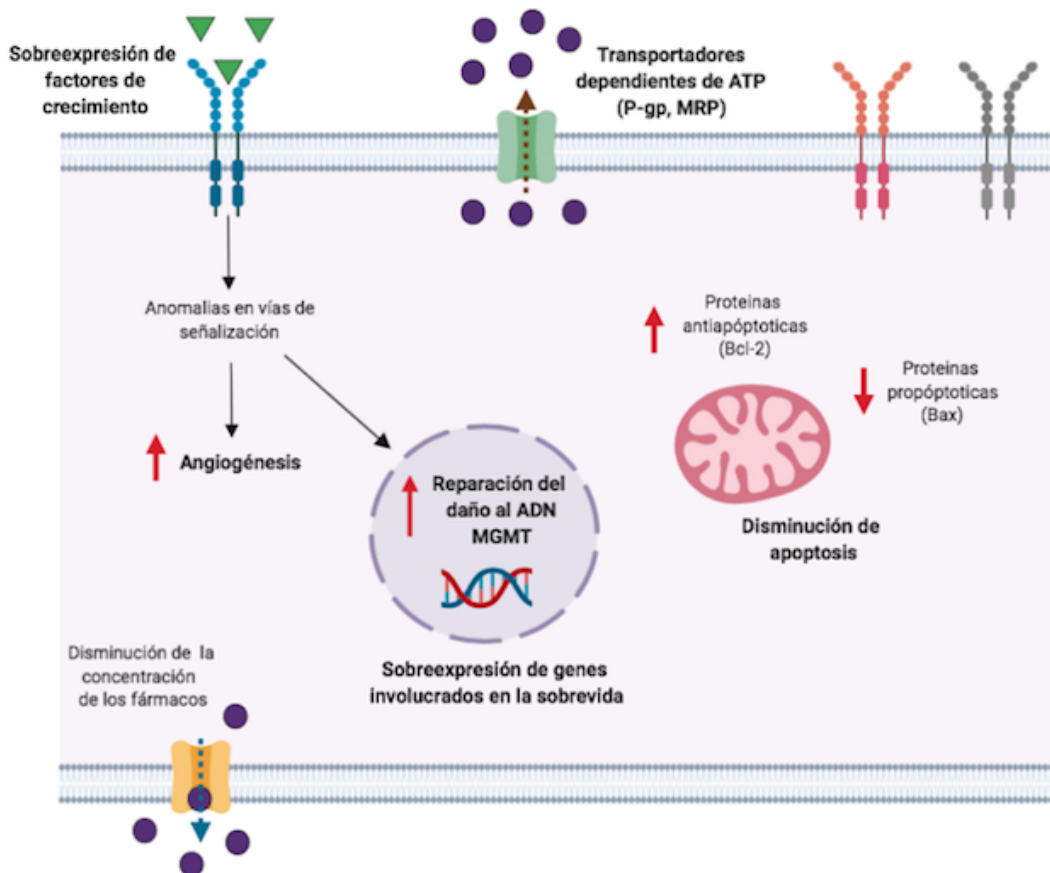


Figura 3. Esquema de los posibles mecanismos de quimioresistencia en glioblastoma.



### 1.7.1. Transportadores dependientes de ATP.

Uno de los mecanismos relacionados a la resistencia a la quimioterapia se debe a alteraciones en los transportadores dependientes de ATP. Los transportadores ATP facilitan el movimiento unidireccional de diferentes sustancias (aminoácidos, lípidos, metales, fármacos, proteínas), para poder realizar la translocación de estas sustancias los transportadores requieren del aporte de energía, esta energía es dada por la hidrólisis de ATP (Borst, et al. 2000, Jones and George 2004). Entre los transportadores que se encuentran más sobreexpresados tanto en la barrera hematoencefálica como en las células tumorales son la glicoproteína-P (P-gp/MDR1/ABC1) y las proteínas asociadas a la resistencia a fármacos MDR (MRP, ABCC) (Kolchinsky and Roninson 1997, Decleves, et al. 2002). P-gp fue el primer transportador ABC clonado y caracterizado; entre los fármacos que tienen afinidad por P-gp se encuentran la actinomicina D, taxanos, doxorubicina, antraciclinas y Temozolamida (Riganti, et al. 2014, Munoz, et al. 2015, Chung, et al. 2016).

P-gp se encuentra expresada de manera fisiológica en diferentes órganos involucrados en la absorción de fármacos y en su eliminación (intestinos, hígado, riñones, cerebro), tiene una alta expresión en la superficie apical de células epiteliales de hígado, páncreas, riñones e intestino (Ambudkar, Dey et al. 1999).

La familia de MRP está involucrada en el transporte de iones, fármacos, xenobioticos y toxinas, dentro de las sustancias que han mostrado afinidad por MRP se encuentran los aniones orgánicos conjugados como el glutatión conjugado. Estos transportadores se encuentran en la membrana luminal de células epiteliales de órganos como riñón, hígado, intestino, barrera hematoencefálica y placenta (Kruh and Belinsky 2003, Klein, Burla et al. 2006).

El bloqueo de estas proteínas podría ser importante para mejorar el tratamiento de glioblastoma, se ha reportado que Temozolamida compite con otros sustratos de P-gp y bloquea la bomba de eflujo (Munoz, Walker et al. 2015), por otro lado Zhang y colaboradores reportaron que Temozolamida es capaz de inhibir la ATPasa de P-gp disminuyendo así su actividad (Zhang, et al. 2016).

Por otro lado existe controversia en si Temozolamida es capaz de disminuir la expresión de Pgp, Munoz y colaboradores observaron que Temozolamida incrementa la expresión de P-gp mediante un incremento en la expresión de EGFR (Munoz, et al. 2014); sin embargo, existen otros reportes en los cuales se ha observado que Temozolamida reduce la expresión de P-gp en células de la barrera hematoencefálica (Riganti, et al. 2014) a través de la metilación del promotor de Wnt3a, este mecanismo podría sensibilizar a las células de glioblastoma al tratamiento.

### 1.7.2. Evasión de la apoptosis.

Otro de los mecanismos involucrados en la resistencia a la quimioterapia es la capacidad que tienen las células tumorales para evadir la apoptosis.

Existen dos vías de señalización, la intrínseca (via mitocondrial) y la extrínseca (receptores de muerte celular) (Danial and Korsmeyer 2004, Green and Kroemer 2004). La activación de la apoptosis es controlada por diferentes proteínas; la familia de anti apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL Y Mcl-1) y proteínas pro apoptóticas (Bax, Bak).

La apoptosis intrínseca se inicia en la mitocondria con la salida del citocromo c, se ha demostrado que Bax se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC), el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje y la ciclofilina D; Bax induce la apertura del poro mitocondrial disminuyendo así el potencial de la membrana provocando la salida de factores apóptóticos como 1) el citocromo c el cual desencadena la activación de las caspasas al unirse al factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf 1); 2) el smac, que bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP) y 3) el factor inductor de la apoptosis (AIF). La liberación de los factores pro apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras (caspasa 9) y efectoras o ejecutoras (caspasa 3, 6 y 7) (Ouyang, et al. 2012, Labi and Erlacher 2015).

Las células tumorales logran escapar de la apoptosis mediante sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) contribuyendo a un incremento en la supervivencia y a una resistencia a la quimioterapia, por lo que la inhibición de este tipo de proteínas se ha vuelto una estrategia importante en el tratamiento del cáncer.

La vía extrínseca se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembranal (Fas, TNFR, TRAIL) y se activan las caspasas activadoras (caspasa 8) estas a su vez activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras (caspasas 3 y 7) (Fulda 2014).

Varios reportes han demostrado que Bcl-2 se encuentra sobreexpresado en glioblastoma contribuyendo a la resistencia a la quimioterapia (Wick, et al. 1998, Steinbach and Weller 2004, Stegh, et al. 2007), cuando se presenta una recurrencia en glioblastoma se ha visto que hay una baja expresión de proteínas antiapoptóticas (Bax, Bak) lo cual se ha asociado con una baja respuesta al tratamiento (Strik, et al. 1999).

### 1.7.3. Mecanismo de MGMT.

Otro factor que juega un papel central en la quimioresistencia es la sobreexpresión de la enzima O6-MGMT (O6-metil guanina ADN-metil transferasa) que interviene en la reparación del daño al ADN ocasionado por la alquilación de compuestos químicos en la guanina en la posición O<sup>6</sup>. MGMT remueve el grupo alquilo del O<sup>6</sup> de la guanina por una reacción de transalquilación a su residuo de cisteína en su sitio activo (Cys 145 en humanos) (Figura 4). Aunque MGMT retira de manera preferente el grupo alquilo también muestra afinidad por grupos etilo, propilo, butilo, benzilo y grupos cloroetilo, a todos estos grupos se une de manera covalente; esta reacción estequiométrica da como resultado la inactivación de la proteína por ubiquitinación y es degradada por proteosomas (Figura 4) (Gouws, et al. 2011, Arora, et al. 2019).

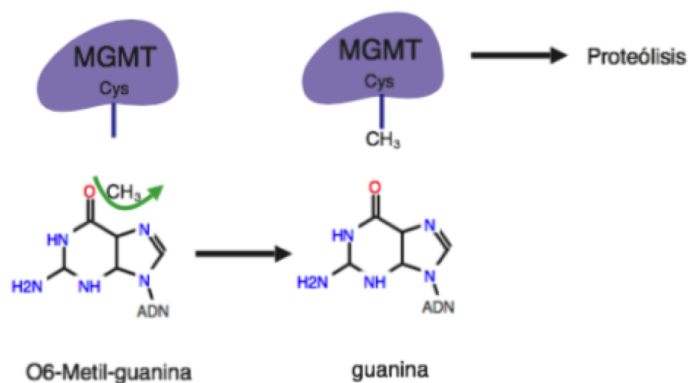


Figura 4. Esquema del mecanismo de MGMT

MGMT es una proteína citoplasmática que se regula por diversos mecanismos como son la metilación de su promotor, modificaciones en las histonas, modificaciones post-trascripcionales y por medio de miRNAs (Verbeek, et al. 2008, Christmann, et al.2019). Diversos estudios han mostrado que la metilación en las islas CpG del promotor de MGMT esta asociada a una prolongación en la sobrevida de los pacientes con glioblastoma, pacientes con el promotor de MGMT metilado sobreviven de 2 a 5 años con un 49% y 14% respectivamente, este porcentaje se ve disminuido en aquellos pacientes que tienen desmetilado el promotor de MGMT (Weller, Stupp et al. 2010). Adicionalmente se ha observado que hay una mejor sobrevida cuando se aplica una terapia conjunta de Temozolamida/Radioterapia y otros agentes que metilen el promotor de MGMT (Hegiet al. 2005).

### MGMT en tejidos sanos.

MGMT se expresa de forma ubicua en diferentes tejidos (Tabla 1), varios estudios realizados en diferentes tejidos humanos han demostrado que existe una variación en la actividad de MGMT (Christmann, et al. 2010). En cuanto a su actividad hay una actividad mayor en hígado comparado con cerebro, además de presentar esta variabilidad entre diferentes tejidos, también hay una diferencia de la actividad de MGMT entre cada individuo y su expresión depende de la etapa de desarrollo, la expresión de MGMT en el hígado es menor en el periodo fetal en comparación a la etapa adulta. (Christmann, et al. 2016).

Tejido	Expresión MGMT (fmol/mg proteína)
Cerebro	76
Hígado	740
Pulmón	86
Colón	350
Estomago	460
Mama	88
Riñón	630
Testículo	428 ± 340

Tabla 1. Expresión de MGMT en tejidos sanos (Christmann, Nagel et al. 2010).

Es probable que el nivel de expresión de MGMT este determinado genéticamente, sin embargo, la influencia de los factores ambientales sobre la expresión basal MGMT aún no se ha elucidado.

### **MGMT en tejido neoplásico.**

La actividad de MGMT ha sido determinada en un amplio rango de tumores, se ha reportado una mayor actividad en cáncer de hígado, colon y ovario, en comparación con su actividad en cerebro; sin embargo, existe una variabilidad dependiendo del tipo de tumor cerebral, la expresión de MGMT en el astrocitoma grado III y el glioblastoma es 45.5 fmol/mg proteína y 37.4 fmol/mg proteína respectivamente, en comparación con los meningiomas (270 fmol/mg) (K. Mineura, et al.1991), esto podría explicar la relativa sensibilidad de los tumores de glioma a los agentes alquilantes. Por otro lado también se ha determinado el cambio en la actividad de MGMT durante la carcinogénesis donde observadose una mayor actividad de MGMT en tumores de cerebro, mama, colon, pulmón y vejiga en comparación a los tejidos normales.

### **MGMT en el pronóstico y recurrencia de glioblastoma.**

La expresión de MGMT se ha considerado un biomarcador importante en los pacientes con glioblastoma, se ha visto que en pacientes que presentan una expresión baja de MGMT (< 30 fmol/mg) tienen una mayor sobrevida comparada con aquellos pacientes con una actividad mayor. Asi mismo la metilación del promotor ha mostrado ser un biomarcador importante en las recurrencias del glioblastoma. Sin embargo; también existen reportes que no muestran una asociación significativa entre la expresión de MGMT con la respuesta al tratamiento

De acuerdo a estos antecedentes se ha vuelto importante estudiar la actividad de MGMT del tumor primario y durante la recurrencia, varios estudios han observado un incremento en la actividad de MGMT en la recurrencia (30.5 %vs 68.3%), teniendo un peor pronóstico para estos pacientes (Metellus, et al. 2009). De manera interesante se ha observado un incremento en la expresión de MGMT después del tratamiento con Temozolamida (135.4 fmol/mg) en comparación de su expresión antes del tratamiento;

sin embargo cuando se aplica solo radioterapia el incremento es menor (64.6 fmol/mg) (Christmann, et al. 2010).

## 1.8. *Reposicionamiento Farmacológico.*

A pesar de los avances científicos en la búsqueda de nuevos tratamientos contra el glioblastoma hasta el momento no se ha mejorado la sobrevivencia de los pacientes. Una estrategia atractiva es el reposicionamiento de fármacos en combinación con la terapia estándar. Esta estrategia puede incrementar la respuesta al tratamiento. Con el reposicionamiento de medicamentos se puede acelerar el desarrollo de terapias dándole una nueva utilidad a un fármaco ya aprobado para otras enfermedades. Una de las ventajas de usar estos fármacos es que se tienen su perfil y seguridad farmacológica además de tener un menor costo. Un factor importante en el desarrollo de nuevos tratamientos es el económico, se sabe que el costo del desarrollo de nuevos fármacos es aproximadamente de 1 billon de dólares (Pushpakom, et al, 2018, Hernández J, et al, 2017), el glioblastoma es considerada por la FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés) como una enfermedad rara limitando así la iniciativa de las industrias farmacéuticas por el desarrollo de nuevos fármacos para esta neoplasia, por lo que el reposicionamiento farmacológico es una estrategia atractiva; la administración de varios agentes terapéuticos permitirá dirigirse a diferentes fenotipos del glioblastoma proporcionando más beneficios que con la quimioterapia estándar sola.

Se han hecho grandes esfuerzos para encontrar una mejoría en el tratamiento actual de glioblastoma; sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios de reposicionamiento farmacológico que se hayan aplicado en combinación con Temozolamida. Existen reportes tanto en modelos animales como en pacientes con recurrencia, fases clínicas I/II donde observan que la respuesta de inhibidores de GSK3B (Valproato, Olanzapina, Carbonato de litio) usados comúnmente para el tratamiento de ataques epilépticos, esquizofrenia y trastornos bipolares, en combinación con Temozolamida hay una atenuación en la progresión de la enfermedad así como una protección de los efectos neurodegenerativos provocados por la radioterapia (Pyko, et al. 2013, Furuta, et al. 2017).

Otro fármaco que se ha estado estudiando como reposicionamiento en glioblastoma es la Metformina, la cual esta indicada para diabetes tipo 2, se sabe que la Metformina disminuye la actividad de mTOR (Inoki, et al. 2003) y ha mostrado sensibilizar a las células de glioblastoma al tratamiento a base de Temozolamida en estudios tanto in vitro como in vivo (Yu, et al. 2015).

Roix y colaboradores en el 2014 realizaron un screening de 182 compuestos en modelos in vivo, identificaron 3 fármacos (Eisedronato, Rerbinafina, Candesartán) que en combinación con Temozolamida mejoran la respuesta, sin embargo, hacen falta aun mas estudios preclínicos para demostrar su eficacia (Roix, et al. 2014).

## ***1.9. Mifepristona como fármaco de reposicionamiento en cáncer.***

Debido a la quimioresistencia que se presenta al tratamiento surge la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan una mejor respuesta al tratamiento, el reposicionamiento farmacológico se ha convertido en una estrategia prometedora para el glioma. En este trabajo proponemos el uso de un agente antihormonal, Mifepristona (Mif) para mejorar la respuesta al tratamiento; estudios preclínicos han proporcionado una amplia evidencia de la efectividad potencial de Mifepristona en cancer al bloquear el crecimiento de varios tipos de células cancerosas (Tieszen, et al. 2011).

Mifepristona (RU486) fue el primer antiprogéstágeno desarrollado, en 1981 se describió como un antagonista de los receptores a glucocorticoides, progesterona y andrógenos. Mifepristona tiene una biodisponibilidad del 69% con un tiempo de vida media de 20–40 h (Im and Appleman 2010). En el 2000 fue aprobado por la FDA como un agente abortivo; sin embargo, se ha usado en una gran variedad de enfermedades y condiciones clínicas como lo es en terminación del embarazo, endometriosis, síndrome de Cushing (Baulieu, 1997).

Reportes en la literatura sugieren la importancia de los estrógenos y otras hormonas esteroideas en la patogénesis de los gliomas, viéndose involucradas en el desarrollo tumoral. Varios agentes antihormonales han sido usados como una opción terapéutica en diferentes tipos de cáncer dependientes y no dependientes de hormonas como es el caso de Mifepristona.

El mecanismo por el cual Mifepristona actúa sobre los receptores hormonales es complejo y no está bien definido, cuando una hormona se acopla con su receptor forma un complejo hormona-receptor (HR) y se disocian las proteínas de choque térmico del receptor. Este HR se trasloca al núcleo uniéndose a elementos de respuesta a hormonas y llevando la expresión de diferentes genes, cuando Mifepristona se une al receptor hormonal provoca un cambio conformacional y recluta a proteínas co represoras de la transcripción como NCoR y SMRT por lo tanto inhibe la transcripción del DNA (Im and Appleman 2010).

In vitro mifepristona tiene efectos antiproliferativos en cáncer de mama (Gaddy, et al. 2004), cérvix (Segovia-Mendoza, et al. 2015), endometrio (Moe, et al. 2009), ovario (Rose, 1996), próstata (Lin, et al. 1995). Este fármaco es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ha mostrado tener efectos paliativos en tumores cerebrales como meningiomas (Touat, Lombardi et al. 2014) y glioblastoma (Check, et al. 2014); se ha documentado que mejora la calidad de vida de los pacientes con cáncer de tiroides, renal, colon, leucemia, páncreas y glioma.

Pinski y cols reportaron que el antagonista de los receptores de progesterona y glucocorticoides Mifepristona, disminuye la velocidad de crecimiento del tumor en xenotransplantes de la línea celular de glioma U87MG (Pinski, et al. 1993). Recientemente German-Castelan y cols. demostraron que progesterona incrementa la infiltración del tumor en un modelo ortotópico de glioma y que este efecto es bloqueado por Mifepristona, además observaron una disminución en la proliferación celular con este antihormonal por lo que podría ser un adyuvante en el tratamiento del glioblastoma al evitar su propagación (German-Castelan, et al. 2014).

Se ha reportado que Mifepristona es capaz de inhibir el crecimiento celular en células de cáncer de mama (MDA-MB-321) (Liang, et al. 2003) y próstata (LNCaP) (El Etreby, et al. 2000) negativas a receptores de progesterona, estrógenos y andrógenos. Hasta la fecha se desconocen el mecanismo por el cual actúa Mifepristona en células negativas a receptores hormonales. Tieszen y colaboradores observaron que Mifepristona logra inhibir



el crecimiento celular, disminuye la actividad de Cdk2 y produce un arresto celular en la fase G1 en 10 diferentes líneas celulares de cáncer; del sistema nervioso central, mama, próstata, ovario y hueso de las cuales solo una expresa RP (MCF7) demostrando que el efecto de Mifepristona no es dependiente de la presencia del RP (Tieszen, et al. 2011).

También se ha reportado que Mifepristona es capaz de inhibir el crecimiento de células de adenocarcinoma (SGC-7901) en un modelo *in vitro* por múltiples mecanismos como arresto en la fase G0/G1, un incremento en la tasa de apoptosis debido al aumento en la expresión de caspasa 3 y disminución en Bcl-2 (Li, et al. 2004).

Se ha encontrado que en células de cáncer de ovario el uso de Mifepristona inhibe la expresión Bcl-2 e induce la expresión de Bax (proteínas involucradas en la apoptosis), por lo tanto la relación Bcl-2/Bax es clave en la susceptibilidad celular. Además se ha reportado que la Mifepristona inhibe la expresión del VEGF (Hyder, et al. 2001) y bloquea la función de las proteínas involucradas en la resistencia múltiple a la quimioterapia (MDR) (Li, et al. 2004). En relación a la expresión de la enzima O6-MGMT (enzima relacionada con la resistencia a Temozolamida) hasta la fecha no se ha demostrado la participación de Mifepristona sobre esta enzima. Por lo mencionado anteriormente Mifepristona puede ser un adyuvante en el tratamiento del glioblastoma al evitar la propagación del mismo, aumentar la concentración de los fármacos dentro del tejido tumoral e incrementar la sensibilidad a Temozolamida.

Mifepristona es un candidato atractivo para el reposicionamiento, se considera un fármaco seguro y con pocos efectos adversos, dentro de sus efectos adversos se encuentran fatiga, náuseas, vómito y diarrea, se ha estudiado su uso de manera prolongada y no se reportaron efectos adversos mayores.

### **1.10. *Mifepristona como agente quimiosensibilizante.***

Estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado que Mifepristona es capaz de incrementar el efecto de la Quimio-Radioterapia basada en cisplatino en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer cervicouterino, este tipo de cáncer se considera no hormono dependiente, en este trabajo se utilizó una línea celular negativa tanto a receptores de

progesterona como de estrógenos (HeLa), en este estudio se observó un arresto en la fase G2/M del ciclo celular y un incremento en la capacidad de cisplatino de inducir apoptosis (Segovia-Mendoza, et al. 2015). Otro estudio de nuestro laboratorio demostró que la Mifepristona ejerce un efecto radio-quimiosensibilizante mostrando un mayor control en la velocidad de crecimiento tumoral cuando se combina Mifepristona con Temozolamida y Radioterapia, esto se determinó en un modelo de xenotransplante de glioma donde se midió la actividad metabólica del tumor usando un equipo microPET/CT además se determinó que esta combinación disminuye la expresión de VEGF (Llaguno-Munive, et al. 2013); el modelo de xenotransplante desarrollado en ese trabajo nos ofrece algunas ventajas, es un modelo relativamente sencillo y rápido; además se puede dar seguimiento al crecimiento tumoral utilizando un vernier y obtener la respuesta tumoral con un método sencillo y menos costoso; sin embargo, este modelo presenta algunas desventajas como lo son que las células inoculadas subdermicamente no reproducen un microambiente tumoral como el que se presenta en los pacientes con tumores cerebrales, el glioblastoma es un tumor heterogéneo y dentro del tumor no solo se encuentran células tumorales, también podemos encontrar astrocitos normales, células de la microglia, células endoteliales, monocitos y linfocitos, las interacciones de las células tumorales con las del microambiente tiene un impacto sobre el progreso e invasión del tumor (Maher, et al. 2001, Alves, et al. 2011), además no se puede determinar si los fármacos atraviesan la barrera hematoencefálica, esta barrera es una limitante en el tratamiento ya que no todos los fármacos logran atravesarla (Khawli and Prabhu 2013); por lo tanto, un modelo experimental ortotópico, en el cual las células se implantan directamente en el cerebro ofrece ventajas sobre el modelo del implante subdermico (Jacobs, et al. 2011). Un modelo ortotópico reproduce un microambiente tumoral heterogéneo y se puede evaluar si el tratamiento atraviesa la BH (Jacobs, et al. 2011, Huszthy, et al. 2012, Garcia, et al. 2014). Por lo tanto en este proyecto se utilizó dicho modelo para evaluar tanto el efecto terapéutico así como los mecanismos moleculares de la combinación de Temozolamida y Mifepristona en un modelo ortotópico de glioblastoma durante y después del tratamiento.

