



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE CISPLATINO Y  
MIFEPRISTONA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR  
DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)  
EN CÁNCER CERVICAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

NATALÍ NADIA GUERRERO VARGAS

TUTOR(A)

DRA. PATRICIA GARCIA LÓPEZ





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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

**Apellido paterno:** Guerrero

**Apellido materno:** Vargas

**Nombre(s):** Natalí Nadia

**Teléfono:** 5549 04 18

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**Carrera:** Biología

**Número de cuenta:** 30203336-6

### 2. Datos del tutor

**Grado:** Dra.

**Nombre(s):** Patricia

**Apellido paterno:** García

**Apellido materno:** López

### 3. Datos del sinodal 1

**Grado:** Dr.

**Nombre(s):** Luis Alonso

**Apellido paterno:** Herrera

**Apellido materno:** Montalvo

#### **4. Datos del sinodal 2**

**Grado:** Dra.

**Nombre(s):** Marcela

**Apellido paterno:** Lizano

**Apellido materno:** Soberón

#### **5. Datos del sinodal 3**

**Grado:** Dr.

**Nombre(s):** Adolfo

**Apellido paterno:** Andrade

**Apellido materno:** Cetto

#### **6. Datos del sinodal 4**

**Grado:** Dr.

**Nombre(s):** Emilio Joaquín

**Apellido paterno:** Córdova

**Apellido materno:** Alarcón

#### **7. Datos del trabajo escrito.**

**Título:** Efecto de la combinación de cisplatino y mifepristona sobre la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en cáncer cervical

**Número de páginas:** 72 pp

**Año:** 2008

*A mis padres*

*Por su apoyo, confianza e infinito amor*

*A Bere*

*Por tener siempre una sonrisa para mí*

*A mi tutora la Dra. Paty, por su confianza e inestimable ayuda en la realización de este trabajo.*

*A Rafa por sus enseñanzas y sobre todo por su amistad.*

*A la Dra. Lily por el apoyo durante la realización de este proyecto, a mis compañeros de laboratorio: Edith, Julio, Vicky, Carlos, Deirdre, Diana y Aurora.*

*A mis amigos: Fania, Brenda, Rody, Alan y a los Capis, gracias por estar a mi lado en todo momento.*

*A Patrick por vivir conmigo este cuarto de hora en minuto y medio.*

El presente trabajo fue apoyado económicamente por el proyecto de CONACYT No. 44386.

La realización de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología en la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología

## INDICE GENERAL

**RESUMEN..... 1**

**1 INTRODUCCIÓN..... 3**

**1.1 CÁNCER CERVICO UTERINO ..... 4**

1.1.1 Virus del papiloma humano..... 4

1.1.2 Estructura del VPH..... 5

**1.2 TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER CERVICAL..... 7**

1.2.1 Cisplatino..... 8

1.2.2 Mifepristona..... 10

1.2.3 Terapia Anti-angiogénica..... 11

**1.3 ANGIOGÉNESIS..... 12**

1.3.1 Factores Pro-angiogénicos y Anti-angiogénicos..... 13

1.3.2 Angiogénesis Fisiológica..... 15

1.3.3 Angiogénesis en cáncer..... 16

1.3.4 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular VEGF..... 17

1.3.5 Reguladores de los VEGF's..... 20

1.3.6 Receptores del VEGF..... 21

1.3.7 Angiogénesis y hormonas..... 23

**2 ANTECEDENTES..... 24**

|            |   |    |
|------------|---|----|
| <b>3</b>   | <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....  | 25 |
| <b>4</b>   | <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....   | 27 |
| <b>4.1</b> | <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....   | 27 |
| <b>5</b>   | <b>MATERIAL Y METODOS</b> .....   | 28 |
| <b>5.1</b> | <b>Ensayos <i>in vitro</i></b> .....  | 28 |
| <b>5.2</b> | <b>Cuantificación del VEGF en un modelo tumoral de CaCU<br/>    Desarrollado en ratones atímicos</b> .....        | 33 |
| <b>6</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....   | 36 |
| <b>6.1</b> | <b>Evaluación de las dosis de MF y CP en células HeLa y CaSki</b> .....   | 36 |
| <b>6.2</b> | <b>Efecto de MF en combinación con CP sobre la expresión del gen VEGF</b> .....                                   | 40 |
| <b>6.3</b> | <b>Efecto de MF, CP y su combinación sobre la concentración del VEGF<br/>    <i>In-vitro</i></b> .....            | 44 |
| <b>6.4</b> | <b>Cuantificación del VEGF en un modelo experimental de CaCU<br/>    después del tratamiento de MF y CP</b> ..... | 46 |
| <b>6.5</b> | <b>Efecto de MF en combinación con CP sobre la expresión del gen E6</b> .....                                     | 47 |
| <b>7</b>   | <b>DISCUSIÓN</b> .....  | 49 |
| <b>8</b>   | <b>CONCLUSIÓN</b> .....   | 58 |
| <b>9</b>   | <b>ANEXO</b> .....  | 59 |
| <b>10</b>  | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 61 |



## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Fig.1</b> Estructura del virus del papiloma humano.....  | 5  |
| <b>Fig. 2</b> Cis-diaminocloroplatino (CDDP).....   | 8  |
| <b>Fig. 3</b> Progesterona, Mifepristona (RU486).....   | 11 |
| <b>Fig.4</b> VEGF y sus receptores.....   | 23 |
| <b>Fig. 5</b> Viabilidad de células HeLa (XTT).....   | 36 |
| <b>Fig. 6</b> Viabilidad de células HeLa (Cristal violeta).....   | 37 |
| <b>Fig. 7</b> Viabilidad de células CaSki (XTT).....  | 38 |
| <b>Fig. 8</b> Viabilidad de células CaSki (Cristal violeta).....  | 39 |
| <b>Fig. 9</b> Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre la expresión del VEGF en células HeLa.....                               | 41 |
| <b>Fig. 10</b> Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre la expresión del VEGF-A en células CaSki.....                           | 42 |
| <b>Fig. 11</b> Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre la expresión del VEGF-C en células CaSki .....                          | 43 |
| <b>Fig. 12.</b> Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre la expresión de la oncoproteína E6 en células HeLa .....               | 44 |
| <b>Fig. 13</b> Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre la expresión de la oncoproteína E6 en células CaSki.....                | 45 |
| <b>Fig. 14</b> Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre la concentración del del VEGF en células HeLa.....                      | 46 |
| <b>Fig. 15</b> Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre los niveles del VEGF en células CaSki.....                              | 47 |
| <b>Fig. 16</b> La concentración del VEGF extracelular <i>in-vivo</i> .....  | 48 |
| <b>Fig. 17</b> Posibles mecanismos de acción del cisplatino y la mifepristona sobre la expresión y concentración del VEGF en cáncer cervical..... | 57 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Fig. 18</b> Curva de estandarización para el gen VEGF-A..... | 59 |
| <b>Fig. 19</b> Curva de estandarización para el gen VEGF-C..... | 60 |

## INDICE DE TABLAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>TABLA 1. Reguladores positivos de la angiogénesis secretados por tumores.....</b> | <b>14</b> |
| <b>TABLA 2. Reguladores negativos de la angiogénesis.....</b>                        | <b>15</b> |
| <b>TABLA 3. Familia de genes del VEGF.....</b>                                       | <b>17</b> |
| <b>TABLA 4. Isoformas del VEGF.....</b>  | <b>18</b> |

*A mis padres*

*Por su apoyo, confianza e infinito amor*

*A Bere*

*Por tener siempre una sonrisa para mí*

*A mi tutora la Dra. Paty, por su confianza e inestimable ayuda en la realización de este trabajo.*

*A Rafa por sus enseñanzas y sobre todo por su amistad.*

*A la Dra. Lily por el apoyo durante la realización de este proyecto, a mis compañeros de laboratorio: Edith, Julio, Vicky, Carlos, Deirdre, Diana y Aurora.*

*A mis amigos: Fania, Brenda, Rody, Alan y a los Capis, gracias por estar a mi lado en todo momento.*

*A Patrick por vivir conmigo este cuarto de hora en minuto y medio.*

El presente trabajo fue apoyado económicamente por el proyecto de CONACYT No. 44386.

La realización de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología en la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología

## RESUMEN

El factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) juega un papel importante en el desarrollo de angiogénesis tumoral y en la progresión de distintos tipos de cánceres incluido el CaCU; por lo cual se ha utilizado una terapia dirigida contra este factor de crecimiento, quien participa en el desarrollo de la angiogénesis tumoral. Se ha reportado además que algunos esteroides como la progesterona, el acetato de medroxyprogesterona y los glucocorticoides dexametasona y cortisona tienen actividad anti-angiogénica. Los agentes anti-angiogénicos presentan ciertas ventajas sobre la quimioterapia convencional que van desde un fácil acceso a sus blancos en la vasculatura hasta la independencia de los mecanismos de resistencia de las células tumorales, ya que su blanco farmacológico son las células endoteliales. En el presente trabajo se evaluó al antiprogestágeno mifepristona en combinación con el cisplatino sobre el efecto anti-angiogénico en cáncer de cérvix.

**OBJETIVO:** Evaluar el efecto de la combinación de mifepristona y cisplatino sobre la expresión y producción del VEGF, en líneas celulares de CaCU y en un modelo experimental *in vivo*.

**MATERIAL Y METODOS:** Para los estudios *in vitro*, la citotoxicidad de mifepristona (MF) a 10  $\mu$ M, cisplatino (CP) a 7.5 y 12  $\mu$ M para HeLa y CaSki respectivamente y su combinación (MF y CP) se evaluó mediante las técnicas de XTT y cristal violeta. El efecto de dichos fármacos sobre la expresión del gen VEGF se realizó mediante ensayos de RT-PCR para los genes VEGF-A y VEGF-C, así mismo se determinaron los niveles protéicos del VEGF en células HeLa y CaSki mediante un kit inmunométrico TiterZyme® EIA (Assay Designs). En los estudios *in vivo* se utilizaron 6 ratones nu/nu hembras de 8 semanas (20-25 g) a las cuales se les inoculó  $5 \times 10^6$  células (s.c.) HeLa en el lomo, cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 10x10 mm se formaron al azar 2 grupos. El grupo 1 recibió una única dosis de cisplatino (3 mg/Kg/díaX1día) y al grupo 2 se le administró un pre-tratamiento de mifepristona (2mg/kg/díaX4 días) más cisplatino a la misma dosis. La toma de muestras se realizó utilizando una cánula de microdiálisis, la cual se implantó en el tejido tumoral utilizando una cánula guía.

**RESULTADOS:** En la línea celular HeLa, se expresa únicamente el gen VEGF-A, mientras que en CaSki se expresa tanto el gen VEGF-A como el gen VEGF-C. Cuando se aplicó un tratamiento combinado de MF y CP, la expresión del gen VEGF-A disminuyó de manera significativa con respecto a los tratamientos individuales en HeLa; contrario a lo que ocurre en células CaSki en las cuales la expresión de gen VEGF-A no se modificó con ninguno de los tratamientos; sin embargo, la expresión de gen VEGF-C con el tratamiento combinado disminuyó de manera significativa.

La combinación de tratamientos modificó la expresión del gen E6 en ambas líneas celulares estudiadas.

En la determinación del VEGF secretado en la línea celular HeLa y los ensayos *in-vivo* sometidos a los distintos tratamientos, observamos una correlación con los patrones de expresión analizados con el ensayo de RT-PCR. En el caso de CaSki, la secreción de la proteína VEGF-A disminuye de manera significativa con cada uno de los tratamientos.

Los ensayos de citotoxicidad muestran que con los tratamientos individuales de MF y CP la viabilidad celular no se modifica en ninguna de las líneas celulares estudiadas; sin embargo, su combinación disminuyó la viabilidad en un 80% en ambas líneas celulares con respecto al control.

**CONCLUSIONES:** Los genes VEGF-A y VEGF-C se expresan de manera diferente en las dos líneas celulares utilizadas, lo cual puede explicarse por la presencia de distintos tipos de VPH, (HeLa VPH-18 y CaSki VPH-16). Mifepristona presentó un efecto anti-angiogénico al ser combinada con cisplatino de manera distinta entre ambas líneas celulares. Aún faltan estudios para dilucidar el mecanismo por el cual se observa éste efecto; sin embargo, observamos que la oncoproteína E6 tiene una participación importante sobre la modulación de la expresión del VEGF en cáncer de cérvix. Las dosis de cisplatino empleadas en éste trabajo fueron lo suficientemente bajas que al ser aplicadas de manera individual no mostraron efectos sobre la citotoxicidad, sin embargo, la combinación de los tratamientos mostró un efecto citotóxico sinérgico.

Es necesario realizar más estudios que nos permitan proponer la inclusión de la Mifepristona en el esquema convencional de Cisplatino utilizado en cáncer de cérvix, como un posible tratamiento anti-angiogénico en pacientes con cáncer avanzado.

## **1 INTRODUCCIÓN**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en hombres y mujeres en el mundo. La Organización Mundial de la Salud, reporta que en el 2007 el 13% de las muertes se debieron a éste padecimiento y se pronostica un aumento en el número de muertes en los próximos años, lo cual hace que se considere un grave problema de salud y nos alienta a entender y atender lo más rápido posible la enfermedad, con el fin de disminuir su incidencia y prevalencia en la población mundial. De los más de 200 tipos de cáncer descritos por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NCI, National Cancer Institute of Health), los que contribuyen de una manera más significativa al elevado número de muertes son: el cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon, mama y cérvix.

El cáncer se puede definir como un grupo de enfermedades las cuales son generadas por alteraciones genéticas o epigenéticas que originan una serie de cambios por todo el genoma. Algunos de estos cambios alteran la regulación de genes asociados al cáncer (activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores) y confieren una ventaja selectiva a las células, lo cual les permite expandirse a los diferentes tejidos y formar tumores. Las células cancerosas pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo.

### **1.1 CANCER CERVICO UTERINO**

En México, los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en el año 2005; 63, 128 personas fallecieron por esta enfermedad, lo cual representó 12.7% del total de las defunciones registradas (INEGI).

El CaCU es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial (Parkin y Bray, 2006), en el año 2005 fue el responsable de 4, 270 decesos (OMS). La mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo en los cuales es la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina (Ferlay et al, 2004). Este tipo de cáncer lo desarrollan principalmente mujeres que se encuentran entre los 40 y 50 años de edad, aunque recientemente se ha incrementado su incidencia en mujeres jóvenes.



Diversos factores se han asociado con el desarrollo del CaCu. Entre los más importantes podemos mencionar: infección persistente con tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH's), el comportamiento sexual, inmunosupresión y la utilización de píldoras anticonceptivas entre otros (Walboomers et al, 1999; Clarke y Chetty, 2002).

Diversos estudios epidemiológicos demuestran que la infección por VPH es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical (Zur Hausen, 2000) ya que se presenta en casi todos los casos (99.8 %) (López y Lizano, 2006). La infección por VPH, es un requisito necesario aunque no suficiente para el desarrollo de esta enfermedad, lo anterior ha sido demostrado por la presencia de ADN de VPH en biopsias de tumores, la expresión de oncogenes virales, la identificación de propiedades transformantes de estas oncoproteínas, la interacción de las proteínas virales con proteínas que regulan el crecimiento en el hospedero.

#### 1.1.1 Virus del papiloma humano

Los VPH's son pequeños virus que consisten en una molécula de DNA circular de doble cadena y pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Los virus pertenecientes a esta familia infectan el epitelio escamoso de una gran variedad de animales incluyendo a los humanos y son específicos para sus hospederos. Se han identificado alrededor de 200 tipos de VPH's, de los cuales 40 infectan el tracto genital (De Villiers et al, 2004) y se transmiten por contacto sexual. Los VPH's pueden infectar a las células del epitelio basal de la piel o a la parte interna de los tejidos. Basado en lo anterior se dividen en tipos cutáneos o tipos que infectan mucosas. Los tipos cutáneos infectan la piel de las manos y pies, los tipos que infectan mucosas son específicos para la mucosas bucal, el tracto respiratorio y el epitelio anogenital (Burd, 2003).

Los tipos de VPH's que infectan el epitelio anogenital son clasificados según su grado relativo de malignidad en: bajo y alto riesgo. Los tipos de bajo riesgo incluyen a los tipos VPH-6, VPH-11, VPH-42, VPH-43 y VPH-44, entre otros. Los VPH's de bajo riesgo se asocian comúnmente con condilomas virales o cambios displásicos moderados en el epitelio cervical (NIC I, Neoplasia Intraepitelial Cervical.) y raramente progresan hacia una enfermedad invasiva. Los tipos de alto riesgo incluyen al VPH-16, VPH-18, VPH-31,

VPH-33 y VPH-45 entre otros y se asocian con displasias moderadas (NIC II) y displasias severas o carcinoma *in situ* (NIC III) (Mandic y Vuljkov, 2004). Los tipos de alto riesgo son los que se observan comúnmente en las pacientes con cáncer cérvico uterino (Kjaer et al, 2002).

### 1.1.2 Estructura del VPH

Los VPH's son virus que carecen de envoltura y están compuestos por una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros y con un diámetro de 55 nm (Figura 1). El genoma de los VPH's puede ser dividido en tres grandes porciones: una porción de alrededor de 4kb la cual corresponde a la región temprana (E) y codifica para proteínas no estructurales (E1 a E8), una región de 3 kb que corresponde a la región tardía (L) que codifica para las dos proteínas de la cápside (L1 y L2), y una región de 1 kb sin un marco de lectura abierto denominada región larga de control (LCR), esta región contiene una gran variedad de elementos regulatorios para la replicación y transcripción viral (Münger et al, 2004).

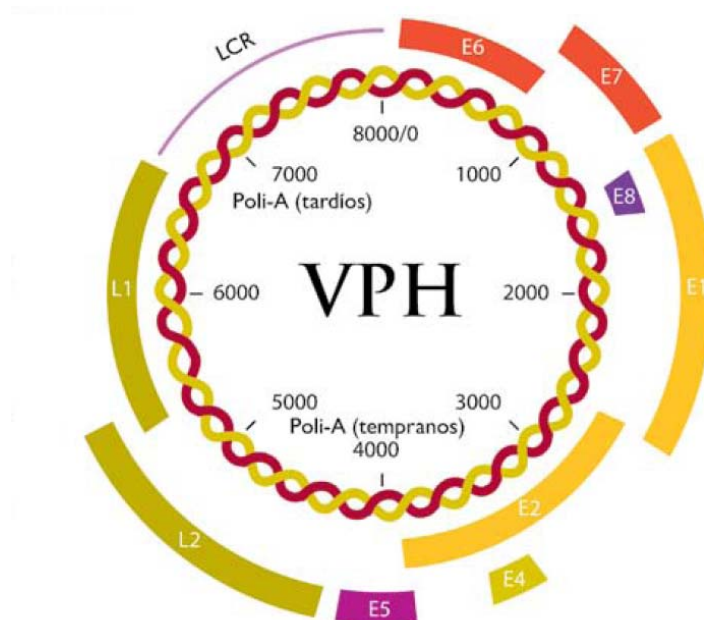


Figura 1. Estructura del virus del papiloma humano (López y Lizano, 2006).

Los tipos de VPH de alto riesgo codifican por lo menos tres proteínas que presentan propiedades transformantes y de proliferación (E5, E6 y E7) (Zur Hausen, 2000).

El ciclo de vida de los virus del papiloma humano se encuentra íntimamente ligado a la dinámica de diferenciación del epitelio infectado. La infección viral se realiza en las células del epitelio basal, las cuales constituyen la única capa en el epitelio que se encuentra en constante división. Se piensa que la infección por VPH, ocurre a través de pequeñas heridas del epitelio que exponen a las células de la capa basal a la entrada del virus (Longwort y Laimins, 2004). El receptor por medio del cual se logra la entrada del virus a las células aún se desconoce, pero se ha implicado a la integrina  $\alpha 4\beta 6$  en el proceso (Evander et al, 1997), así como al sulfato de heparina, el cual media la unión inicial de los viriones a la célula (Joyce et al 1997).

