



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Psicología

**Alteración motriz en un modelo experimental de
Glioblastoma Multiforme (GBM) en ratas: Análisis
morfométrico y efectos del RU486**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A:

LESLIE VANESSA RUIZ RIVAS

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Minerva Edith Calvillo Velasco



REVISOR DE TESIS:

Dr. Antonio Paulino Zainos Rosales

MÉXICO, D. F.

Enero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y en especial a la **Facultad de Psicología**, por haber recibido de ella mi formación profesional, por los profesores de los que tuve la oportunidad de aprender y por la oportunidad de pertenecer a una comunidad universitaria

Al **Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suarez** en especial al **Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas**, al **Laboratorio de Fisiología de la Formación Reticular**, al **Laboratorio de Patología Clínica**, al **Laboratorio de Neuroquímica** y al **Laboratorio de Neuroinmunología** por permitir que ésta tesis se llevara a cabo, por el préstamo de los equipos, por la enseñanza de las diferentes técnicas utilizadas, por el conocimiento y la experiencia. Muchas gracias.

A mis padres

Muchas gracias por su apoyo y comprensión, por aguantar mis cambios drásticos de humor, mis berrinches y mis necesidades. Porque sin su ayuda hubiera sido imposible culminar mi carrera.

A mis hermanos

Por los momentos de risas, ocio, juegos y confianzas. Porque tienen la capacidad innata de hacerme desesperar y enojar. Y porque a pesar de todo eso, sé que puedo contar con ustedes.

A mi hija

Mi amor, no tengo palabras para expresar lo agradecida con Dios y con la vida por haberme permitido ser madre de una niña muy inteligente y testaruda. Por recordarme el día a día que tú eres un motivo más por el cual salir adelante y ser mejor persona. Por soportar mis regaños, mi ausencia, mis días malos y mis días buenos.

A Irving

Amor, muchas gracias por el apoyo incondicional que me has brindado, por ser mi compañero de aventuras, amigo, novio y paño de lágrimas. También, por aguantar mis berrinches, necesidades y cambios de humor. Y por todas las palabras de aliento que me dabas cuando sentía que ya no podía más.

Dra. Minerva Calvillo

Por dejarme explorar el bello mundo de la investigación, por su esfuerzo y dedicación, por sus exigencias, por sus regaños, sus orientaciones y su paciencia. Por su responsabilidad, por sus buenos consejos y motivación que han sido fundamentales para mi formación como investigador. Y lo más importante por creen mí.

Dr. Joaquín Manjarrez

Por sus regaños, por su dedicación, enseñanza y por compartir su experiencia conmigo.

Dr. Jorge Guevara

Por las largas pláticas, por su apoyo y por sus consejos.

*“Muere lentamente quien se transforma en esclavo de los hábitos,
Quien no se arriesga, quien evita una pasión,
Quien no arriesga lo cierto
Por lo incierto,
Quien abandona antes de empezar,
Quien se queja de su mala suerte,
Quien no viaja, ni lee, quien no sueña
Ni persigue sueños,
Quien no confía, quien no lo intenta, quien no ama (...).”
Lo contrario es estar vivo...*

Pablo Neruda

INDICE

ABREVIATURAS	1
TABLAS	3
FIGURAS	4
GRÁFICAS	5
RESUMEN	6

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	9
Tumores cerebrales	9
Gliomas	9
Astrocitomas	10
Glioblastoma multiforme	10
Etiología	13
Epidemiología	13
Incidencia	14
Síntomas y alteraciones neuropsicológicas	14
Tratamiento del Glioblastoma multiforme	16
Mifepristona o RU486	19
Metabolismo y excreción del RU486	21
Mecanismo de acción	21
Toxicología	21
Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del RU486	22