### 1.11. *Relevancia e impacto del proyecto.*

A pesar de los esfuerzos que se han hecho para incrementar la respuesta terapéutica y sobrevida de los pacientes con glioblastoma no se han encontrado nuevos tratamientos que disminuyan la resistencia al tratamiento y mejoren su respuesta; existen algunas limitantes que dificultan la búsqueda de nuevos tratamiento debido a la localización del tumor, la heterogeneidad intratumoral y a la presencia de la BH, a pesar de estas limitantes se han estado desarrollando fármacos dirigidos a blancos específicos en algunas vías de señalización; sin embargo, no todos atraviesan la BH; esta barrera esta formada por células endoteliales las cuales se encuentran unidas de una manera muy estrecha, tiene la función de proteger el cerebro de agentes neurotóxico, aunque algunas moléculas son capaces de atravesar la BH existen proteínas (P-gp) que se encargan de expulsar la molécula hacia la circulación sistémica, existen ciertas propiedades fisicoquímicas que le permiten a las moléculas atravesar la BH como son el peso molecular (menos a 600 Da) y tienen que ser lipofílicos, teniendo esto en cuenta se pueden identificar aquellos fármacos que sean capaces de atravesar la BH y que puedan tener un efecto sobre las células tumorales de glioblastoma. Debido a que el desarrollo de nuevos fármacos es muy costoso y tarda mas de 10 años una estrategia prometedora es el reposicionamiento farmacológico, con esta estrategia se puede acelerar el desarrollo de nuevos tratamientos proporcionándonos la ventajas de que son fármacos con perfil y seguridad conocida además de ser de menor costo. Se han estado investigando diferentes fármacos de reposicionamiento farmacológico en glioblastoma; sin embargo, hasta la fecha hay poco estudios en combinación con el tratamiento estándar a base de Temozolamida. En este proyecto se propone el estudio preclínico del uso de Mifepristona en el tratamiento estándar de glioblastoma (Temozolamida), así como el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a la terapia y a la resistencia del tratamiento.

# Capítulo 2

## Hipótesis

---

Mifepristona sensibilizará la respuesta de Temozolamida en glioblastoma incrementando la concentración intracerebral de Temozolamida e involucrando mecanismos de apoptosis, angiogénesis y reparación de daño al DNA.

# Capítulo 3

## Objetivos

---

### 3.1. *Objetivo General*

Evaluar el efecto terapéutico y los mecanismos moleculares involucrados en la quimio-sensibilización de Mifepristona sobre la quimioterapia estándar en glioblastoma.

### 3.2. *Objetivos Particulares*

*Objetivo 1.* Evaluar el efecto terapéutico de Mifepristona como agente quimiosensibilizante a Temozolamida.

*Objetivo 2.* Evaluar la participación de proteínas apoptóticas (Bcl-2, Bax, Caspasa 3) relacionadas con el efecto quimio-sensibilizante de Mifepristona en tumores de glioblastoma.

*Objetivo 3.* Evaluar el efecto de Mifepristona sobre la expresión de la enzima de reparación al daño al ADN (MGMT) involucrada en la resistencia a Temozolamida en tumores de glioblastoma.

*Objetivo 4.* Determinar la participación de Temozolamida/Mifepristona sobre la expresión del VEGF y la densidad vascular en el tejido tumoral.

*Objetivo 5.* Determinar la participación de Mifepristona sobre la proteína de resistencia a fármacos (P-gp) en tumores de glioblastoma.

*Objetivo 6.* Estimar el efecto de Mifepistona sobre la concentración intracerebral de Temozolamida.

*Objetivo 7.* Analizar el efecto terapéutico y los mecanismos de apoptosis, reparación al daño al ADN y angiogénesis de Mifepristona en combinación con Temozolamida durante la recurrencia tumoral.

# Capítulo 4

## Materiales y Métodos

---

### 4.1. *Animales de Experimentación.*

Se utilizaron ratas Wistar machos entre 200- 250g, las cuales fueron obtenidas del la Facultad de Medicina de la UNAM, los animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos, con un ciclo luz/oscuridad 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).

### 4.2. *Línea celular.*

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°C con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.3. *Desarrollo de tumores de glioma en un modelo ortotópico.*

Las células se proliferaron en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, se mantuvieron en medio DMEM suplementado con el 5% de suero fetal bovino, las cajas de cultivo se revisaron diariamente para verificar el porcentaje de confluencia hasta obtener entre 70-80%. Las células se despegaron con buffer de fosfatosácido etilendiaminotetracético (PBS-EDTA) posteriormente, las células se centrifugaron y se llevó a cabo el conteo de células por medio de un hemocitómetro. Una vez contadas las células se resuspendieron en un volumen adecuado de medio de cultivo para obtener una concentración  $7.5 \times 10^5$  células.

Bajo condiciones de anestesia con un sistema de isoflurano/oxígeno las ratas se sometieron a una cirugía estereotáxica realizando un defecto a 2mm a la derecha del Bregma y se depositaron células C6 de glioblastoma ( $7.5 \times 10^5$ ) a una profundidad de 6 mm con una velocidad de 0.5  $\mu$ l/min utilizando una bomba de infusión. La incisión fue suturada con hilo quirúrgico. Los animales se pesaron 3 veces por semana durante el estudio.

### 4.4. *Tratamientos.*

Dos semanas después de la cirugía las ratas se aleatorizaron y fueron sometidas a los siguientes tratamientos: A) Sham (solo cirugía), B) Sin tratamiento (vehículo), C) Temozolamida sola (Tz), D) Mifepristona sola (Mif), E) Combinación: Mifepristona/Temozolamida (Mif/Tz). La Tz se administró a una dosis de 5 mg/kg/ i.p y Mif a una dosis de 10 mg/kg/s.c. Los fármacos se administraron en 3 ciclos, cada ciclo consistió en 5 días consecutivos



## **4.5. *Seguimiento del crecimiento tumoral.***

### **4.5.1. Imagen molecular.**

Se realizó utilizando un equipo de microPET/CT (Albira ARS, Oncovision, España) usando como radiomarcador el emisor de positrones 18-FLT (fluorotimidina). Las imágenes se adquirieron los días 14, 28, 35 y 49 días después de la cirugía. Para la realización del estudio las ratas fueron administradas con 300  $\mu$ Ci de 18 F-FLT por vía intravenosa, la imagen se adquirió después de 40 minutos de biodistribución. Durante todo el estudio las ratas fueron anestesiadas.

### **4.5.2. Pérdida de peso y sobrevida.**

Otra manera de darle seguimiento al crecimiento del tumor fue por la pérdida de peso corporal de los animales, los animales se pesaron tres veces a la semana durante el estudio; además se le dio seguimiento a la sobrevida de cada grupo..

## **4.6. *Inmunohistoquímica.***

Para los estudios de inmunohistoquímica las ratas se perfundieron con formaldehído al 4%, el cerebro fue removido y almacenado en formaldehído al 4%. Se realizaron cortes de 2 mm del cerebro en un plano coronal los cuales fueron incluidos en parafina para el posterior análisis de Eosina y Hematoxilina (H&E), la determinación de la densidad vascular mediante el marcador CD31 y la evaluación de proliferación celular usando ki-67.

## 4.7. *Estudios moleculares.*

Al final del estudio las ratas fueron sacrificadas y fue extraído el tumor, el tejido cerebral fue homogenizado con buffer de lisis el cual contenía inhibidores de fosfatas y proteasas. Las muestras se centrifugaron a 10000 g a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas se cuantificaron con el reactivo ácido bicinónico (B9643, Sigma Aldrich, Estados Unidos) y se separaron mediante una electroforesis en un gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %; para la determinación de los niveles de P-gp se utilizó un gel de gradiente del 4-20 % (Mini-Protean TGX 456-1094, Bio-Rad Laboratories, Inc, Estados Unidos). Para cada muestra se usó 40  $\mu\text{g}$  de proteína. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Amersham, Buckinghamshire, UK), posteriormente la membrana se bloqueó por 2 horas a temperatura ambiente con leche libre de grasa al 5 %. Los anticuerpos utilizados fueron anti-MGMT (sc-166528, 1:1000), anti-Bcl-2 (sc-7382, 1:1000), anti-Bax (sc-20067, 1:1000), anti- $\beta$ -actina (sc-69879, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) y anti-cl-caspasa 3 (9661, 1:1000; Cell Signaling Technology, MAB230, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), estos anticuerpos fueron incubados toda la noche a 4°C. Posterior a los lavados las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo, IgG-HRP (1:1500 and 1:3000, respectivamente; Santa Cruz 352 Biotechnology, TX, USA) por 1 hora. Se detectaron las bandas con reactivos de quilioluminiscencia (Amersham ECL,Prime Western Blotting Detection, Buckinghamshire, UK) y se usaron películas autoradiográficas (Amersham Hyperfilm ECL, Buckinghamshire, UK), las densidades de las bandas fueron analizadas con software Image Studio (version, 5.2 Li-cor, Lincoln, NE, USA), como control de carga se usó  $\beta$ -actina. Para la evaluación de la angiogénesis se determinó VEGF con un kit de Elisa siguiendo las instrucciones del proveedor (VEGF human, ENZ-KIT156-0001, Enzo Life Sciences,Inc).

#### **4.8. Estandarización del método cromatográfico por HPLC/MS para la cuantificación de Tz en tejido cerebral.**

Para la estandarización del método cromatográfico por HPLC/MS se evaluó la linealidad, precisión y exactitud de diferentes curvas patrón. Para la cuantificación de Tz se pesaron 400 mg de tejido cerebral y se homogenizaron con 400  $\mu$ l de Metanol/ácido acético 0.5 % para tener una solución de trabajo apropiada y con la cual se realizó la curva patrón en la matriz biológica (50, 100, 500, 1000, 2000 y 5000 ng/ml). La curva se realizó a partir de un stock de 1 mg/ml de Temozolamida, a esta curva se le adicionó 1000 ng/ml de teofilina como estandar interno (EI).

##### **4.8.1. Proceso de extracción.**

El tejido cerebral se homogeneizó con una solución de Metanol/ácido acético 0.5 %. Posteriormente se le agregó el estándar de Temozolamida y el E.I, Para la extracción de Tz se utilizó acetato de etilo, la mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4 °C; este procedimiento se repitió 2 veces, posteriormente la fase orgánica se evaporó bajo corriente de nitrógeno, las muestras fueron re-suspendidas con Metanol/ácido acético 0.5 % y filtradas en unidades de filtración Millex con membrana de nylon con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m (Millex HV, Millipore), finalmente 5  $\mu$ l de las muestras fueron inyectadas al sistema de Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas triple Cuadrupolo (LC-MS QQQ) (Agilent Technologies, Infinity 1260).

##### **4.8.2. Condiciones cromatográficas.**

Se usó un Sistema de Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas triple Cuadrupolo (LC-MS QQQ) (Agilent Technologies, Infinity 1260). Las muestras se mantuvieron a 4°C, la separación se realizó con un columna Agilent Zorbax SB-C18 column (1.8  $\mu$ m, 2.1x50mm). La fase móvil consistió en una solución isocrática de ácido

acético 0.5 %, acetato de amonio 10 mM y metanol (10-90) a un pH de 3.5 con un flujo de 0.3 mL/min.

#### **4.8.3. Condiciones del espectrómetro de masas.**

Se utilizó un detector triple cuadrupolo (Agilent Technologies, Infinity 1260) en modo positivo (ESI). El voltaje del capilar fue de 3.0 kV; con una temperatura de solvatación de 350°C. La cuantificación se llevó a cabo con el monitoreo de reacciones múltiples de las siguientes transiciones: para Temozolamida  $m/z$  195.10  $\rightarrow$  137.95 y para el EI  $m/z$  181.10  $\rightarrow$  124.0.

#### **4.8.4. Determinación de los parámetros de desempeño.**

Para la determinación de los parámetros de desempeño nos basamos en la norma oficial NOM-177-SSA1-2013 apartado 9 donde se establecen los criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad, se evaluó la selectividad, linealidad, precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad) y exactitud del método los cuales se describen a continuación.

##### ***Linealidad del método.***

Para la evaluación de la linealidad se realizaron 6 curvas de calibración por duplicado y se graficó la respuesta (Relación de alturas de Tz y el EI) en función de la concentración, se obtuvo la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ). El criterio de aceptación que marca la norma es  $r^2 \geq 0.99$ .

***Precisión del método.***

Para este parámetro se evaluó la Repetibilidad intradía y Reproducibilidad enterdía del método. Para la repetibilidad intradía. Se analizaron 2 curvas de calibración en un día por duplicado y para la reproducibilidad se analizaron 6 curvas de calibración realizadas en diferentes días. Se determinó la desviación estandar (DE) y el coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación es  $CV \leq 20\%$  para la menor concentración y  $CV \leq 15\%$  para el resto de las concentraciones.

***Exactitud.***

Se analizaron los controles de calidad por quintuplicado, los cuales son concentraciones conocidas que entran dentro de la curva de calibración y se determinó el coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación que marca la norma para concentraciones pequeñas es que el CV debe ser  $\leq 20\%$  y para el resto de las concentración el CV debe ser  $\leq 15\%$ .

***4.9. Cuantificación de Tz en tejido cerebral de rata después de la administración de Mifepristona.***

Una vez que el método de HPLC/MS demostró ser lineal, preciso y exacto se evaluó el diseño experimental como a continuación se describe: se usaron 8 ratas wistar 200 - 250 g, las cuales se dividieron en dos grupos: Al grupo 1 se le administró 30 mg/kg de Temozolamida i.p, al grupo 2 se le administró 60 mg/kg de Mifepristona s.c mas Temozolamida. La administración de Mifepristona se realizó 2 horas previas a la administración de Temozolamida; las ratas se sacrificaron 45 minutos después de la administración de Temozolamida y el tejido cerebral fue extraído y guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su cuantificación, el proceso de extracción y cuantificación se realizó con el procedimiento descrito anteriormente.

#### 4.10. *Análisis estadístico.*

Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  DE o promedio  $\pm$  EEM, se realizó un análisis de varianza 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.

# Capítulo 5

## Resultados

---

### 5.1. *Modelo ortotópico de glioma en rata.*

Para la implementación del modelo ortotópico de glioma se realizó un seguimiento del peso corporal después de la inoculación de las células C6, se tomaron imágenes moleculares cada semana utilizando un equipo microPET/CT, los resultados obtenidos se muestran en la figura 5a. Tanto en el grupo de las ratas inoculadas con las células C6 como en el grupo sham, se observó un aumento gradual del peso corporal durante el tiempo de la post-inoculación; sin embargo, a partir del día 14 el peso corporal disminuyó gradualmente solo en el grupo inoculado con las células C6, esta disminución fue estadísticamente significativa a partir del día 18. La pérdida de peso corporal se atribuyó al crecimiento tumoral, lo que se corroboró con las imágenes moleculares observando un incremento de la captación de 18-FLT (fluorotimidina) al día 12 y 21 (Figura 5b).

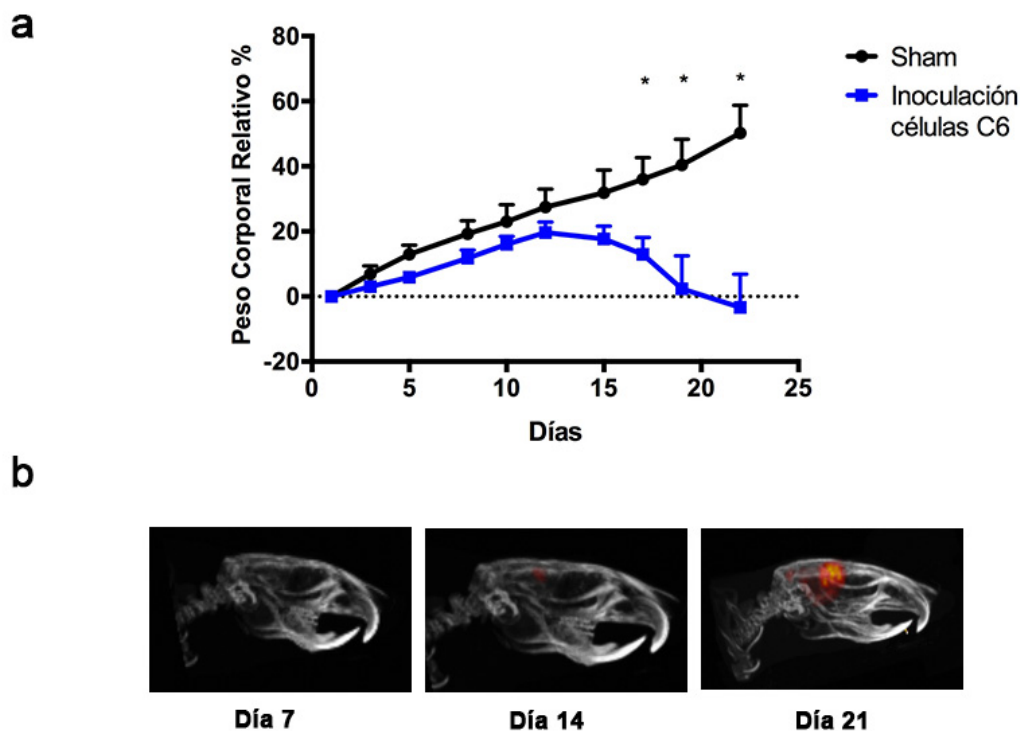


Figura 5. a) Registro de peso corporal de las ratas después de la inoculación intracraneal de células C6 o del vehículo. Cada punto representa el promedio de  $n=6 \pm$  EEM. b) Imágenes Moleculares tomadas con un microPET/CT. La intensidad del color rojo representa la captación de 18-FLT. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$  entre el grupo sham y el grupo inoculado con células C6

## 5.2. *Efecto terapéutico de Mifepristona como agente Quimio-sensibilizante.*

Después de dos semanas de la inoculación de las células (tiempo en el cual el tumor alcanza  $3 \text{ mm}^3$ ) las ratas se aleatorizaron en los diferentes grupos y se inició el esquema de tratamientos descrito anteriormente. El seguimiento del crecimiento tumoral se realizó por imagen molecular y la pérdida de peso. En la figura 6a se muestran las imágenes moleculares al día basal (inicio de tratamiento) y al día 21 de los diferentes grupos: sin tratamiento, Temozolamida sola, Mifepristona sola y la combinación de Temozolamida/Mifepristona. En



cada tratamiento se observan diferentes intensidades de color en el tumor, que representa la captación del radiofármaco 18-FLT. Una menor intensidad de color rojo refleja menor captación y por lo tanto una menor proliferación celular. En el día 21 con respecto al día basal se observa una mayor proliferación en el grupo sin tratamiento, Temozolamida y Mifepristona, mientras que en el grupo que recibió la combinación del tratamiento (Mif/Tz) mostró una menor tasa de proliferación. La actividad proliferativa se determinó en términos de TLP (total lesion proliferation por sus siglas en inglés). En el día 21 los datos muestran una diferencia significativa entre el TLP de Mif/Tz con respecto al grupo sin tratamiento y Temozolamida sola (Figura 6b).

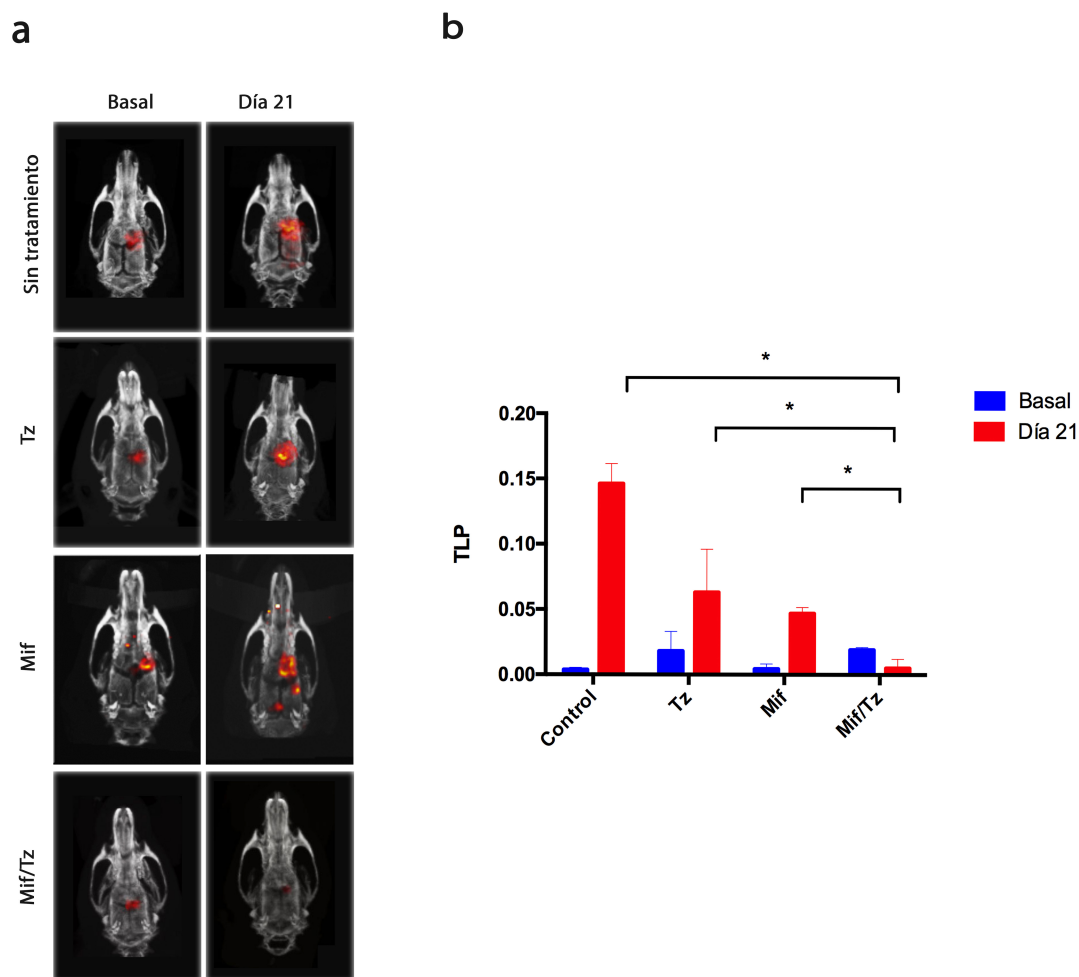


Figura 6. Imágenes Moleculares de tumores de glioblastoma tomadas con un equipo microPET/CT. Tomografía computarizada (CT) fusionada con PET. a) Imágenes al inicio del tratamiento (Basal) y a la segunda semana del tratamiento. b) Actividad proliferativa en términos de TLP ( $n=3 \pm EEM$ ).