El mecanismo oncogénico de los virus del papiloma humano puede ser explicado por la regulación y funcionamiento de dos oncogenes virales: E6 y E7, los cuales muestran propiedades transformantes en líneas celulares (Harms et al, 2001). La expresión de los genes E6 y E7 es regulada por el producto protéico del gen E2. Un evento característico pero no necesario para la transformación maligna, es la integración del genoma del VPH en el genoma del hospedero, el gen E2 es mayormente el sitio de dicha integración, con lo cual se produce una ruptura de éste gen y ocasiona la no represión de los genes E6 y E7 (Choo et al, 1987).

La oncoproteína E6 se une a la proteína codificada por el gen supresor de tumores p53 e induce su degradación. Por otro lado, E7 se une al producto protéico de otro supresor de tumores, el gen retinoblastoma (pRB) (Chellapan, 1992; Scheffner, 1993), la unión de E7 a la forma fosforilada de RB inactiva funcionalmente a esta proteína. Tanto p53, como Rb son proteínas claves en la regulación del ciclo celular, su inactivación tiene como resultado la entrada de las células en la fase S del ciclo celular de manera constante.

## 1.2 TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER CERVICAL

El tipo de tratamiento para este tipo de cáncer depende de su estado de desarrollo. La displasia de alto grado o el carcinoma *in situ* pueden tratarse con biopsia mediante resección en cono (conización cervical con técnicas de resección electroquirúrgica). El estadio Ia1 (cáncer de cuello uterino microinvasor con profundidad de invasión  $\leq 3$  mm y con una amplitud de lesión  $\leq 7$  mm) sin invasión linfovascular se trata con cirugía conservadora (conización o histerectomía extrafacial). Las lesiones en estadio Ia2 (invasión  $\geq 3$  mm y con una amplitud de lesión  $\leq 7$  mm) y las Ia1 con invasión linfovascular se tratan con histerectomía radical modificada. Las lesiones en estadio Ib y IIa se tratan con histerectomía radical o radioterapia con una probabilidad equivalente de curación pero con diferente morbilidad. Las pacientes en estadio IIb a IVa se tratan con radioterapia y quimioterapia simultáneas (Harris et al, 2005).

El tratamiento para las pacientes que presentan cáncer cervical avanzado puede ser dividido en dos: dependiente e independiente de platino. De los compuestos de platino que han sido estudiados, el cisplatino se considera el más eficaz, seguido del carboplatino y del iproplatino. Desde 1981, el cisplatino se convirtió en el fármaco estándar para el tratamiento del cáncer cervical avanzado después de que *Thigpen et al* (1981), reportaran una tasa de respuesta del 38% al utilizar el fármaco a dosis de 50 mg/m<sup>2</sup> vía intravenosa en intervalos de 3 semanas.

Los fármacos con mayor actividad incluyen al cisplatino y a los compuestos independientes de platino: paclitaxel, topotecan, vinorelbina e ifosfamida, los cuales pueden administrarse de manera individual en pacientes que no sean candidatos para una quimioterapia combinada debido al deterioro en su salud.

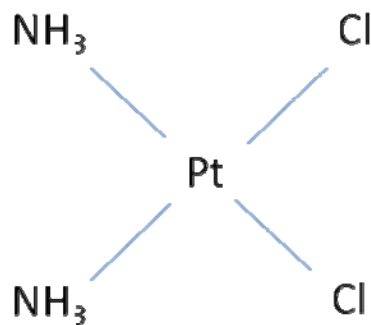
Otros fármacos investigados que han demostrado una baja respuesta clínica son: irinotecan, etopósido, vinorelbina, fluorouracilo y la gemcitabina.

A continuación se describen algunas propiedades generales del cisplatino.

### 1.2.1 Cisplatino

Los fármacos basados en platino representan una clase importante de agentes antitumorales. El desarrollo clínico del cis-diaminodicloroplatino (II) (cisplatino) en 1970, marcó una nueva etapa en el tratamiento contra el cáncer. El cisplatino tiene un amplio efecto contra cánceres epiteliales y se ha convertido en un agente fundamental en los regímenes terapéuticos contra el cáncer testicular, de ovario, cervical, hígado, cabeza y cuello, entre otros (Rossenberg, 1999).

El cisplatino contiene dos grupos amonio en la posición cis y dos cloros. (Figura 2)



**Figura 2. Cis-diaminocloroplatino (CDDP)**

Cuando el cisplatino se disuelve en agua los iones de cloro son desplazados para permitir la formación de especies acuosas, las cuales son las formas reactivas del compuesto; esta reacción es ocasionada por las altas concentraciones de agua y bajas concentraciones de cloro que se presentan en los tejidos. (Lippard S, 1987). El complejo acuo reacciona con una gran variedad de macromoléculas, ya que es un potente electrófilo que puede interactuar con cualquier neutrófilo, incluyendo los grupos sulfidrilo de las proteínas y grupos nucleofílicos de los ácidos nucleicos (Chu, 1994). El cisplatino se une con mayor frecuencia al ARN que al ADN y al ADN más que a proteínas (Go y Adjei, 1999).

La citotóxicidad del cisplatino se debe a la formación de aductos con el ADN; el cisplatino se une preferentemente a la posición 7-N de guanina o adenina. Aunque, el mecanismo citotóxico de estos aductos aún no se encuentra bien establecido, se ha propuesto a la apoptosis como uno de ellos (Eastman, 1999; Gonzalez, 2001). Otros efectos incluyen la inhibición de la función de los canales de calcio, funciones mitocondriales, transporte de aminoácidos esenciales, la polimerización de la actina y la interacción con fosfolípidos y fosfatidilserinas en las membranas (Pinto et al 1985).

A pesar de su gran eficacia en el tratamiento de diversos cánceres, las células tumorales pueden presentar resistencia al cisplatino, intrínseca o adquirida. Esta resistencia puede deberse a diversos mecanismos como: una baja acumulación celular del fármaco, inactivación citosólica y aumento en la reparación del ADN. Evidencias recientes atribuyen a ciertos genes y proteínas la sensibilidad de las células al cisplatino (Go y Adjei 1999).

Otro de los problemas que se presentan con la administración del cisplatino son sus múltiples efectos secundarios (nefrotóxicidad, náuseas, vómito, neurotóxicidad, mielosupresión). Lo anterior minimiza las dosis de administración, por lo cual para el tratamiento del cáncer cervical avanzado, se recurre a la quimioterapia combinada en la que se utiliza al cisplatino como agente estándar combinado con otro fármaco con capacidad anti-neoplásica demostrada. En las terapias combinadas se toma en consideración que las toxicidades de ambos fármacos no se sobrelapen; la presencia de efectos aditivos o sinérgicos en la actividad antineoplásica y la ausencia de un incremento en la toxicidad sistémica. En general, la adición de otro agente al cisplatino resulta en una respuesta mayor. Algunos de los fármacos que se han seleccionado para

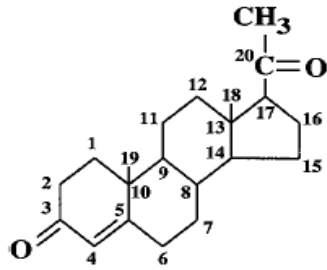
combinarse con el cisplatino y que han sido probados en estudios clínicos fase III incluyen: bleomicina, fluorouracilo, paclitaxel, ifosfamida, gemcitabine, vinorelbina y topotecan (Long, 2007).

En el presente trabajo se estudio el efecto farmacológico del cisplatino combinado con el agente anti-progestágeno mifepristona (MF). A continuación se describen algunas generalidades de MF.

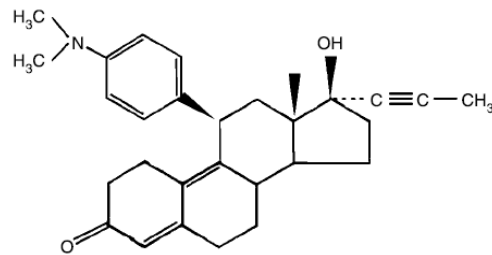
### 1.2.2 Mifepristona

La mifepristona es un derivado sintético del progestágeno noretindrona (Figura 3) que se une con gran afinidad a los receptores de glucocorticoides en humanos y también actúa como un antagonista de la progesterona endógena compitiendo por la unión a su receptor (receptor de progesterona PR); la mifepristona se une con alta afinidad a estos receptores (2 a 10 veces más que la progesterona) (Brogden et al, 1991).

El mecanismo por medio del cual la mifepristona inactiva a la progesterona es complejo y aún no se encuentra bien definido; sin embargo, los mecanismos de activación del receptor de progesterona que incluyen: la disociación de las proteínas de choque térmico llamadas hsp's (heat shock proteins) y dimerización y unión a elementos de respuesta a progesterona, no se encuentran dañados (Leonhardt y Edwards, 2002); aunque algunos estudios señalan que la mifepristona actúa estabilizando el complejo inactivo PR-hsp previniendo que se transloque al núcleo, algunos de estos complejos logran llegar hasta el ADN pero su actividad transcripcional es muy baja (Baulieu, 1989). En otros estudios se ha observado que la mifepristona induce la dimerización del PR seguida de su unión a elementos de respuesta a progesterona, aún con mayor fuerza que la propia progesterona (Skafar, 1991; Spitz y Robbins, 1998) pero la unión del complejo mifepristona-PR al ADN es transcripcionalmente inactiva.



**Figura 3. Progesterona**



**Mifepristona (RU486)**

Debido a que los receptores de progesterona se encuentran mayormente en órganos reproductivos, la mifepristona ejerce su efecto principal en el útero (Weiss, 1993) siendo actualmente utilizada de manera clínica para la inducción del aborto y presentando efectos secundarios poco severos como son, dolor abdominal, náuseas, vómito, diarrea, calambres, dolor de cabeza, fiebre o resfriados.

Además de sus efectos anticonceptivos, la mifepristona interfiere con el crecimiento de las células cancerosas, ya que en combinación con el tamoxifeno, se observa la inhibición de la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA) (El Etreby et al, 1998). Otros estudios reportan la inhibición de la proliferación en células de endometrio normales y malignas, células de cáncer de próstata y líneas celulares de adenocarcinoma gástrico, (Goyeneche et al, 2007). En un estudio realizado por Goyeneche et al. (2007), se demuestra que la mifepristona inhibe la proliferación del cáncer de ovario *in-vitro* e *in- vivo* dependiendo de la dosis administrada.

### 1.2.3 Terapia Anti-angiogénica

La quimioterapia ha sido la piedra angular para el tratamiento del cáncer durante muchas décadas. Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos presentan diversos efectos secundarios que limitan su dosis de administración, además del desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales. Actualmente se han desarrollado fármacos cuyo blanco de acción es la misma célula maligna o las células que mantienen el crecimiento tumoral. Las estrategias dirigidas contra la angiogénesis



tumoral han sido un objetivo primordial de la investigación en décadas pasadas debido a que se sabe que la angiogénesis es esencial para el proceso metastásico ya que los vasos sanguíneos proporcionan a las células tumorales una vía por la cual pueden migrar hacia otros tejidos del organismo.

El uso de inhibidores de la angiogénesis como una terapia anticáncer, se encuentra en pleno desarrollo. Dichos inhibidores pueden ser clasificados en distintas categorías funcionales que incluyen: inhibidores de factores de crecimiento, de proliferación de células endoteliales, de metaloproteinasas de la matriz, de transducción de señales de células endoteliales, de supervivencia de las células endoteliales y de precursores de la médula ósea (Kerber, 2001). Los agentes anti-angiogénicos presentan ciertas ventajas sobre la quimioterapia convencional que van desde un fácil acceso a sus blancos en la vasculatura, hasta la independencia de los mecanismos de resistencia de las células tumorales, ya que van dirigidos contra las células endoteliales.

Es importante señalar que la inhibición de la angiogénesis induce un estado de latencia en el tumor; es decir, las células tumorales no son eliminadas sino que el tumor al no tener una red vascular, deja de crecer y por lo tanto, no puede migrar lo que resulta en la estabilización del tumor.

### **1.3 ANGIOGÉNESIS**

Para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de todos los tejidos, incluyendo aquellos que han iniciado una transformación maligna, la entrega de nutrientes a la célula y la remoción de productos de desecho es algo indispensable. Por lo tanto, los tejidos normales y tumorales dependen de un sistema circulatorio funcional. La vasculatura se extiende más de 900 m<sup>2</sup> y juega un papel importante en el mantenimiento e integridad del cuerpo de diferentes maneras.

Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales que se encuentran en contacto directo con la sangre, pericitos localizados subendotelialmente, células del músculo liso, fibroblastos, membrana basal (BM) y matriz extracelular (ECM). Las células endoteliales forman una monocapa en cada vaso sanguíneo, son metabólicamente activas, permeables a pequeños solutos, regulan la coagulación

sanguínea y dirigen células del sistema autoinmune a sitios específicos del cuerpo. Las células endoteliales se encuentran involucradas en la remodelación vascular durante la ovulación, reparación de heridas, crecimiento tumoral y retinopatía diabética entre otros procesos.

La angiogénesis es un proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura pre-existente. El proceso de pasos múltiples de la angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales (EC's), la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables (Martínez y Herrera, 2006).

Bajo condiciones normales la vasculatura de un adulto es una estructura estable. Las células endoteliales maduras no se dividen y tienen una vida media de muchos años, pero en situaciones patológicas como en la angiogénesis inducida por tumores, la remodelación tisular seguida de algún daño, infarto cardíaco, retinopatía diabética, psoriasis, etc., las células endoteliales responden de manera rápida y proliferan (Folkman, 1995).

### 1.3.1 Factores Pro-angiogénicos y Anti-angiogénicos

Los moduladores de la angiogénesis son secretados por células endoteliales, células tumorales y por el estroma que las rodea (Tonini et al, 2003). Diversas moléculas han sido propuestas como factores pro-angiogénicos debido a su capacidad de activar el crecimiento de las células endoteliales. En la tabla 1 se presenta una lista de los reguladores positivos de la angiogénesis secretados por tumores.

**Tabla 1 Reguladores positivos de la angiogénesis secretados por tumores**

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>VEGF</b>                    | Factor de crecimiento del endotelial vascular          |
| <b>bFGF</b>                    | Factor básico de crecimiento de fibroblastos           |
| <b>aFGF</b>                    | Factor ácido de crecimiento de fibroblastos            |
| <b>PDGF</b>                    | Factor de crecimiento derivado de plaquetas            |
| <b>PD-ECGF</b>                 | Factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas |
| <b>IL-8</b>                    | Interleucina-8   |
| <b>EGF</b>                     | Factor de crecimiento Epidermal                        |
| <b>HGF</b>                     | Factor de crecimiento de hepatocitos                   |
| <b>Angiogenina</b>             |  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Factor de necrosis tumoral alfa                        |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Factor de necrosis tumoral beta                        |
| <b>Proliferina</b>             |  |
| <b>PLGF</b>                    | Factor de crecimiento de placenta                      |

La presencia de factores angiogénicos no es suficiente para iniciar el crecimiento de los vasos sanguíneos. La acción de los factores pro-angiogénicos es contrarrestada por diversos agentes inhibitorios (Tabla 2); el resultado de esto determina la homeostasis del proceso

**Tabla 2 Reguladores negativos de la angiogénesis**

|                       |
|-----------------------|
| <b>Trombospondina</b> |
| <b>Endostatina</b>    |
| <b>Arrestina</b>      |
| <b>Vasostatina</b>    |
| <b>Interleucinas</b>  |
| <b>Endorepelina</b>   |
| <b>Fibulina</b>       |
| <b>Angiostatina</b>   |

### 1.3.2 Angiogénesis Fisiológica

Cuando un organismo multicelular se encuentra en crecimiento, las células inducen angiogénesis y vasculogénesis con la finalidad de reclutar suministro sanguíneo. En situaciones fisiológicas, la angiogénesis es un proceso altamente regulado; es decir, se activa por periodos cortos (días) y después es completamente inhibida.

Este tipo de angiogénesis ocurre mayormente durante el desarrollo embrionario, en el cual se establece la vasculatura primaria y adecuada para el crecimiento y desarrollo de los órganos (Folkman y Klagsbrun, 1987); en el adulto, la activación de las células endoteliales es baja y la vasculatura se mantiene en un estado quiescente gracias al balance entre los reguladores positivos y negativos de la angiogénesis, limitándola a sitios en donde la demanda metabólica del tejido es tan alta que se necesite de nuevos vasos sanguíneos, como ocurre durante la cicatrización de heridas, reparación de fracturas, inflamación, foliculogénesis y ovulación durante el ciclo menstrual, así como

en situaciones de isquemia (Lotta y Kari, 2002). En estas condiciones, los reguladores positivos de la angiogénesis predominan permitiendo así la activación de mecanismos angiogénicos.

### 1.3.3 Angiogénesis en cáncer

En un tumor sólido, los vasos sanguíneos son líneas de suministro que se requieren para la persistencia, expansión y metástasis del tumor (Folkman, 1996). Tumores de menos de 1 mm<sup>3</sup> obtienen sus necesidades metabólicas vía difusión, pero al sobrepasar este tamaño requieren de un sistema más elaborado para mantener su crecimiento; es decir, distribuir los nutrientes, obtener oxígeno, remover toxinas y metabolitos (Diane y D'Amore, 2001). El proceso angiogénico en tejidos neoplásicos se inicia por medio de un cambio en el balance de los reguladores angiogénicos en el microambiente del tumor, lo cual favorece el crecimiento y remodelación de vasos sanguíneos. Un ambiente pro-angiogénico promueve la expresión de marcadores en células endoteliales que se relacionan con proliferación, migración y activación de factores de crecimiento.

Los vasos sanguíneos que se forman o activan en el microambiente tumoral, difieren morfológica y funcionalmente de la vasculatura de tejidos sanos, ya que presentan diámetros irregulares y paredes delgadas sostenidas por menos pericitos que los vasos de órganos normales (Chaplin y Dougherty; 1999).

La angiogénesis se inicia rápidamente en respuesta a condiciones hipóxicas o isquémicas. En cualquier tipo de angiogénesis, bajo condiciones fisiológicas o patológicas, el primer proceso en llevarse a cabo es la activación de las células endoteliales. Diversas citocinas (factores de crecimiento que sobre-expresan al factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF) son liberadas en respuesta a hipoxia o isquemia. Las células tumorales expresan y secretan el VEGF al estar expuestas a estas condiciones y también como resultado de mutaciones genéticas (Korpany et al.).

Se ha sugerido que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es de particular importancia para la iniciación y desarrollo de la angiogénesis (Dvorak, 1995;

Ferrara, 2002), debido a su capacidad para inducir vasodilatación por medio de la producción endotelial de óxido nítrico e incrementar la permeabilidad de las células endoteliales, lo cual permite a las proteínas plasmáticas entrar en el tejido para formar una red provisional rica en fibrina.

#### 1.3.4 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular VEGF

El VEGF conocido también como factor de permeabilidad vascular (VPF) o vasculotropina, es una citocina multifuncional que fue originalmente identificada como una proteína producida por las células tumorales, con la función de incrementar la permeabilidad de los capilares a las proteínas (Ferrara, 1999). Años después se descubrieron las propiedades mitógenicas que el VEGF ejercía sobre las células endoteliales, así como su participación como estimulante en la angiogénesis (Hyder, 2006).

VEGF-A, comúnmente llamado simplemente VEGF, pertenece a la familia de genes que incluyen al factor de crecimiento de la placenta PLGF, VEGF-B, VEGF-C, y VEGF-D (Tabla 3). VEGF-A se expresa en las células epiteliales y mesenquimales de una gran variedad de tejidos y es altamente expresado en muchos tumores (Carmeliet, 2005; Ferrara et al, 2004; Ferrara, 1999).

**Tabla 3. Familia de genes VEGF**

|               | <b>Funciones</b>   |
|---------------|--|
| <b>VEGF-A</b> | Es el más estudiado, incrementa la permeabilidad, proliferación, migración y señales de supervivencia. |
| <b>VEGF-B</b> | Su expresión no es regulada por hipoxia, estimula ligeramente la proliferación.                        |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>VEGF-C</b> | Permeabilidad, estimula migración y proliferación.<br>Desarrollo del sistema linfático             |
| <b>VEGF-D</b> | Mitógeno para las células endoteliales, aumenta la permeabilidad. Desarrollo del sistema linfático |
| <b>VEGF-E</b> | Virus que causa dermatitis. Carece del dominio de unión a heparina.                                |

El gen del factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A), está organizado en ocho exones separados por siete intrones (Houck et al, 1991) y se localiza en el cromosoma 6p21.3 (Vicenti et al, 1996). El procesamiento alternativo de los exones, genera alrededor de seis isoformas del VEGF (Neufeld et al, 1999).