CAPÍTULO II	
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Cultivo Celular	27
Cirugía estereotáxica	29
Fase I: Estandarización de un modelo experimental de GBM en ratas	30
Fase II: Efecto del RU486 sobre el crecimiento de un tumor inducido en ratas	32
Administración del RU486 en CMP (<i>in situ</i>)	34
Pruebas conductuales	35
Análisis histopatológico	40
Análisis estadístico	41
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS	42
Fase I: Estandarización del Modelo de GBM en ratas	42
Fase II: Efecto del RU486 sobre un modelo de GBM en ratas	48
Efecto del RU486 sobre la actividad motriz	53

CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN	68
CAPÍTULO VI	
CONCLUSIONES	74
LIMITACIONES	75
PERSPECTIVAS	76
CAPÍTULO VII	
REFERENCIAS	77

ABREVIATURAS

ACV	Accidente Cerebro Vascular.
Bax	Bcl-2-asociado a la proteína X.
Bcl-2	Protooncogén, B-cel linfoma 2.
CMP	Corteza Motora Primaria.
Cyc-D	Ciclina-D3.
DMBA	7,12,-dimetilbenz-(α)antraceno.
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido Desoxirribunucleico.
EDTA	Ácido Diamino Etilen Tetraacético.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos.
GBD	Carga Mundial de la Enfermedad.
GBM	GlioBlastoma Multiforme.
H-E	Hematoxilina-Eosina.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática.
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular.
RG	Receptores a Glucocorticoides.
RP	Receptores a Progesterona.

RP-A	Receptores a Progesterona A.
RP-B	Receptores a Progesterona B.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SNC	Sistema Nervioso Central.
TUNEL	Tdt-mediado por biotina-dUTP etiquetado al final de Nick.
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

TABLAS

Tabla 1. Promedio del crecimiento de tumores con agar y sin agar	43
Tabla 2. Diferencia del área de tumores tratados con vehículo y RU486	49
Tabla 3. Promedio de la prueba de trepado antes del tratamiento	56
Tabla 4. Promedio del desempeño en la prueba de fuerza	58
Tabla 5. Promedio del desempeño en la prueba de reflejo de enderezamiento	60
Tabla 6. Promedio del desempeño en la prueba de trepado post-tratamiento	63
Tabla 7. Promedio del desempeño en la prueba de fuerza	65
Tabla 8. Promedio del desempeño en la prueba de reflejo de enderezamiento	67

FIGURAS

Figura 1. Imagen de resonancia magnética de un GBM	11
Figura 2. Microfotografía de un corte de GBM	12
Figura 3. Estructura química del RU486	20
Figura 4. Esquema de La Fase I	31
Figura 5. Esquema de la Fase II	33
Figura 6. Prueba de trepado	37
Figura 7. Prueba de fuerza	38
Figura 8. Prueba de reflejo de enderezamiento	39
Figura 9. Microfotografías fase I: grupo con agar	44
Figura 10. Microfotografías fase I: grupo sin agar	45
Figura 11. Microfotografías fase II: Efecto del RU486	50

GRÁFICAS

Gráfica 1. Fase I: Crecimiento tumoral	46
Gráfica 2. Fase I: Promedio del peso corporal	47
Gráfica 3. Fase II: Efecto del RU486 sobre un modelo de GBM	51
Gráfica 4. Fase II: Promedio del peso corporal	52
Gráfica 5. Prueba de trepado antes del tratamiento	55
Gráfica 6. Prueba de fuerza de la pata derecha antes del tratamiento	57
Gráfica 7. Prueba de reflejo de enderezamiento antes del tratamiento	59
Gráfica 8. Prueba de trepado post-tratamiento	62
Gráfica 9. Prueba de fuerza de la pata derecha post-tratamiento	64
Gráfica 10. Prueba de reflejo de enderezamiento post-tratamiento	66