El crecimiento del tumor también fue evaluado por la pérdida o ganancia de peso corporal de las ratas de los diferentes grupos (Figura 7). Todos los grupos tuvieron una ganancia de peso corporal durante las primeras dos semanas después de la implantación, posteriormente las ratas fueron aleatorizadas en los diferentes grupos observándose una mayor pérdida de peso corporal en los grupos sin tratamiento, Temozolamida sola y Mifepristona sola en comparación con el grupo Sham; sin embargo, en el grupo que recibió la terapia combinada (Mif/Tz) el peso se mantiene constante sin un aumento significativo en comparación al grupo Sham.

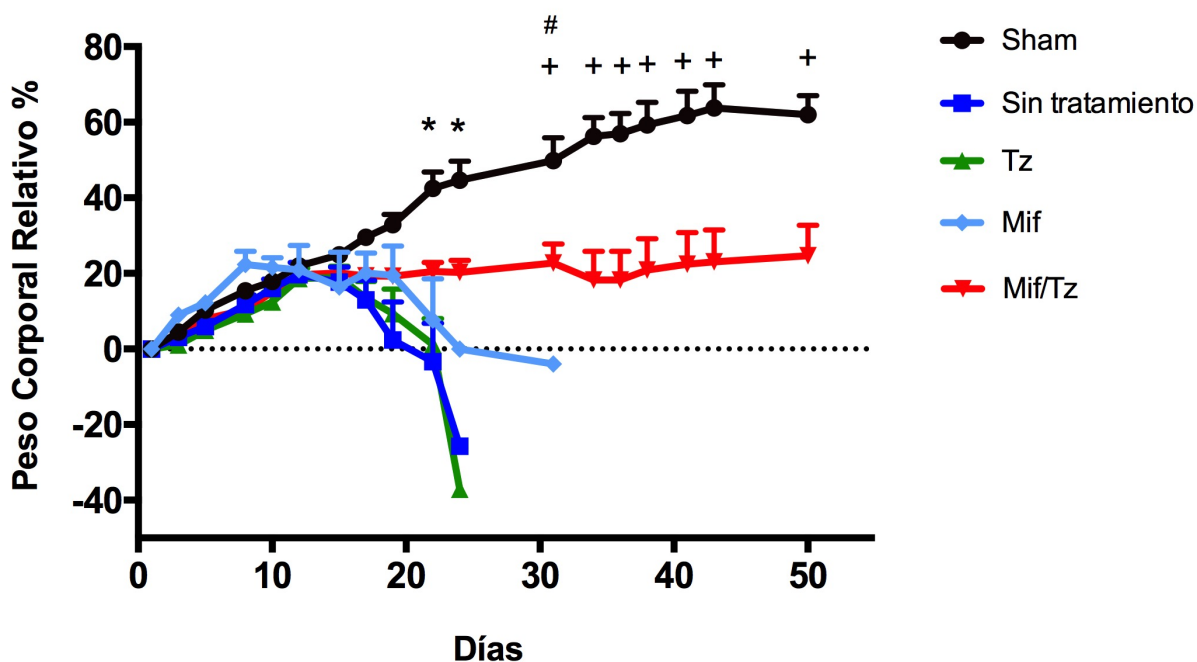


Figura 7. Seguimiento de peso relativo en el modelo ortotópico de glioma durante el tiempo de evaluación de los diferentes tratamientos. Cada punto representa el promedio de  $n=8 \pm$  EEM. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$  Mif/Tz vs los otros grupos (Sin tratamiento, Tz sola y Mif sola). + Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$  Mif/Tz vs Sham. ‡ Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$  Mif vs Mif/Tz)

### ***5.3. Efecto de Mifepristona sobre la proliferación celular.***

Los análisis histológicos del tejido tumoral se analizaron al final de los tratamientos. Los cortes de H&E en el grupo sin tratamiento, Tz sola y Mif sola se observó hiper celularidad, mitosis y necrosis, esto se vio disminuido en los grupos de Mif/Tz, que muestran una lesión hipocelular. Para corroborar el estudio de proliferación celular evaluados por imagen molecular, se realizó un análisis de inmunohistoquímica con el marcador de proliferación celular Ki-67, el cual se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en aquellas células que se encuentran en reposo (G0) observándose así una menor actividad proliferativa en el tejido tumoral de las ratas tratadas con Mif/Tz, lo que nos indica que Mif podría estar incrementando el efecto de Tz sobre la disminución de la proliferación de las células de glioblastoma (Figura 8).

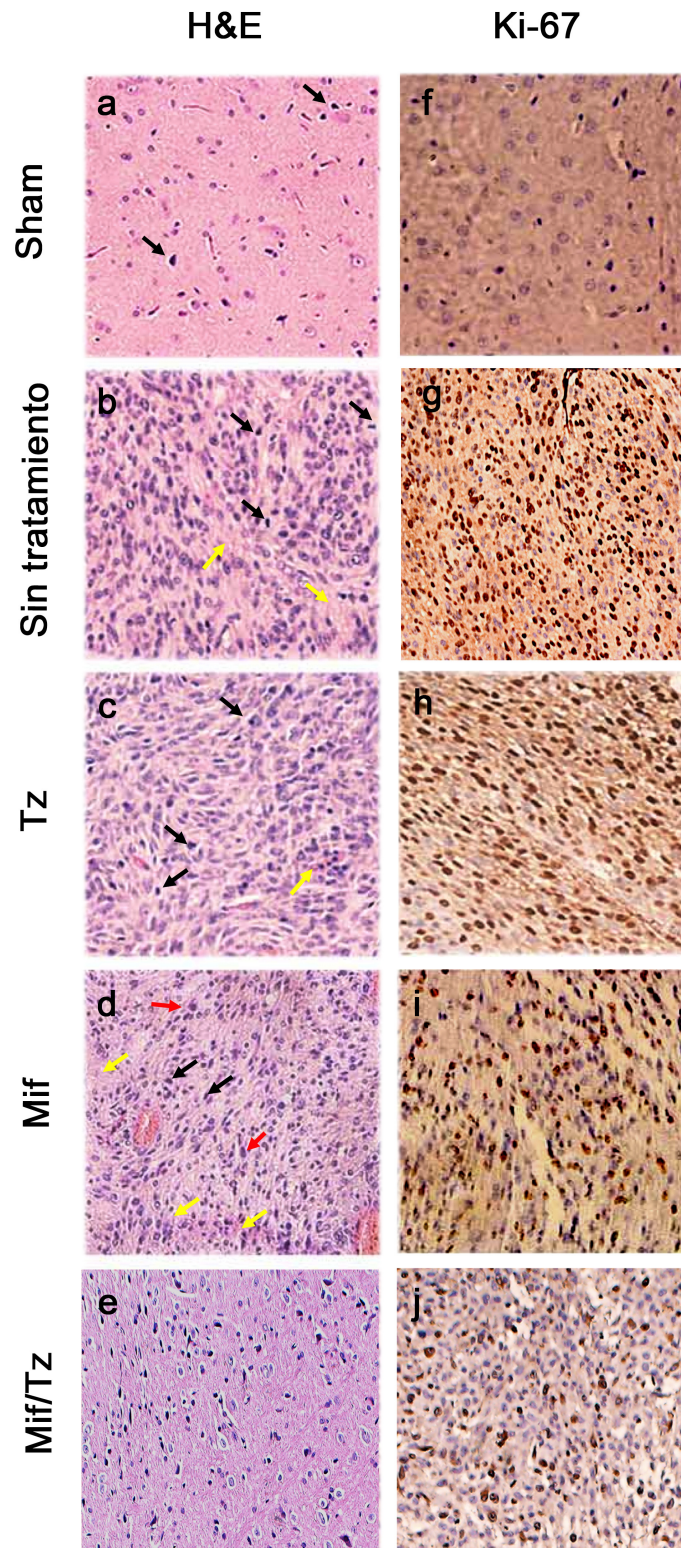


Figura 8. Tinción de Eosina y Hematoxilina (H&E) y Ki67 en cortes histológicos de los diferentes tratamientos. Cortes histológicos con hematoxilina y eosina (H&E) (a-e). Mitosis (flechas negras), pleomorfismo nuclear (flechas rojas) y necrosis (flechas amarillas). Inmunohistoquímica de ki-67 (f-j). Aumento 40x.

## 5.4. Apoptosis en el mecanismo quimio-sensibilizante de Mifepristona.

La participación de la apoptosis sobre el mecanismo quimiosensibilizante fue evaluada por los niveles de las proteínas pro apoptóticas (Bax, cl caspasa 3) y antiapoptóticas (Bcl-2). Los resultados muestran que hubo un incremento significativo de aproximadamente 4 veces en la relación Bax/Bcl-2 en el grupo de Mif/Tz comparado con el grupo sin tratamiento, Tz sola o Mif sola. Resultados similares se encontraron con los niveles de Cl-caspasa 3 con un incremento significativo del doble con respecto al grupo sin tratamiento o de los grupos con Tz y Mif aplicados de manera individual. (Figura 9).

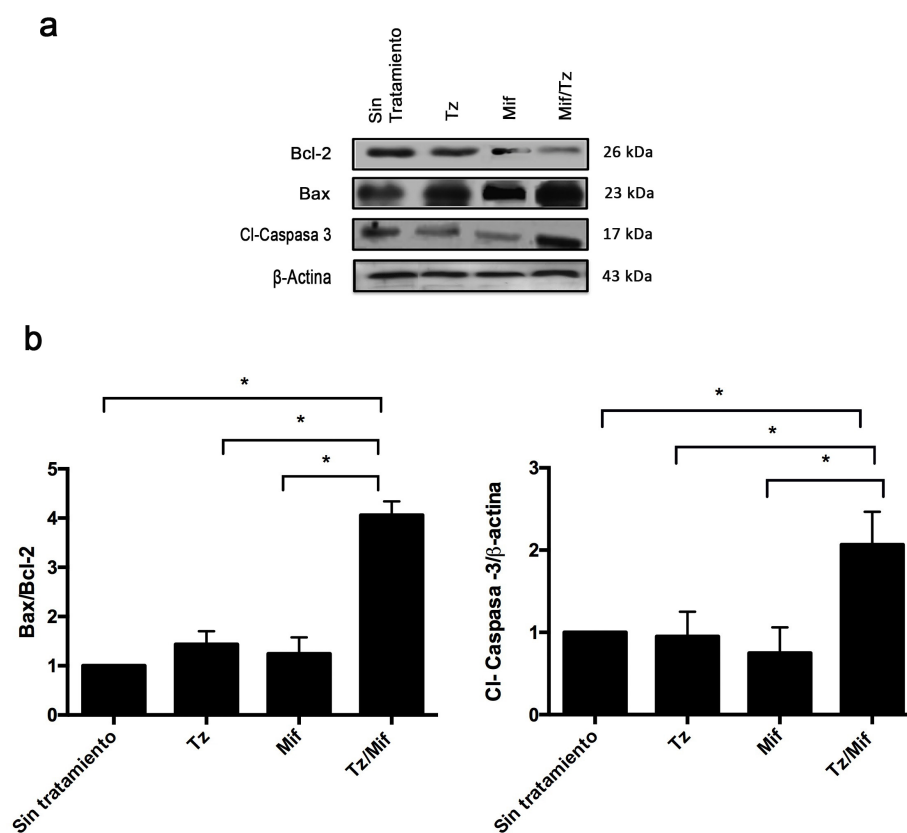


Figura 9. a) Niveles de proteínas apoptóticas Bcl-2, Bax y cl-caspasa 3 a los 21 días de tratamiento en los diferentes grupos. b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos.  $n=3 \pm DE$ . \*Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$

## 5.5. Efecto de Mifepristona sobre la expresión de la enzima MGMT.

MGMT es un importante mediador en la resistencia a Temozolamida, su nivel de proteína fue evaluado por Western Blot en cada uno de los grupos (Figura 10), no se observó algún cambio en el grupo de Temozolamida sola con respecto al grupo sin tratamiento, por el contrario Mifepristona sola mostró una disminución de MGMT; la cual fue mayor con la combinación Mif/Tz.

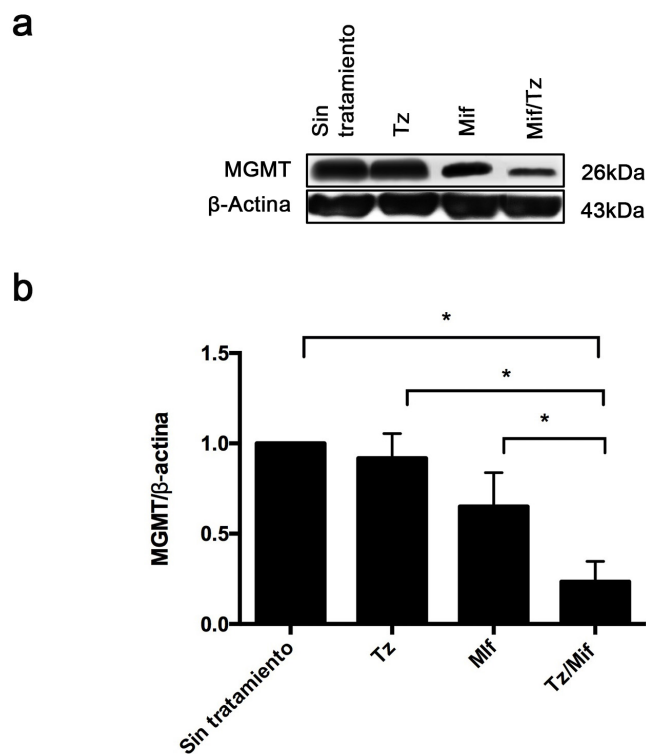


Figura 10. a) Niveles de MGMT a los 21 días de tratamiento en los diferentes grupos b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos.  $n=3 \pm DE$ . \*Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$

## 5.6. *Participación de Mifepristona y Temozolamida sobre la densidad vascular y VEGFA.*

La densidad vascular se evaluó utilizando el marcador de expresión CD31. Observando una menor densidad vascular en los cortes de las ratas tratadas con Mifepristona/Temozolamida, lo que nos indica que la combinación de fármacos podría estar bloqueando la formación de nuevos vasos sanguíneos (Figura 11). VEGF es una proteína angiogénica la cual tiene una contribución en la formación de vasos sanguíneos en glioblastoma multiforme de manera importante. La determinación de VEGF se realizó mediante un kit de Elisa (VEGF human). En la figura 12 se puede apreciar una disminución de los niveles de VEGF en las ratas a las que se les administró Temozolamida y Mifepristona sola comparada con el grupo sin tratamiento, en el caso del tratamiento de Mifepristona/Temozolamida la disminución de los niveles de VEGF que fue mayor comparada con los demás grupos.

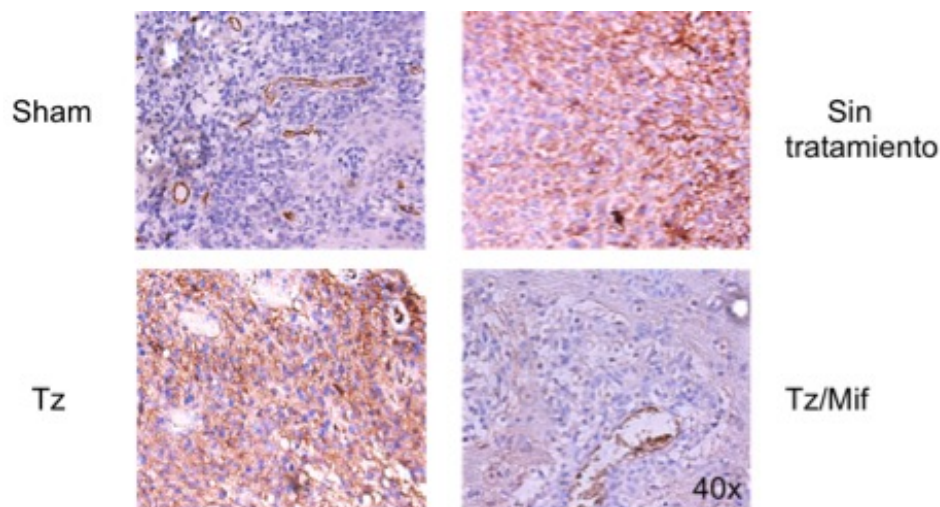


Figura 11. Inmunohistoquímica de CD31 en cortes histológicos al término del tratamiento. Aumento de 40x.

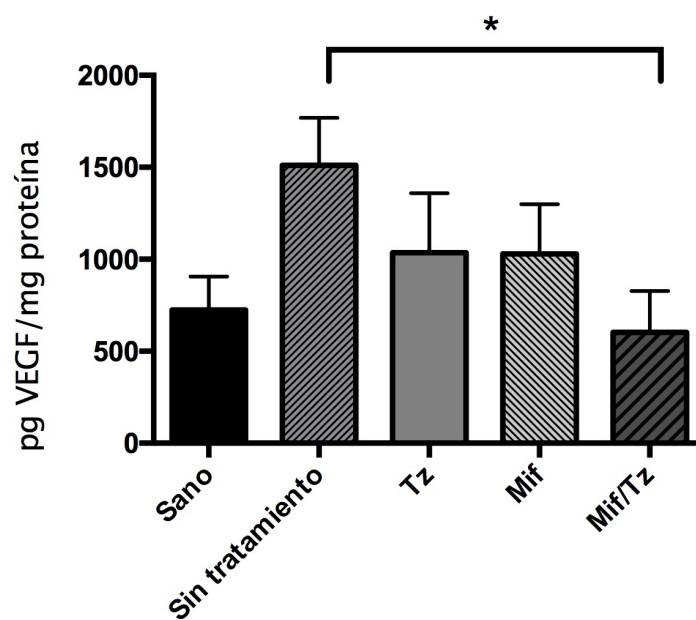


Figura 12. Cuantificación de VEGF a los 21 días con tratamiento en los diferentes grupos  $n=8 \pm DE$ . \*Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$

### 5.7. Efecto de Mifepristona y Temozolamida sobre la proteína P-gp.

Los niveles de la proteína P-gp se analizaron por medio de Western blot, observándose que el Mifepristona disminuyó los niveles de P-gp en comparación al grupo sin tratamiento y temozolamida, esta disminución es mayor cuando se administra Mif/Tz (Figura 13).



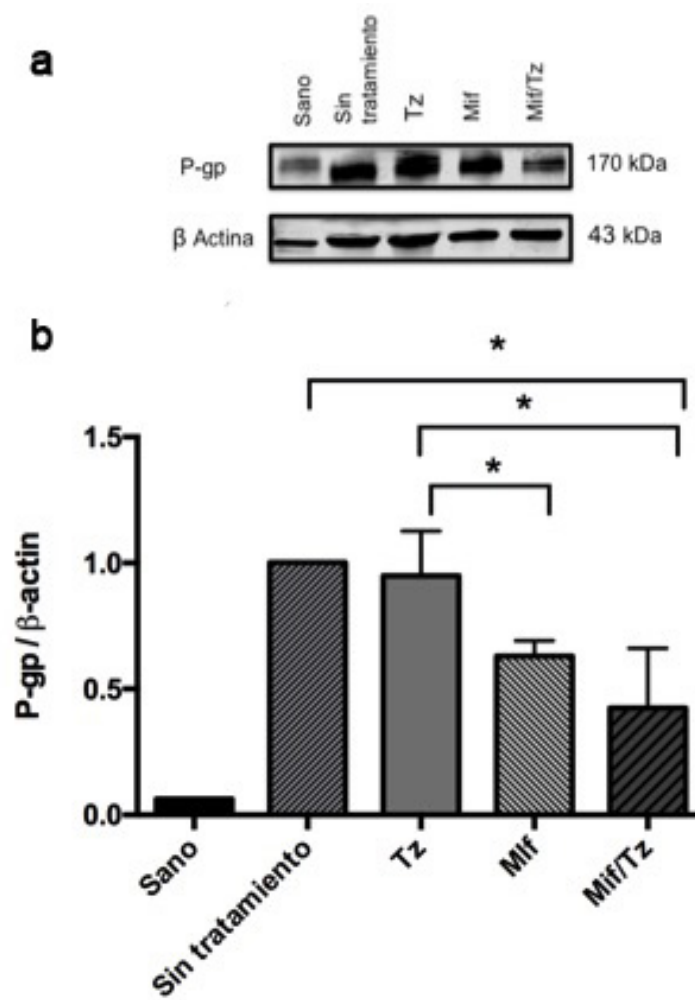


Figura 13. a) Niveles de P-gp a los 21 días de tratamiento en los diferentes grupos b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos.  $n=3 \pm$  DE. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p<0.05$

## 5.8. *Método cromatográfico por HPLC-MS para la cuantificación de Tz en cerebro.*

### 5.8.1. *Determinación de los parámetros de desempeño del método.*

Con el fin de obtener resultados confiables y exactos en la cuantificación de Temozolamida intracerebral se llevó a cabo la estandarización del método cromatográfico evaluando la selectividad, linealidad, precisión y exactitud del método.

#### **Selectividad.**

En la figura 14a, se observa un cromatograma de una muestra biológica a la que no se le adicionó ninguno de los compuestos de interés (muestra blanco) y los cromatogramas obtenidos después de la extracción de Tz (500 ng/ml) y el E.I (1000 ng/ml). Los espectros tanto de Temozolamida como Teofilina se muestran en la figura 14b con una relación de  $m/z$  de 137.9 y 124 respectivamente.

#### **Linealidad.**

Para la evaluación de la linealidad del método se determinaron las respuestas analíticas (relación de alturas Tz/E.I) de los puntos de la curva de calibración obteniéndose un coeficiente de correlación  $r^2 = 0.99$  (Figura 15) cumpliendo con los criterios de aceptación que indica la norma.