Las isoformas más estudiadas y las más comunes en humanos son las que contienen 121, 165, 189 y 206 aminoácidos (Ferrara, 1999). Las isoformas más expresadas son VEGF-121 y VEGF-165. La mayor diferencia entre las isoformas del VEGF es la capacidad con la cual se unen a la heparina (Tabla 4).

**Tabla 4. Isoformas del VEGF**

| <b>Isoformas</b>          | <b>Características</b>   |
|---------------------------|--|
| <b>VEGF<sub>165</sub></b> | Isoforma predominante, glicoproteína homodimérica. Se une a heparina con gran afinidad.            |
| <b>VEGF<sub>121</sub></b> | Polipéptido ácido que no se une a heparina ni a la matriz extracelular. Proteína de libre difusión |

|  |   |
|--|---|
| <b>VEGF<sub>189</sub></b><br><b>VEGF<sub>206</sub></b> | Se unen a heparina con gran afinidad (mayor que VEGF <sub>165</sub> y VEGF <sub>145</sub> ). Se encuentran secuestradas en la membrana extracelular |
| <b>VEGF<sub>145</sub></b>                              | Se une a heparina y a la matriz extracelular.   |
| <b>VEGF<sub>183</sub></b>                              | Función aún desconocida   |
| <b>VEGF<sub>162</sub></b>                              | Función aún desconocida   |
| <b>VEGF<sub>165b</sub></b>                             | Inhibe a VEGF <sub>165</sub> mitogénico   |

Las isoformas del VEGF<sub>165</sub>, <sub>121</sub>, <sub>145</sub> inducen proliferación de células endoteliales y angiogénesis *in vivo* (Poltorak et al, 1997; Zhang et al, 1993).

El VEG-A es una glicoproteína homodimérica de unión a heparina de aproximadamente 40 kDa (Olsson et al, 2006) y sus propiedades corresponden a aquellas del VEGF<sub>165</sub>, considerada la isoforma más común. VEGF-A promueve el crecimiento de células vasculares endoteliales derivadas de las arterias, venas y linfocitos (Ferrara y Smyth, 1997); también es un factor de supervivencia para las células endoteliales *in vitro*, previene la apoptosis endotelial induciendo extravasación del suero e induce la expresión de proteínas antiapoptóticas en células endoteliales como Bcl-2 (Kim et al 2000).



Las células endoteliales son el principal blanco del VEGF-A, sin embargo se han reportado los efectos mitogénicos y no mitogénicos del VEGF-A en diversos tipos celulares no endoteliales, incluyendo a las células del ducto pancreático y células de Schwann.

### 1.3.5 Reguladores de los VEGF's

La producción de los VEGF's se encuentra bajo el control del factor inducible a hipoxia (HIF), el cual es una proteína básica heterodimérica que consiste en dos subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ . En respuesta a hipoxia HIF-1 $\alpha$  se une a elementos de respuesta en la región promotora de los VEGF's, lo cual incrementa la transcripción del gen (Ferrara, 2007).

Lo anterior sugiere que el VEGF participa en las primeras etapas durante la respuesta angiogénica. Además, los receptores de los VEGF's (VEGFR) se encuentran sobre expresados bajo condiciones de hipoxia o isquemia. En una variedad de circunstancias patofisiológicas se ha observado que la expresión de mRNA del VEGF es inducida por la exposición a bajas presiones de oxígeno (pO<sub>2</sub>) y se ha identificado una secuencia de 28 bases en el promotor 5' en el gen del VEGF humano y el de rata que media la transcripción inducida por hipoxia (Levy et al, 1995; Liu et al, 1995).

Otra de las proteínas que regulan al VEGF pero de manera indirecta, es el producto del gen supresor de tumores Von Hippel-Lindau (VHL). VHL regula de manera negativa al VEGF y a otros genes que son inducidos por hipoxia (Iliopoulos et al, 1996). Estudios recientes demuestran que una de las funciones de esta proteína es formar parte del complejo ubiquitina ligasa que dirige a las subunidades de HIF hacia una degradación proteosomal (Jaakkola et al, 2001). Muchos factores de crecimiento incluyendo EGF, TGF $\alpha$ , KGF, IGF-1, FGF y PDGF regulan de manera positiva la expresión de mRNA del VEGF (Pertovaara et al, 1994; Warren et al, 1996), lo cual sugiere que la liberación parácrina o autócrina de dichos factores cooperan con la hipoxia local en la regulación de la liberación del VEGF en el microambiente. También citocinas inflamatorias como IL-1 $\alpha$  e IL6 inducen la expresión del VEGF en distintos tipos celulares (Cohen et al, 1996).

Las hormonas también son importantes reguladores en la expresión del VEGF. Muller et al, 2002; reportaron que el estradiol es un activador transcripcional directo del VEGF, mediado por una variante del elemento de respuesta a estrógenos. Otros eventos transformantes pueden resultar en la inducción de VEGF. La amplificación del oncogen ras también ocasiona sobre-regulación de éste factor (Grugel et al 1995).

### 1.3.6 Receptores del VEGF

Las propiedades angiogénicas específicas de los VEGF's se basan en sus efectos en el endotelio vascular a través de receptores de alta afinidad (VEGFR) que se localizan principalmente en la superficie de celular.

Estos receptores son miembros de la superfamilia Tirosina-cinasa (RTK), están constituidos por un dominio extracelular de aproximadamente 750 aminoácidos, los cuales se encuentran organizados en siete dominios de inmunoglobulina (Ig). En el VEGFR-3, el quinto dominio de inmunoglobulina es reemplazado por un puente disulfuro. El domino extracelular es seguido por una región transmembranal, un dominio juxtamembranal, un domino tirosina-cinasa interrumpido en el aminoácido 70 por un injerto de cinasa y una cola C Terminal (Olsson AK, 2006) (Figura 4).

La clasificación de receptores del VEGF se describe a continuación:

#### *VEGFR-1 (Flt-1)*

El VEGFR-1 es una glicoproteína transmembranal cuyo ARNm puede procesarse y producir una proteína más corta, cuya función es regular de manera negativa a VEGF-A (Martinez y Herrera, 2006). Fue el primer receptor tirosina-cinasa en ser identificado como receptor del VEGF, su función precisa aún continúa en debate. Las funciones y las propiedades de señalización de VEGFR-1, pueden diferir dependiendo del estado de desarrollo y del tipo celular, ej. células endoteliales y no endoteliales. La expresión de VEGFR-1 se encuentra aumentada por hipoxia vía un mecanismo dependiente de HIF. VEGFR-1 se une a VEGF-A, PLGF y a VEGF-B.

#### *VEGFR-2 (Flt-2)*

El VEGFR-2 es el principal mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de aumento de la permeabilidad del VEGF. Después de la unión del VEGF, el VEGFR-2 se dimeriza y auto-fosforilación en un residuo de tirosina resultando en señales mitogénicas, quimiotácticas, de supervivencia y de migración (Ferrara et al, 2003). VEGFR-2 induce crecimiento de células endoteliales activando la vía de señalización Raf, Merk-Erk.

#### *VEGFR-3 (Flt-3)*

El VEGFR-3 presenta una superficie altamente glicosilada. Se conocen dos formas transcritas que difieren entre sí por sus extremos carboxilo (Partanen y Pavoneen, 2001). La forma glicosilada del VEGFR-3 es cortada proteolíticamente en el quinto dominio de inmunoglobulina, pero las cadenas resultantes permanecen unidas por un enlace disulfuro.

#### *Neuropilina (NRP1)*

Ciertos tumores y células endoteliales expresan sitios de unión en sus superficies distintos a los receptores tirosina-cinasa. Soker et al, 1998, identificaron estas isoformas específicas de los receptores del VEGF como Neuropilina (NRP1), una molécula implicada en la guía neuronal; cuando la NRP1 se expresa en las células junto con VEGFR-2, aumenta la unión de VEGF<sub>165</sub> a VEGFR-2. La NRP1 parece reclutar al VEGF<sub>165</sub> para VEGFR-2 de tal manera que aumenta la efectividad del VEGFR-2 de mediar señales de transducción.

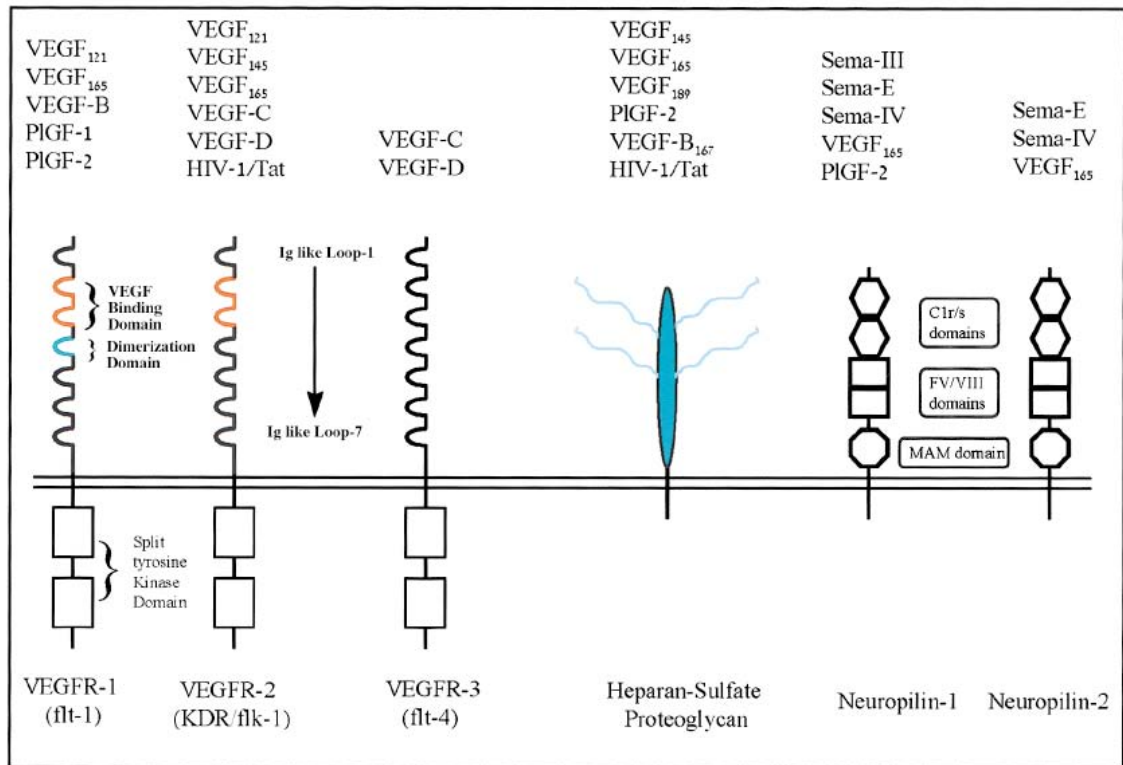


Figura 4. VEGF y sus receptores (Neufeld et al, 1999)

### 1.3.7 Angiogénesis y hormonas

En el sistema reproductor femenino, la neovascularización aparece de manera recurrente por el desarrollo cíclico de estructuras transitorias y la reparación cíclica de los tejidos dañados. Los estrógenos y la progesterona son primariamente uterotrópicos y controlan los patrones de la proliferación celular y crecimiento vascular uterino que ocurre a través del ciclo menstrual. Dado la sincronía natural de la neovascularización en este proceso, se sugiere la participación de las hormonas esteroideas en la formación de vasos sanguíneos en el tracto reproductivo.

Diversos estudios con ratones knockout para el receptor  $\alpha$  estrogénico (ER-  $\alpha$ ) han propuesto la participación de los estrógenos en la angiogénesis; así mismo, la utilización de antagonistas estrogénicos inhiben la angiogénesis (Losordo e Isner, 2000).

La correlación positiva entre la expresión de receptores estrógenicos, la actividad angiogénica y la capacidad de invasión de los tumores de mama, también apoyan la hipótesis de la participación de los estrógenos en la angiogénesis. (Fox et al, 1993; Toi et al, 1993).

Reportes en la literatura sugieren la importancia de los estrógenos y otras hormonas esteroideas en la angiogénesis fisiológica y patológica. Uno de los primeros hallazgos fue el efecto inhibitorio de la vascularización tumoral mediado por la medroxiprogesterona (Gross, 1981); el mecanismo de esta inhibición puede deberse a la regulación de la trombospondina-1 (un inhibidor de la angiogénesis) por la 2-metoxiprogesterona. Otros estudios reportan anomalías en los vasos sanguíneos del endometrio después de la administración de progestágenos utilizados como anticonceptivos orales, además de un incremento en la microvasculatura del endometrio después de administrar pequeñas dosis de progesterona (Rogers et al, 1993).

## **2 ANTECEDENTES**

Algunos esteroides fueron las primeras moléculas en ser reconocidas por su actividad antiangiogénica, estos compuestos incluyen a la progesterona, acetato de medroxiprogesterona y glucocorticoides como dexametasona y cortisona (Folkman e Ingber, 1992; Folkman y Shing 1992).

Los esteroides angiostáticos presentan múltiples efectos sobre la angiogénesis tumoral, incluyendo la inhibición de la proliferación de las células endoteliales, inhibición de la colagenólisis y la producción de activador del plasminógeno.

En un estudio, Mooberry y cols (2003), demuestran que el 2-metoxiestradiol, (un metabolito endógeno del estrógeno) inhibe la proliferación, migración e invasión de las células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo*, el mecanismo aún no se encuentra bien definido. Por otro lado, la escualamina (compuesto esteroideo natural) induce cambios morfológicos en las células endoteliales y se ha reportado que posee actividad antiangiogénica en modelos de cáncer de pulmón, mama, cerebro y ovario (Eckhardt, 1999; Teicher et al, 1998; Sills et al, 1998).

A la fecha, no existen reportes del uso de agentes esteroideos para el tratamiento del cáncer cervical. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la mifepristona aumenta la quimiosensibilidad al cisplatino en una línea celular de cáncer de ovario (COC1) que expresa receptores a progesterona. En este estudio se observa un aumento en el porcentaje de inhibición en el tratamiento combinado (mifepristona y cisplatino) con respecto al tratamiento de cisplatino solo (Qin and Wang 2002). García y Jurado (2007) reportaron que el efecto antiproliferativo del cisplatino es potenciado en presencia de mifepristona en una línea celular de cáncer cervical (HeLa) que expresa un bajo porcentaje de receptores a progesterona en comparación con la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) utilizada como control (García-López et al 2004). Diversos estudios han sugerido que el VEGF juega un papel importante en la progresión de distintos cánceres (Alvarez et al, 1999; Paley et al, 1997; Yamamoto et al 1997) por lo cual se han dirigido moléculas pequeñas, proteínas y anticuerpos contra este factor de crecimiento.

A pesar de la evidencia clínica del papel que juegan las hormonas esteroideas en la neovascularización endotelial, los resultados experimentales reportados aún no son concluyentes en definir los elementos de los mecanismos patofisiológicos.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Un evento crítico en la progresión de un carcinoma es el establecimiento de las células tumorales en sitios secundarios de crecimiento (metástasis). La velocidad de metástasis de un tumor sólido, depende de una cascada crítica de eventos que incluye: el escape del sitio del tumor primario, penetración al estroma local, entrada a la vasculatura local o vasos linfáticos (intravasación), agregación en plaquetas, interacción y adhesión al endotelio distante, extravasación, recolonización y expansión (Liotta et al, 1991). Durante la metástasis, las células tumorales evaden su eliminación por el sistema inmune y son capaces de sobrevivir en estas condiciones adversas. La metástasis en cánceres cervicales no ha sido ampliamente descrita en la literatura; sin embargo, el cáncer cervical avanzado, recurrente y metastásico continúa siendo una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. Alrededor de un tercio

de las pacientes que se presentan con cáncer cervical invasor mueren a causa de la enfermedad (Long, 2007).

El VEGF es señalado como un buen blanco terapéutico contra la angiogénesis tumoral debido al papel que tiene en la promoción de diversos cánceres, a través del crecimiento tumoral y el establecimiento de metástasis. La inhibición del VEGF mediante el bloqueo de sus receptores y su sistema de señalización por medio de diversos fármacos, es eficaz en cualquier etapa del desarrollo canceroso y previene la metástasis, lo cual resulta en un gran beneficio para el tratamiento del cáncer.

La coadministración de inhibidores de la angiogénesis junto con quimioterapia y radioterapia puede aumentar la eficiencia de estos tratamientos estándares. Diversos estudios clínicos han demostrado una relación bastante clara entre los factores angiogénicos y la prognóstico de distintos tipos de cáncer incluyendo al de máma, gástrico, colorectal, pulmonar de células no pequeñas y melanoma (Fox et al, 2001).

El cisplatino es el fármaco más utilizado para el tratamiento del cáncer cervical; sin embargo, presenta efectos secundarios severos, lo cual ha motivado la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos que al ser utilizados en combinación con él, aumenten su actividad antineoplásica y al mismo tiempo disminuyan sus efectos secundarios. Los agentes anti-hormonales han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de diversos cánceres principalmente aquellos que son dependientes de hormonas, como es el caso del cáncer de próstata o de mama; además de su actividad antineoplásica, actúan como quimiosensibilizadores y modulan la actividad de otros agentes antineoplásicos. El cérvix normal responde a hormonas esteroideas, no obstante el tratamiento hormonal no se utiliza en la terapia del cáncer cervical, debido a una baja expresión de receptores estrogénicos y progestágenos.

A pesar de que diversos fármacos se encuentran bajo estudio, los agentes anti-hormonales han sido poco probados en combinación con el cisplatino para tratar el cáncer cervical metastásico, ya que éste se considera que no responde a una terapia antihormonal. La investigación con agentes antihormonales permitiría evaluar su acción anti-angiogénica al combinarlo con dosis bajas de cisplatino disminuyendo sus efectos secundarios. En este trabajo se evaluó la respuesta anti-angiogénica y citotóxica de mifepristona (anti-progestágeno) combinada con el cisplatino en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.

## **4 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto del antiprogéstágeno mifepristona combinado con cisplatino sobre la expresión y producción del factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) así como en la citotoxicidad en cáncer cérvico uterino.

### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar las dosis de mifepristona y cisplatino en células de CaCU mediante ensayos de citotoxicidad.
- Determinar el efecto de mifepristona, cisplatino y su combinación sobre la expresión y la producción del VEGF en células de CaCU.
- Evaluar el efecto de mifepristona, cisplatino y su combinación sobre la expresión del gen E6 en células HeLa y CaSki
- Determinar el efecto de cisplatino y su combinación con mifepristona sobre la concentración del VEGF en el líquido extracelular de tumores de cérvix desarrollados en ratones atímicos utilizando una técnica de microdiálisis.



## 5 MATERIAL Y METODOS

### 5.1 Ensayos *in vitro*

#### Fármacos

La mifepristona (MF) fue preparada en etanol (solución stock  $1 \times 10^{-3}$  mM). El Cisplatino (CP) fue disuelto en solución salina (solución stock 1 mg/mL) ambos fármacos fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer cervical HeLa (VPH-18) y CaSki (VPH-16), ambas fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Las líneas celulares fueron mantenidas rutinariamente en medio RPMI con suero fetal bovino (SFB) al 10% e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### Tratamiento de Mifepristona y Cisplatino

Las células se despegaron de la caja, utilizando tripsina 1% y EDTA (0.02 %). Se contaron y se sembraron  $2 \times 10^5$  células HeLa y  $1 \times 10^6$  células Caski en botellas de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$ . Ambas líneas celulares fueron pre-tratadas durante 72 horas con mifepristona a una concentración de  $10 \mu\text{M}$ . Las células control fueron expuestas únicamente al vehículo (1 % etanol). Después de este tiempo se aplicó únicamente cisplatino  $7.5 \mu\text{M}$  a las células HeLa ó  $12 \mu\text{M}$  a las células CaSki, ó combinado con mifepristona. Después de 24 hrs, se realizaron los ensayos de viabilidad, expresión y producción del VEGF.