Resumen

El Glioblastoma Multiforme (GBM), representa la causa principal de morbilidad y mortalidad en la práctica neurológica. Hay poca evidencia del déficit cognitivo y conductual. El tratamiento farmacológico utilizado hasta la fecha no ha logrado modificar la sobrevivencia de los pacientes. Es por esto, que se sigue trabajando en la búsqueda de tratamientos farmacológicos que mejoren la calidad de vida, disminuir el costo y los efectos secundarios. Por otra parte, se sabe que el RU486 inhibe la angiogénesis, es citostático, apoptótico y antiproliferativo. De tal manera que, los objetivos de este trabajo fueron: observar la alteración motriz en un modelo experimental de GBM en ratas, así como el efecto de la administración *in situ* del RU486. Se utilizaron ratas wistar macho. Para estandarizar el modelo, las ratas se agruparon como sigue: tumor con agar y tumor sin agar. Mediante cirugía estereotáxica se hizo la microinyección de células C6 con agar (2%) y células sin agar en corteza motora primaria (AP=+1.6, L=+3.0). Los animales fueron sacrificados a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días, para medir el crecimiento del tumor. En un segundo grupo de ratas se realizó la microinyección de células C6 y se dejaron 20 días de crecimiento del tumor. Se analizó el efecto del RU486 sobre el área tumoral con las siguientes concentraciones (1 μ L, i.c. durante 7 días) 10, 20, 40, 100 μ M y vehículo (propilenglicol). Después los animales fueron sacrificados, se obtuvo el cerebro con tumor y se realizó el análisis histopatológico con la tinción Hematoxilina-Eosina. Se midió el área tumoral con el software IM500 (Leica). Se registró el peso de las ratas durante los dos experimentos. Antes y después de la administración del RU486 se realizaron las pruebas conductuales de trepado, fuerza de la pata derecha y reflejo de enderezamiento. Se observó un incremento significativo de los 2 a los 10 días en el grupo sin agar ($P < 0.0001$). Hubo un incremento significativo en el peso de las ratas en el grupo con agar ($P = 0.0001$). El RU486 disminuyó el área tumoral en todas las concentraciones ($P < 0.0001$). Hubo diferencias significativas ($P < 0.0001$) en el peso de las ratas en las concentraciones de 20 y 40 μ M con respecto al vehículo. En las pruebas de trepado ($P < 0.0001$) y fuerza ($P = 0.0001$) antes del tratamiento con el RU486, se observaron diferencias significativas. Conclusiones: se estandarizó el modelo experimental de GBM en ratas. El RU486 podría ser un fármaco coadyuvante para el tratamiento del GBM. La motricidad en las ratas se vio poco alterada antes y después del tratamiento con el RU486.

Palabras clave: Glioblastoma Multiforme, Alteración motriz y RU486.

INTRODUCCIÓN

Los tumores cerebrales son una masa anormal de tejido formado por la proliferación incontrolada de células en el cerebro (Gladson et al., 2010); se clasifican en función de su origen, grado de infiltración en el tejido nervioso y malignidad (Portellano., 2005). Los tumores cerebrales constituyen un apartado de gran interés no solo por ser una de las principales causa de muerte, en la práctica neurológica (Salcman., 2001), sino porque provocan trastornos en las funciones cognitivas y del comportamiento (Portellano., 2005).

El Glioblastoma Multiforme (GBM) se define como un tumor infiltrante, con alto índice de malignidad y la expectativa de supervivencia de los pacientes diagnosticados con éste tumor es muy limitada, ya que tan solo el 1% de los pacientes sobreviven más de cinco años después de su diagnóstico (Portellano., 2005). Los métodos de tratamiento para el GBM incluyen la cirugía (Holland, 2000), la quimioterapia, la radioterapia (Fogh et al., 2010) y la inmunoterapia (Holland., 2000); estos tratamientos pueden ser aplicados en forma única o combinados (Kanu et al., 2009). En la actualidad, la mayoría de las investigaciones clínica o básica conducen al desarrollo de tratamientos más efectivos y esto conlleva al desarrollo de fármacos cada vez más potentes y con efectos secundarios. Con base en lo anterior, los efectos secundarios que producen estos fármacos, siguen siendo los principales limitantes para su uso, además que representan altos costos (Holland., 2000). A pesar de que se han reportado las diversas alteraciones motrices ocasionadas por los tumores cerebrales (Portellano., 2005), no se han desarrollado trabajos experimentales

sobre alteraciones como la paresia, la espasticidad y los reflejos anormales que ocasiona este tumor, debido a que el GBM produce diversos síntomas y alteraciones neuropsicológicas. La importancia en la investigación básica es encontrar un tratamiento que sea de bajo costo y que ocasione menos efectos secundarios sin contemplar aún mejorar las alteraciones neuropsicológicas ocasionadas por el GBM en los pacientes.