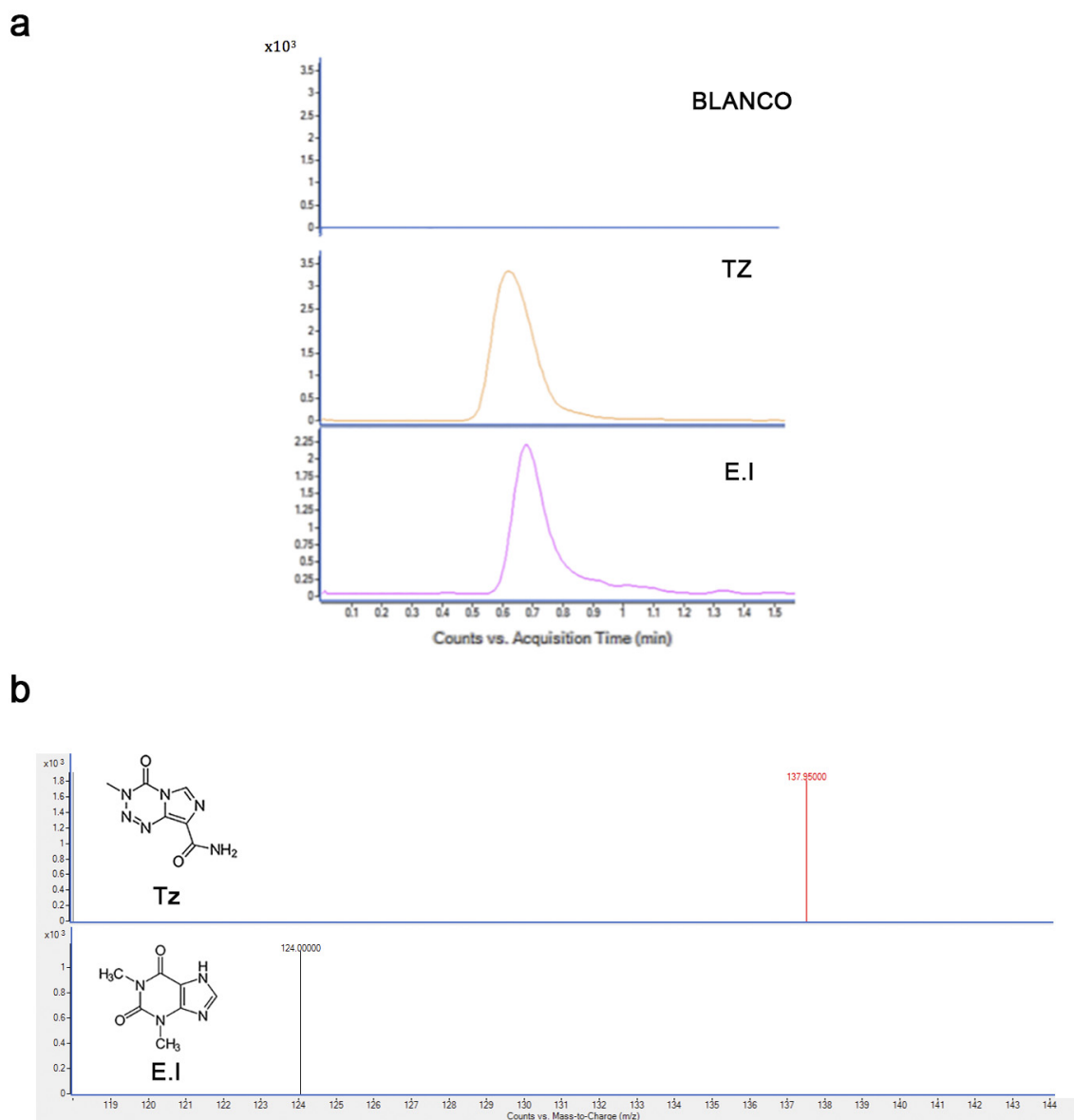


Figura 14. a) Cromatograma blanco (matriz biológica), cromatograma de Tz (500 ng/ml) con tiempo de retención 0.67 min y EI (1000 ng/ml) con tiempo de retención de 0.70 min. b) Espectros de masa Tz (137.95 m/z) y EI (124 m/z).

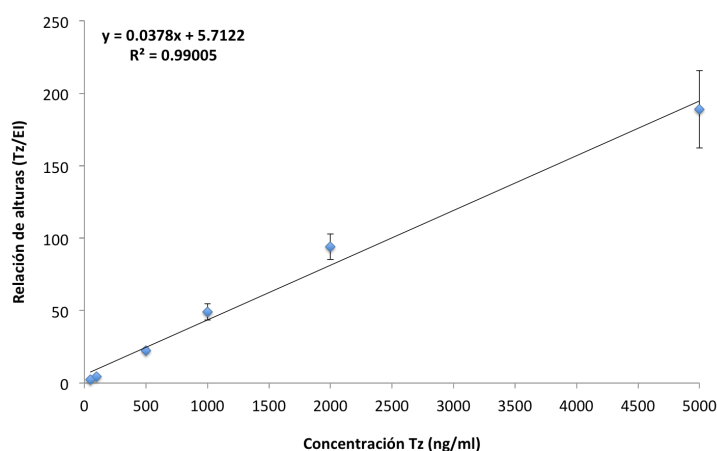


Figura 15. Curva de calibración de Tz en tejido.. Criterio de aceptación obteniéndose un coeficiente de correlación  $r^2 = 0.99$   $n=6 \pm DE$

### *Precisión.*

La precisión del método se evaluó a partir de la repetibilidad intradía y reproducibilidad interdía del sistema (Tabla 2 y 3). El CV cumple con los límites establecidos ( $CV \leq 15\%$ )

Concentración Tz (ng/ml)	Día 1 n=2		Día 2 n=2		Día 3 n=2	
	Promedio $\pm$ DE (Relación de alturas Tz/EI)	CV	Promedio $\pm$ DE (Relación de alturas Tz/EI)	CV	Promedio $\pm$ DE (Relación de alturas Tz/EI)	CV
50	2.8 $\pm$ 0.23	8.2	2.2 $\pm$ 0.23	11.5	2.5 $\pm$ 0.24	9.7
100	4.0 $\pm$ 0.38	9.5	3.9 $\pm$ 0.13	3.5	5.1 $\pm$ 0.7	1.4
500	21.7 $\pm$ 1.09	5.0	22.3 $\pm$ 1.9	8.4	23.5 $\pm$ 2.12	9.0
1000	48.9 $\pm$ 4.5	9.2	44.8 $\pm$ 1.7	3.7	53.4 $\pm$ 7.9	14.8
2000	112.2 $\pm$ 4.1	3.6	93.3 $\pm$ 3.0	3.2	100.8 $\pm$ 0.7	0.7
5000	202.3 $\pm$ 31.8	15.7	201.8 $\pm$ 15.3	7.6	162.8 $\pm$ 15.9	9.8

Tabla 2. Repetibilidad intradía de Tz en tejido obtenida en tres diferentes días. Criterio de aceptación % CV ( $\leq 15\%$ )

Concentración Tz (ng/ml)	Interdía n=6	
	Promedio $\pm$ DE (Relación de alturas Tz/EI)	CV
50	2.5 $\pm$ 0.33	13.2
100	4.3 $\pm$ 0.60	13.6
500	22.5 $\pm$ 1.59	7.1
1000	49.0 $\pm$ 5.6	11.5
2000	102.1 $\pm$ 8.8	8.6
5000	189.0 $\pm$ 26.7	14.1

Tabla 3. Reproducibilidad interdía de Tz en tejido cerebral. Criterio de aceptación %CV ( $\leq 15\%$ ) n=6  $\pm$  DE

### *Exactitud.*

Para determinar el parámetro de exactitud del método, se evaluó el coeficiente de variación de tres controles (25 ng/ml, 150 ng/ml y 450 ng/ml)(Tabla 4), los resultados muestran el coeficiente de variación cumplió con los límites establecidos por la norma para el parámetro de exactitud CV ( $\leq 20\%$ ) para la menor concentración y CV ( $\leq 15\%$ ) para las concentraciones restantes de la curva.

Concentración nominal (ng/ml)	Concentración experimental (ng/ml) Promedio $\pm$ DE	CV %
25	23.5 $\pm$ .01	0.1
150	136.7 $\pm$ 14.1	10.3
450	454.7 $\pm$ 13.3	2.9

Tabla 4. Exactitud de Tz en tejido cerebral. n= 5  $\pm$  DE

## **5.9. *Influencia de Mifepristona sobre la concentración de Temozolamida intracerebral.***

La concentración de Temozolamida fue determinada en tejido cerebral de rata a las cuales se les administró Temozolamida sola o en combinación con Mifepristona, los cromatogramas y los espectros de los iones producto se muestran en la figura 16, se observa

que lo niveles de Temozolamida incrementaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en las ratas tratadas con la combinación ( $4518 \pm 495$  ng Tz/g de tejido) en comparación a las que solo se les administró Temozolamida ( $1780 \pm 272$  ng Tz/g de tejido) (Figura 17).

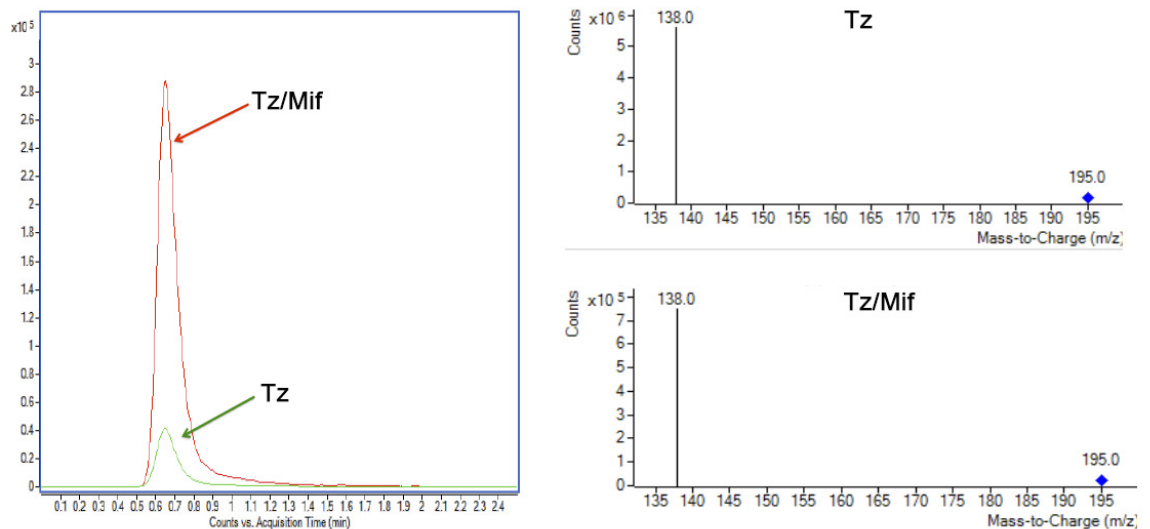


Figura 16. Cromatogramas y espectro de  $m/z$  de las ratas administradas con Tz y Tz/Mif.

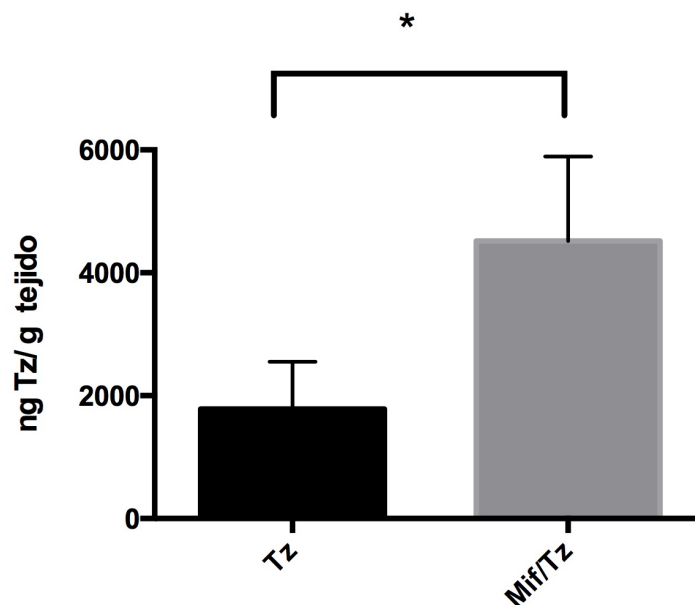
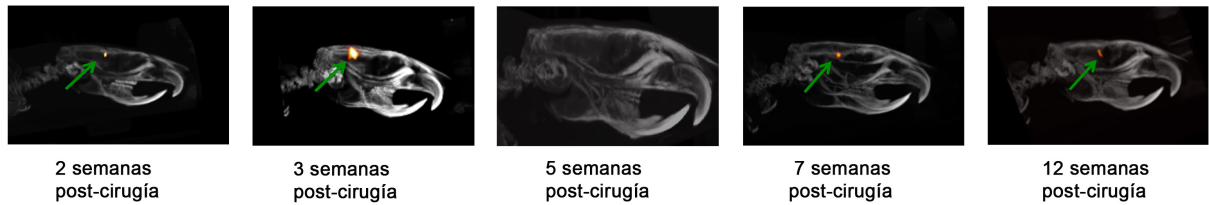


Figura 17. Concentración de Tz presente en tejido cerebral  $n=8 \pm$  DE. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$

### **5.10. *Efecto terapéutico de Mifepristona en combinación con Temozolamida durante la recurrencia tumoral.***

En la primera parte de este proyecto se evaluó el efecto y mecanismos relacionados a los 21 días de la administración de los diferentes tratamientos (Tz sola, Mif sola y la combinación Mif/Tz) donde se encontró que la combinación disminuye la proliferación celular, la reparación al daño al ADN, la angiogénesis e incrementa la concentración de Tz intracerebral. En esta etapa del proyecto evaluamos el efecto y los mecanismos involucrados durante la recurrencia del tumor a las 7 y 12 semanas post-tratamiento (Mif/Tz). Para la evaluación de la proliferación celular por imagen molecular se usó un equipo microPET/CT (figura 18a); a las 2 semanas después de la cirugía (inicio de tratamiento) se observa una actividad proliferativa; sin embargo a la 5 semanas post-cirugía esta actividad proliferativa no se detectó en el microPET/CT observandose de nuevo a la 7, esta actividad no incrementó durante las 12 semanas de estudio. En cuanto a la evaluación del peso corporal hubo una mayor pérdida de peso corporal en el grupo sin tratamiento, sin embargo, en el grupo que recibió la terapia combinada (Mif/Tz) el peso se mantuvo constante sin un aumento significativo (Figura 18b). El análisis de supervivencia de los diferentes grupos nos mostró que el tiempo promedio de supervivencia para las ratas sin tratamiento, Tz y Mif fue de 17-26 días; mientras que para el grupo de Mif/Tz el 70 % de las ratas sobreviven de 60-70 días y menos del 30 % más de 80 días (Figura 19). Durante el tiempo de evaluación se observó que el grupo sin tratamiento y el de Temozolamida presentaban cambios en su comportamiento teniendo una pérdida de coordinación motora; sin embargo, esto no se observó en la combinación de Mifepristona/Temozolamida en las cuales las mostraron un comportamiento normal a pesar de presentar una recurrencia del tumor.

a



b

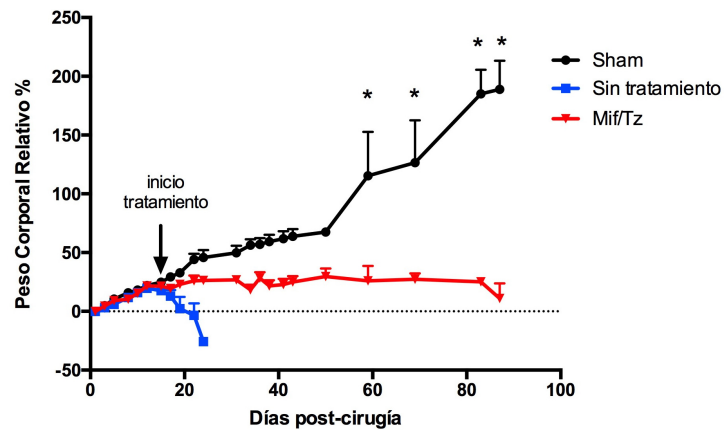


Figura 18. a) Seguimiento del crecimiento tumoral post-tratamiento con un equipo microPET/CT. b) Seguimiento de peso relativo en el modelo ortotópico de glioblastoma durante y después del tratamiento. Cada punto representa el promedio de  $n=8 \pm$  EEM. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0.05$  Mif/Tz vs Sham

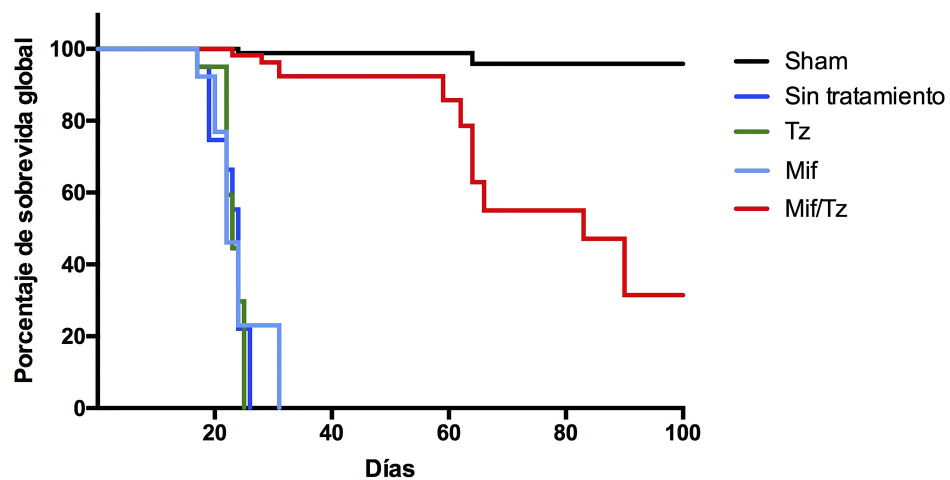


Figura 19. Curvas Kaplan-Meier. Análisis de sobrevida de los diferentes tratamientos.  $n=8$



### **5.11. *Efecto de Mifepristona en combinación con Temozolamida sobre MGMT durante la recurrencia tumoral.***

La evaluación de la modulación de Mifepristona/Temozolamida sobre MGMT se muestran en la Figura 20, observándose que los niveles de la enzima MGMT en el grupo de las ratas sanas son menores en comparación del grupo que no recibió tratamiento (S/T); sin embargo, como se había descrito antes a las 3 semanas los niveles de MGMT disminuyeron llegando a niveles similares del grupo sano, esta disminución parece revertirse a las 7 y 12 semanas post-tratamiento (Mifepristona/Temozolamida) lo que significa que durante la recurrencia tumoral los niveles de MGMT se restablecen gradualmente.

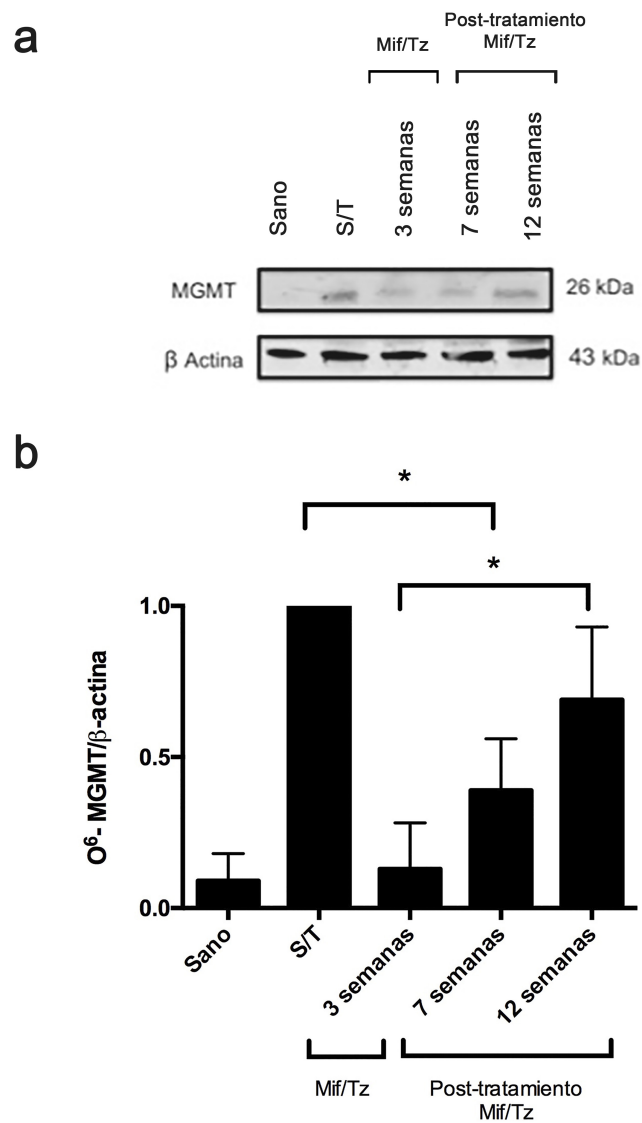


Figura 20. Determinación de la enzima de reparación al ADN (MGMT). a) Comparación de los niveles de MGMT después del tratamiento con Mif/Tz. b) Análisis de densitometría.  $n=3 \pm$  DE. S/T=Sin tratamiento. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0.05$

### 5.12. Participación de Mifepristona y Temozolamida sobre VEGFA durante la recurrencia tumoral.

En la figura 21 se observan los niveles de VEGF durante la recaída tumoral. El grupo al que no se le administró ningún tratamiento muestra niveles de VEGF más altos que el grupo sano; en cambio, en el grupo al que se le administró Mif/Tz por tres semanas los niveles de VEGF disminuyeron, llegando al mismo nivel que el grupo sano. Por otro lado a las 7 y 12 semanas post-tratamiento observamos un incremento en los niveles de proteína lo que significa que durante la recurrencia tumoral los niveles de VEGF se restablecieron casi al mismo nivel que el grupo sin tratamiento.

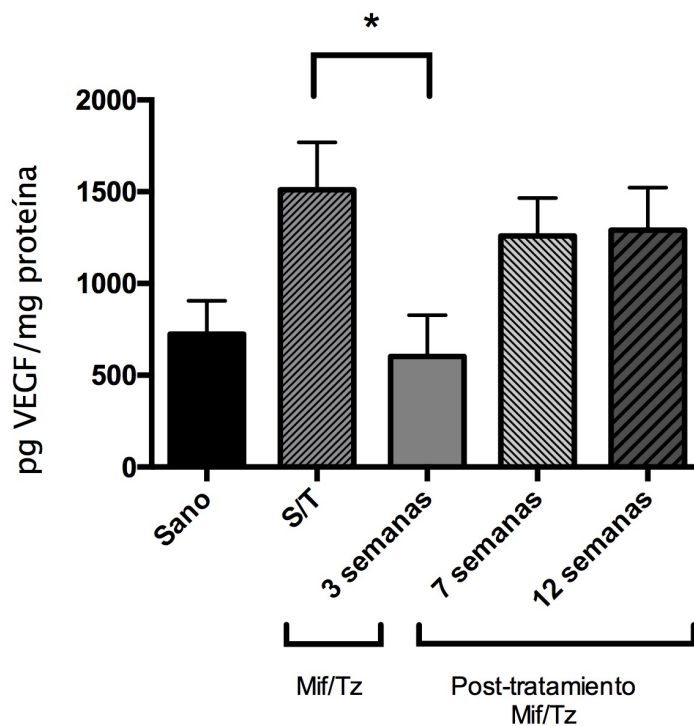


Figura 21. Determinación de VEGF después del tratamiento.  $n=5 \pm DE$ . S/T=Sin tratamiento. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0.05$

### 5.13. Efecto de Mifepristona en combinación con Temozolamida sobre la proteína P-gp durante la recurrencia tumoral.

En el caso de la proteína P-gp se observa que los niveles en el grupo de las ratas sanas son menores en comparación del grupo que no recibió tratamiento (S/T); sin embargo, a las 3 semanas los niveles de la proteína P-gp disminuyeron en comparación del grupo S/T, esta disminución parece revertirse gradualmente a las 7 y 12 semanas post-tratamiento (Mifepristona/Temozolamida), a las 12 semanas se observa que los niveles de proteína de P-gp alcanzan los mismos niveles del grupo sin tratamiento (Figura 22).