### Ensayo de viabilidad

Se sembraron células HeLa y CaSki en placas de 12 pozos a una densidad celular de  $2 \times 10^5$  cel/pozo y  $2.5 \times 10^4$  cel/pozo respectivamente, 24 hrs. después se expusieron a los tratamientos anteriormente descritos. La viabilidad se evaluó por el método de XTT y Cristal violeta. El primero se basa en la ruptura de una sal de tetrazolio (XTT) para convertirse en formazán, un colorante naranja que es formado por las células metabólicamente activas. El formazán es soluble en agua y su aumento es directamente proporcional a la cantidad de las deshidrogenasas mitocondriales en la muestra y por lo tanto de las células vivas. Al finalizar los tratamientos, se añadió al medio RPMI el reactivo XTT a una concentración final de 0.3 mg/mL y se incubó por 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La absorbancia de la muestra se leyó en un lector de placa (modelo Mustiskan MCC Fisher Scientific) a 492 nm.

El método de Cristal violeta consiste en la inclusión de éste colorante en las células viables a través de su difusión por la membrana plásmatica; la disolución de dicho colorante permite su cuantificación en un espectrofotómetro. Al final de los tratamientos, el medio fue removido y las células se fijaron adicionando a cada pozo 1 ml de formaldehído al 10% por 24 horas, pasado este tiempo, las células fueron teñidas con el colorante cristal violeta al 1% y lavadas con PBS. El colorante unido se disolvió con ácido acético al 33%. La absorbancia de las muestras fue medida en un lector de placa a 570 nm.

### Extracción de RNA

La extracción del RNA total se hizo mediante la técnica de TRIzol (GIBCO BRL Company). El trizol mantiene íntegro al RNA mientras al mismo tiempo rompe a las células y disuelve sus componentes, la adición de cloroformo y centrifugación de la solución la separa en una fase acuosa y otra orgánica. El RNA permanece en la fase acuosa. Después de transferir la fase acuosa a otro tubo, el RNA es recuperado precipitando con isopropanol y antes de disolverlo se lava con etanol, posteriormente es disuelto en agua con DEPC.

Al final del tratamiento con MF y CP, las células fueron despegadas mediante tripsina y centrifugadas, se obtuvo un botón de células al cual se le agregaron 500 µL de trizol, se incubó el homogeneizado durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 100 µL de cloformo, se incubó durante 3 minutos y se centrifugó la muestra a 12 000 rcf por 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó isopropanol (250 µL) para precipitar el RNA, se centrifugó a 12 000 rcf por 10 minutos. El RNA formó un pequeño pellet, el sobrenadante se removió y el pellet se lavó con etanol al 75% (500 µL), se mezcló la muestra y se centrifugó a 7 500 rcf por 5 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se desechó el sobrenadante y se dejó secar, cuando estuvo seco se resuspendió en 20 µL de agua con DEPC, se y almacenó a -70 °C hasta su uso.

Posteriormente, el RNA fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y el total de RNA de las muestras fue normalizado antes de realizar el ensayo de RT-PCR.

#### Estandarización del ensayo RT-PCR para los genes VEGF-A y VEGF-C

La técnica de RT- PCR, permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas de RNA con gran especificidad mediante su transcripción reversa a cDNA, el cual es posteriormente delimitado por un par de cebadores que lo flanquean y amplificado de una manera específica a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Obteniendo así millones de copias de la secuencia deseada de ADN.

La estandarización del método se realizó con el RNA obtenido de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. La secuencia de los oligonucleótidos para VEGF-A fue 5'GCA GAA TCA TCA CGA AGT GG3' VEGF-A y 5' GCA TGG TGA TGT TGG ACT CC 3'. La secuencia para VEGF- C fue 5'AGA CTC AAT GCA TGC CACG 3' y 5'TTG AGT CAT CTC CAG CAT CC 3' tal como se utiliza en Ueda Matsuga et al 2001. Como control de normalización se utilizó el gen constitutivo GAPDH utilizando los oligonucleótidos 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3' y 5' TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC 3'. Todos los primers fueron sintetizados por GIBCO BRL Company.

Para transcribir el RNA Se utilizó el kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) con la enzima ThermoScript RT que es una transcriptasa reversa aviar (7.5 U para transcribir 500 ng de RNA total, Oligo dt (2.5 µM) en un volumen de 10 µL. El cDNA generado se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con la enzima Platinum® Taq DNA polimerasa (1 U/ reacción), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM/ reacción) y 2 µL de cDNA.

La visualización de los fragmentos amplificados por la PCR fue a través de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% a un voltaje constante de 100 volt, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Se utilizó como indicador de peso molecular el DNA Ladder de 100 pb (Gibco BLR). La observación de los fragmentos amplificados se efectuó en un transiluminador de UV acoplado a una cámara (MultiDc-It Imaging System). Los resultados obtenidos se grabaron en un archivo de imagen y se analizaron con el programa UTHSCSA Image tool for Windows Versión 3.00.

#### Efecto de MF, CP y su combinación sobre la expresión de los genes VEGF-A y VEGF-C

Después de los tratamientos individuales y combinados según el esquema descrito anteriormente, se extrajo el RNA de las células HeLa y CaSki y se realizó el ensayo de RT-PCR para observar el efecto de MF, CP y su combinación en la expresión de los genes VEGF-A y VEGF-C.

El RNA obtenido de los tratamientos fue transcrito a cDNA por medio de la técnica de RT-PCR para ser posteriormente utilizado en la ampliación de los fragmentos tanto de VEGF-A como de VEGF-C. Para lo anterior se utilizó el kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) con las especificaciones previamente mencionadas.

#### Efecto de mifepristona en combinación con cisplatino sobre la expresión del gen E6

Al finalizar los tratamientos anteriormente descritos, se extrajo RNA de las células HeLa y CaSki y se realizó el ensayo de RT-PCR para observar el efecto de MF, CP y su combinación en la expresión del gen E6. La secuencia de los oligonucleótidos para VPH-18E6 fue Hz30: HPV18E63'-Hind III 5'GGG AAG CTT TTA TAC TTG TGT TTC TCT

GCG TCG 3'; HPV18E65'Bam HI 5'GGG GGA TCC ATG GCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA 3'. Para VPH-16 E6 fue HZ27: HPV16 E65'Bam HI 5'GGG GGA TCC ATG TTT CAG GAC CCA CAG GAG CGA 3' HZ28:HPV16 E63'ECORI 5'GGG GAA TTC TTA CAG CTG GGT TTC TCT ACG TGT 3'.

La visualización de los fragmentos amplificados por la PCR fue a través de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%.

### Efecto de MF, CP y su combinación sobre la producción del VEGF secretado por las células de CaCU

Para cuantificar el VEGF secretado por las células tumorales, al final de los tratamientos se recolectaron los medios de cultivo de las células tratadas y se analizaron a través del kit inmunométrico TiterZyme® EIA (Assay Designs), el cual utiliza un anticuerpo específico para el VEGF que tiene acoplado una peroxidasa que al ponerse en contacto con el sustrato reacciona con el VEGF unido al anticuerpo y genera color. El color generado por dicha reacción se puede leer a 450 nm en un lector de placa. La densidad óptica medida es directamente proporcional a la cantidad del VEGF presente en la muestras. La cantidad del VEGF se expresa en pg/ mg de proteína. A continuación se describe brevemente la metodología para la cuantificación de proteínas.

### Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, las células expuestas a cada uno de los tratamientos anteriormente mencionados fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo un botón celular al cual se le adicionó 100 µL de buffer de lisis (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, Nonidet P-40 al 1%) y 10 µL de inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail, Sigma). Se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Los sobrenadantes (proteínas) se transfirieron a un tubo limpio y se almacenaron a -70°C hasta su cuantificación, que se realiza a través del método de ácido bicinconínico.

### Cuantificación de proteínas (método de ácido bicinonínico)

Las proteínas se cuantificaron mediante el método del ácido bicinonínico. Previamente se realizó una curva estándar con una solución de albúmina a diferentes concentraciones (0-15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Posteriormente se preparó una solución de sulfato de cobre (200  $\mu\text{L}$ ) y 10 mL de ácido bicinonínico. Dicha solución fue adicionada a la curva estándar de albúmina y a las proteínas a cuantificar. La solución se dejó reposar por 15 minutos y se procedió a leerlas en un lector de placa a 540 nm. Se realizó una curva de concentraciones conocidas de albúmina y se interpolaron los datos de las muestras.

### Análisis estadístico

Los experimentos de viabilidad, RT-PCR y cuantificación de la proteína VEGF *in-vitro* fueron sometidos a análisis estadístico. Todos los ensayos fueron repetidos de manera independiente al menos 3 veces. La significancia de los datos fue determinada utilizando la prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tuckey.  $P \leq 0.05$  se considera estadísticamente significativa. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar. Para el ensayo *in-vivo* se utilizó una prueba de t-Student.  $P \leq 0.05$  se considera estadísticamente significativa.

## **5.2 Cuantificación del VEGF en un modelo tumoral de Cáncer cérvico uterino desarrollado en ratones atímicos**

Se estudió la producción del VEGF en el líquido extracelular de tumores de CaCU generados en ratones atímicos. Para cuantificar el VEGF secretado directamente en el tumor, se utilizó una técnica de microdialisis descrita por Dabrosin et al, 2003.

## Animales

Se utilizaron 6 ratones nu/nu<sup>-</sup> hembras de 8 semanas (20-25 g). Los cuales fueron alimentados *ad libitum*. El cuidado de los animales fue de acuerdo a los principios establecidos por el Instituto Nacional de Salud (NIH, EUA), Guía para el cuidado de animales de laboratorio, US Departamento de Salud (DHEW) NIH 86, 23 revisado en 1985.

## Generación de tumores

Los ratones fueron inoculados subcutáneamente con  $5 \times 10^6$  células HeLa vía subdérmica en el lomo. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 10x10 mm, los ratones fueron divididos al azar en 2 grupos.

## Diseño experimental

Se formaron 2 grupos. El grupo 1 se le administró una única dosis de cisplatino (3mg/kg/día), mientras que al grupo 2 se le administró un pre-tratamiento de mifepristona (2mg/kg/día x 4 días) y cisplatino a la dosis descrita. La toma de muestras se realizó utilizando una cánula de microdiálisis.

## Técnica de microdiálisis

La microdiálisis consiste en implantar en un órgano o área específica, una cánula con una membrana permeable la cual es perfundida con un líquido utilizando una bomba de perfusión, lo cual permite estabilizar el medio interno con el espacio extracelular. Esta técnica se puede aplicar en animales vivos y en libre movimiento (Rocha 1997).

Se utilizaron cánulas CMA<sub>20</sub> (CMA, Microdialysis, Suiza) las cuales se componen de una membrana tubular (4 mm largo X 0.5 mm de diámetro y poro de 100 kDa). A los animales bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (Lisorane, Baxter) se les realizó una incisión en la piel de aprox. 2 mm a una distancia aprox. de 3-4 mm del final del tumor,

la cánula de microdiálisis fue insertada en el centro del tumor. Los sitios de incisión se suturaron y las cánulas fueron fijadas. La sonda de microdiálisis se conectó a una bomba de microdiálisis (MD-1001, BAS Bioanalytical Systems Inc, EUA), a través de la cual se perfundió el vehículo (NaCl 0.9%) a una velocidad de 0.6  $\mu\text{L}/\text{min}$  y un periodo de estabilización de 30 minutos; la muestra se tomó durante 1 hora.

Esta parte de la metodología se realizó con ayuda de la Dra. Liliana Carmona Aparicio.

Los niveles del VEGF se cuantificaron mediante el kit inmunométrico TiterZyme<sup>®</sup> EIA (Assay Designs), el cual utiliza un anticuerpo específico para el VEGF que tiene acoplado una peroxidasa que al ponerse en contacto con el sustrato reacciona con el VEGF unido al anticuerpo y genera color. El color generado por dicha reacción se puede leer a 450 nm en un lector de placa. La densidad óptica medida es directamente proporcional a la cantidad del VEGF presente en la muestras.



## 6 RESULTADOS

### 6.1 Evaluación de las dosis de MF y CP en células HeLa y CaSki.

La citotoxicidad se expresa como el % de inhibición de la viabilidad celular. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos con la línea celular HeLa mediante el método XTT. Se observó que los tratamientos individuales de Mifepristona y Cisplatino no modifican la viabilidad celular; sin embargo la combinación disminuyó significativamente la viabilidad en un 80%.

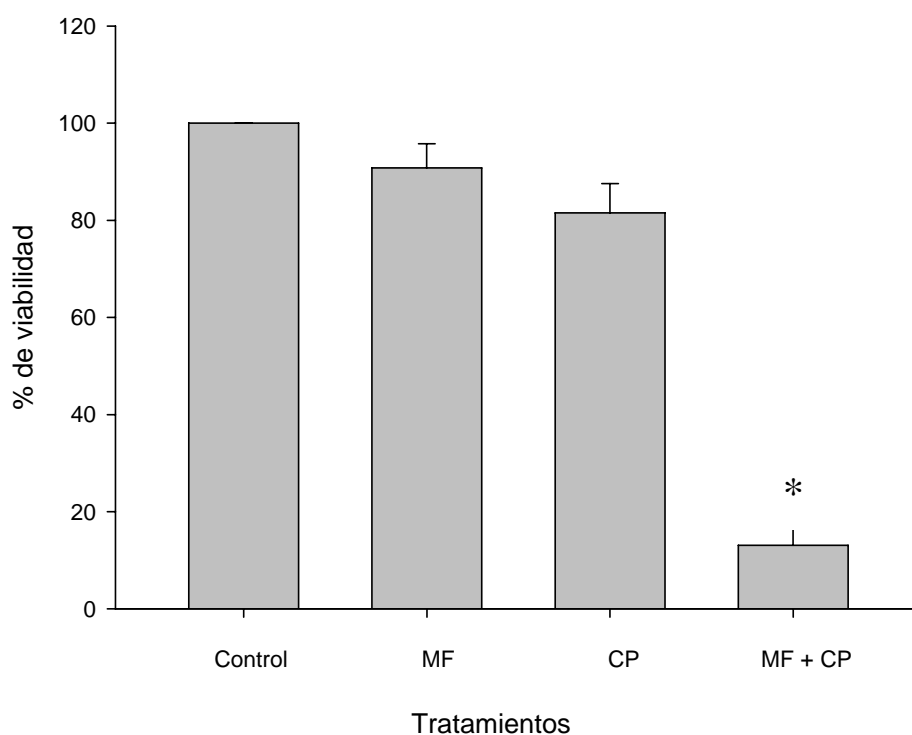


Figura 5. Viabilidad de células HeLa tratadas con mifepristona, (MF 10 $\mu$ M) cisplatino (CP 7.5  $\mu$ M) o la combinación. La citotoxicidad se expresa como el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \* P $\leq$  0.05 para la combinación vs CTRL, MF, CP, utilizando una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tuckey.

La viabilidad se evaluó también con el método de cristal violeta (Figura 6) y se observó un comportamiento similar al obtenido con el método XTT, es decir, los tratamientos individuales de mifepristona y cisplatino no modificaron la viabilidad celular, mientras que la combinación la disminuyó en un 76%.

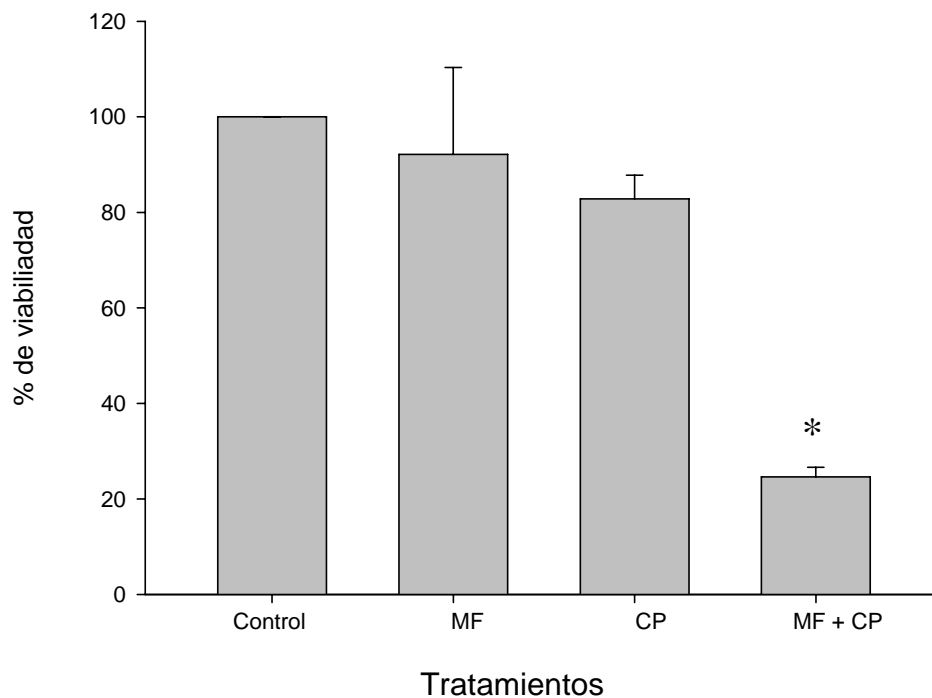


Figura 6. Viabilidad de células HeLa tratadas con mifepristona, cisplatino o la combinación. La citotóxicidad se expresa como el porcentaje de inhibición de la viabilidad de estas células sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 7.5  $\mu$ M y la combinación). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar. \*  $P \leq 0.05$  para la combinación vs CTRL, MF, CP, utilizando una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tuckey.

En la figura 7 se muestran los resultados de la inhibición celular evaluada con el método de XTT en la línea celular CaSki. El tratamiento con mifepristona no modificó significativamente la viabilidad celular, la administración de cisplatino disminuyó la viabilidad celular en un 40%; sin embargo, la combinación de los tratamientos inhibió de manera significativa la proliferación celular en un 70%.

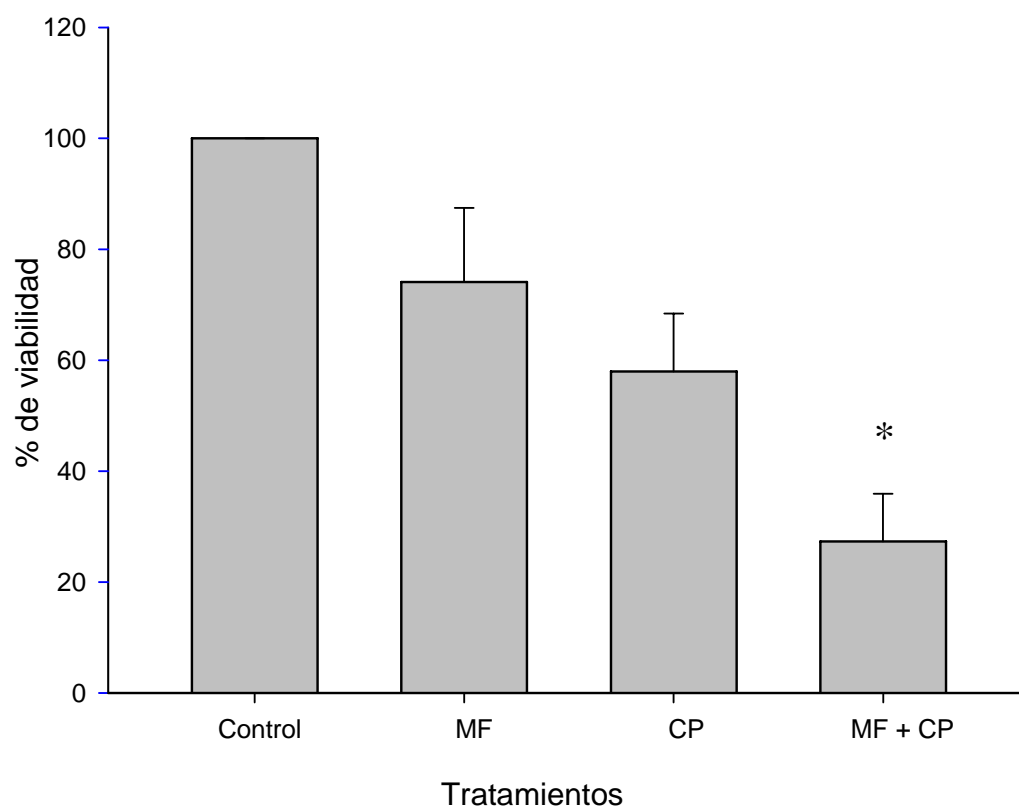


Figura 7. Viabilidad de células CaSki tratadas con mifepristona, cisplatino o la combinación. La citotoxicidad se expresa como el porcentaje de inhibición de la viabilidad de estas células sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 12.5  $\mu$ M y la combinación). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar. Se realizó una prueba de ANOVA \* P $\leq$  0.05 para la combinación vs CTRL, MF.