Recientemente, diversas investigaciones han mostrado la efectividad de fármacos como la Casiopeína II-gly (Trejo-Solís et al., 2005), el (R, R')-4metoxi-1-naftilfenoterol (Bernier et al., 2013), inhibidores de la aromatasa (Dave et al., 2015), entre otros. De igual forma, han mostrado la efectividad de la Mifepristona (RU486) contra células tumorales en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* abriendo un camino más para la investigación de fármacos anticancerígenos con derivados hormonales (Atif et al., 2011, Tieszen et al., 2011, Bakker et al., 1987, Pinski et al., 1993, Michna et al., 1992, Wiehle et al., 2007, Goyeneche et al., 2007, Tian et al., 2008, Moe et al., 2009 y Llaguno-Munive et al., 2013).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

Tumores cerebrales

Las neoplasias cerebrales se definen como lesiones expansivas benignas (neoplasias que no causan metástasis) o malignas (neoplasias que causan metástasis), cuyas células se multiplican de manera irrestrictiva y forman una masa dentro de la cavidad craneal o raquídea (Lapuente et al., 2010).

El análisis histopatológico ha permitido clasificar a los tumores cerebrales. Esta clasificación es complicada debido a la capacidad de las células de convertirse en malignas (El-Zein., 2005). Los tumores se originan a partir de las células embrionarias primitivas del ectodermo dando lugar a subtipos dependiendo del tipo celular que lo compone (Serrano., 2008 en Aguirre y Sotelo., 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica a los tumores cerebrales en base al carácter invasivo y a la malignidad, en: meningionas, meduloblastomas, gangliogliomas, schwannomas (neurilemomas), cordomas y gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas y ependinomas) (El-Zein., 2005). Sin embargo, en este trabajo hablaremos solo de los gliomas.

Gliomas

Los gliomas son tumores derivados de células gliales, dentro de estos tumores son más frecuentes los que se originan como consecuencia de la proliferación de los astrocitos, oligodendrocitos o células ependimarias (Portellano., 2005).

Astrocitomas

Los astrocitomas representan la mayoría de los tumores cerebrales. La OMS clasifica a los astrocitomas como: Grado I o astrocitoma pilocítico; Astrocitomas de grado II o fibrilares; Astrocitomas malignos anaplásicos de grado III con tendencia a progresar a glioblastoma y Grado IV, astrocitoma difuso o Glioblastoma multiforme (El-Zein., 2005); siendo el Glioblastoma Multiforme, de gran interés en este trabajo.

Glioblastoma multiforme

El Glioblastoma Multiforme (GBM) (Fig. 1) es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos y representa la causa principal de morbilidad y mortalidad en la práctica neurológica (Salcman., 2001). En México, es la tercera causa más frecuente de muertes relacionadas con cáncer en hombres de mediana edad (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades., 2011) convirtiéndose en un problema de salud pública.



Figura 1. Fotografía de un estudio de resonancia magnética nuclear que muestra un GBM (círculo rojo) (Hernández-Reyna et al., 2010).

El GBM es un tumor que presenta un crecimiento rápido y se diferencia de los demás astrocitomas por presentar cambios, como pleomorfismo celular (variabilidad de tamaño y forma del núcleo), atipia celular y nuclear, actividad mitótica, necrosis con células en pseudoempalizada (acumulaciones de células tumorales hipóxicas alrededor de un centro necrótico, son el resultado de las demandas metabólicas del tumor y de la oclusión vascular) en la periferia y microhemorragias (Jaramillo et al., 2010) (Fig.2).