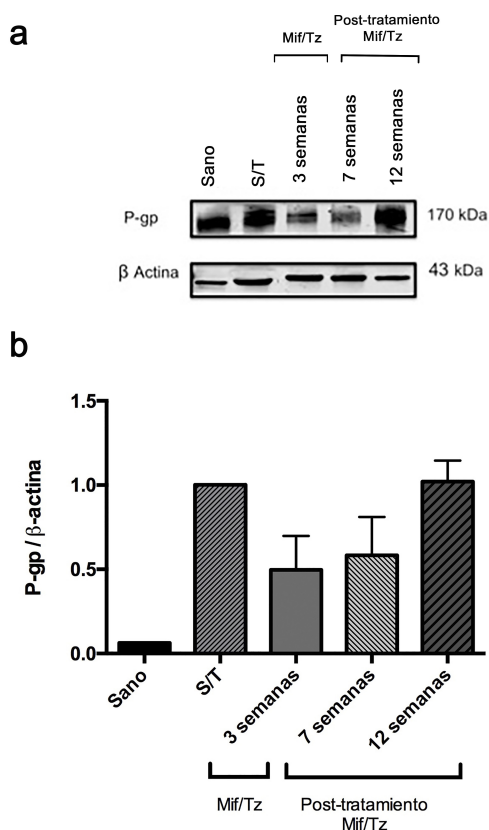


Figura 22. a) Determinación de los niveles de P-gp después del tratamiento. b) Análisis de densitometría de los diferentes grupos.  $n=3 \pm DE$ . S/T=Sin tratamiento. \*Diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0.05$

# Capítulo 6

## Discusión

---

A pesar de los avances en la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer, a la fecha no se ha logrado mejorar la sobrevida de los pacientes con glioblastoma, uno de los principales problemas en el tratamiento de este tipo de neoplasia es la dificultad de los fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica, además de la resistencia de los tumores a la quimioterapia. El tratamiento estándar para este tipo de neoplasias es cirugía, quimioterapia y radioterapia; en México de acuerdo con datos estadísticos del Globocan durante el 2018, se identificaron 2663 (por 100000 habitantes) pacientes fallecidos por tumores del sistema nervioso central y se proyecta un incremento a 4785 para el 2040; los pacientes con glioblastoma presentan una sobrevida media de 14.6-16 meses una vez diagnosticados (Johnson and O'Neill 2012), por lo que es necesario contar con nuevas estrategias que nos permitan mejorar la respuesta del tratamiento estándar que se ha utilizado a la fecha.

En los últimos 10 años se han desarrollado nuevas moléculas para el tratamiento del glioblastoma, las cuales han presentado poco impacto para mejorar el pronóstico y la sobrevida. El descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas involucra la identificación y optimización de nuevos compuestos, seguidos por estudios preclínicos y clínicos para probar y caracterizar sus propiedades farmacológicas; además de sus efectos antineoplásico y toxicidad; sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, el éxito en el desarrollo de nuevas moléculas contra el glioblastoma ha sido difícil. El tiempo promedio para completar el proceso regulatorio de una nueva molécula, oscila alrededor de 15 años además de ser un proceso costoso. Actualmente hay más de 10000 investigaciones de ensayos clínicos; sin embargo, solamente un limitado número de fármacos candidatos progresan a la siguiente fase clínica.

Los fármacos oncológicos que finalmente reciben la aprobación clínica para su comercialización tienen altos costos para un paciente, ya que deben cubrir las inversiones tanto de candidatos farmacológicos exitosos como los que fallaron en su eficacia; esta problemática ha estimulado la búsqueda de alternativas para mejorar el éxito de tratamientos y acortar el tiempo de procedimientos, así como el de disminuir los costos en el desarrollo de fármacos antineoplásicos. Una de estas alternativas es el reposicionamiento farmacológico, que se refiere a la aplicación de fármacos en otra indicación para la que originalmente fue aprobada. Una de las principales ventajas es la extensa cantidad de datos que están disponibles reduciendo la necesidad de estudios adicionales como los estudios de farmacocinética y de toxicidad, esto con la finalidad de incrementar la probabilidad de identificar nuevos fármacos candidatos que puedan ser trasladados a pacientes con glioblastoma (Pushpakom, et al, 2018, Hernández J, et al, 2017). En este trabajo se estudió al agente antihormonal, Mifepristona, como un fármaco de reposicionamiento.

La Mifepristona es un agente antagonista de los receptores de progesterona, de glucocorticoides y de andrógenos (Spitz and Bardin 1993, Im and Appleman 2010). En los últimos años se ha estudiado su uso en diferentes tipos de cáncer, hormono y no hormono dependientes (Tieszen, et al. 2011); sin embargo, hasta la fecha se desconocen los mecanismos de Mifepristona como agente quimiosensibilizante. Un trabajo previo en nuestro laboratorio demostró el efecto quimio-radiosensibilizante de Mifepristona en combinación con la terapia estándar en un modelo de xenotransplante de glioma, observando un mayor control en la velocidad de crecimiento tumoral y correlacionando este efecto con una disminución en la expresión de VEGF (Llaguno-Munive, 2013). El modelo experimental desarrollado en ese trabajo fue la inoculación subdérmica de células de glioblastoma en ratones atímicos, este modelo nos ofrece varias ventajas como el de ser relativamente sencillo y rápido; además se puede dar seguimiento al crecimiento tumoral utilizando un vernier y obtener la respuesta tumoral con un método sencillo y menos costoso; sin embargo, este modelo presenta algunas desventajas como lo son que las células inoculadas subdérmicamente no reproducen un microambiente tumoral como el que se presenta en los pacientes con tumores cerebrales; además no se puede determinar si los fármacos atraviesan la barrera hematoencefálica, por lo tanto, un modelo experimental ortotópico, en el cual las células se implantan directamente en el cerebro ofrece ventajas sobre el modelo del implante subdérmico (Jacobs, et al. 2011). Un modelo ortotópico reproduce un microambiente tumoral heterogéneo y se puede evaluar si el tratamiento atraviesa la BH. Por lo tanto en este proyecto se utilizó dicho modelo para evaluar tanto el efecto terapéutico así como los mecanismos moleculares de la combinación de Temozolamida y Mifepristona en un modelo ortotópico de glioblastoma durante y después del tratamiento. En la primera etapa se evaluó la respuesta de la combinación

del tratamiento en ratas inoculadas intracerebralmente con las células tumorales (C6), se observó una diferencia significativa en la tasa de proliferación celular en los animales a los que se les administró la combinación (Mifepristona/Temozolamida) en comparación con los grupos a los que se les administró el vehículo, Temozolamida sola y Mifepristona sola, esto se observó en las imágenes del microPet/CT utilizando como radiofármaco 18F-FLT, así mismo se observó una mayor pérdida de peso en los grupos sin tratamiento, Mifepristona sola, Temozolamida sola en comparación con la combinación (Mif/Tz) estos resultados correlacionaron con el marcador de proliferación celular Ki-67.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, en los últimos años se ha estado investigando el uso de Mifepristona en algunos tipos de cáncer como: meningioma (Lamberts, et al. 1992, Cossu, et al. 2015), células de cáncer de mama (Klijn, et al. 1989, Mitre-Aguilar, et al. 2019), ovario (Goyeneche, et al. 2007) y próstata (Ligr, et al. 2012) entre otros, demostrando ser eficaz mediante la inhibición del crecimiento de células tumorales tanto in vivo como in vitro. En glioma, Pinski y colaboradores demostraron que Dexametasona tiene un efecto estimulante sobre la proliferación de células U87MG implantados en xenotransplantes en ratones atímicos y Mifepristona fue capaz de inhibir el efecto de la Dexametasona sugiriendo que el efecto antiproliferativo de Mifepristona se debe a la inhibición de la unión de los glucocorticoides a sus receptores (Pinski, et al. 1993), además se ha reportado que progesterona, al igual que Dexametasona, es capaz de incrementar la proliferación y migración de células tumorales en glioblastoma y que Mifepristona logra disminuir este efecto (German-Castelan, et al. 2014). Mifepristona puede actuar a través de dos mecanismos; el primero implica el receptor nuclear de progesterona (RPN) y el segundo involucra al receptor membranal de progesterona (RPM) (Cabrera-Munoz, et al. 2009). El receptor nuclear está presente en tumores cerebrales incluyendo gliomas y meningiomas y su sobreexpresión incrementa la malignidad del tumor; en el caso del RPM se expresa en líneas celulares de glioblastoma como U256 y U87 (Valadez-Cosmes, et al. 2015); sin embargo, Su y colaboradores observaron que la línea celular C6 no expresa RPN pero sí RPM (Su, et al. 2012), por lo que posiblemente los resultados obtenidos en este proyecto no estén relacionados con el RPN.

A la fecha se desconocen los mecanismos de acción por los que Mifepristona incrementa el efecto antiproliferativo de Temozolamida en tumores de glioblastoma, uno de los mecanismos propuestos en este trabajo es la promoción de apoptosis; nuestros resultados demostraron que la combinación de Temozolamida/Mifepristona disminuye la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 e incrementa proteínas proapoptóticas como Bax y

Cl-caspasa 3, esto sugiere que la combinación induce la apoptosis en el modelo ortotópico de glioma mejorando así la respuesta al tratamiento con Temozolamida. Otros estudios han reportado que Mifepristona aumenta la sensibilidad de las células tumorales, Li et al demostraron que Mifepristona promueve la apoptosis disminuyendo los niveles de expresión de Bcl-XL e incrementando la expresión de caspasa 3 en células de adenocarcinoma gástrico SGC-79901 (Li, et al. 2004). En células de cáncer de ovario Mifepristona inhibe Bcl-2, además activa la expresión de Bax; en células de cáncer de mama se le ha relacionado con la activación de caspasas 3, 8 y 9 (Han and Sidell 2003, Gaddy, et al. 2004); en células Ishikawa Mifepristona modula la expresión de genes involucrados en apoptosis (Bcl-2/Bax) (Li, et al. 2005).

Como se mencionó anteriormente otro de los mecanismos importantes en la resistencia al tratamiento de Temozolamida es la expresión de la enzima de reparación al daño al ADN (MGMT). La metilación (silenciamiento epigenético) del promotor de MGMT se ha observado aproximadamente en el 50 % de los pacientes de glioblastoma (Wick, Weller et al. 2014) mostrando un incremento en la respuesta terapéutica con agentes alquilantes, por lo que la disminución de MGMT es un factor importante para mejorar la respuesta al tratamiento de Temozolamida. Hasta la fecha no hay ningún reporte del efecto de Mifepristona sola sobre la expresión de MGMT, por lo que uno de los objetivos del proyecto fue evaluar la modulación de Mifepristona/Temozolamida sobre MGMT observándose que Mifepristona disminuye los niveles de MGMT comparado con el grupo sin tratamiento o de Temozolamida sola; sin embargo, se observó una disminución mayor de los niveles de MGMT con la combinación de Mifepristona/Temozolamida. Esto podría incrementar la sensibilidad de las células a Temozolamida y mejorar la respuesta al tratamiento convencional.

En la actualidad se desconoce si Mifepristona inhibe epigenéticamente la expresión de MGMT y a la fecha se sabe que la expresión de MGMT está regulada por diferentes factores de transcripción como la proteína específica 1 (SP1), la proteína activadora (AP-1), el factor de necrosis tipo B (NF $\kappa$ - $\beta$ ), el factor inducible de hipoxia (HIF); otra proteína relacionada con la expresión de MGMT es p53, la cual secuestra al factor SP1 y previene la transcripción de MGMT; se sabe que Mifepristona promueve la activación de p53 en diferentes líneas de cáncer y de esta manera Mifepristona podría estar modulando los niveles de MGMT de manera indirecta. Además se ha reportado que el promotor de MGMT contiene elementos de respuesta a glucocorticoides incrementando así su expresión; los glucocorticoides como la Dexametasona, es usada de manera frecuente en pacientes con



glioblastoma para disminuir el edema, algunos autores sugieren que los glucocorticoides incrementan la expresión de MGMT, Biswas y colaboradores reportaron que Dexametasona incrementa la expresión de MGMT en células de glioblastoma; por otro lado Hoiguchi encontró que Dexametasona incrementa la expresión de MGMT en células hepáticas y este efecto se revierte por Mifepristona; en conjunto estos mecanismos podrían estar parcialmente involucrados en la disminución de los niveles de MGMT que se presentaron con la combinación de Mif/Tz; sin embargo, hacen falta mas estudios para definir claramente los mecanismos por los cuales Mifepristona actua sobre la expresión de MGMT.

Se ha visto que MGMT no es el único mecanismo relacionado con la resistencia a la quimioterapia, el micro-ambiente tumoral juega un papel muy importante en la resistencia al tratamiento; en particular un microambiente de hipoxia esta altamente relacionado con la quimio-radio-resistencia por la modulación de diferentes mecanismos como la angiogénesis. La angiogénesis es el desarrollo de una nueva vasculatura a partir de una preexistente (Tate and Aghi 2009). Existe una diversidad de moléculas que tienen propiedades pro-angiogénicas como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TGF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), entre otros (Mischel and Cloughesy 2003). VEGF responde a varios estímulos como es la hipoxia/isquemia principalmente a través del factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1), a distintos factores de crecimiento (EGF, TGF- $\alpha$  y  $\beta$ , KGF, PDGF), a oncogenes activados y a estrógeno, entre otros (Tate and Aghi 2009). VEGF es el mediador más importante de la neovascularización en glioblastoma y su expresión aumenta durante la progresión del tumor.

Debido a la importancia que tiene VEGF dentro de la fisiopatología de los glioblastomas una de las estrategias para incrementar la sobrevida de los pacientes es la inhibición de su expresión o la interferencia de vías de señalización mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra VEGF y sus receptores. Uno de los anticuerpos que mas se ha utilizado es el Bevacizumab (BVZ), este anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF fue autorizado por la FDA para glioblastomas recurrentes desde el 2009. El uso de BVZ no ha mostrado resultados alentadores, incrementa el tiempo libre de progresión de la enfermedad pero no la sobrevida de los pacientes. En el 2016 Wick y colaboradores reportaron que aquellos pacientes que recibieron la terapia estandar (Tz/Rad) presentaron 6.3 meses libres de progresión de la enfermedad mientras que aquellos pacientes que recibieron BVZ junto con Tz/Rad se incrementó a 10 meses; sin embargo, en ambos casos se reportó una sobrevida de 27 meses (Wick, et al. 2016).

A la fecha no se ha logrado mejorar la respuesta al tratamiento de glioblastoma con inhibidores de VEGF, por lo que nos resultó interesante evaluar la participación de Mif sobre la modulación de VEGF; así que nos planteamos determinar si la combinación Mif/Tz es capaz de disminuir los niveles de VEGF y la densidad vascular. Nuestros resultados mostraron que la combinación Mifepristona/Temozolamida disminuyó de manera significativa la expresión del VEGF en comparación con el grupo sin tratamiento lo que se correlacionó con el marcador CD31 observando una menor densidad vascular, por lo que la disminución de VEGF también podría incrementar la respuesta al tratamiento en glioblastoma. Varios estudios han demostrado que Mifepristona participa en la disminución de la expresión de VEGF, en el caso de astrocitoma, Hernández y colaboradores observaron, en la línea U373, que progesterona incrementa la expresión de VEGF a través del reclutamiento del coactivador de receptores esteroideos (SRC-1), el cual es importante para la activación de la transcripción de VEGF, esto se ve revertido cuando se aplica Mifepristona, disminuyendo así la expresión de VEGF (Hernandez-Hernandez, et al. 2012).

Además de lo mencionado anteriormente otro de los principales problemas para el tratamiento de glioblastoma es la BH y la presencia de proteínas transportadoras de fármacos dependientes de ATP (por ejemplo P-gp), estas proteínas se encuentran sobreexpresadas tanto en la BH como en las células tumorales (Toth, et al. 1996). P-gp facilita el movimiento unidireccional de Temozolamida de la célula tumoral a la circulación sistémica ocasionando una disminución de las concentraciones intratumorales de Temozolamida, por lo que en los últimos años se han estado investigado nuevas estrategias para lograr incrementar la concentración de Tz en el tumor y una de ellas es la inhibición o bloqueo de P-gp. En este trabajo se evaluó si la combinación de Mifepristona/Temozolamida modifica los niveles de la proteína P-gp observándose que Mifepristona sola fue capaz de disminuir los niveles de P-gp.

Otra manera de evaluar la participación de Mifepristona sobre la modulación de P-gp es determinando de manera indirecta el bloqueo o la disminución de la actividad de P-gp y una de las técnicas que se emplea es la cuantificando Tz intracerebral. En este proyecto nos planteamos evaluar si Mifepristona es capaz de disminuir la actividad de P-gp y lograr incrementar la concentración intratumoral de Temozolamida, para ello se desarrolló y validó un método confiable, preciso y exacto para cuantificar Tz en tejido cerebral de rata. Los resultados mostraron que Mifepristona incrementó aproximadamente 4 veces la concentración intracerebral de Tz en comparación con el grupo al que solo se le administró Temozolamida sola; por lo tanto, proponemos que el bloqueo de P-gp por Mifepristona

es uno de los posibles mecanismos involucrados en la mejora a la respuesta terapéutica mejorando la disponibilidad de Tz en el sitio blanco. Estos resultados concuerdan con diferentes autores los cuales han reportado que Mifepristona es capaz de inhibir la actividad de P-gp en una línea celular gástrica SGC7901/VCR (Da-Qiang, et al, 2004) y en la línea celular de leucemia KG1a (Fardel, 1996).

En la segunda parte de este proyecto se evaluó la respuesta post-tratamiento de Mif/Tz, observamos que a la quinta semana no había una actividad proliferativa en las imágenes moleculares mientras que a la séptima semana se observó nuevamente una actividad proliferativa, esto nos podría indicar una recurrencia tumoral; sin embargo, de manera interesante los animales mantuvieron su peso corporal y además la actividad proliferativa no incrementó durante el estudio (12 semanas) obteniendo una supervivencia global del 30 %, este resultado es importante ya que se conoce que en los pacientes con glioblastoma la recurrencia es inevitable teniendo un 100 % de mortalidad. Durante la recurrencia también se evaluaron algunos de los mecanismos involucrados con la resistencia al tratamiento, se observó que los niveles de MGMT, VEGF y P-gp incrementaron de manera gradual cuando se dejó de administrar el tratamiento, alcanzando niveles similares al grupo control. Varios estudios han sugerido que las células troncales pueden ser el elemento responsable de la resistencia y la recaída en glioblastoma, así que un reto en el tratamiento del glioblastoma es la eliminación no solo de las células tumorales, sino además de las células troncales de glioblastoma. Se ha reportado que las células troncales de glioblastoma expresan altos niveles de MGMT e hipoxia y de esta manera provocan una mayor resistencia y recurrencia al tratamiento (Pistollato, Abbadi et al. 2010). Además se ha reportado que en las células troncales existe una sobreexpresión de P-gp incrementando la resistencia a la quimioterapia. (Eramo, et al. 2006). Hasta la fecha hay una gran variedad de estrategias para desarrollar nuevos tratamientos para el glioblastoma, aunque aún han sido insuficientes en evitar el progreso del crecimiento tumoral y la recurrencia; sin embargo, se requiere investigar los mecanismos involucrados en la recurrencia. Con los resultados obtenidos en el presente proyecto Mifepristona podría estar involucrada en la modulación de la recurrencia en glioblastoma.

# Capítulo 7

## Conclusión

---

Los resultados obtenidos indican que Mifepristona es capaz de incrementar el efecto de Temozolamida en un modelo ortotópico de glioblastoma, disminuyendo la proliferación celular y aumentando la apoptosis, además de una disminución en la expresión de proteínas relacionadas con resistencia al tratamiento como MGMT, P-gp y VEGF.

# Capítulo 8

## Perspectivas.

---

Dentro de las perspectivas de este trabajo se propone administrar de manera continua el tratamiento de Mif/Tz y evaluar la recurrencia tumoral, así como los posibles mecanismos involucrados en la recurrencia.

Además de evaluar el efecto quimio-radio-sensibilizante de Mifepristona en un modelo ortotópico de glioblastoma.

# Capítulo 9

## Bibliografía

---

Agarwal, S., P. Manchanda, M. A. Vogelbaum, J. R. Ohlfest and W. F. Elmquist (2013). "Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma." *Drug Metab Dispos* 41(1): 33-39.

Ahmed, R., M. J. Oborski, M. Hwang, F. S. Lieberman and J. M. Mountz (2014). "Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods." *Cancer Manag Res* 6: 149-170.

Alves, T. R., F. R. Lima, S. A. Kahn, D. Lobo, L. G. Dubois, R. Soletti, H. Borges and V. M. Neto (2011). "Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma." *Life Sci* 89(15-16): 532-539.

Ambudkar, S. V., S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan and M. M. Gottesman (1999). "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 361-398.

Arora, A. and K. Somasundaram (2019). "Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won?" *Cancer Biol Ther* 20(8): 1083-1090.

Baulieu, E. E. (1997). RU 486 (mifepristone). A short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996. *Ann N Y Acad Sci* 828: 47-58.

Barone, T. A., J. W. Gorski, S. J. Greenberg and R. J. Plunkett (2009). "Estrogen increases survival in an orthotopic model of glioblastoma." *J Neurooncol* 95(1): 37-48.

Benke, G., M. C. Turner, S. Fleming, J. Figuerola, L. Kincl, L. Richardson, M. Blettner, M. Hours, D. Krewski, D. McLean, M. E. Parent, S. Sadetzki, K. Schlaefel, B. Schlehofer, J. Siemiatycki, M. van Tongeren and E. Cardis (2017). "Occupational solvent exposure and risk of glioma in the INTEROCC study." *Br J Cancer* 117(8): 1246-1254.

Berrington de Gonzalez, A., R. E. Curtis, S. F. Kry, E. Gilbert, S. Lamart, C. D. Berg, M. Stovall and E. Ron (2011). "Proportion of second cancers attributable to radiotherapy treatment in adults: a cohort study in the US SEER cancer registries." *Lancet Oncol* 12(4): 353-360.

Biswas, T., C. V. Ramana, G. Srinivasan, I. Boldogh, T. K. Hazra, Z. Chen, K. Tano, E. B. Thompson and S. Mitra (1999). "Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone." *Oncogene* 18(2): 525-532.

Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." *J Natl Cancer Inst* 92(16): 1295-1302.

Brown, T. J., M. C. Brennan, M. Li, E. W. Church, N. J. Brandmeir, K. L. Rakszawski, A. S. Patel, E. B. Rizk, D. Suki, R. Sawaya and M. Glantz (2016). "Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis." *JAMA Oncol* 2(11): 1460-1469.

Cabrera-Munoz, E., A. Gonzalez-Arenas, M. Saqui-Salces, J. Camacho, F. Larrea, R. Garcia-Becerra and I. Camacho-Arroyo (2009). "Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines." *J Steroid Biochem Mol Biol* 113(1-2): 80-84.

Check, J. H., C. Wilson, R. Cohen and M. Sarumi (2014). "Evidence that Mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV." *Anticancer Res* 34(5): 2385-2388.

Christmann, M., C. Boisseau, R. Kitzinger, C. Berac, S. Allmann, T. Sommer, D. Aasland, B. Kaina and M. T. Tomicic (2016). "Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations." *Nucleic Acids Res* 44(22): 10727-10743.

Christmann, M. and B. Kaina (2019). "Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy." *Mutat Res* 780: 15-28.

Christmann, M., G. Nagel, S. Horn, U. Krahn, D. Wiewrodt, C. Sommer and B. Kaina (2010). "MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma." *Int J Cancer* 127(9): 2106-2118.

Chung, F. S., J. S. Santiago, M. F. Jesus, C. V. Trinidad and M. F. See (2016). "Disrupting P-glycoprotein function in clinical settings: what can we learn from the fundamental aspects of this transporter?" *Am J Cancer Res* 6(8): 1583-1598.

Cobbs, C. S. (2011). "Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis." *Herpesviridae* 2(1): 10.

Cobbs, C. S., L. Harkins, M. Samanta, G. Y. Gillespie, S. Bharara, P. H. King, L. B. Nabors, C. G. Cobbs and W. J. Britt (2002). "Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma." *Cancer Res* 62(12): 3347-3350.

Cogliano, V. J., R. Baan, K. Straif, Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Freeman, L. Galichet and C. P. Wild (2011). "Preventable exposures associated with human cancers." *J Natl Cancer Inst* 103(24): 1827-1839.

Cossu, G., M. Levivier, R. T. Daniel and M. Messerer (2015). "The Role of Mifepristone in Meningiomas Management: A Systematic Review of the Literature." *Biomed Res Int* 2015: 267831.

Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-219.

Darkes, M., Plosker and B. Jarvis (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.