Cuando se midió la viabilidad celular por el método de cristal violeta se observó que los tratamientos individuales de mifepristona y cisplatino disminuyen la viabilidad celular en un 35%, mientras que la combinación muestra una disminución mayor, de aproximadamente un 50% (Figura 8).

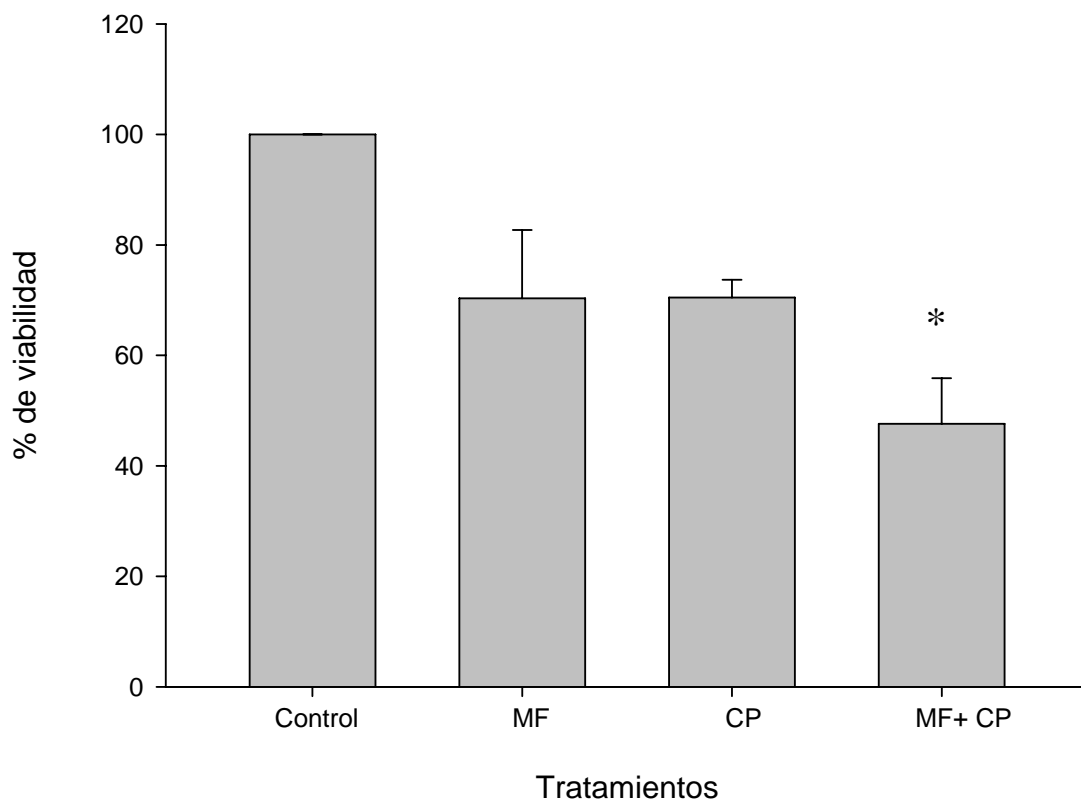
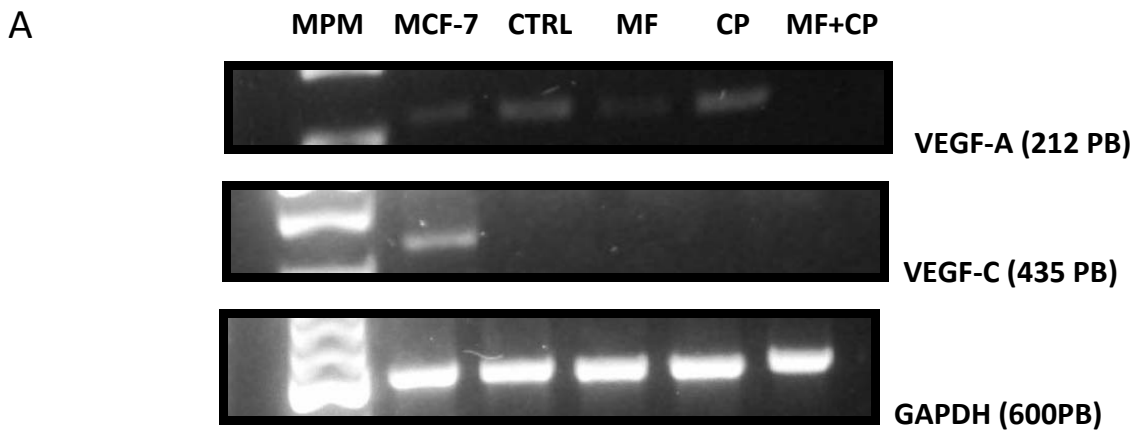


Figura 8. Viabilidad de células CaSki tratadas con mifepristona, cisplatino o la combinación. La citotóxicidad se expresa como el porcentaje de inhibición de la viabilidad de estas células sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 12.5  $\mu$ M y la combinación). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar. Se realizó una prueba de ANOVA \*  $P \leq 0.05$  para la combinación vs CTRL, MF, CP.

## 6.2 Efecto de MF en combinación con CP sobre los niveles de expresión del gen VEGF

El efecto de la mifepristona, cisplatino o la combinación sobre la expresión de los genes VEGF-A y VEGF-C en las células HeLa se analizó a través del ensayo RT-PCR (Figura 9). Nuestros resultados indican que el gen VEGF-C no se expresa en células HeLa, mientras que el gen VEGF-A muestra una expresión baja en el grupo control y esta expresión es similar tanto en el tratamiento con mifepristona como en el de cisplatino; sin embargo, con el tratamiento combinado de mifepristona y cisplatino la expresión del gen no fue detectada.



B

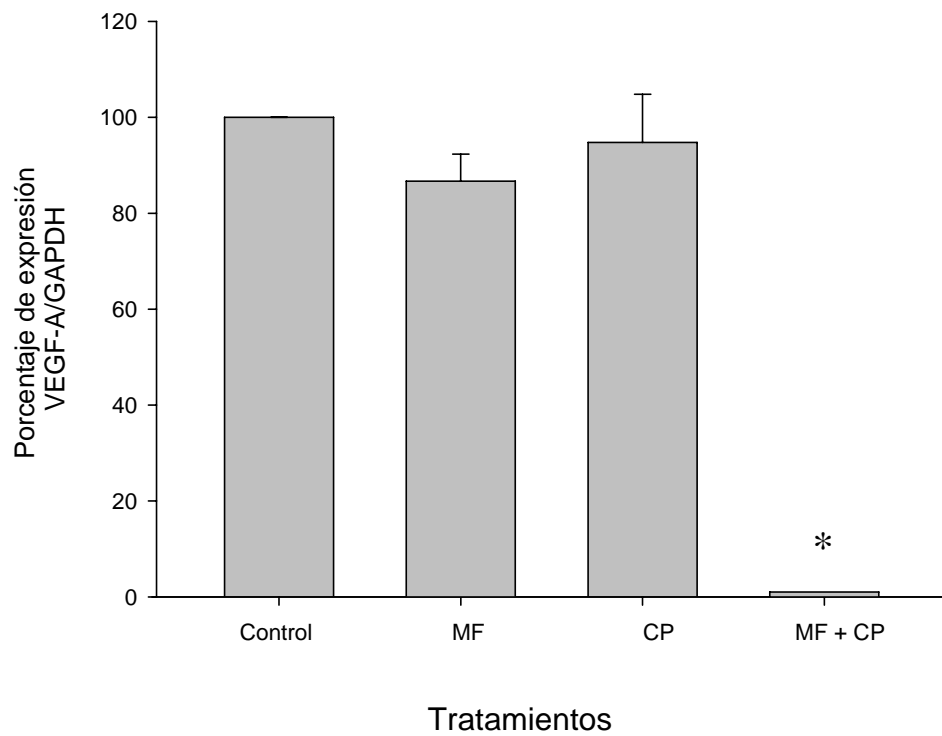


Figura 9. (A) Expresión de los genes VEGF-A y VEGF-C en células HeLa sometidas a los distintos tratamientos (MF 10  $\mu$ M, CP 7.5  $\mu$ M y la combinación) utilizando el método RT-PCR. (B) Los resultados fueron evaluados semi-cuantitativamente al calcular la relación de la expresión del gen VEGF-A con respecto a la expresión del gen GAPDH. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \* P= 0.05 para la combinación vs CP, MF, CTRL; utilizando una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tuckey.

En células CasKi se observó que la mifepristona, cisplatino o la combinación no modifican la expresión del gen VEGF-A (Figura 10), mientras que la expresión de VEGF-C disminuye cuando se aplica la combinación de los tratamientos con respecto a los tratamientos individuales (Figura 11).

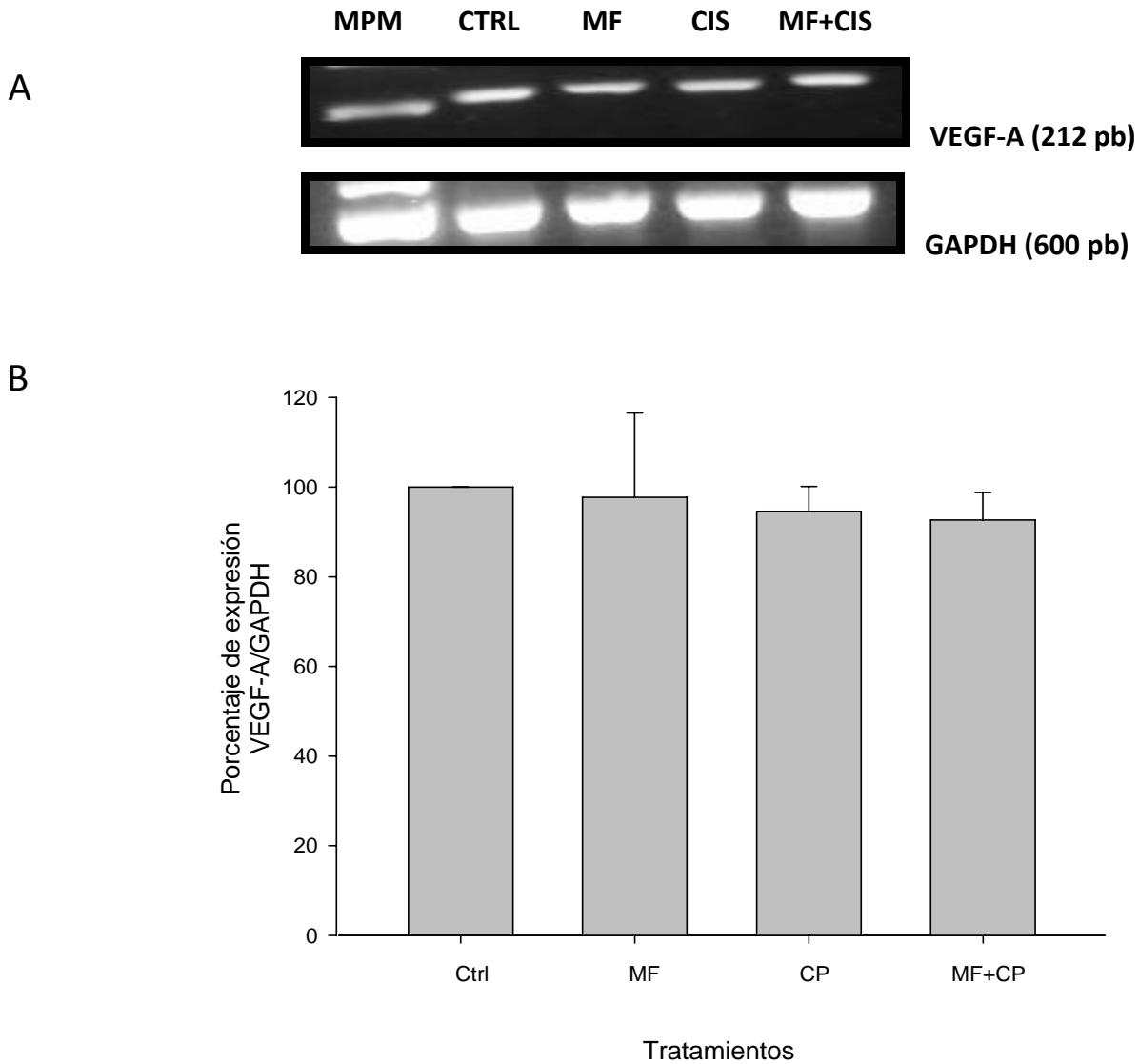


Figura 10 (A) Expresión del gen VEGF-A en células sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 12  $\mu$ M y la combinación) utilizando el método RT-PCR. (B) Los resultados fueron evaluados semi-cuantitativamente al calcular la relación de la expresión del gen VEGF-A con respecto a la expresión del gen GAPDH. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar (n=3).

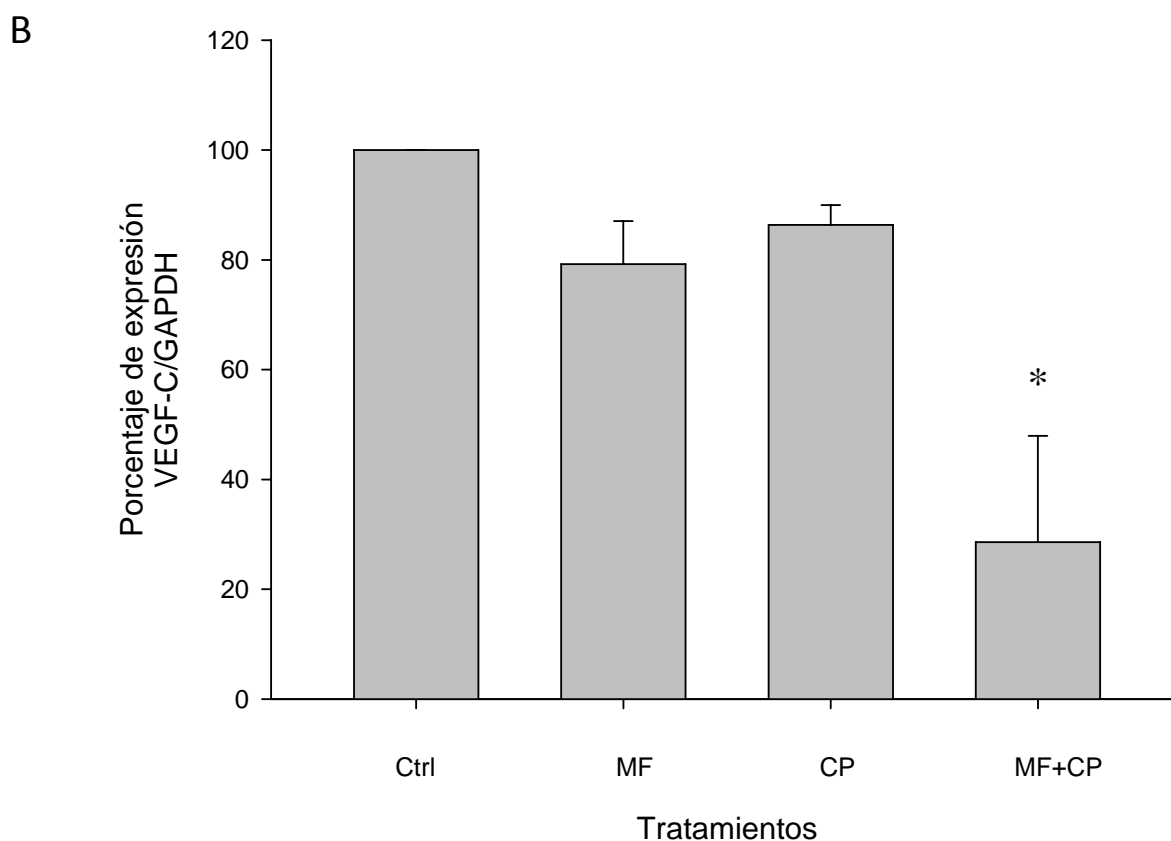
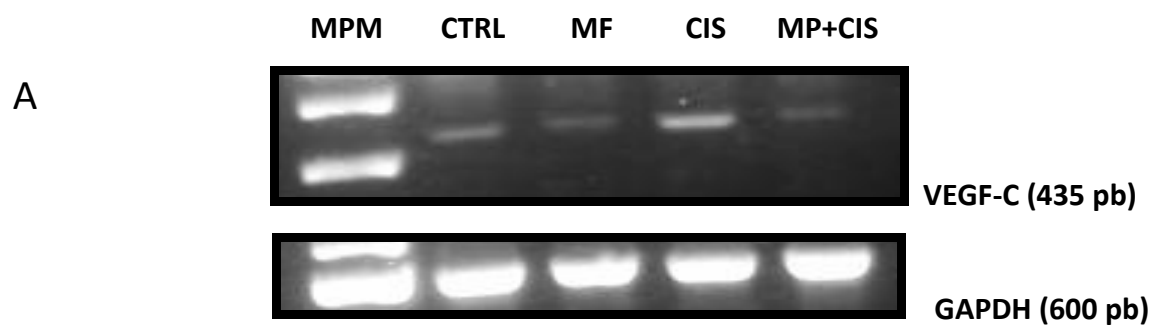


Figura 11. (A) Expresión del gen VEGF-C en células sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 12  $\mu$ M y la combinación) utilizando el método RT-PCR. (B) Los resultados fueron evaluados semi-cuantitativamente al calcular la relación de la expresión del gen VEGF-C con respecto a la expresión del gen GAPDH. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar (n=3). \*  $P \leq 0.05$  para la combinación vs CP, MF, CTRL; utilizando una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Newman-Keuls.



### 6.3 Efecto de MF, CP y su combinación sobre la concentración del VEGF secretado en células HeLa y CaSKi

En células HeLa se observa que el tratamiento de mifepristona disminuye los niveles la concentración de la proteína VEGF secretada con respecto al control; sin embargo, esta disminución fue significativamente mayor en el tratamiento combinado (Figura 12). El tratamiento de cisplatino no disminuye la concentración de la proteína VEGF secretada.

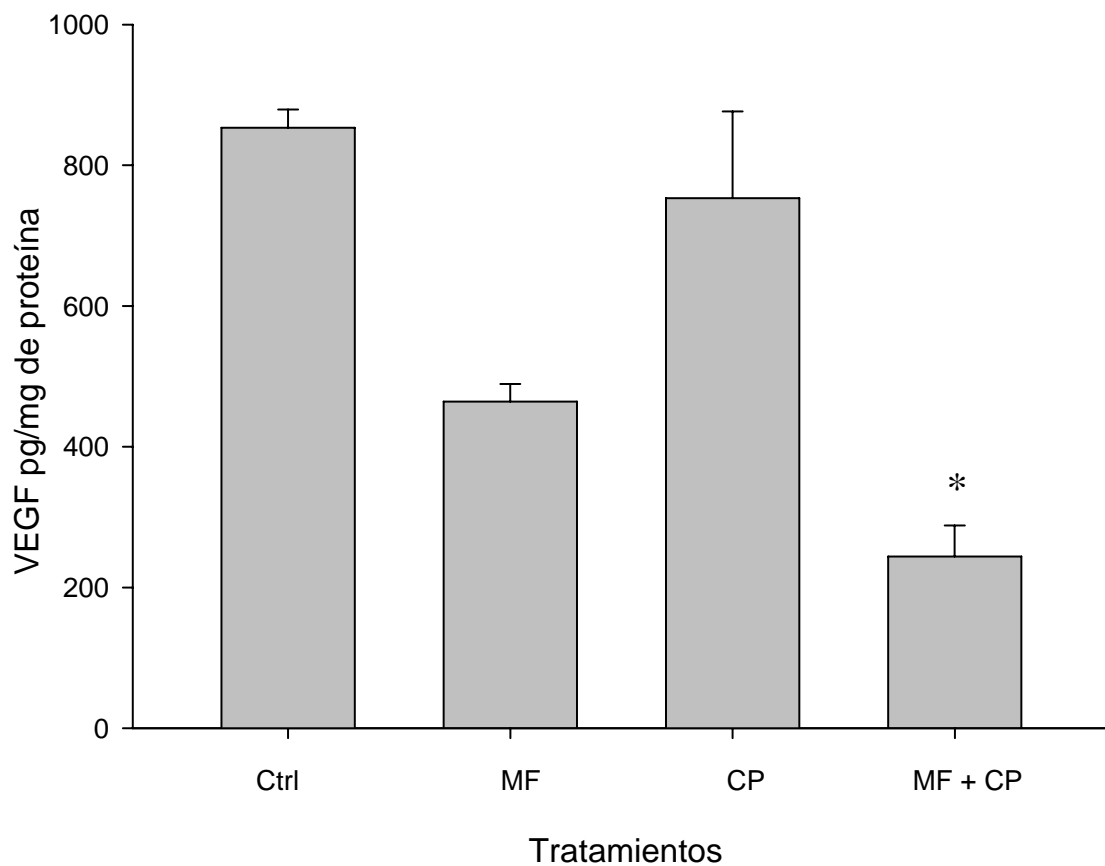


Figura 12. Concentración del VEGF secretado al medio de células HeLa sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 7.5  $\mu$ M y la combinación). La determinación se realizó por un ensayo de ELISA y se normalizó con respecto a concentración de proteína total. Los valores representan la media  $\pm$  e.e (n= 3) \*P $\leq$  0.05 para la combinación vs CTRL, CP, utilizando una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tuckey.