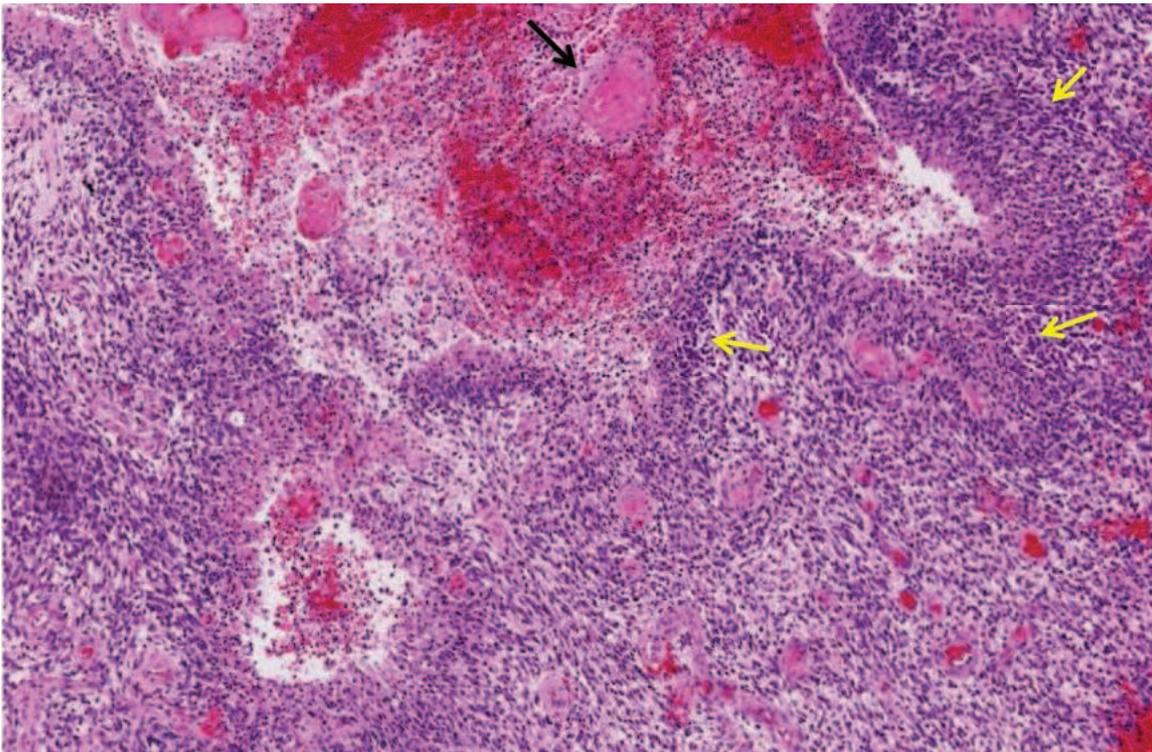


Figura 2. Microfotografía del Glioblastoma Multiforme de Grado IV con la Técnica de H-E, se muestra el área de necrosis (flecha negra) y las células en pseudoempalizada (flechas amarillas) (www.seap.es/documents/228448/524247/02_Ribalta.pdf).

Etiología

En la actualidad, no es clara la etiología del GBM; en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de los factores que producen, condicionan o se asocian con su aparición. Los estudios epidemiológicos, clínicos y de biología molecular, han contribuido a la identificación de sustancias químicas, virus, genes y agentes físicos que actúan como carcinógenos. También se han establecido condiciones particulares en los pacientes, como las diferencias ambientales, hormonales, de resistencia inmunológica y hereditaria, que aumentan la susceptibilidad de cáncer (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades., 2011).

Epidemiología

La mortalidad general en México en las últimas décadas ha mostrado una tendencia a la baja, los estudios demográficos y el último censo de población realizado en el 2010 por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI), ha registrado un total de 592 018 defunciones por tumores cerebrales, que representa una tasa de mortalidad de 5.5 muertes por cada 1000 habitantes (Secretaria de Salud., 2012). En el año 2012, los tumores cerebrales se ubicaron dentro de la tercera causa de muerte en México según la lista de la Global Burden of Disease (GBD) propuesta por la OMS, teniendo un total de 73, 240 defunciones (Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática., 2012).