Decleves, X., A. Fajac, J. Lehmann-Che, M. Tardy, C. Mercier, I. Hurbain, J. L. Laplanche, J. F. Bernaudin and J. M. Scherrmann (2002). "Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines." *Int J Cancer* 98(2): 173-180.

Demuth, T. and M. E. Berens (2004). "Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion." *J Neurooncol* 70(2): 217-228.

El Etreby, M. F., Y. Liang and R. W. Lewis (2000). "Induction of apoptosis by mifepristone and tamoxifen in human LNCaP prostate cancer cells in culture." *Prostate* 43(1): 31-42.

Eramo, A., L. Ricci-Vitiani, A. Zeuner, R. Pallini, F. Lotti, G. Sette, E. Pillozzi, L. M. Larocca, C. Peschle and R. De Maria (2006). "Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells." *Cell Death Differ* 13(7): 1238-1241.

Fulda, S. (2014). "Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)." *Adv Exp Med Biol* 818: 167-180.

Furuta, T., H. Sabit, Y. Dong, K. Miyashita, M. Kinoshita, N. Uchiyama, Y. Hayashi, Y. Hayashi, T. Minamoto and M. Nakada (2017). "Biological basis and clinical study of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma." *Oncotarget* 8(14): 22811-22824.

Gaddy, V. T., J. T. Barrett, J. N. Delk, A. M. Kallab, A. G. Porter and P. V. Schoenlein (2004). "Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells." *Clin Cancer Res* 10(15): 5215-5225.

Garcia, C., L. G. Dubois, A. L. Xavier, L. H. Geraldo, A. C. da Fonseca, A. H. Correia, F. Meirelles, G. Ventura, L. Romao, N. H. Canedo, J. M. de Souza, J. R. de Menezes, V. Moura-Neto, F. Tovar-Moll and F. R. Lima (2014). "The orthotopic xenotransplant of human glioblastoma successfully recapitulates glioblastoma-microenvironment interactions in a non-immunosuppressed mouse model." *BMC Cancer* 14: 923.

German-Castelan, L., J. Manjarrez-Marmolejo, A. Gonzalez-Arenas, M. G. Gonzalez-Moran and I. Camacho-Arroyo (2014). "Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat." *Biomed Res Int* 2014: 393174.

Gouws, C. and P. J. Pretorius (2011). "O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): can function explain a suicidal mechanism?" *Med Hypotheses* 77(5): 857-860.

Goyeneche, A. A., R. W. Caron and C. M. Telleria (2007). "Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo." *Clin Cancer Res* 13(11): 3370-3379.

Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." *Science* 305(5684): 626-629.

Gutin, P. H. and J. B. Posner (2000). "Neuro-oncology: diagnosis and management of cerebral gliomas—past, present, and future." *Neurosurgery* 47(1): 1-8.

Han, S. and N. Sidell (2003). "RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells involves the nuclear factor-kappa B signaling pathway." *J Clin Endocrinol Metab* 88(2): 713-719.

Hart, M. G., R. Grant, R. Garside, G. Rogers, M. Somerville and K. Stein (2008). "Temozolomide for high grade glioma." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD007415.

Hatch, E. E., M. S. Linet, J. Zhang, H. A. Fine, W. R. Shapiro, R. G. Selker, P. M. Black and P. D. Inskip (2005). "Reproductive and hormonal factors and risk of brain tumors in adult females." *Int J Cancer* 114(5): 797-805.

Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer and R. Stupp (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 997-1003.

Hernandez-Hernandez, O. T., T. K. Gonzalez-Garcia and I. Camacho-Arroyo (2012).

"Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines." *J Steroid Biochem Mol Biol* 132(1-2): 127-134.

Horiguchi, M., J. Kim, N. Matsunaga, H. Kaji, T. Egawa, K. Makino, S. Koyanagi and S. Ohdo (2010). "Glucocorticoid-dependent expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene modulates dacarbazine-induced hepatotoxicity in mice." *J Pharmacol Exp Ther* 333(3): 782-787.

Houben, M. P., C. M. van Duijn, J. W. Coebergh and C. C. Tijssen (2005). "[Gliomas: the role of environmental risk factors and genetic predisposition]." *Ned Tijdschr Geneeskd* 149(41): 2268-2272.

Huszthy, P. C., I. Daphu, S. P. Niclou, D. Stieber, J. M. Nigro, P. O. Sakariassen, H. Miletic, F. Thorsen and R. Bjerkvig (2012). "In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives." *Neuro Oncol* 14(8): 979-993.

Hyder, S. M., C. Chiappetta and G. M. Stancel (2001). "Pharmacological and endogenous progestins induce vascular endothelial growth factor expression in human breast cancer cells." *Int J Cancer* 92(4): 469-473.

Im, A. and L. J. Appleman (2010). "Mifepristone: pharmacology and clinical impact in reproductive medicine, endocrinology and oncology." *Expert Opin Pharmacother* 11(3): 481-488.

J.M., M., G. L. Darkes and P. a. B. Jarvis (2002). "Temozolomide: A Review of its Use in the Treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and Other Advanced Cancers." *Am J Cancer* 1(1).

Jacobs, V. L., P. A. Valdes, W. F. Hickey and J. A. De Leo (2011). "Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model." *ASN Neuro* 3(3).

Inoki, K., T. Zhu and K. L. Guan (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." *Cell* 115(5): 577-590.

Jakel, S. and L. Dimou (2017). "Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation." *Front Cell Neurosci* 11: 24.

Johnson, D. R. and B. P. O'Neill (2012). "Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era." *J Neurooncol* 107(2): 359-364.

Jones, P. M. and A. M. George (2004). "The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research." *Cell Mol Life Sci* 61(6): 682-699.

Jurado, R., A. Lopez-Flores, A. Alvarez and P. Garcia-Lopez (2009). Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: an in vitro and in vivo study. *Oncol Rep* 22(5): 1237-1245.

Kabat, G. C., A. M. Etgen and T. E. Rohan (2010). "Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma?" *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 19(10): 2421-2427.

Kaur, B., F. W. Khwaja, E. A. Severson, S. L. Matheny, D. J. Brat and E. G. Van Meir (2005). "Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis." *Neuro Oncol* 7(2): 134-153.

Khawli, L. A. and S. Prabhu (2013). "Drug delivery across the blood-brain barrier." *Mol Pharm* 10(5): 1471-1472.

Klein, M., B. Burla and E. Martinoia (2006). "The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants." *FEBS Lett* 580(4): 1112-1122.

Klijn, J. G., F. H. de Jong, G. H. Bakker, S. W. Lamberts, C. J. Rodenburg and J. Alexieva-Figusch (1989). "Antiprogesterins, a new form of endocrine therapy for human breast cancer." *Cancer Res* 49(11): 2851-2856.

Kolchinsky, A. and I. B. Roninson (1997). "Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines." *Anticancer Res* 17(5A): 3321-

3327.

Kong, D. X., C. Y. Chen, F. Y. Xu and J. H. Jia (2007). "[Study of mifepristone on reversing multidrug resistance of leukemic cell line K562/A02]." *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 28(8): 555-559.

Kruh, G. D. and M. G. Belinsky (2003). "The MRP family of drug efflux pumps." *Oncogene* 22(47): 7537-7552.

Labi, V. and M. Erlacher (2015). "How cell death shapes cancer." *Cell Death Dis* 6: e1675.

Lamberts, S. W., H. L. Tanghe, C. J. Avezaat, R. Braakman, R. Wijngaarde, J. W. Koper and H. de Jong (1992). "Mifepristone (RU 486) treatment of meningiomas." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55(6): 486-490.

Lee, N. Y., Q. Zhang, D. G. Pfister, J. Kim, A. S. Garden, J. Mechalakos, K. Hu, Q. T. Le, A. D. Colevas, B. S. Glisson, A. T. Chan and K. K. Ang (2012). "Addition of bevacizumab to standard chemoradiation for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma (RTOG 0615): a phase 2 multi-institutional trial." *Lancet Oncol* 13(2): 172-180.

Li, A., J. C. Felix, P. Minoo, C. A. Amezcua and J. K. Jain (2005). "Effect of mifepristone on proliferation and apoptosis of Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells." *Fertil Steril* 84(1): 202-211.

Li, D. Q., Z. B. Wang, J. Bai, J. Zhao, Y. Wang, K. Hu and Y. H. Du (2004). "Effects of mifepristone on invasive and metastatic potential of human gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 in vitro and in vivo." *World J Gastroenterol* 10(12): 1726-1729.

Li, D. Q., Z. B. Wang, J. Bai, J. Zhao, Y. Wang, K. Hu and Y. H. Du (2004). "Effects of mifepristone on proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 in vitro." *World J Gastroenterol* 10(18): 2628-2631.

Li, D. Q., Z. B. Wang, J. Bai, J. Zhao, Y. Wang, K. Hu and Y. H. Du (2004). "Reversal

of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR by antiprogestin drug mifepristone." *World J Gastroenterol* 10(12): 1722-1725.

Liang, Y., M. Hou, A. M. Kallab, J. T. Barrett, F. El Etreby and P. V. Schoenlein (2003). 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 TGFbeta1. *Int J Oncol* 23(2): 369-380.

Ligr, M., Y. Li, S. K. Logan, S. Taneja, J. Melamed, H. Lepor, M. J. Garabedian and P. Lee (2012). "Mifepristone inhibits GRbeta coupled prostate cancer cell proliferation." *J Urol* 188(3): 981-988.

Lin, M. F., M. H. Kawachi, M. R. Stallcup, S. M. Grunberg and F. F. Lin (1995). "Growth inhibition of androgen-insensitive human prostate carcinoma cells by a 19-norsteroid derivative agent, mifepristone." *Prostate* 26(4): 194-204.

Llaguno-Munive, M., L. A. Medina, R. Jurado, M. Romero-Pina and P. Garcia-Lopez (2013). "Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts." *Cancer Cell Int* 13(1): 29.

Lopez-Gonzalez, M. A. and J. Sotelo (2000). "Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma." *Surg Neurol* 53(2): 157-162.

Louis, D. N. (2006). "Molecular pathology of malignant gliomas." *Annu Rev Pathol* 1: 97-117.

Louis, D. N., A. Perry, P. Burger, D. W. Ellison, G. Reifenberger, A. von Deimling, K. Aldape, D. Brat, V. P. Collins, C. Eberhart, D. Figarella-Branger, G. N. Fuller, F. Giangaspero, C. Giannini, C. Hawkins, P. Kleihues, A. Korshunov, J. M. Kros, M. Beatriz Lopes, H. K. Ng, H. Ohgaki, W. Paulus, T. Pietsch, M. Rosenblum, E. Rushing, F. Soylemezoglu, O. Wiestler, P. Wesseling and N.-H. International Society Of (2014). "International Society Of Neuropathology-Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading." *Brain Pathol* 24(5): 429-435.

Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K.

Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues and D. W. Ellison (2016). "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." *Acta Neuropathol* 131(6): 803-820.

Machein, M. R. and K. H. Plate (2000). "VEGF in brain tumors." *J Neurooncol* 50(1-2): 109-120.

Maher, E. A., F. B. Furnari, R. M. Bachoo, D. H. Rowitch, D. N. Louis, W. K. Cavenee and R. A. DePinho (2001). "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter." *Genes Dev* 15(11): 1311-1333.

Mariana, S. (2009). "Gliomas de alto grado en adultos." *Rev. Hosp. Clin. Univ.* 20: 215-220

Metellus, P., B. Coulibaly, I. Nanni, F. Fina, N. Eudes, R. Giorgi, M. Barrie, O. Chinot, S. Fuentes, H. Dufour, L. Ouafik and D. Figarella-Branger (2009). "Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort." *Cancer* 115(20): 4783-4794.

Mischel, P. S. and T. F. Cloughesy (2003). "Targeted molecular therapy of GBM." *Brain Pathol* 13(1): 52-61.

Mitre-Aguilar, I. B., T. Barrios-Garcia, V. M. Ruiz-Lopez, A. J. Cabrera-Quintero, N. R. Mejia-Dominguez, J. L. Ventura-Gallegos, D. Moreno-Mitre, A. Aranda-Gutierrez, J. Mejia-Rangel, A. R. Escalona-Guzman, Y. Chavarri-Guerra, A. Leon-Del-Rio and A. Zentella-Dehesa (2019). "Glucocorticoid-dependent expression of IAP participates in the protection against TNF-mediated cytotoxicity in MCF7 cells." *BMC Cancer* 19(1): 356.

Moe, B. T., A. B. Vereide, A. Orbo, R. Jaeger and G. Sager (2009). "Levonorgestrel, medroxyprogesterone and progesterone cause a concentration-dependent reduction in endometrial cancer (Ishikawa) cell density, and high concentrations of progesterone and mifepristone act in synergy." *Anticancer Res* 29(4): 1047-1052.

Munoz, J. L., V. Rodriguez-Cruz, S. J. Greco, V. Nagula, K. W. Scotto and P.

Rameshwar (2014). "Temozolomide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells." *Mol Cancer Ther* 13(10): 2399-2411.

Munoz, J. L., N. D. Walker, K. W. Scotto and P. Rameshwar (2015). "Temozolomide competes for P-glycoprotein and contributes to chemoresistance in glioblastoma cells." *Cancer Lett* 367(1): 69-75.

Ohgaki, H. and P. Kleihues (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." *Clin Cancer Res* 19(4): 764-772.

Ostrom, Q. T., J. B. Rubin, J. D. Lathia, M. E. Berens and J. S. Barnholtz-Sloan (2018). "Females have the survival advantage in glioblastoma." *Neuro Oncol* 20(4): 576-577.

Ouyang, L., Z. Shi, S. Zhao, F. T. Wang, T. T. Zhou, B. Liu and J. K. Bao (2012). "Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis." *Cell Prolif* 45(6): 487-498.

Ozdemir-Kaynak, E., A. A. Qutub and O. Yesil-Celiktas (2018). "Advances in Glioblastoma Multiforme Treatment: New Models for Nanoparticle Therapy." *Front Physiol* 9: 170.

Pina-Medina, A. G., V. Hansberg-Pastor, A. Gonzalez-Arenas, M. Cerbon and I. Camacho-Arroyo (2016). "Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells." *Steroids* 105: 19-25.

Pinski, J., G. Halmos, Y. Shirahige, J. L. Wittliff and A. V. Schally (1993). "Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486." *J Clin Endocrinol Metab* 77(5): 1388-1392.

Pistollato, F., S. Abbadi, E. Rampazzo, L. Persano, A. Della Puppa, C. Frasson, E. Sarto, R. Scienza, D. D'Avella and G. Basso (2010). "Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma." *Stem Cells* 28(5): 851-862.

Posti, J. P., M. Bori, T. Kauko, M. Sankinen, J. Nordberg, M. Rahi, J. Frantzen, V. Vuorinen and J. O. Sipila (2015). "Presenting symptoms of glioma in adults." *Acta Neurol*



Scand 131(2): 88-93.

Pyko, I. V., M. Nakada, H. Sabit, L. Teng, N. Furuyama, Y. Hayashi, K. Kawakami, T. Minamoto, A. S. Fedulau and J. Hamada (2013). "Glycogen synthase kinase 3beta inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling." *Carcinogenesis* 34(10): 2206-2217.

Ranjit, M., K. Motomura, F. Ohka, T. Wakabayashi and A. Natsume (2015). "Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma." *Brain Tumor Pathol* 32(3): 153-162.

Riganti, C., I. C. Salaroglio, M. L. Pinzon-Daza, V. Caldera, I. Campia, J. Kopecka, M. Mellai, L. Annovazzi, P. O. Couraud, A. Bosia, D. Ghigo and D. Schiffer (2014). "Temozolomide down-regulates P-glycoprotein in human blood-brain barrier cells by disrupting Wnt3 signaling." *Cell Mol Life Sci* 71(3): 499-516.

Rose, F. V. and E. R. Barnea (1996). Response of human ovarian carcinoma cell lines to antiprogestin mifepristone. *Oncogene* 12(5): 999-1003.

Roix, J. J., S. D. Harrison, E. A. Rainbolt, K. R. Meshaw, A. S. McMurry, P. Cheung and S. Saha (2014). "Systematic repurposing screening in xenograft models identifies approved drugs with novel anti-cancer activity." *PLoS One* 9(8): e101708.

Sanai, N. and M. S. Berger (2009). "Operative techniques for gliomas and the value of extent of resection." *Neurotherapeutics* 6(3): 478-486.

Schaich, M., L. Kestel, M. Pfirrmann, K. Robel, T. Illmer, M. Kramer, C. Dill, G. Ehninger, G. Schackert and D. Krex (2009). "MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients." *Ann Oncol* 20(1): 175-181.

Schwartzbaum, J. A., J. L. Fisher, K. D. Aldape and M. Wrensch (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma." *Nat Clin Pract Neurol* 2(9): 494-503; quiz 491 p following 516.

Segovia-Mendoza, M., R. Jurado, R. Mir, L. A. Medina, H. Prado-Garcia and P. Garcia-Lopez (2015). "Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study." *BMC Cancer* 15: 21.

Spitz, I. M. and C. W. Bardin (1993). "Mifepristone (RU 486)—a modulator of progestin and glucocorticoid action." *N Engl J Med* 329(6): 404-412.

Stegh, A. H., H. Kim, R. M. Bachoo, K. L. Forloney, J. Zhang, H. Schulze, K. Park, G. J. Hannon, J. Yuan, D. N. Louis, R. A. DePinho and L. Chin (2007). "Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma." *Genes Dev* 21(1): 98-111.

Steinbach, J. P. and M. Weller (2004). "Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications." *J Neurooncol* 70(2): 247-256.

Strik, H., M. Deininger, J. Streffer, E. Grote, J. Wickboldt, J. Dichgans, M. Weller and R. Meyermann (1999). "BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67(6): 763-768.

Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiotherapy and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 987-996.

Su, C., R. L. Cunningham, N. Rybalchenko and M. Singh (2012). "Progesterone increases the release of brain-derived neurotrophic factor from glia via progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1)-dependent ERK5 signaling." *Endocrinology* 153(9): 4389-4400.

Tan, S. K., A. Jermakowicz, A. K. Mookhtiar, C. B. Nemeroff, S. C. Schurer and N. G. Ayad (2018). "Drug Repositioning in Glioblastoma: A Pathway Perspective." *Front Pharmacol* 9: 218.

Tanaka, M., Y. Ino, K. Nakagawa, M. Tago and T. Todo (2005). "High-dose conformal radiotherapy for supratentorial malignant glioma: a historical comparison." *Lancet Oncol* 6(12): 953-960.

Tate, M. C. and M. K. Aghi (2009). "Biology of angiogenesis and invasion in glioma." *Neurotherapeutics* 6(3): 447-457.

Thakkar, J. P., T. A. Dolecek, C. Horbinski, Q. T. Ostrom, D. D. Lightner, J. S. Barnholtz-Sloan and J. L. Villano (2014). "Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23(10): 1985-1996.

Tieszen, C. R., A. A. Goyeneche, B. N. Brandhagen, C. T. Ortbahn and C. M. Telleria (2011). "Antiprogesterin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression." *BMC Cancer* 11: 207.

Toth, K., M. M. Vaughan, N. S. Peress, H. K. Slocum and Y. M. Rustum (1996). "MDR1 P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors." *Am J Pathol* 149(3): 853-858.

Urbanska, K., J. Sokolowska, M. Szmidt and P. Sysa (2014). "Glioblastoma multiforme - an overview." *Contemp Oncol (Pozn)* 18(5): 307-312.

Valadez-Cosmes, P., L. German-Castelan, A. Gonzalez-Arenas, M. A. Velasco-Velazquez, V. Hansberg-Pastor and I. Camacho-Arroyo (2015). "Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* 154: 176-185.

Verbeek, B., T. D. Southgate, D. E. Gilham and G. P. Margison (2008). "6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy." *Br Med Bull* 85: 17-33.

Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson,

C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes and N. Cancer Genome Atlas Research (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17(1): 98-110.

Wang, H., T. Xu, Y. Jiang, H. Xu, Y. Yan, D. Fu and J. Chen (2015). "The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas." *Neoplasia* 17(3): 239-255.

Weller, M., R. Stupp, G. Reifenberger, A. A. Brandes, M. J. van den Bent, W. Wick and M. E. Hegi (2010). "MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?" *Nat Rev Neurol* 6(1): 39-51.

Wick, W., O. L. Chinot, M. Bendszus, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, C. Revil, Y. Kerloeguen and T. Cloughesy (2016). "Evaluation of pseudoprogression rates and tumor progression patterns in a phase III trial of bevacizumab plus radiotherapy/temozolomide for newly diagnosed glioblastoma." *Neuro Oncol* 18(10): 1434-1441.

Wick, W., S. Wagner, S. Kerkau, J. Dichgans, J. C. Tonn and M. Weller (1998). "BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells." *FEBS Lett* 440(3): 419-424.

Wick, W., M. Weller, M. van den Bent, M. Sanson, M. Weiler, A. von Deimling, C. Plass, M. Hegi, M. Platten and G. Reifenberger (2014). "MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment." *Nat Rev Neurol* 10(7): 372-385.

Yang, W., N. M. Warrington, S. J. Taylor, P. Whitmire, E. Carrasco, K. W. Singleton, N. Wu, J. D. Lathia, M. E. Berens, A. H. Kim, J. S. Barnholtz-Sloan, K. R. Swanson, J. Luo and J. B. Rubin (2019). "Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data." *Sci Transl Med* 11(473).

Yu, X., Y. Jiang, W. Wei, P. Cong, Y. Ding, L. Xiang and K. Wu (2015). "Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men." *Tumour Biol* 36(2): 967-972.

Yu, Z., G. Zhao, G. Xie, L. Zhao, Y. Chen, H. Yu, Z. Zhang, C. Li and Y. Li (2015). "Metformin and temozolomide act synergistically to inhibit growth of glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo." *ncotarget* 6(32): 32930-32943.


Zhang, R., R. Saito, I. Shibahara, S. Sugiyama, M. Kanamori, Y. Sonoda and T. Tominaga (2016). "Temozolomide reverses doxorubicin resistance by inhibiting P-glycoprotein in malignant glioma cells." *J Neurooncol* 126(2): 235-242.

# Capítulo 10

## Apéndice

Article

# Mifepristone Overcomes Tumor Resistance to Temozolomide Associated with DNA Damage Repair and Apoptosis in an Orthotopic Model of Glioblastoma

Monserrat Llaguno-Munive <sup>1,2</sup>, Mario Romero-Piña <sup>1</sup>, Janeth Serrano-Bello <sup>3</sup>, Luis A. Medina <sup>4</sup> , Norma Uribe-Urbe <sup>5</sup>, Ana Maria Salazar <sup>6</sup>, Mauricio Rodríguez-Dorantes <sup>7</sup> and Patricia Garcia-Lopez <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Farmacología, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México 14080, Mexico; muniv1250@hotmail.com (M.L.-M.); esau1708@gmail.com (M.R.-P.)