En células CaSki se observa que tanto los tratamientos individuales como la combinación disminuyen de manera significativa la cantidad de VEGF secretado por las células tumorales con respecto al control (Figura 13).

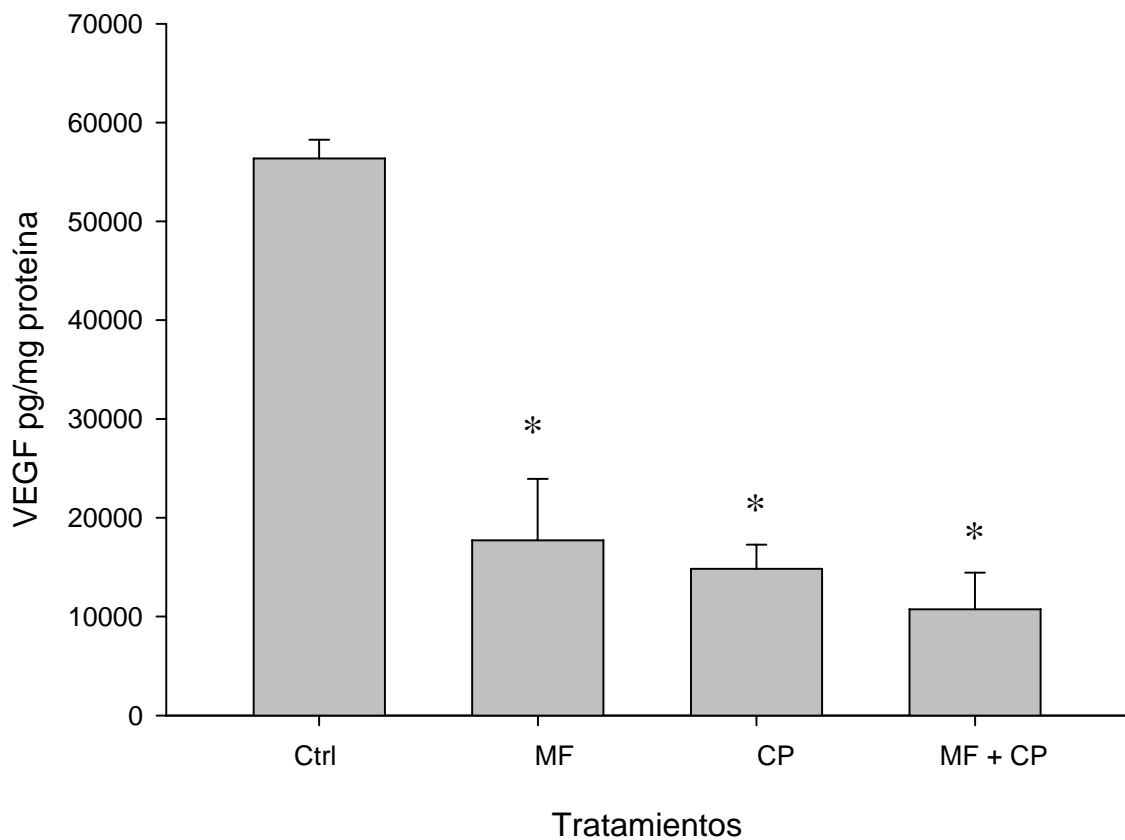


Figura 13. Concentración del VEGF secretado al medio de células CaSki sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 12  $\mu$ M y la combinación). La determinación se realizó por un ensayo de ELISA y se normalizó con respecto a concentración de proteína total. Los datos representan la media  $\pm$  e.e (n= 3) \*P $\leq$  0.05 para el CTRL vs MF, CP y la combinación; utilizando una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tuckey.

## 6.4 Cuantificación del VEGF en un modelo experimental de CaCU después del tratamiento de mifepristona y cisplatino

La determinación del VEGF en un modelo experimental, demuestra que la concentración de la proteína en el líquido extracelular de tumores de cérvix, disminuye después de un tratamiento combinado de CP y MF con respecto al tratamiento único de cisplatino (Figura 14).

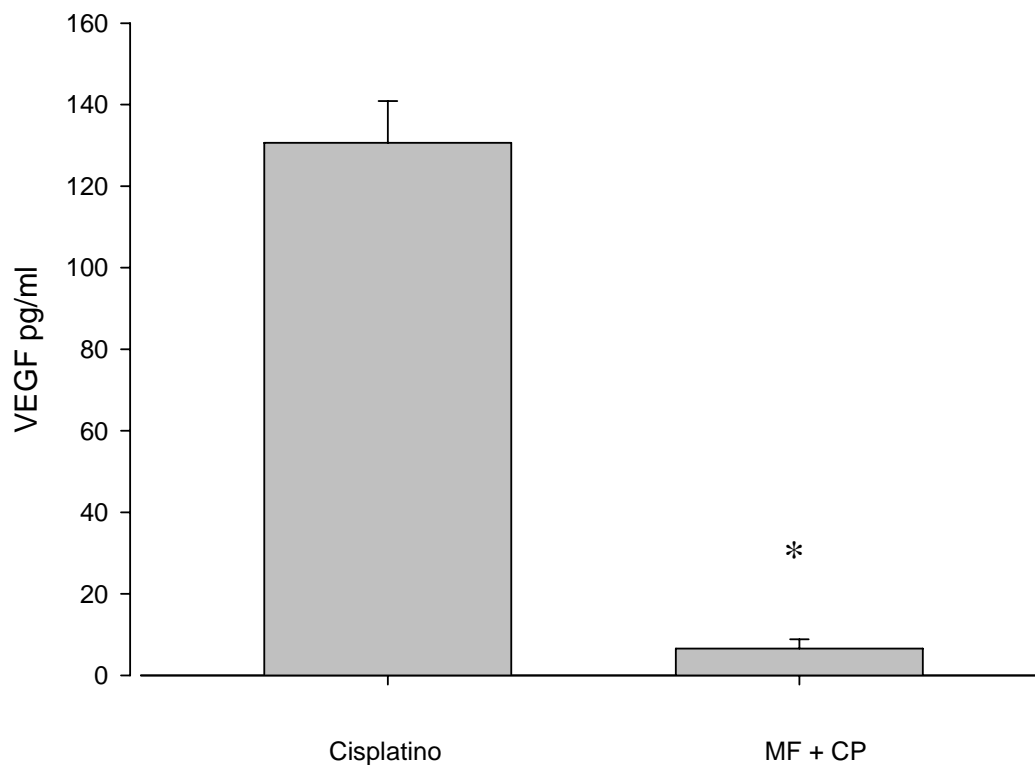


Figura 14. Concentración del VEGF extracelular en dializados de tumores de cérvix desarrollado en ratones atímicos y tratados con cisplatino (3mg/kg/día x 1 día. I.P) y MF (2mg/Kg/día x 4 días) combinado con CP a la misma concentración. La concentración del VEGF fue analizada mediante un ensayo de ELISA. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  e.e. (CP n=2), (CP + MF n=4). \*P $\leq$  0.05 para la combinación vs CP. Utilizando una prueba de T.

## 6.5 Efecto de MF en combinación con CP sobre la expresión del gen E6

En células HeLa se observó que mifepristona y cisplatino no modifican la expresión del gen E6, mientras que su combinación disminuye su expresión de manera significativa con respecto a los tratamientos individuales y al control (Figura 15).

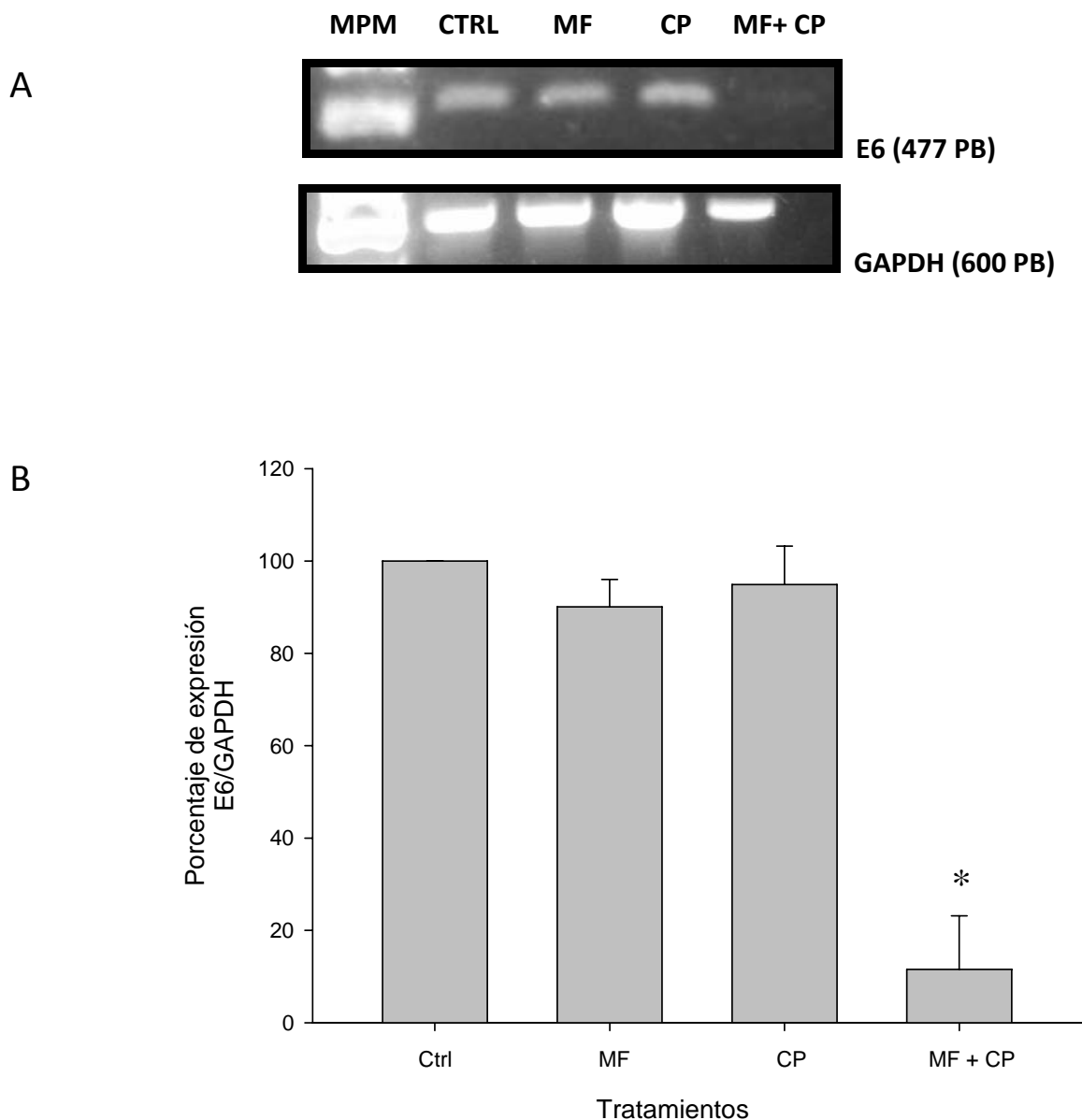


Figura 15. (A) Expresión del gen E6 en células sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 7.5  $\mu$ M y la combinación) utilizando el método RT-PCR. (B) Los resultados fueron evaluados semi-cuantitativamente al calcular la relación de la expresión del gen E6 con respecto a la expresión del gen GAPDH. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar (n=3).  $P \leq 0.05$  para la combinación vs CTRL, CP, MF, utilizando una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tuckey.

Nuestros resultados en células CaSki muestran que los tratamientos individuales disminuyen moderadamente la expresión del gen E6; sin embargo, la disminución fue mayor con el tratamiento combinado (Figura 16).

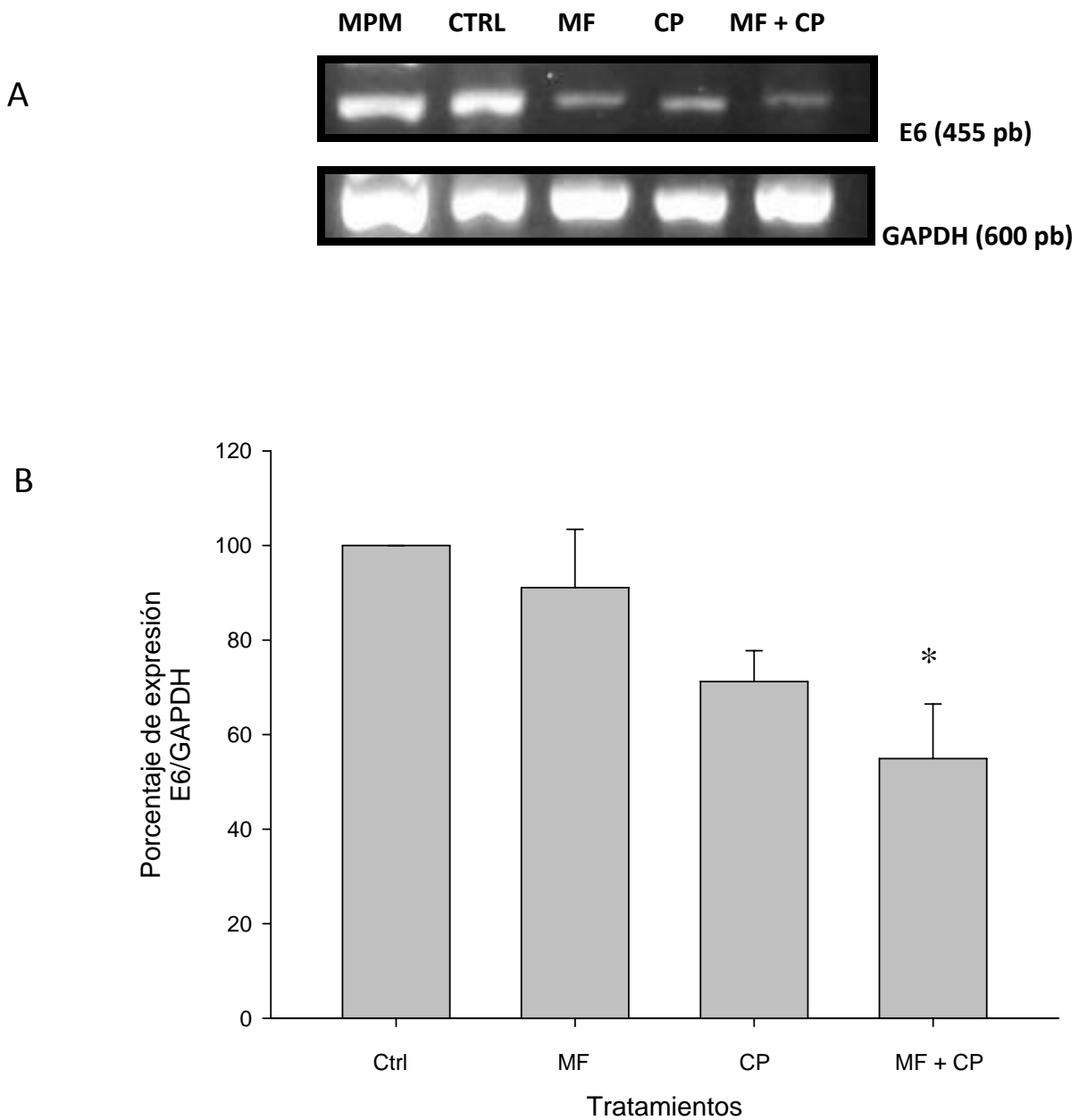


Figura 16. (A) Expresión del gen E6 en células sometidas a los distintos tratamientos (MF 10 $\mu$ M, CP 7.5  $\mu$ M y la combinación) utilizando método RT-PCR. (B) Los resultados fueron evaluados semi-cuantitativamente al calcular la relación de la expresión del gen E6 con respecto a la expresión del gen GAPDH. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar \*  $P \leq 0.05$  para la combinación vs CTRL, MF.

## 7 DISCUSIÓN

Las terapias actuales para el tratamiento de cáncer cervical avanzado incluyen el uso de cisplatino y su combinación con radioterapia u otros agentes quimioterapéuticos. Se cree que el mecanismo de acción del cisplatino es mediante la formación de uniones inter o intra-catenarias con el ADN culminando en la iniciación de la apoptosis. Los problemas asociados con la terapia de cisplatino incluyen desarrollo de resistencia y efectos secundarios de los cuales los más importantes son la neurotoxicidad y la nefrotoxicidad. A pesar de lo anterior, el cisplatino continúa siendo el tratamiento más eficaz para el cáncer cervical; por lo cual, la búsqueda de nuevos fármacos o regímenes en combinación con el cisplatino son necesarios para incrementar su actividad tumoral y disminuir sus efectos secundarios.

En el presente estudio, se evaluó el efecto del agente anti-progestágeno mifepristona sobre la citotoxicidad y la actividad antiangiogénica de cisplatino en dos líneas celulares de cáncer cervical (HeLa VPH-18 y CaSki VPH-16) con cisplatino y mifepristona así como su combinación. Cabe señalar que las dosis utilizadas de cisplatino para ambas líneas celulares, fueron lo suficientemente bajas que al ser aplicadas de manera individual no mostraron efectos significativos sobre la citotoxicidad. En el caso de mifepristona, la dosis de 10  $\mu\text{M}$  representa la dosis farmacológica; además, en estudios previos se ha demostrado que esta dosis funciona como quimiosensibilizante (Qin and Wang 2002).

Nuestros resultados indican que la combinación de los tratamientos cisplatino, mifepristona disminuyó el porcentaje de viabilidad celular de manera significativa, en ambas líneas analizadas con respecto al control y a los tratamientos individuales de mifepristona y cisplatino.

La mifepristona se ha empleado para modular la actividad citotóxica de fármacos como la doxorrubicina, paclitaxel, cisplatino y otros agentes antineoplásicos, principalmente en cánceres hormono-dependiente (mama, próstata, ovario); sin embargo, no se ha demostrado su eficacia en la modulación de los efectos citotóxicos de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer cervical. Nuestros resultados concuerdan con reportes en la literatura en los cuales se demuestra que la mifepristona produce un

aumento de la quimiosensibilidad hacia el cisplatino en una línea celular de cáncer de ovario (COC1) que expresa receptores a progesterona (RP+); en el mismo estudio se observa también que el porcentaje de inhibición en el tratamiento combinado (mifepristona más cisplatino) es mayor que en el tratamiento de cisplatino solo (Qin and Wang 2002); sin embargo, en las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo (HeLa y CaSki), la expresión de receptores a progesterona es baja comparada con la expresión en células de cáncer de mama MCF-7 (García-López et al, 2004), así que probablemente el mecanismo por el cual mifepristona actúa como un agente quimiosensibilizante sea independiente de receptores de estrógenos y progesterona; uno de los mecanismos propuestos podría ser un efecto mediado por receptores a glucocorticoides los cuales se expresan en las líneas celulares estudiadas, además dichos receptores participan en la quimiosensibilidad y proliferación celular (Lu et al, 2005).