Actualmente, los informes disponibles revelan que los tumores cerebrales tienen una frecuencia mayor en países desarrollados. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la disminución en la mortalidad de pacientes con GBM coincide con el acceso a los servicios de salud y con la introducción de nuevas tecnologías diagnósticas, tales como la resonancia magnética y la tomografía axial computarizada, que han facilitado la identificación de estos tumores (Lonn et al., 2004).

Incidencia

Se ha visto que menos del 3% de todos los pacientes con diagnóstico de GBM sobreviven más de cuatro años y la sobrevivencia promedio es de seis meses (Jelsma and Bucy., 1967 y Jaramillo et al., 2010).

Síntomas y alteraciones neuropsicológicas

Según Portellano (2005), el dolor de cabeza es habitualmente la primera manifestación. Otros síntomas consisten en falta de coordinación y equilibrio, visión doble y mareos, algunas veces puede llegar a causar crisis epilépticas, vómitos y rigidez de nuca. El daño cerebral progresivo que provoca el GBM se da a causa de la readaptación progresiva del tejido nervioso, produciendo efectos directos sobre las funciones cognitivas y de la conducta. Los efectos directos del GBM son consecuencia del crecimiento expansivo del tumor y la gravedad de los efectos neuropsicológicos producidos dependerá de la localización y tamaño. Sin embargo, sabemos que el GBM no tiene una localización específica debido a su

capacidad infiltrativa, proliferativa y migratoria de las células tumorales. A pesar de esto, la localización del tumor es el factor que determinará el tipo de alteraciones sensomotoras y cognitivas, dependiendo de su ubicación en el encéfalo. Los pacientes pueden manifestar alteraciones del estado de ánimo como apatía o abulia que puede desencadenar en un síndrome pseudodepresivo (reducción de la espontaneidad motora y verbal, pérdida de iniciativa, menor productividad, indiferencia efectiva y escasa emotividad), empobrecimiento de las funciones cognitivas, trastornos de la memoria, alteraciones visoespaciales, trastornos de la conducta que pueden ser confundidos con un trastorno psicopático como desinhibición, hiperactividad, agresividad, alucinaciones o trastornos de la personalidad. También pueden ocasionar paresias (ausencia parcial del movimiento voluntario), hipocinesia (disminución del movimiento), trastornos afásicos de tipo motor o alteraciones sensitivas o motoras.

Tratamiento del Glioblastoma multiforme

El tratamiento para los pacientes con GBM utilizado en la actualidad depende de la edad del paciente, el tamaño del tumor y la localización del mismo (Hayat., 2011). En general, el tratamiento más eficaz para el GBM consiste en una combinación de: cirugía (Holland., 2000), quimioterapia con fármacos como la Temozolamida (Hayat., 2011), radioterapia (Fogh et al., 2010) o terapia angiogénica (Moscote et al., 2010).

La cirugía consiste en la resección total o parcial del tumor que va a depender de la localización y la expansión del tumor, seguido de otros agentes terapéuticos como las nitrosoureas, procarbazona, etopósido, irinotecán y análogos derivados del platino. Se ha visto, que la efectividad de estos agentes generalmente, suele ser transitoria (Padros et al., 2006). La radiación ionizante es la terapia más efectiva hasta el momento. Sin embargo, sigue siendo paliativa debido a la radioresistencia (capacidad de los tejidos tumorales para soportar la irradiación) (Hayat., 2011). Por otro lado, la terapia antivascular es otro tipo de tratamiento para los pacientes con GBM, esta terapia se basa en privar a las células de oxígeno y de nutrientes evitando la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), mediante el uso de un factor de crecimiento endotelial antivascular, mejorando el pronóstico de supervivencia libre de progresión de los pacientes con GBM durante 6 meses (de Groot and Yung., 2008).