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 04510, Mexico

<sup>3</sup> Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 04510, Mexico; janserbe@hotmail.com

<sup>4</sup> Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM, Ciudad de México, 14080, Mexico; medina@fisica.unam.mx

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, Mexico; nofelauribe@yahoo.com.mx

<sup>6</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 04510, Mexico; anamsm@biomedicas.unam.mx

<sup>7</sup> Instituto de Medicina Genómica, Ciudad de México 14080, Mexico; mrodriguez@inmegen.gob.mx

\* Correspondence: pgarcia\_lopez@yahoo.com.mx; Tel.: +52-55-56280400 (ext. 32085)

Received: 10 November 2018; Accepted: 20 December 2018; Published: 22 December 2018



**Abstract:** The standard treatment for glioblastoma multiforme (GBM) is surgery followed by chemo/radiotherapy. A major limitation on patient improvement is the high resistance of tumors to drug treatment, likely responsible for their subsequent recurrence and rapid progression. Therefore, alternatives to the standard therapy are necessary. The aim of the present study was to evaluate whether mifepristone, an antihormonal agent, has a synergistic effect with temozolomide (used in standard therapy for gliomas). Whereas the mechanism of temozolomide involves damage to tumor DNA leading to apoptosis, tumor resistance is associated with DNA damage repair through the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) enzyme. Temozolomide/mifepristone treatment, herein examined in Wistar rats after orthotopically implanting C6 glioma cells, markedly reduced proliferation. This was evidenced by a decreased level of the following parameters: a proliferation marker (Ki-67), a tumor growth marker (<sup>18</sup>F-fluorothymidine uptake, determined by PET/CT images), and the MGMT enzyme. Increased apoptosis was detected by the relative expression of related proteins, (e.g. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bax (bcl-2-like protein 4) and caspase-3). Thus, greater apoptosis of tumor cells caused by their diminished capacity to repair DNA probably contributed significantly to the enhanced activity of temozolomide. The results suggest that mifepristone could possibly act as a chemo-sensitizing agent for temozolomide during chemotherapy for GBM.

**Keywords:** glioblastoma; temozolomide; mifepristone; MGMT; drug resistance; apoptosis

## 1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM), the most common tumor of the central nervous system, is a highly aggressive cancer with a prognosis of 14.6 months median survival upon diagnosis [1]. Agents for GBM therapy encounter obstacles nonexistent in the treatment of non-neurological cancers. For instance, the blood-brain barrier restricts the passage of many chemotherapeutic agents due to certain well-known characteristics, such as the presence of tight junctions between cells and the lack of fenestrae [2,3].

The current treatment for GBM consists of surgery followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide. Unfortunately, the great tumor resistance to this drug limits its effectiveness and often leads to recurrence and rapid tumor progression [4]. Subsequent to the oral administration of temozolomide, its spontaneous breakdown at physiological pH produces monomethyltriazene 5-(3-methyltriazene-1-yl)-imidazole-4-carboxamide (MTIC), which in turn reacts with water to liberate 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) and the highly reactive methyl diazonium cation. The latter methylates DNA purine residues, preferentially O-6 guanine (O<sup>6</sup>-MeG, 6%) in guanine-rich regions [5], but also N-7 guanine (N<sup>7</sup>-MeG, 70%) and N-3 adenine (N<sup>3</sup>-MeA, 9%). Alkylation of the O<sup>6</sup> site on guanine promotes the insertion of a thymine instead of a cytosine during DNA replication, which can result in cell death [5].

Tumor cells often show chemoresistance to temozolomide, continuing to proliferate after treatment. Drug resistance is due in part to the overexpression of MGMT (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase), an enzyme involved in the repair of temozolomide-induced DNA damage. There is an inverse relationship between the levels of MGMT expression and the cellular response to temozolomide [6]. Hence, MGMT expression is a relevant prognostic factor for the response to temozolomide therapy, with an elevated expression linked to drug resistance [7].

Clinical and experimental data have established the resistance of GBM to apoptosis. Defects in apoptotic mechanisms foster tumorigenesis and contribute to the resistance to temozolomide, since its cytotoxic activity is exerted in part through the triggering of apoptosis [8]. In recent years, new molecules have been developed to attempt to overcome the problem of tumor resistance to temozolomide, but with little impact on the prognosis and survival of GBM patients [9–11]. One strategy for improving GBM treatment is to seek new chemo-sensitizing agents that enhance the effectiveness of temozolomide by increasing the apoptosis of tumor cells through a decrease in the activity of the DNA repair enzyme.

One possibility is mifepristone, which blocks the capacity of progesterone to stimulate the growth, migration and invasion of human astrocytoma cells lines (such as U373, U87 and D54) [12,13]. This synthetic steroid is used as an abortifacient drug because of its anti-progestational and anti-glucocorticoid action. Our group previously demonstrated an important role of mifepristone in chemo-radio-sensitization, describing its synergistic effect with cisplatin and radiotherapy to act against proliferation of cervical cancer cell lines and cervix xenografts [14]. We also studied the addition of mifepristone to temozolomide-based chemotherapy (accompanied by radiation), observing improved antiproliferative activity on a glioma xenograft in the flank of nude mice. The tumor growth rate was slower than that found with radiation alone or temozolomide alone, indicating a chemo- and radio-sensitizing effect [15].

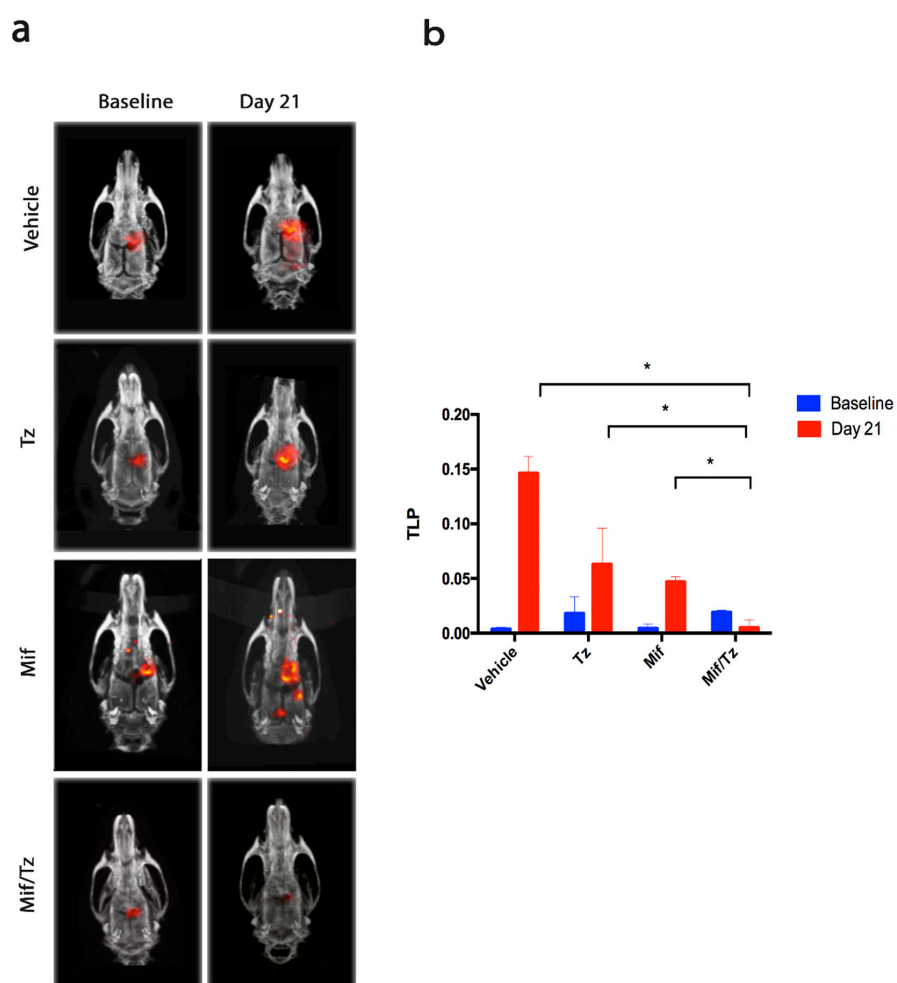
However, the flank tumor model has drawbacks, especially the absence of the environment provided by the normal brain parenchyma and blood brain barrier. Since these factors are known to influence drug delivery to the tumor [16], orthotopic models are preferred. The aim of the present study was to evaluate, with an immunocompetent orthotopic model based on the intracranial implantation of a glioma cell line in rats, whether mifepristone is able to modulate the growth of temozolomide-treated tumors. The possible mechanism of action of mifepristone as a chemo-sensitizing agent was explored by determining the levels of MGMT (a DNA repair enzyme) as well as the expression of proteins as Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bax (bcl-2-like protein 4) and caspase that participate in the apoptotic pathway.



## 2. Results

### 2.1. Tumor Growth Assessed by Molecular Imaging

Rats were subjected to four treatments: the vehicle only, temozolomide only, mifepristone only, and mifepristone/temozolomide. PET/CT scans were performed at baseline (day 0 of drug treatment, 2 weeks post-implantation) and at the end of the experiment (day 21). In the resulting images (Figure 1a), the presence of red reflects the uptake of  $^{18}\text{F}$ -fluorothymidine ( $^{18}\text{F}$ -FLT), a tumor cell growth marker. It is measured as total lesion proliferation (TLP).

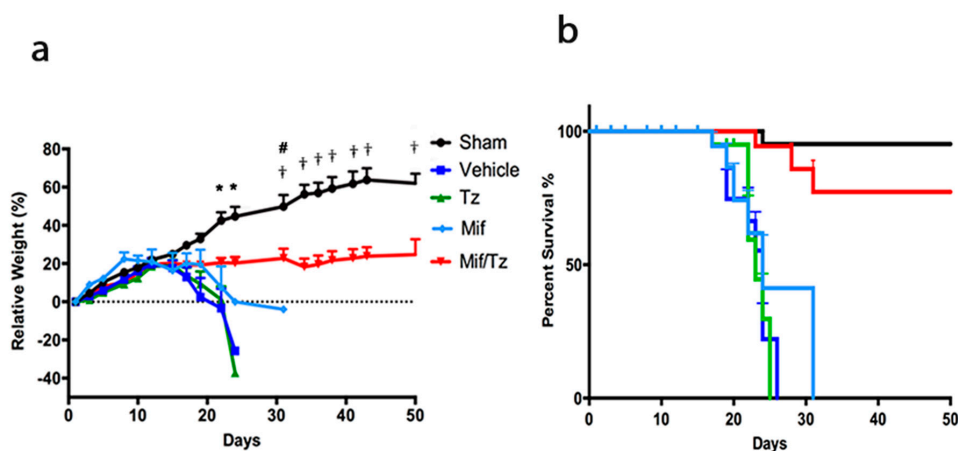


**Figure 1.** Antitumor activity in the orthotopic rat model of a glioma. (a) PET/CT images showing  $^{18}\text{F}$ -FLT ( $^{18}\text{F}$ -fluorothymidine) tumor uptake for the distinct groups. The images on the left represent the beginning of drug treatment (baseline, two weeks after tumor cell implantation, considered as day 0) and those on the right depict the end of the third week of treatment (day 21). Red reflects the uptake of ( $^{18}\text{F}$ -FLT). (b) The proliferative activity of tumors, measured as total lesion proliferation (TLP). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three animals. \* A significant difference ( $p < 0.05$ ) between the Mifepristone/Temozolomide (Mif/Tz) group and the other groups with implantation of glioma cells (the vehicle only, Tz only and Mif only).

After 21 days of treatment, there was an increase in TLP and consequently in the tumor size for the control, temozolomide and mifepristone groups, and a decrease in this parameter for the mifepristone/temozolomide group (Figure 1b). At day 21, both the increase for the vehicle only (control) animals and the decrease for the mifepristone/temozolomide group were significant compared to baseline. Moreover, a significantly lower rate of proliferation was found for the combination treatment than for each of the other three groups (the control, temozolomide only and mifepristone only).

### 2.2. Determination of Body Weight and Overall Survival

Tumor growth was also assessed by means of weight loss (Figure 2a). All animals continued to gain weight during the first two weeks post-implantation of tumor cells. Subsequently, the rats treated with the vehicle or temozolomide only rapidly lost weight, evidencing accelerated tumor proliferation.



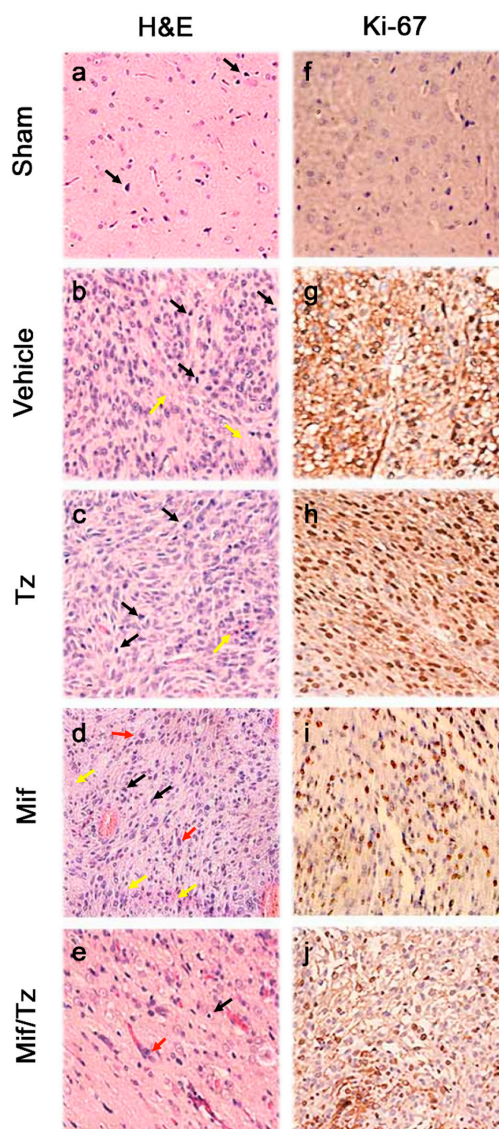
**Figure 2.** The effect of tumor growth in the orthotopic rat model of a glioma, evaluated by weight loss and overall survival. (a) Relative weight of rats in the five groups: sham surgery (without implanting glioma cells) (●), and the implantation of glioma cells followed by each of the treatments: vehicle only (●), temozolomide only (●), mifepristone only (●), and the mifepristone/temozolomide combination (●). Each point represents the mean  $\pm$  SEM of six animals. \* A significant difference ( $p < 0.05$ ) between Mif/Tz and the other groups (Sham, Control, Tz only and Mif only) on day 24. # A significant difference ( $p < 0.05$ ) between Mif/Tz and Mif only on day 31. † A significant difference ( $p < 0.05$ ) between the Mif/Tz and the Sham group on day 31. (b) Survival analysis of the same groups for up to 50 days after implantation (day 0 = day of surgery).

The rats in the group given mifepristone only displayed a less drastic weight loss. All animals in these three groups survived between 17 and 32 days (Figure 2b). In contrast, the rats receiving mifepristone/temozolomide maintained their weight throughout the study (Figure 2a), and those having no tumor cell implantation (sham operation) gained weight. The latter two groups were still alive when all the rats of the other three groups had died, and most survived to the end of the study (50 days post-implantation) (Figure 2b).

### 2.3. Histological and Immunohistochemical Analysis

At the end of the treatments, the brain tissue was processed for histological examination, applying hematoxylin and eosin (H&E) stain to the tissue sections (Figure 3a–e). The tissue of the animals treated with the vehicle only, temozolomide only or mifepristone only showed hypercellularity, mitosis, pleomorphism and necrosis (Figure 3b–d). These characteristics were exhibited to a lesser

extent in the rats administered mifepristone/temozolomide (Figure 3e), but with a hypo- versus hypercellular lesion.



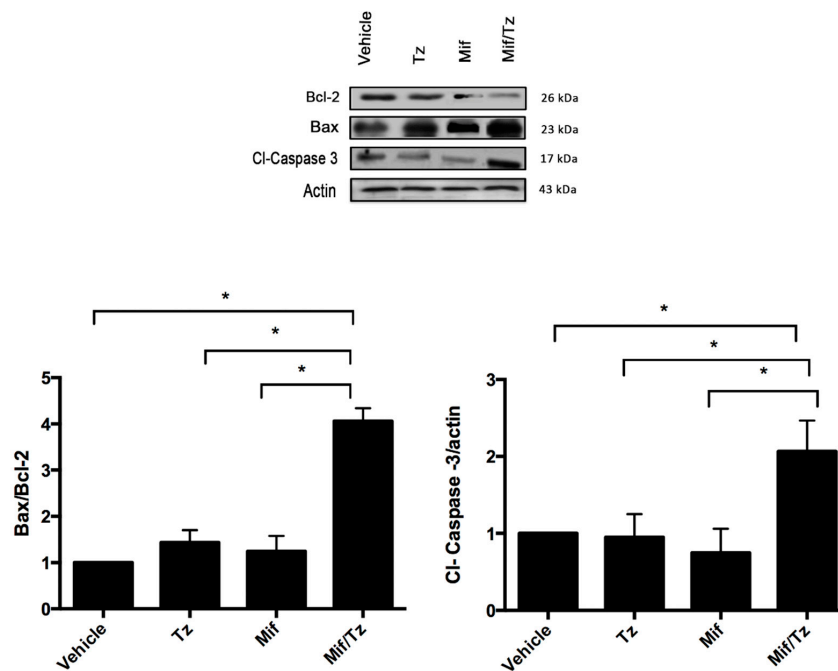
**Figure 3.** Haematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemical analysis of glioma tissue. Sections of tumor tissue were stained with haematoxylin and eosin (a–e): Mitosis (black arrows), nuclear pleomorphism (red arrows) and necrosis (yellow arrows). Immunostaining of Ki-67 (f–j), showing few cell nuclei positive to this protein in the tumors of the Mif/Tz group compared to those of the individual treatments (Tz or Mif). The images are representative of three animals per treatment. Magnification 40 $\times$ .

Immunohistochemical staining of brain tumor tissue was employed to detect the presence of Ki-67 (Figure 3f–j), a protein expressed by proliferating cells. Compared to the groups receiving the vehicle only, temozolomide alone or mifepristone alone, rats given mifepristone/temozolomide

displayed a lower proportion of Ki-67 positive cells in tumors. Indeed, the stained sections from the latter group were similar to those from the sham animals, indicating few cells undergoing proliferation. For animals administered mifepristone only, there was slightly diminished proliferation compared to those in the control and temozolomide only groups. In the mifepristone/temozolomide group, a close correlation can be observed between a lower level of Ki-67 and the significant reduction in tumor growth illustrated in the PET/CT images.

#### 2.4. Expression of Apoptotic Proteins

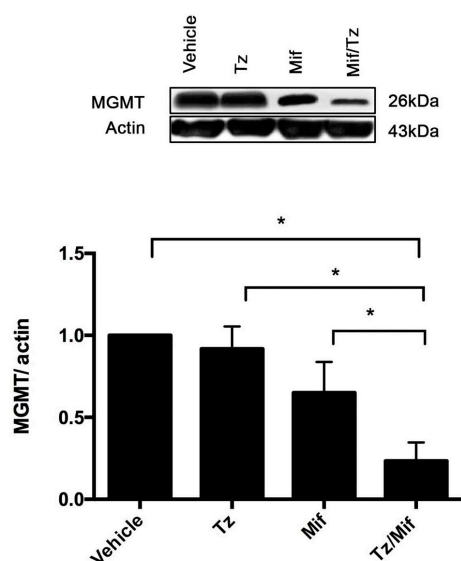
The combination treatment also affected the expression of apoptotic proteins in tumor cells (Figure 4). Compared to the control group, animals with temozolomide only or mifepristone only displayed a slight increase in the Bax/Bcl-2 ratio, but no change in the expression of cleaved caspase 3. In animals given mifepristone/temozolomide, contrarily, a significant increase was found in the Bax/Bcl-2 ratio and the expression of cleaved caspase 3, revealing a synergy between these two drugs.



**Figure 4.** Expression of apoptotic proteins. Representative western blot results and densitometric analysis of Bcl-2, Bax and Cl-Caspase 3. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* Indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) between Mif/Tz and the other groups with tumor cell implantation (given Tz, Mif or the vehicle).

#### 2.5. Expression of MGMT

MGMT, an enzyme involved in DNA repair, plays a significant role in the resistance of glioma tumors to temozolomide. Western blot data and band intensity showed the protein expression of MGMT to be strikingly downregulated in the mifepristone/temozolomide group and slightly decreased in the mifepristone only group compared to the animals administered temozolomide only (Figure 5).



**Figure 5.** Expression of MGMT (O6-methylguanine-DNA-methyltransferase). Representative western blot results and densitometric analysis of the MGMT protein. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* A significant difference ( $p < 0.05$ ) between Mif/Tz and the other groups with tumor cell implantation (given Tz, Mif or the vehicle).

### 3. Discussion

One of the major problems in the treatment of GBM is the drug resistance of tumors and the repopulation carried out by cells that escape chemotherapy. The standard treatment for this disease, consisting of surgery followed by radiation therapy plus chemotherapy with temozolomide, yields a median survival of only 1–2 years. Therefore, it is essential to find new strategies for treating GBM in order to lengthen patient survival and avoid recurrence.

The current study evaluated whether the combination of mifepristone and temozolomide could give a better outcome than temozolomide only applied to glioma tumors in rats. Mifepristone is known to act as an antagonist of progestins, glucocorticoids and androgens by blocking progesterone receptor (PR), glucocorticoid receptor (GR) and androgen receptor (AR), respectively [17,18]. However, the role of this antihormonal agent as a chemo-sensitizer in GBM has scarcely been explored. Although we previously suggested the potential of mifepristone as a chemo-radio-sensitizer for the standard treatment of a glioma tumor based on a subcutaneous xenograft model of GBM [15], the present intracerebral model more closely resembles the native niche of such a tumor in the central nervous system.

A significant difference in tumor growth was observed between the animals administered mifepristone/temozolomide and those given the vehicle only, temozolomide only or mifepristone only. Compared to the latter three groups, the animals submitted to the combination treatment exhibited significantly reduced tumor growth and greater survival time.

The level of Ki-67 was herein scrutinized due to its expression by proliferating cells in all phases of the active cell cycle and its absence in resting cells ( $G_0$ ). Ki-67 was abundant in the tumor cells of the groups given temozolomide only, mifepristone only or the vehicle only, but was scarcely detected in tumor cells of the animals receiving mifepristone/temozolomide. Hence, the mifepristone/temozolomide combination blocked the proliferation of glioma cells.

The PET/CT scans, which measured  $^{18}\text{F}$ -FLT uptakes, were in agreement with the Ki-67 results, revealing a lack of tumor cell growth with the combined treatment.  $^{18}\text{F}$ -FLT displays minimal uptake in normal brain tissue because the expression level of thymidine kinase-1 is very limited in neurons and glia. Thus,  $^{18}\text{F}$ -FLT/PET may be advantageous for examining tumor recurrence [19,20].

Mifepristone is known to diminish the proliferation of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin [21] and to inhibit the *in vitro* growth of cancer cells derived from the nervous system, breast, prostate, and ovary. It also gives rise to G1-S blockage of the cell cycle through inhibition of cdk2 activity in human ovarian cancer cells [22].

Whereas progesterone is known to generate the proliferation of tumor cells, the progesterone/mifepristone combination has proven to block the proliferative effect. This combination also significantly decreases the tumor area compared to progesterone only administered to rats [23]. Experimental studies have indicated that progesterone is capable of stimulating the infiltration and migration of astrocytes to the rat cortex, exerting its effects through two mechanisms. The first implies an interaction with nuclear PR (nPR), while the second requires the participation of membrane receptors (mPR) [24]. PR expression exists in several types of brain tumors, including meningiomas and gliomas, and increases with histological malignancy [25]. Moreover, mPRs are expressed in GBM cell lines such as U251 and U87 [26]. Upon evaluating the expression of PRs in C6 glioma cells, Su et al. observed no expression of classical nuclear PRs but identified significant levels of mPRs [27].