Los receptores a glucocorticoides al unirse con su ligando, son traslocados al núcleo y pueden interactuar con el ADN, inducir la transcripción de genes que contengan elementos de respuesta a glucocorticoides e incluso desencadenar mecanismos de apoptosis. (Dvorak et al, 2006). Estudios *in-vitro* e *in-vivo* han demostrado que mifepristona induce arresto y muerte celular por medio de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en líneas celulares de cáncer de mama que son positivas a receptores de estrógenos y progesterona y además son resistentes a una terapia antiestrogénica (Gaddy et al, 2004).

Por otra parte se ha reportado que las hormonas pueden inducir efectos fisiológicos tales como síntesis y expresión de ciclinas, de manera independiente a sus receptores, lo cual sugiere que una gran cantidad de células pueden responder a hormonas aún en ausencia de receptores (Marino et al, 2002). Lo anterior podría ser un mecanismo para explicar la quimiosensibilidad del cisplatino después de la exposición a mifepristona en células HeLa y CaSki.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que mifepristona incrementa tanto las concentraciones intracelulares de cisplatino en una línea de CaCU como las concentraciones intratumorales en un modelo experimental; así que mifepristona a 10  $\mu$ M incrementa la retención del cisplatino *in-vitro* e *in-vivo*. Además, algunos antagonistas como tamoxifeno y toremifeno interfieren con la función de la

glicoproteína P (P-gp, una proteína de membrana cuya función es expulsar diversos compuestos al exterior de la célula), dichos antagonistas se caracterizan por su hidrofobicidad y la presencia de anillos fenilo (Haity, 1992) característica que también presenta mifepristona, por lo que se sugiere que el efecto sensibilizante de la mifepristona al tratamiento quimioterapéutico puede deberse a la inhibición de la función de P-gp mediante el bloqueo de sitios de unión de la proteína; un mecanismo de acción que ya se ha demostrado para otros agentes quimiosensibilizantes (Ford y Hait, 1990).

Por otro lado, el incremento en la angiogénesis se ha correlacionado con la progresión tumoral y la metástasis en diversos cánceres incluidos los carcinomas cervicales (Branca et al, 2006; Kodama et al, 1999; Cheng et al, 2000); la angiogénesis se asocia con displasias cervicales de alto grado y carcinomas invasivos de células escamosas del cuello uterino; por lo cual, la presencia de anomalías en la vasculatura es una herramienta útil en la detección colposcópica de este tipo de lesiones (Stafil y Mattingly, 1975; Smith-McCune y Weidner, 1994; Loncaster et al, 2000). El incremento en la expresión del VEGF parece estar asociado con la angiogénesis en carcinomas cervicales ya que existe una correlación positiva entre los niveles del VEGF y el tamaño del tumor (Wen-Fang et al, 1999).

Los trabajos que han estudiado el efecto de agentes antineoplásicos sobre la expresión del VEGF en tumores ginecológicos son escasos; así que en el presente estudio se evaluó el efecto de mifepristona, cisplatino y su combinación sobre la expresión y la producción del VEGF en células HeLa y CaSki. Nuestros resultados demuestran que la expresión de los distintos tipos del gen VEGF difiere entre líneas celulares. En células HeLa un tratamiento de cisplatino combinado con mifepristona disminuyó la expresión y secreción del VEGF-A con respecto a los tratamientos individuales; mientras que el gen VEGF-C no se expresa en células HeLa, en células CaSki se expresan ambos.

En células CaSki, la expresión del gen VEGF-A no se ve modificada por ninguno de los tratamientos; sin embargo, la expresión del VEGF-C disminuye con la combinación. La concentración extracelular del VEGF-A se altera en cada uno de los tratamientos con respecto al control, lo cual sugiere que el mecanismo podría estar a un nivel post-transcripcional.



Diversos estudios sugieren que el gen VEGF-C es un marcador específico para las neoplasias intraepiteliales (NIC), además las células tumorales que secretan VEGF-C poseen una mayor capacidad invasiva y metastásica debido no sólo a su capacidad de pasar a través de las barreras tisulares; sino también a su capacidad de estimular el endotelio linfático lo cual conlleva a la expansión tumoral (Branca et al, 2006; Koji et al, 2005; Masatsugu et al, 2001).

Se ha reportado que cisplatino a dosis elevadas reduce las concentraciones del VEGF en líneas celulares de cáncer de ovario, mediante la inhibición de la actividad del factor inducible de hipoxia (HIF-1), el cual es un potente regulador del VEGF (Xiao-Song Zhong et al, 2007; Duyndam MCA et al, 2007). Además se ha demostrado el efecto inhibitorio de los glucocorticoides (mediante su unión a receptores de glucocorticoides) sobre la angiogénesis y la linfangiogénesis en células de cáncer de próstata y queratinocitos; en dichos trabajos la mifepristona es utilizada como un antagonista de receptores a glucocorticoides, mostrando inhibición del efecto anti-angiogénico sólo cuando es administrada junto con éstos (dexametasona, hidrocortisona, 5 $\alpha$ -dihidrocortisona). Sin embargo, mifepristona administrada como agente único, no modifica la expresión de VEGF-A ni de VEGF-C en líneas celulares de cáncer de próstata (Yano et al 2006 (a); Yano et al, 2006 (b)). También se ha demostrado que mifepristona actúa bloqueando los elementos de respuesta a glucocorticoides contenidos en diversos genes mediante la alteración de sus receptores durante la etapa de transformación; no obstante, existen complejos mifepristona-RG que son capaces de unirse al ADN y se ha demostrado que mifepristona revierte sólo parcialmente la supresión de la actividad del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). La región promotora del VEGF-C presenta un elemento de respuesta para NF- $\kappa$ B con lo cual regula su transcripción (Chilov et al, 1997). Al igual que los glucocorticoides, la mifepristona ejerce un efecto inhibitorio del VEGF-C, mediando la supresión de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, aunque en menor grado.

Aunque el mecanismo molecular que gobierna la expresión del VEGF aún no ha sido bien caracterizado, se ha reportado la regulación de su expresión por diversas citocinas existen citocinas que. De esta forma, la expresión *in-vivo* de la interleucina 6 (IL-6) participa en la vascularización en tejidos reproductivos e incluso en el crecimiento tumoral, por lo que se ha sugerido su participación durante el proceso

angiogénico (Motro, 1990; Hirano et al, 1990). Cohen et al (1996) reportaron que la IL-6 promueve la angiogénesis induciendo la expresión del VEGF, mediante elementos específicos de ADN localizados en regiones promotoras de éste factor.

En un estudio realizado por Lu et al (2001), se demuestra que la mifepristona inhibe la secreción de la IL-6 en células ectópicas de endometrio.

El efecto de la combinación del tratamiento de mifepristona y cisplatino sobre la expresión del gen VEGF, podría ser explicado parcialmente por alguno de los mecanismos antes mencionados; además, tomando en cuenta el efecto quimiosensibilizante de la mifepristona, podríamos también proponer que el efecto de cisplatino sobre la modulación del gen VEGF sea mayor en presencia de mifepristona.

Estudios previos han reportado una posible correlación entre la expresión del VEGF y virus del papiloma humano (VPH's) de alto riesgo en neoplasias intraepiteliales de bajo grado (Branca et al, 2006; Branca et al, 2006; Cheng et al, 2000; Kodama et al, 1999) y se ha propuesto que la capacidad transformante de los oncogenes E6 y E7 podría actuar en la sobre-expresión de moléculas pro-angiogénicas que se requieren para la progresión hacia un fenotipo tumorigénico *in vivo* (López-Ocejo et al 2000) así como en la sobre expresión de VEGF en líneas de cáncer cervical (Bequet, 2000; Toussaint et al, 2004). El 99.7% de los carcinomas cervicales invasivos alrededor del mundo contienen y expresan ADN de VPH (Herrington, 1999; Walboomers et al, 1999), siendo los más comunes los tipos VPH 16 y VPH 18. Las proteínas tempranas E6 y E7 se expresan de manera continua en los tejidos de cánceres cervicales asociados a VPH, tejidos y líneas celulares derivadas de tumores cervicales (Androphy et al., 1987; Choo et al., 1987; Hawley-Nelson et al, 1989). Estas dos oncoproteínas pueden interactuar físicamente e inhibir dos proteínas reguladoras del ciclo celular, p53 y el producto del gen retinoblastoma pRB (Dyson et al., 1989; Werness et al, 1990).

Tomando en cuenta la importancia de estas oncoproteínas, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la combinación mifepristona y cisplatino sobre la expresión de la oncoproteína E6. Nuestros resultados demuestran que la combinación de tratamientos mifepristona cisplatino inhiben la expresión del gen E6 en células HeLa ésta es directamente proporcional a la expresión del gen VEGF-A; lo anterior concuerda con estudios reportados en la literatura los cuales señalan que la pérdida de la expresión de E6/VPH-18 inhibe la expresión del gen VEGF-A, lo que sugiere que E6/VPH-18 regula

de manera positiva la expresión de VEGF-A en células. La inducción indirecta de la expresión del gen VEGF por E6 podría involucrar factores regulatorios tales como HIF- $\alpha$ .

La expresión del gen E6 también se analizó en la línea celular CaSki (VPH-16) observando que al igual que en HeLa, la combinación mifepristona cisplatino disminuye la expresión de E6. Además, se observó que la expresión de E6 en CaSki es directamente proporcional a la expresión del gen VEGF-C; la expresión del VEGF-A no se ve afectada en ausencia o presencia de E6. Se sabe que la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 en queratinocitos y líneas celulares de cáncer cervical, incrementan la expresión del VEGF (Beckner, 1999). Diversos trabajos han indicado que E6 contribuye a la angiogénesis tumoral vía la estimulación directa del promotor del gen VEGF a través de sitios de unión Sp1, además, la expresión de E6 podría contribuir al menos en parte a la elevada expresión de HIF- $\alpha$  en cánceres cervicales, ya que se ha demostrado que la sobre-expresión de E6 y E7 promueven de manera significativa la acumulación de HIF- $\alpha$  y la subsecuente expresión del VEGF en células de cáncer cervical (López-Ocejo, 2000).

Para explicar el mecanismo por medio del cual la combinación de los tratamientos utilizados en el presente trabajo (MF+CP) modifica la expresión del gen E6 en ambas líneas celulares analizadas, se menciona el estudio realizado por Zhong y colaboradores (2007) en el cual se demuestra que cisplatino inhibe la activación transcripcional del VEGF en células de cáncer de ovario de una manera dosis dependiente, alcanzando su máxima inhibición a una dosis de 100  $\mu$ M; dicha inhibición requiere de un sitio de unión a HIF-1 en el ADN.

Liu y colaboradores (2008) demuestran que el cisplatino disminuye la expresión de E6, p53, p21, Bax y Bcl-2, por lo cual concluyen que el cisplatino puede inducir apoptosis en células HeLa a través de la supresión de E6 y restaurando la función de p53. Ravi et al (2000), demuestra que p53 inhibe la actividad de HIF mediante su ubiquitinización y degradación proteosomal; por lo tanto, la pérdida de p53 incrementa los niveles de hipoxia inducidos por HIF y aumenta la expresión del VEGF dependiente de HIF en células tumorales.

La expresión de E6 es controlada, entre otras, por una región regulatoria del VPH (URR), dicha región, contiene una serie de elementos de respuesta a glucocorticoides

(GREs) (Gloss et al, 1991). En presencia de glucocorticoides, los GREs incrementan la transcripción de E6/E7 aumentando tanto la proliferación celular como el crecimiento tumoral de células de cáncer cervical en ratones desnudos (Von Knebel et al 1991; Von Knebel et al, 1992). Tomando en cuenta lo anterior, la mifepristona podría estar bloqueando la transcripción de E6 mediante su unión a receptores de glucocorticoides. La activación post-traducciona que el VEGF puede presentar, claramente indica que además de su cuantificación a nivel génico o nivel de ARN es necesaria su cuantificación en el compartimiento en donde la proteína es biológicamente activa es decir, en el espacio extracelular; por lo cual, el estudio del VEGF en el modelo experimental de CaCU fue realizado mediante la técnica de microdialisis, la cual nos permitió obtener muestras de dializado en los cuales se cuantificó el VEGF secretado por las células tumorales. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos *in-vitro*, ya que la combinación de tratamientos de mifepristona y cisplatino disminuyen de manera significativa la concentración del VEGF en comparación con el tratamiento de cisplatino individual. El mecanismo por medio del cual la mifepristona y el cisplatino interactúan con el VEGF, aún es desconocido; sin embargo, en este estudio se demuestra que la combinación de tratamientos disminuye la expresión del gen VEGF en líneas celulares, así como la concentración de la proteína en un modelo *in-vitro* e *in-vivo*. Así que podemos sugerir que la combinación de tratamientos tiene un efecto a nivel transcripcional, traduccional e incluso post-traducciona.

En los últimos años, el tratamiento con inhibidores de la angiogénesis ha aumentado. El esquema de quimioterapia tradicional se basa en la administración de altas dosis de fármacos en un periodo de tiempo corto, con la finalidad de eliminar rápidamente a las células cancerosas. Dosis crónicas no son posibles debido a la alta toxicidad de estos fármacos. Los fármacos dirigidos a la angiogénesis generalmente son menos tóxicos y teóricamente pueden administrarse durante periodos más largos. Además el resultado de una terapia anti-angiogénica será mayormente un arresto en el crecimiento tumoral o la regresión hacia un tumor no vascularizado. Muchos de los agentes quimioterapéuticos tradicionalmente utilizados, pueden ser anti-angiogénicos cuando son administrados a dosis menores a las que se utilizan comúnmente en pacientes. En el 2000, Timoty Browder, Folkman y colaboradores, reportaron que el uso de ciclofosfamida, a dosis bajas durante un periodo de tiempo largo, resulta en la

inhibición de la angiogénesis y la regresión tumoral. Resultados similares fueron reportados al mismo tiempo por Robert Kerbel y colaboradores, quienes utilizaron una combinación de vinblastina a dosis bajas con un anticuerpo dirigido al receptor celular de la molécula pro-angiogénica VEGF-A.

A éste tipo de régimen se le ha denominado como terapia monotronómica y es actualmente el objetivo de numerosos estudios.

En la figura 17 se resumen los posibles mecanismos del cisplatino y la mifepristona sobre la expresión y concentración del VEGF en CaCU.

1) La mifepristona (MF) se une a receptores de glucocorticoides (RG) que se encuentran asociados a HSP90 en el citoplasma, la unión de MF a su receptor puede: inducir la liberación de HSP90 activando el complejo o estabilizar el complejo dejándolo en un estado inactivo. 2) El complejo MF-RG, se trasloca al núcleo en dónde puede unirse a sitios de unión a NF-kB en el promotor del VEGF limitando la actividad de este factor de transcripción y suprimiendo la expresión del VEGF. 3) MF también inhibe a la interleucina 6 (IL-6) evitando que se una a sus elementos de respuesta en el promotor del VEGF. Por otra parte, la MF puede activar algunas caspasas con lo cual se activa la cascada apoptótica; 5) además, puede unirse a la glicoproteína p (P-gp), interfiriendo con su función, lo cual resulta en el aumento de la concentración del cisplatino (CP) intracelular. 6) El CP por su parte, daña al DNA con lo cual la célula entra en apoptosis; 7) además puede inhibir a la oncoproteína E6, lo cual eleva los niveles de p53 y la entrada hacia apoptosis. 8) Se ha reportado que CP inhibe al factor inducible de hipoxia  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) una proteína importante en la activación transcripcional del VEGF. 9) La inhibición E6 por CP también puede a su vez suprimir a HIF- $\alpha$ , ya que E6 puede inhibir la actividad de ésta proteína.

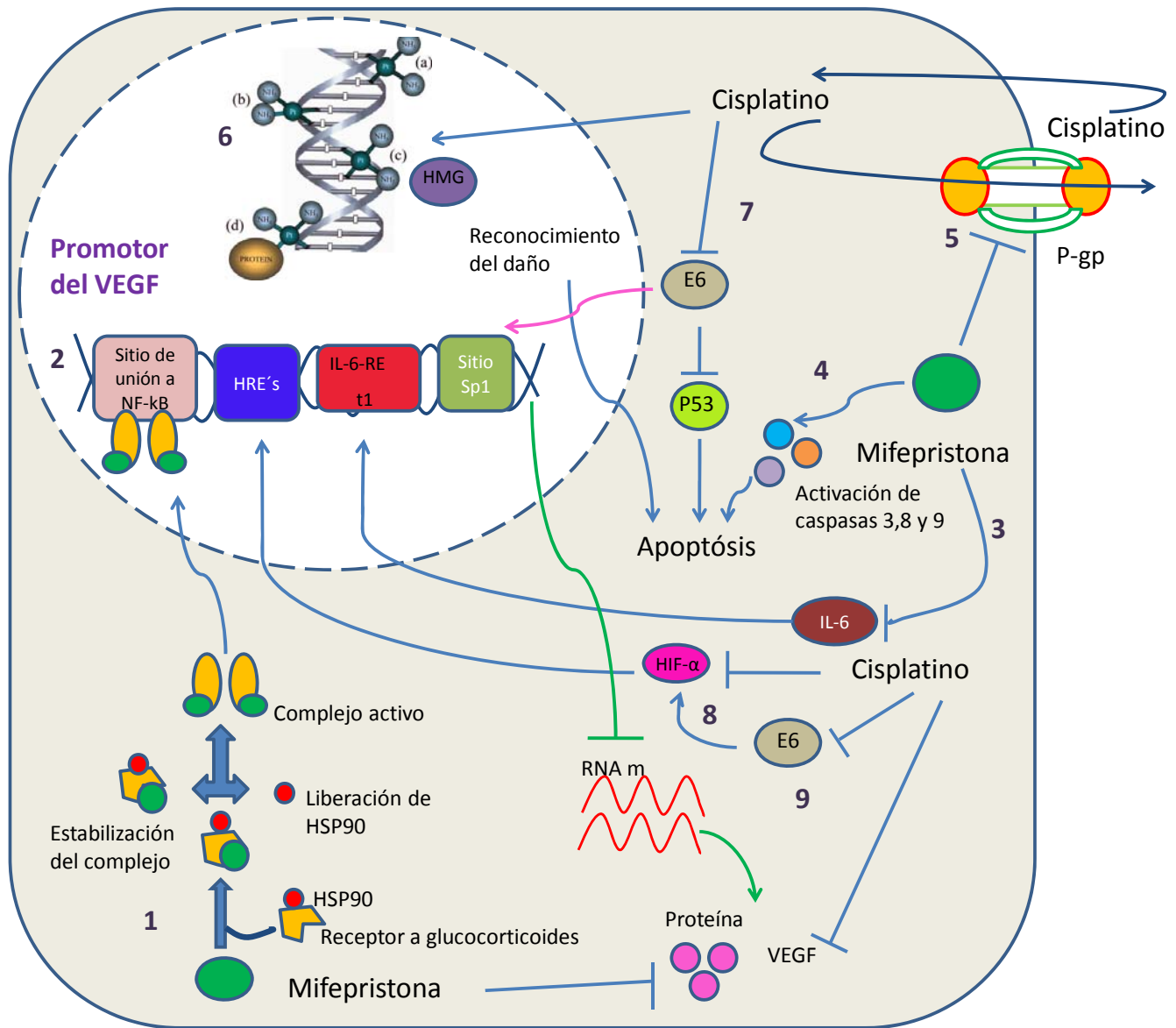


Figura 17. Posibles mecanismos del cisplatino y la mifepristona sobre la expresión y concentración del VEGF en cáncer cervical.