Por otro lado, en la investigación básica, se han realizado diversos estudios con modelos de tumores *in vivo*, en rata o ratones con el fin de encontrar un

tratamiento más efectivo que permita aumentar la sobrevivencia de los pacientes con Glioblastoma Multiforme, así como, disminuir los costos y los efectos colaterales que ocasionan los tratamientos utilizados actualmente. Sin embargo, la inducción de estos modelos han sido realizados de manera periférica es decir, los tumores se han implantado en la pata (Trejo-Solís et al., 2005) y en la paleta de la rata (Llaguno-Munive et al., 2013) con resultados significativos del tratamiento. Reportes de Trejo-Solís y colaboradores., (2005) indican que el tratamiento con Casiopeína II-gly en ratas con la inoculación subcutánea de células C6 en el dorso de ratas, redujo el volumen del tumor de manera significativa. Adicionalmente, Bernier y colaboradores., (2013) realizaron el mismo modelo con células C6 implantadas subcutáneamente pero en los flancos de ratones. Observaron que la administración sistémica del (R, R')-4-metoxi-1-naftilfenoterol, redujo la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, así como el volumen del tumor de manera significativa. Adicionalmente, Zhang et al., (2014) administraron Temozolamida, terapia fotodinámica y/o la combinación de Temozolamida y terapia fotodinámica a ratas con microinyección de células C6 en corteza motora. Estos autores encontraron que la combinación de Terapia fotodinámica con Temozolamida tuvo un efecto sinérgico, indicando que la combinación puede ser un posible tratamiento para el Glioblastoma Multiforme. Recientemente, Dave et al., (2015) implantaron células C6 en cerebro de ratas Sprague-Dawley a las cuales les administraron un inhibidor de la aromatasa (Letrozol) y observaron que

este fármaco tiene efectos citotóxicos y disminuyó la actividad de la aromatasa. También, observaron la disminución del volumen tumoral después del tratamiento.

Por otro lado, Chicoine y Silbergeld (1995) determinaron la invasividad y migración de las células C6 con agar en la corteza de ratas Sprage-dawley y Wistar. Encontraron que no hubo invasión y migración de las células y observaron que el tumor en las ratas Sprage-dawley creció empaquetado en comparación con las ratas Wistar. El objetivo del trabajo fue microinyectar las células con agar para controlar la migración y proliferación de las células cancerígenas. Sin embargo, nos surgió la duda de si el modelo utilizado por Chicoine y Silbergerld cumplía con características similares al GBM en humanos, ya que una de las principales características del GBM es su alta capacidad migratoria y proliferativa.

Es por esto, que en este trabajo se decidió hacer dos grupos de ratas con células C6 uno con agar y otro sin agar, para estandarizar el modelo utilizando el método que realizaron Chicoine y Silbergeld. Ya que, las características histopatológicas del tumor formado con las células C6, son similares al GBM en humanos y que representa un buen modelo para estudiar los mecanismos de acción de diversos fármacos. Con base en lo anterior, se decidió realizar el modelo experimental de GBM en Corteza Motora Primaria haciendo una comparación del modelo de células C6 inyectadas con agar (Chicoine y Silbergergeld., 1995) con la microinyección de células C6 sin agar.

Mifepristona o RU486

A principios de 1980, la identificación de la Mifepristona (RU486), fue un descubrimiento importante en la investigación de esteroides, debido a que, investigadores de la compañía farmacéutica francesa Roussel-Uclaff afirmaban que habían encontrado un agonista y antagonista para las cinco clases de hormonas esteroideas (estrógenos, andrógenos, mineralocorticoides, progestinas y glucocorticoides) con posibles aplicaciones clínicas (Schafft., 2010). Este grupo de franceses fueron quienes introdujeron por primera vez el uso de este fármaco (Cadepond et al., 1997) como agente abortivo, finalmente después de varios años de prohibición debido a problemas morales y políticos, en 1993 cedieron la licencia a la Agencia de alimentos y medicamentos (FDA, Food and Drug Administration), quienes en el año 2000 proporcionaron la carta de aprobación final que indicaba que el RU486 es un fármaco eficaz y seguro para el uso clínico como agente abortivo (Schafft., 2010).