Although mifepristone plus temozolomide herein diminished tumor growth, its mechanism of action as a chemo-sensitizing agent is unknown. The promotion of apoptosis by mifepristone has been documented in distinct tumor types. Li et al. demonstrated that this drug produces an antiproliferative effect on human SGC-79901 gastric adenocarcinoma cells by downregulating Bcl-XL expression and upregulating caspase 3 activity [28]. Moreover, mifepristone inhibits cell growth by arresting cell cycle progression at the S phase, triggers apoptosis by activating caspase-3, and modulates the genes involved in apoptosis (including BCL2/BAX and FAS/FASLG) in Ishikawa cells [29]. According to Gonzalez-Agüero et al., progesterone significantly increases the growth of U373 and D54 human astrocytoma cells, an outcome blocked by mifepristone in both cases. Additionally, mifepristone administered without progesterone reduced the growth of these two cell lines [12], evidencing a possible antiproliferative effect on gliomas.

Mifepristone/temozolomide treatment presently exerted a strong downregulation of the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and an upregulation of the expression of two apoptotic proteins (Bax and cl-caspase-3) (Figure 4). This suggests that mifepristone/temozolomide induces apoptosis in glioblastoma tumors *in vivo*, which could be relevant for improving the effectiveness of standard therapy for GBM.

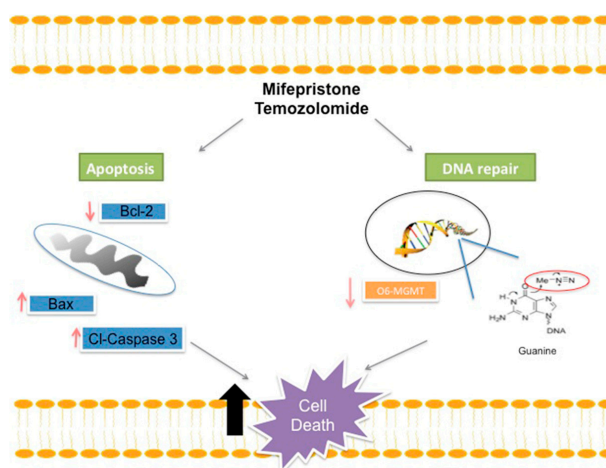
On the other hand, the epigenetic silencing of MGMT was shown to enhance the response of GBM patients to chemotherapy based on alkylating agents, leading to longer mean survival. The median survival of patients treated with temozolomide is greater when the promoter of MGMT is hypermethylated [30,31]. Whereas most patients are resistant to temozolomide, epigenetic inactivation of MGMT, occurring in approximately 40% of patients, is associated with a better response. [32]. Therefore, the depletion of MGMT is important for increasing tumor sensitivity to temozolomide.

It is still unknown whether mifepristone epigenetically inhibits MGMT. However, some previously described mechanisms could partially account for the current results. Different nuclear transcription factors, including SP1 (protein 1-binding), AP-1 (activator protein), NF- $\kappa$ B (nuclear factor for the polypeptide gene enhancer in B cells) and HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ), can also activate the transcription of the MGMT gene [33]. Some of the aforementioned transcription factors may participate in MGMT gene regulation by mifepristone. It has recently been documented that MGMT expression is associated with SP1 expression in glioma cell lines. Since knockdown of SP1 strongly reduced MGMT protein expression, SP1 is one of the main factors regulating MGMT [34]. MGMT expression also depends on p53, a transcription factor that sequesters SP1 and prevents its binding to MGMT [34]. Additionally, there is evidence of mifepristone increasing apoptosis due to p53 activation in several cancer cell lines [35,36]. Hence, the present findings could be partially explained by some of these mechanisms. Further studies are needed to clearly define the mechanisms responsible for the inhibition of MGMT by mifepristone.

Glucocorticoids are frequently used in glioblastoma therapy to address edema. According to some authors, they are involved in eliciting the expression of the MGMT gene, meaning that they could contribute to an elevated MGMT protein level. Biswas et al. and Ueda et al. detected an upregulation of MGMT in glioblastoma cell lines during glucocorticoid treatment [37,38]. Furthermore, Horiguchi et al. found that dexamethasone acts as a positive regulator of hepatic MGMT expression, an effect reversed by concomitant administration of its antagonist mifepristone [39]. The present results are the first, to our knowledge, in relation to the influence of mifepristone on MGMT expression when administered alone. The current mifepristone only treatment was able to decrease the levels of MGMT compared to the group given the vehicle only and temozolomide only. This could account for the enhancement of sensitivity of tumor cells to temozolomide, observed in the group receiving the mifepristone/temozolomide combination (Figure 5).

A correlation existed between a higher MGMT expression and greater resistance of the tumor to treatment (the latter reflected in the lower survival of the animals). Whereas the rats administered temozolomide only did not survive more than 24 days, those with the mifepristone/temozolomide combination showed a remarkable increase in mean survival. About 75% of the animals receiving the latter treatment survived to the end of the experiment (50 days).

A possible mechanism of mifepristone for improving the efficacy of temozolomide is proposed (Figure 6). Drug resistance to temozolomide is associated with DNA damage repair, which impedes apoptosis. Among the numerous mechanisms utilized by glioma cells to resist temozolomide-induced DNA damage, the avoidance of apoptosis is probably one of the most frequently studied. It has been reported that glioma tumors have elevated levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and reduced levels of the apoptotic protein Bax, giving rise to a predisposed anti-apoptotic state correlated with resistance to chemotherapy.



**Figure 6.** Schematic portrayal of the possible mechanisms of treatment with mifepristone/temozolomide. This combination decreased the level of anti-apoptotic protein Bcl-2 and increased the levels of pro-apoptotic proteins Bax and cl-caspase-3, leading to greater cellular apoptosis. As described elsewhere, temozolomide releases a compound, O<sup>6</sup>-guanine, that causes DNA damage and cell death. However, there are different mechanisms of repair or avoidance employed by tumor cells. For example, resistance to temozolomide treatment is reportedly related to the presence of the MGMT enzyme, which removes the methyl group from O<sup>6</sup>-guanine and thus restores the cellular replication of tumor cells. A lower expression of MGMT was herein detected when administering mifepristone/temozolomide versus temozolomide alone. The combination treatment perhaps allows methylation to occur in the purine bases of DNA at the O<sup>6</sup> position of guanine without removing the methyl groups, and consequently contributes to an increase in the effect of temozolomide.

Consequently, the inhibition of Bcl-2 through mifepristone treatment, fostering higher levels of Bax and Cl-Caspase, may be an effective strategy for overcoming the resistance of tumors to apoptosis when administering temozolomide. Although new small molecules have been investigated for the inhibition of the Bcl-2 family of proteins in numerous cancer types, their application to GBM has been scarcely explored.

Temozolomide generates numerous DNA adducts (e.g., O<sup>6</sup>-methylguanine) that are regarded as very cytotoxic. Contrarily, MGMT removes alkylating adducts from the O<sup>6</sup> position of guanine and thus protects glioma cells from this cytotoxicity. A decrease in the levels of MGMT by mifepristone would impede the repair of temozolomide-induced damage, leading to an eventual accumulation of adducts, a reduction of replication and the triggering of cell death.

Mifepristone has been widely studied as an abortifacient and contraceptive drug. According to recent evidence and the current findings, this drug seems to have great potential for cancer treatment. It offers palliative benefits for a wide variety of human cancer types, including patients with glioblastoma (demonstrating that it successfully crosses the blood-brain barrier) [40,41]. Mifepristone has only a mild adverse effect, even when taken daily for up to 13 years [42]. Therefore, long-term administration of mifepristone may be feasible and clinically well-tolerated in combination with temozolomide to treat patients suffering from a glioma. We propose a Phase I clinical trial to test this combination in the near future.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Drugs and Reagents

Mifepristone and temozolomide were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and SDS were purchased from Gibco, BRL (Grand Island, NY, USA). High-quality water for the solutions was processed with a Milli-Q Reagent Water System (Continental Water Systems; El Paso, TX, USA). Temozolomide was prepared in DMSO at a final concentration of 4% and mifepristone was reconstituted in polyethylenglycol and saline solution. All standard solutions were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

##### 4.2. Animals

Male Wistar rats, (200–230 g) were supplied by the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ), Mexico City, Mexico. All procedures for the care and handling of the animals were approved by the Ethics Committee of the "Instituto Nacional de Cancerología" (INCan, Mexico City, Mexico), and were in accordance with Mexican Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico).

##### 4.3. Cell Culture

The glioma C6 cell line was acquired from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). It was routinely maintained as a monolayer in DMEM, supplemented with 5% fetal bovine serum and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at high humidity. Cells were harvested with 1mM EDTA.

##### 4.4. Tumor Cell Implantation

Posterior to anaesthetization with a combination of tiletamine hydrochloride (10 mg/kg) and acepromazine maleate (0.4 mg/kg) administered s.c., each animal was placed in a stereotactic device for surgery. After fastening the head in the frame, a midline incision was made and bregma was identified. The skull was then drilled at the coordinates of 2.0 mm right from bregma and 6 mm deep (hippocampus), in accordance with the Paxinos and Watson atlas [43].



C6 cells were harvested, washed three times and diluted in DMEM to a concentration of  $7.5 \times 10^5$  in a volume of 3  $\mu$ L. Employing an infusion pump and a 27-gauge needle, these cells were slowly implanted at a depth of 6 mm from the dura mater. The injection was made over a 6-min period. Upon closing the scalp, the rat was returned to the animal facility. The rats of the sham group were submitted only to the surgical procedure, without the implantation of tumor cells. Animals were subsequently weighed 3 times/week during the study.

#### 4.5. Treatments

At two weeks post-implantation of tumor cells, the animals were divided into four groups ( $n = 6-8$ ): (A) temozolomide only (5 mg/kg/day i.p), (B) mifepristone only (10 mg/kg/day s.c.), (C) mifepristone plus temozolomide (the same doses), and (D) control animals (vehicle only). A fifth group consisted of sham animals (inoculated only with DMEM, in the absence of glioma cells). The drug treatments were administered in three cycles of five consecutive days over a period of three weeks. The antitumor activity of temozolomide is schedule-dependent, with multiple administrations being more effective than a single treatment. In clinical practice, the recommended dose of temozolomide is 75–200 mg/m<sup>2</sup> given orally for 5 consecutive days every 28-day cycle (5/28 d) [44,45].

#### 4.6. Tumor Growth Assessed by Molecular Imaging

Brain tumor growth was measured with a microPET/CT scanner (Albira ARS, Oncovision Valencia, Spain). PET/CT images were acquired at 2 weeks post-implantation (day 0 of drug treatment) and subsequently on a weekly basis up to the time of euthanization. 300  $\mu$ Ci of <sup>18</sup>F-FLT was injected into the caudal vein of rats under O<sub>2</sub>/isoflurane anesthesia (1–3% isoflurane in 100% oxygen). The images were acquired at 40–60 min post-injection.

#### 4.7. Determination of Body Weight and Overall Survival

Tumor growth was also evaluated by monitoring weight loss during treatments and recording the global survival of animals throughout the study, which lasted 50 days.

#### 4.8. Histology and Immunohistochemistry

At the end of the experiment, all rats were euthanized and perfused with saline solution followed by 4% paraformaldehyde. Brains were removed and immersed in 4% paraformaldehyde for 2 weeks. The brain tissue was embedded in paraffin and sliced into sections (2 mm thick) on the coronal plane. The tissue slices were stained using the H&E method, and cell proliferation examined according to the level of the Ki-67 protein. A section of rat spleen was employed as a positive control.

#### 4.9. Western Blot Analysis

Tissue samples were homogenized with a lysis buffer containing protease inhibitors. Proteins were obtained by centrifugation at 10,000 g and 4 °C, separated on 10% polyacrylamide gel and quantified by bicinchoninic acid assay (BCA). Colored markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were included to establish size. Proteins were then electrophoretically transferred from the gel onto PVDF membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK), which were blocked with 5% non-fat dry milk at room temperature for 2 h. Membranes were incubated overnight at 4 °C with antibodies against MGMT (sc-166528, 1:500), Bcl-2 (sc-7382, 1:1000), Bax (sc-20067, 1:1000), actin (sc-69879, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and cleaved caspase 3 (9661, 1:1000; Cell Signaling Technology, MAB230, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). After washing, the membranes were incubated with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies, IgG-HRP (1:1500 and 1:3000, respectively; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h.

Blots were developed with a chemiluminescent substrate (ECL Prime). Chemiluminescent bands were developed on Kodak autoradiography film in a darkroom and their densities were measured

on Image Studio software (version, 5.2 Li-cor, Lincoln, NE, USA). In each figure, representative blot images were selected from the same gel.

#### 4.10. Statistical Analysis

Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Statistical analysis was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) on SPSS Base 20.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were scrutinized with multiple comparisons between groups. When necessary, the comparison of means was Bonferroni adjusted. In all cases, a value of  $p < 0.05$  was considered significant.

### 5. Conclusions

The present results indicate that mifepristone was capable of enhancing the inhibitory effect of temozolomide on the proliferation of glioma tumors in an orthotopic rat model of glioblastoma. Hence, this antihormonal drug could possibly be beneficial as a sensitizer for temozolomide in standard therapy for GBM. Since standard GBM treatment is of limited effectiveness, evidenced by low patient survival, the current findings are encouraging and suggest the importance of a Phase I clinical study to further explore the combination of mifepristone and temozolomide.

**Author Contributions:** M.L.-M. participated in the experimental procedures for tumor cell implantation, in data processing and the analysis of the results. J.S.-B. took part in experimental procedures, while M.R.-P. and L.A.M. carried out the evaluation of tumor growth by molecular imaging. N.Ú.-U. contributed to histology and immunohistochemistry. A.M.S. and M.R.-D. designed the Western blot experiments. P.G.-L. planned and supervised the study, coordinated all activities, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

**Funding:** This work was partially financed by CONACYT (México) through grant CB-258823.

**Acknowledgments:** Monserrat Llaguno Munive, a doctoral student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), is grateful for having received a fellowship 330137 from CONACYT. We thank Bruce Allan Larsen for proofreading the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Johnson, D.R.; O'Neill, B.P. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J. Neurooncol.* **2012**, *107*, 359–364. [[CrossRef](#)]
2. Cardoso, F.L.; Brites, D.; Brito, M.A. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* **2010**, *64*, 328–363. [[CrossRef](#)]
3. van Tellingen, O.; Yetkin-Arik, B.; de Gooijer, M.C.; Wesseling, P.; Wurdinger, T.; de Vries, H.E. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist. Updat.* **2015**, *19*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ramirez, Y.P.; Weatherbee, J.L.; Wheelhouse, R.T.; Ross, A.H. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1475–1506. [[CrossRef](#)]
5. Denny, B.J.; Wheelhouse, R.T.; Stevens, M.F.; Tsang, L.L.; Slack, J.A. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9045–9051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kitange, G.J.; Carlson, B.L.; Mladek, A.C.; Decker, P.A.; Schroeder, M.A.; Wu, W.; Grogan, P.T.; Giannini, C.; Ballman, K.V.; Buckner, J.C.; et al. Evaluation of MGMT promoter methylation status and correlation with temozolomide response in orthotopic glioblastoma xenograft model. *J. Neurooncol.* **2009**, *92*, 23–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Weller, M.; Stupp, R.; Reifenberger, G.; Brandes, A.A.; van den Bent, M.J.; Wick, W.; Hegi, M.E. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: Ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol.* **2010**, *6*, 39–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lefranc, F.; Rynkowski, M.; DeWitte, O.; Kiss, R. Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment. *Adv. Tech. Stand Neurosurg.* **2009**, *34*, 3–35.

9. Belhadj, Z.; Zhan, C.; Ying, M.; Wei, X.; Xie, C.; Yan, Z.; Lu, W. Multifunctional targeted liposomal drug delivery for efficient glioblastoma treatment. *Oncotarget* **2017**, *8*, 66889–66900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Darmon, I.; Morisse, M.C.; Coutte, A.; Blonski, M.; Le Rhun, E.; Taillandier, L.; Roufai, D.B.; Desenclos, C.; Trudel, S.; Faivre, J.C.; et al. Temozolomide and Bevacizumab Induction before Chemoradiotherapy in Patients with Bulky Glioblastoma and/or with Severe Neurological Impairment. *J. Cancer* **2017**, *8*, 1417–1424. [[CrossRef](#)]
11. Toms, S.A.; Tapinos, N. Recent Advances in the Treatment of Gliomas—Comprehensive Brain Tumor Center. *R. I. Med. J.* **2017**, *100*, 43–46.
12. Gonzalez-Aguero, G.; Gutierrez, A.A.; Gonzalez-Espinosa, D.; Solano, J.D.; Morales, R.; Gonzalez-Arenas, A.; Cabrera-Munoz, E.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **2007**, *32*, 129–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pina-Medina, A.G.; Hansberg-Pastor, V.; Gonzalez-Arenas, A.; Cerbon, M.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids* **2016**, *105*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Segovia-Mendoza, M.; Jurado, R.; Mir, R.; Medina, L.A.; Prado-Garcia, H.; Garcia-Lopez, P. Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: In vitro and in vivo study. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Llaguno-Munive, M.; Medina, L.A.; Jurado, R.; Romero-Pina, M.; Garcia-Lopez, P. Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, e29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Khawli, L.A.; Prabhu, S. Drug delivery across the blood-brain barrier. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 1471–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Im, A.; Appleman, L.J. Mifepristone: Pharmacology and clinical impact in reproductive medicine, endocrinology and oncology. *Expert Opin. Pharmacother.* **2010**, *11*, 481–488. [[CrossRef](#)]
18. Spitz, I.M.; Bardin, C.W. Mifepristone (RU 486)—A modulator of progestin and glucocorticoid action. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 404–412.
19. Schwarzenberg, J.; Czernin, J.; Cloughesy, T.F.; Ellingson, B.M.; Pope, W.B.; Geist, C.; Dahlbom, M.; Silverman, D.H.; Satyamurthy, N.; Phelps, M.E.; et al. 3'-deoxy-3'-18F-fluorothymidine PET and MRI for early survival predictions in patients with recurrent malignant glioma treated with bevacizumab. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53*, 29–36. [[CrossRef](#)]
20. Moonshi, S.S.; Bejot, R.; Atcha, Z.; Vijayaragavan, V.; Bhakoo, K.K.; Goggi, J.L. A comparison of PET imaging agents for the assessment of therapy efficacy in a rodent model of glioma. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2013**, *3*, 397–407.
21. Tieszen, C.R.; Goyeneche, A.A.; Brandhagen, B.N.; Ortbahn, C.T.; Telleria, C.M. Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer* **2011**, *11*, e207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Goyeneche, A.A.; Caron, R.W.; Telleria, C.M. Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3370–3379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. German-Castelan, L.; Manjarrez-Marmolejo, J.; Gonzalez-Arenas, A.; Gonzalez-Moran, M.G.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, e393174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cabrera-Munoz, E.; Gonzalez-Arenas, A.; Saqui-Salces, M.; Camacho, J.; Larrea, F.; Garcia-Becerra, R.; Camacho-Arroyo, I. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *113*, 80–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tavares, C.B.; Gomes-Braga, F.d.C.S.A.; Costa-Silva, D.R.; Escórcio-Dourado, C.S.; Borges, U.S.; Conde, A.M., Jr.; Barros-Oliveira, M.d.C.; Sousa, E.B.; Barros, L.d.R.; Martins, L.M.; et al. Expression of estrogen and progesterone receptors in astrocytomas: A literature review. *Clinics* **2016**, *71*, 481–486. [[CrossRef](#)]
26. Valadez-Cosmes, P.; German-Castelan, L.; Gonzalez-Arenas, A.; Velasco-Velazquez, M.A.; Hansberg-Pastor, V.; Camacho-Arroyo, I. Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *154*, 176–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Su, C.; Cunningham, R.L.; Rybalchenko, N.; Singh, M. Progesterone increases the release of brain-derived neurotrophic factor from glia via progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1)-dependent ERK5 signaling. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4389–4400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Li, D.Q.; Wang, Z.B.; Bai, J.; Zhao, J.; Wang, Y.; Hu, K.; Du, Y.H. Effects of mifepristone on invasive and metastatic potential of human gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 in vitro and in vivo. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 1726–1729. [[CrossRef](#)]
29. Li, A.; Felix, J.C.; Mino, P.; Amezcua, C.A.; Jain, J.K. Effect of mifepristone on proliferation and apoptosis of Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil. Steril.* **2005**, *84*, 202–211. [[CrossRef](#)]
30. Hegi, M.E.; Diserens, A.C.; Gorlia, T.; Hamou, M.F.; de Tribolet, N.; Weller, M.; Kros, J.M.; Hainfellner, J.A.; Mason, W.; Mariani, L.; et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 997–1003. [[CrossRef](#)]
31. Binabaj, M.M.; Bahrami, A.; ShahidSales, S.; Joodi, M.; Joudi Mashhad, M.; Hassanian, S.M.; Anvari, K.; Avan, A. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 378–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Paz, M.F.; Yaya-Tur, R.; Rojas-Marcos, I.; Reynes, G.; Pollan, M.; Aguirre-Cruz, L.; Garcia-Lopez, J.L.; Piquer, J.; Safont, M.J.; Balana, C.; et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4933–4938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cabrini, G.; Fabbri, E.; Lo Nigro, C.; Dechecchi, M.C.; Gambari, R. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 417–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Aasland, D.; Reich, T.R.; Tomacic, M.T.; Switzeny, O.J.; Kaina, B.; Christmann, M. Repair gene O (6)-methylguanine-DNA methyltransferase is controlled by SP1 and up-regulated by glucocorticoids, but not by temozolomide and radiation. *J. Neurochem.* **2018**, *144*, 139–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Navo, M.A.; Smith, J.A.; Gaikwad, A.; Burke, T.; Brown, J.; Ramondetta, L.M. In vitro evaluation of the growth inhibition and apoptosis effect of mifepristone (RU486) in human Ishikawa and HEC1A endometrial cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2008**, *62*, 483–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Li, C.; Ye, H. Mifepristone sensitizing cisplatin for cervical adenocarcinoma HeLa cell sensitivity to chemotherapy and its mechanism. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **2013**, *34*, 142–147.
37. Biswas, T.; Ramana, C.V.; Srinivasan, G.; Boldogh, I.; Hazra, T.K.; Chen, Z.; Tano, K.; Thompson, E.B.; Mitra, S. Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene* **1999**, *18*, 525–532. [[CrossRef](#)]
38. Ueda, S.; Mineta, T.; Nakahara, Y.; Okamoto, H.; Shiraishi, T.; Tabuchi, K. Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas. *J. Neurosurg.* **2004**, *101*, 659–663. [[CrossRef](#)]
39. Horiguchi, M.; Kim, J.; Matsunaga, N.; Kaji, H.; Egawa, T.; Makino, K.; Koyanagi, S.; Ohdo, S. Glucocorticoid-dependent expression of O (6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene modulates dacarbazine-induced hepatotoxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333*, 782–787. [[CrossRef](#)]
40. Check, J.H.; Wilson, C.; Cohen, R.; Sarumi, M. Evidence that Mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 2385–2388. [[CrossRef](#)]
41. Check, J.H.; Check, D.; Cohen, R.; Sarumi, M. Mifepristone causing complete remission of rapidly advancing leukemia with measurement of progesterone-induced blocking factor. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 2413–2416. [[PubMed](#)]
42. Grunberg, S.M.; Weiss, M.H.; Russell, C.A.; Spitz, I.M.; Ahmadi, J.; Sadun, A.; Sitruk-Ware, R. Long-term administration of mifepristone (RU486): Clinical tolerance during extended treatment of meningioma. *Cancer Investig.* **2006**, *24*, 727–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1998.

*Cancers* **2019**, *11*, 16

15 of 15

44. Lee, S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 198–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Nagane, M. Dose-dense temozolomide: Is it still promising? *Neurol. Med. Chir.* **2015**, *55*, 38–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).