## 8 CONCLUSIÓN

Los genes VEGF-A y VEGF-C se expresan de manera diferente en las dos líneas celulares utilizadas, (HeLa VPH-18, CaSki VPH-16) lo cual podría explicarse por la presencia de distintos tipos de VPH. Mifepristona presentó un efecto anti-angiogénico al ser combinada con cisplatino de manera distinta entre ambas líneas celulares y en un modelo *in-vivo*. En este trabajo observó que la expresión del gen E6 se modifica con el tratamiento combinado de MF y CP. Aún faltan estudios para dilucidar el mecanismo por el cual se observa éste efecto; sin embargo, proteínas que influyen en la expresión del VEGF en cáncer de cérvix tales como E7, HIF- $\alpha$ , IL-6 y hormonas esteroideas entre otras, podrían tener una participación importante sobre la modulación del proceso anti-angiogénico. Mifepristona incrementó la citotóxicidad de cisplatino de manera sinérgica, las dosis empleadas en éste trabajo fueron lo suficientemente bajas que al ser aplicadas de manera individual no mostraron efectos sobre la citotóxicidad. Sin embargo, la combinación de los tratamientos mostró un efecto citotóxico de aproximadamente un 80%.

Es necesario realizar más estudios que nos permitan proponer la inclusión de la Mifepristona en el esquema convencional de Cisplatino utilizado en cáncer de cérvix, como un posible tratamiento anti-angiogénico en pacientes con cáncer avanzado. Sin embargo, el uso de dosis bajas de cisplatino y mifepristona podrían mejorar la eficacia del tratamiento de éste cáncer.

## 9 ANEXO

### Estandarización del método RT-PCR para los genes VEGF-A y VEGF-C

Se realizó una curva de ciclos con la finalidad de obtener el número de ciclos a los cuales cada uno de los genes se encuentra en la fase exponencial. Esto se realizó tanto para VEGF-A como para VEGF-C. En la figura 18, se muestra la curva de ciclos para VEGF-A y en la figura 19 para VEGF-C. Las condiciones obtenidas para la PCR fueron las siguientes: para VEGF-A un periodo inicial de desnaturalización de 96° por 3 minutos; 28 ciclos de 94° por 1 minuto (desnaturalización), 58° por 1 minuto (alineación), 72° por 2 minutos (ampliación) y un ciclo de 72° durante 10 minutos. Para VEGF-C las condiciones fueron las siguientes: 96° durante 3 minutos de desnaturalización inicial, 30 ciclos de 94° por 1 minuto (desnaturalización), 60° por 1 minuto (alineación), 72° por 2 minutos (adsmpliación) y un ciclo de 72° durante 10 minutos.

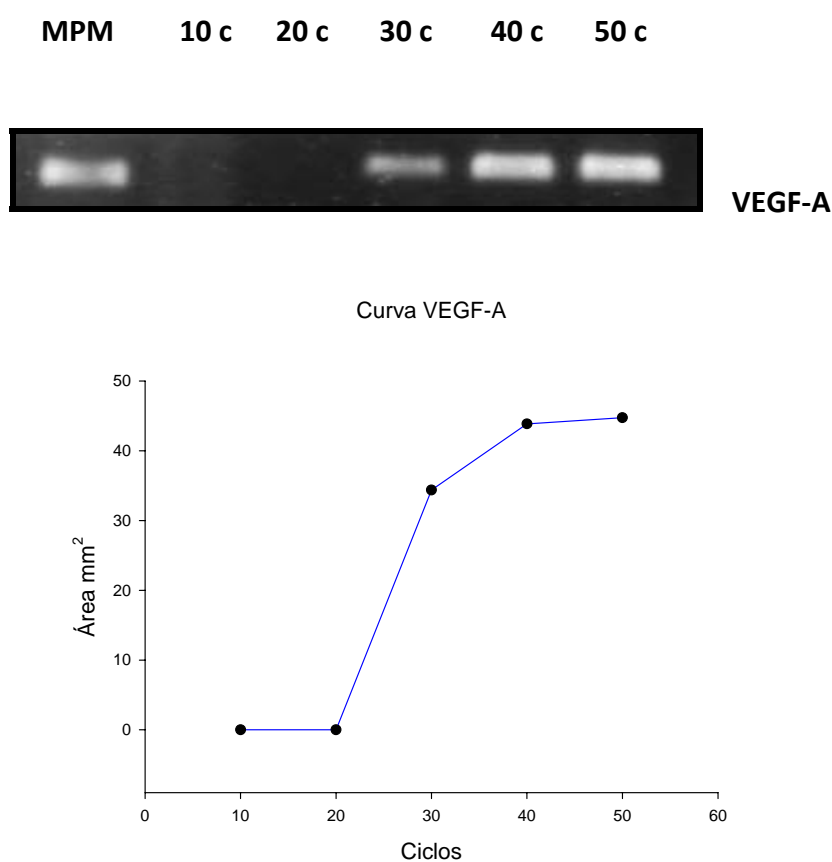


Figura 18. Curva de estandarización para el gen VEGF-A. Cada punto representa el tamaño de la banda (mm<sup>2</sup>) en un número de ciclos determinado.



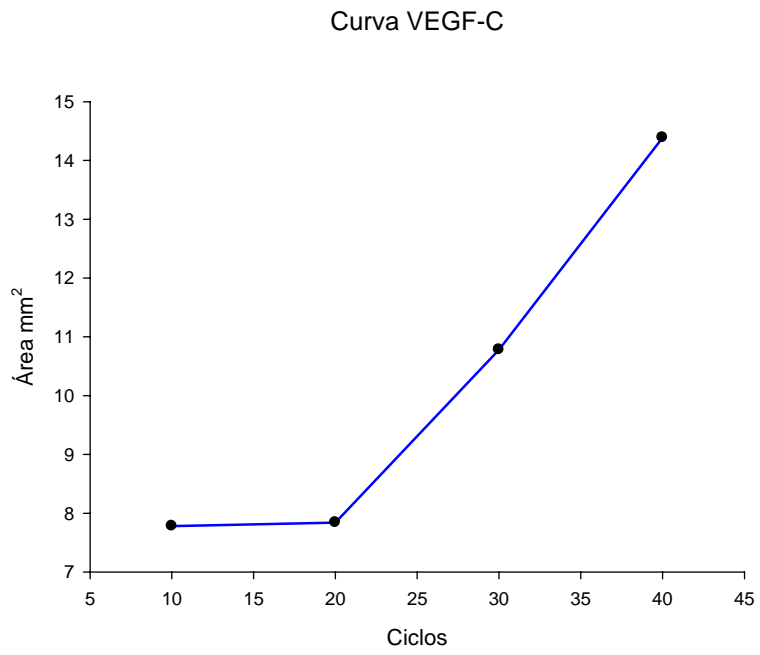
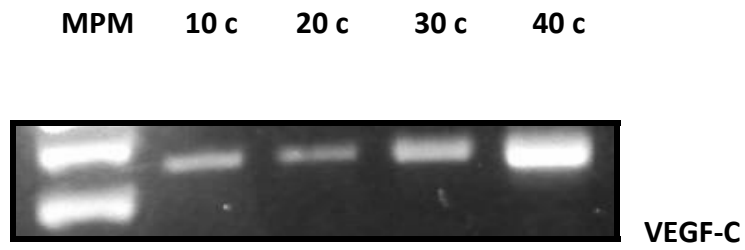


Figura 19. Curva de estandarización para el gen VEGF-C. Cada punto representa el tamaño de la banda (mm<sup>2</sup>) en un número de ciclos determinado.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez AA, Krigman HR, Whitaker RS, Dodge RK, Rodriguez GC. The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5(3).
- Banks L, Spence P, Androphy E, Hubbert N, Matlashewski G, Murray A, Crawford L. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J Gen Virol*. 1987; 68 (Pt 5).
- Baulieu E-E. Contragestion and other clinical applications of RU486, an antiprogestosterone at the receptor. *Science*. 1989; 245 (4924).
- Beckner ME. Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Investig*. 1999; 17.
- Bequet-Romero M, López-Ocejo O. Angiogenesis modulators expression in cultura cell lines positive for HPV.16 oncoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277.
- Brake T and Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102 (7).
- Branca M, Gioggi C, Santini D, et al. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59.
- Brogden RN, Goa KL, Faulds D. Mifepristone: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs*. 1993; 45.
- Browder, T. *et al*. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* .2000; 60.
- Bruce RZ. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(8).
- Burd E M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003 (16); 1.

- C. Diane, D'Amore AP, Endothelial Cells and Pericytes in Tumor Vasculature En: Voest EE. Tumor Angiogenesis and Microcirculation. Marcel Dekker, Inc. New York; 2001: 1-9.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease, and medicine. *Nature*. 2005; 438 (7070).
- Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Mol Pathol*. 2002; 55 (1).
- Chilov D, Kukk E, Taira S, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem*. 1997; 272.
- Clere N, Bermont L, Fauconnet S, Lascombe I, Saunier M, Vettoretti L, Plissonnier ML, Mougin C. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp Cell Res*. 2007; 313 (15).
- Chaplin DJ and Dougherty GJ. Tumour vasculature as a target for cancer therapy. *Br J Cancer*. 1999; 80 Suppl 1.
- Chellapan S, Kraus VB, Kroger B et al. Adenovirus, E1A, simian virus 40 tumor antigen and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between the transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89.
- Chenh WF, Chen CA, Lee CN, Wei LH, Hseih FJ, Hsieh CY. Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* 2000; 96.
- Choo KB, Pan CC, Han SH. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and de E6/E7 open reading frames. *Virology*. 1987; 75.
- Chu G. Cellular responses to cisplatin, the roles of dna.-binding proteins and dna repair. *J Biol Chem*. 1994 (269); 2.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G y Levi BZ. Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1996; 271.

- Dabrosin C, Margetts PJ, y Gauldie J. Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. *Int J Cancer*. 2003; 107(4).
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF and Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999; 237.
- Dvorak H, Brown L, Detmar M, Dvorak A. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995; 146(5). Review.
- Dvorak Z, Vrzal R, Patrick Maurel, Jitka Ulrichova. Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF-kappaB in HeLa cells. *Chem Biol Interact*. 2006; 159..
- Duyndam MCA, Van Berkel MPA, Dorsman JC, Rockx DAP, Pinedo HM, Boven E. cisplatin and doxorubicin repress vascular endothelial growth factor expression and differentially down-regulate hypoxia-inducible factor I activity in human ovarian cancer cells. *Biochem Pharm*. 2007; 74.
- Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243(4893).
- El Etreby MF, Liang Y, Wrenn RW, Schoenlein PV. Additive effect of mifepristone and tamoxifen on apoptotic pathways in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 1998; 51(2).
- Eastman A. The mechanism of action of cisplatin: From adducts to apoptosis, in *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (Bernhard Lippert ed) pp 111-134, Wiley-VCH, Basel, Suiza.
- Eckhardt SG. Angiogenesis inhibitors as cancer therapy. *Hospital Pract*. 1999; 1.
- Evander MI, Frazer H, Payne E, Qi YM, Hengst K y McMillan NA. Identification of the  $\alpha 6$  integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997; 71.

- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: GLOBOCAN 2002; cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base no. 5. Version 2.0, IARC-Press, Lyon, 2004. (<http://www-dep.iarc.fr/>).
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999; 237.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25(4).
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9(6).
- Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer.* 2002(2).
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999; 237
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997; 246.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Cancer Med.* 1996; 1.
- Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1995; 1.
- Folkman J, Ingber D. Inhibition of angiogenesis. *Sem Cancer Biol.* 1992; 3
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987: 235.
- Ford, JM; Hait, WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev,* 1990; 42.
- Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol* 2001; 2.
- Gaddy, VT; Barrett, JT; Delk, JN; Kallab, AM; Porter, AG; Schoenlein, PV. Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cell. *Clin Cancer Res,* 2004; 10.

- Garcia-Lopez, P; Rodriguez-Dorantes, M; Perez-Cardenas, E; Cerbon, M; Mohar-Betancourt, A. Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004; 53.
- Go SR, Adjei A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Onco*. 1999 (17); 1.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C and Perez JM. Is Cisplatin-Induced cell death always produced by apoptosis?. *Molecular Pharmacology*. 2001 (59); 4.
- Gross J, Azizkhan RG, Biswas C, Bruns RR, Hsieh DST, Folman J. Inhibition of tumor growth, vascularización and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78.
- Goyeneche AA, Carón RW and Telleria CM, Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(11).
- Dr, Hait, WN; Aftab, DT. Rational design and pre-clinical pharmacology of drugs for reversing multidrug resistance. *Biochem Pharmacol*, 1992; 43.
- Harms W, Rothamel T, Miller K, Harste G, Grassmann M, Heim A. Characterization of human myocardial fibroblasts immortalized by HPV16 E6—E7 genes. *Experimental Cell Research*. 2001; 268(2).
- Harris EER et al. Cancer de útero, en *Oncología Clínica*, neoplasias malignas específicas. Tercera edición. Vol II. Editorial, Elsevier Churchill Livingstone.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989; 8(12).
- Herrington CS. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol*. 1999; 189(1).
- Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*. 1990; 11(12).
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cacicanes G, Li B y Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol*. 1991; 5 (12).

- Hover MG, Dinh TV, Hannigan EV, Lucci JA, Chopra V, Smith ER and To T. Oncogene expression and microvessel count in recurrent and nonrecurrent stage Ib squamous cell carcinoma of the cervix. *J Reprod Med.* 1999; 44(6).
- [http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/tabs/m\\_016.xls](http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/tabs/m_016.xls)
- <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf>
- <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Papoviruses.html>
- Hyder SM. Sex-steroid Regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13(3). Review.
- Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG y Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(20).
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriessheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW y Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001; 292.
- J Lu, J Jiang, and R Wu. Regulatory effects of mifepristone and progesterone on the secretion of interleukin-6 by cultured eutopic and ectopic endometrial cells. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi,* 2001; 36(10).
- Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU y Keller PM. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274(9).
- Kerbel RS. Clinical trials of antiangiogenic drugs: opportunities, problems, and assessment of initial results. 2001. *J Clin Oncol:* 19 (suppl).
- Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res.* 2000; 86 (9).
- Klement, G. et al. continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest.* 2000. 105, R15–R24

- Kjaer SK, van den Brule AJC, Paull G, Svare EI, Sherman ME et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *Br Med Journal*. 2002; 325.
- Kodama J, Seki N, Tokumo K, et al. Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35.
- Koji K, Masatsugu U, Hikari F, Hiroyuki Y, Kuniko M, Yoshito T, Minoru U. Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2005;98(3).
- Korpanty G, Chen S, Shohet RV, Ding J, Frenkel PA and Grayburn PA. Targeting or VEGF-mediated angiogenesis to rat myocardium using ultrasonic destruction of microbubbles. *Gene Ther*. 2005; 12 (17).
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991; 324.
- Leonhardt SA, Edwards D. Mechanism of action of progesterone antagonists.
- Levy AP, Levy NS, Wegner y Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol. Chem*. 1995; 270.
- Lippard S. *Pure & Appl. Chem*. 1987 (59).
- Liu Y, Cox SR, Morita T y Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: identification of a 5' enhancer. *Circ. Res*. 1995; 77.
- Liu Y, Xing H, Han X, Shi X, Liang F, Cheng G, Lu Y, Ma D. Apoptosis of HeLa cells induced by cisplatin and its mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008; 28(2).
- Long JH. Management of metastatic cervical cancer: Review of the literature. *J Clin Onco*. 2007 (25); 20.
- Loncaster JA, Cooper RA, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD, West CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advance carcinoma of the cervix. *Br J Cancer*, 2000; 83, 620.



- Longworth MS y Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(2).
- Losordo DW, Isner JM. Estrogen and Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21.
- Lotta J and Kari A. Vascular Growth Factors and Lymphangiogenesis. *Physiol Rev.* 2002; 82.
- Lu YS, Lien HC, Yeh PY, Yeh KH, Kuo ML, Kuo SH, Cheng AL. Effects of glucocorticoids on the growth and chemosensitivity of carcinoma cells are heterogeneous and require high concentration of functional glucocorticoid receptors. *World J Gastroenterol.* 2005; 11.
- Mandic A, Vujkov T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Ann Oncol.* 2004; 15(2). Review.
- Marino M, Acconcia F, Bresciani F, Weisz A, Trentalance A Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin (D1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13.
- Masatsugu U, Yoshito T, Koji K, Ken U, Hiroyuki Y, Daisuke A y Minoru U. Vascular endothelial growth factor c gene expression is closely related to invasión pehotype in gynecological tumor cells. *Gynecol Oncol.* 2001; 82.
- Martínez-Ezquerro JD y Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología.* 2006 (1).
- Mooberry SL. Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. *Drug Resist Updates.* 2003; 6.
- Motro B, Itin A, Sachs L y Keshet E. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(8).
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M and Huh KW. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis.
- Muller MD, Vigne JL, Michenko A, Lebovic DI, Leitman DC y Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptor alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97.

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S & Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal*. 1999; 13.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J and Welsh LC. VEGF receptor signaling-in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(5).
- Paley PJ, Staskus KA, gebhard K, et al. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 1997;80
- Parkin, D. M. & Bray, F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 (Suppl. 3), S11-S25 (2006).
- Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech*. 2001; 55.
- Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T Orpana A, Ferrara N, Saksela O y Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*. 1994; 269.
- Pinto AL, Lippard SJ. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1985; 780.
- Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E and Neufeld G. VEGF<sub>145</sub>: a secreted VEGF form that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem*. 1997; 272.
- Qin, TN; Wang, LL. Enhanced sensitivity of ovarian cell line to cisplatin induced by mifepristone and its mechanism. 2002; 22.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*. 2000; 14.
- Rogers PAW, Au CL, Affandi B. Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum. Reprod*. 1993; 9.
- Rosenberg. Platinum complexes for the treatment of cancer. Why the search goes on, in *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. (Bernhard Lippert ed) pp3-27, Wiley-VCH, Basel, Suiza. 1999.

- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD et al. The HPV 16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75.
- Sills AK Jr, Williams JL, Tyler BM et al. Squalamine inhibits angiogenesis and slows tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature. *Cancer Res* 1998; 58.
- Skafar D. Differences in the binding mechanism of RU486 and progesterone to the progesterone receptor. *Biochem*. 1991; 30.
- Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res*. 1994; 54, 800.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G y Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998; 92.
- Spitz MI and Robbins A. Mechanism of action and clinical effects of antiprogestins and the non-pregnant uterus. *Hum Reprod Up*. 1998 (4); 5.
- Staffl A, Mattingly RF. Angiogenesis of cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 1975. 121; 845.
- Stoler MH. Advances in cervical screening technology. *Mod Pathol*. 2000 (3).
- Teicher Ba, Williams JL, Takeuchi H, Ara G, Herbst R, Buxton D. Potential of the aminosterol, squalamine in combination therapy in rat 13762 mammary carcinoma and the murine Lewis Lung Carcinoma. *Anticancer Res*. 1998; 18.
- Thigpen JT, Shingleton H, Homesley H, et al: Cis-platinum in treatment of advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: A phase II study of the Gynecologic Oncology Group. *Cancer*. 1981; 48.
- Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumour angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1993; 55.
- Tonini T, Rossi F y Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003 (2).
- Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene* 2004; 23.

- Vicenti V, Cassano C, Rocchi M y Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996; 93.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N y Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor-1 in colorectal carcinoma. *J. Biol. Chem.* 1996; 271.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology* 1999; 189.
- Weiss BD. RU486: the progesterone antagonist. *Arch Fam Med*. 1993; 2.
- Wen-Fang C, Chi-An C, Chien-Nan L, Tzer-Ming C, Fon-Jou H y Chang-Yao H. Vascular endothelial growth factor in cervical carcinoma. *Obstet. Gynecol.* 1999; 93: 761
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248 (4951).
- Xiao-Song Zhong, Ling-Zhi Liu, Heath D. Skinner, Zongxian Cao, Min Ding, Bing-Hua Jiang. Mechanism of vascular endothelial growth factor expression mediated by cisplatin in human ovarian cancer cells. *Biochem an Biophys Res Commun*. 2007; 358.
- Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer*. 1997; 76.
- (a) Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kageyama Y y Kihara K. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2006; 12(10).
- (b) Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kageyama Y y Kihara K. Glucocorticoids suppress tumor lymphangiogenesis of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2006; 12 (20).
- Zhang HT, Graft P, Scott PA, Ziche M, Weich HA, Harris AL and Bicknell R. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular

endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. J. Natl Cancer Inst. 1997; 87.

- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute. 2000; 9 (2).
- Zur-Hausen y de Viliers, 1994. Human papillomaviruses. Annu Rev Microbiol. 1994; 48:427-47. Review.