El RU486 ó Mifepristona (17 β -hidroxi-11 β -(4-dimetilaminofenil)-17 α -(prop-1-inil)-estra-4,9-dien-3-ona), se deriva de la progestina estrano (Fig. 3); tiene un peso molecular de 429.5 g/mol. Es insoluble en agua (pero se disuelve fácilmente en propilenglicol) y se absorbe rápidamente cuando se ingiere por vía oral (Sitruk-Ware and Spitz., 2003). El RU486 tiene alta afinidad tanto a los receptores a progesterona (RP) como a los receptores a glucocorticoides (RG) (Cadepond et al., 1997). Generalmente se utiliza como agente abortivo, anticonceptivo, así como en el tratamiento para la endometriosis, el cáncer de mama, los meningiomas y en el síndrome de Cushing (Cadepond et al., 1997). También, ha sido usado como agente antiglucocorticoesteroide para la depresión (Krishnan et al., 1992), la ansiedad, la hipertensión arterial (Opoku and Kalimi., 1992), la obesidad (Hardwick et al., 1989), el glaucoma (Munden and Schmidt., 1992) y recientemente ha sido blanco de estudio por sus propiedades como antiproliferativo glial (Pinski et al., 1993).

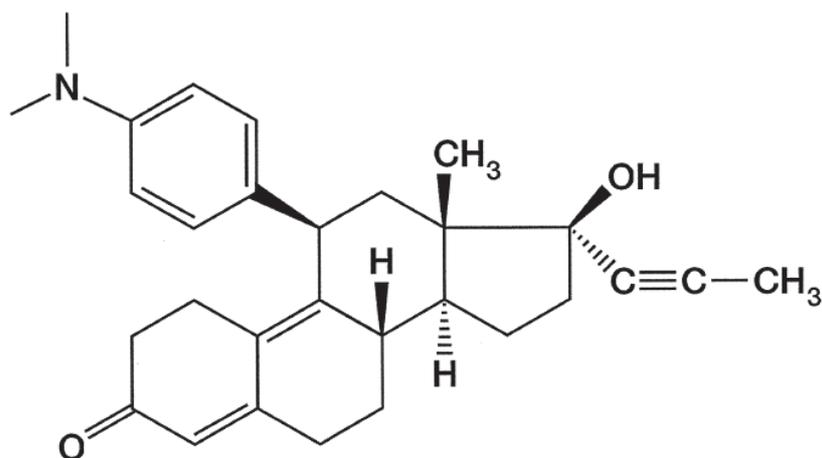


Figura 3. Estructura química del RU486 (Sitruk-Ware and Spitz, 2003).

Metabolismo y excreción del RU486

El RU486 se absorbe fácilmente por vía oral y la concentración máxima en suero se observa a partir de 1h post-administración, tiene una vida media de 18 horas (Heikinheimo et al., 2003) y su eliminación es bifásica.

Mecanismo de acción

Todavía no se conoce bien el mecanismo de acción del RU486 (Horwitz., 1992), aunque se sugiere, que actúa a nivel del receptor de progesterona inhibiendo preferentemente la actividad de la isoforma B del RP (Dijkema et al., 1998). En el año 2000, Camacho-Arroyo y colaboradores, realizaron un estudio sobre la expresión de las isoformas del RP en tejido humano de cordomas, así como en astrocitomas de grado III y IV, en el cual demostraron que los receptores a progesterona tipo B (RP-B) se expresan en mayor proporción que los receptores a progesterona tipo A (RP-A).

Toxicología

La farmacéutica Roussel-Uclaff llevó a cabo diversos estudios toxicológicos para comprobar la seguridad de la molécula para el uso en humanos. Después de administrar el RU486 a roedores por un periodo menor a 6 meses, comprobaron que el compuesto no es mutagénico y no tiene efectos tóxicos con dosis de hasta 1000 mg/kg realizado en varias especies como roedores, conejos y monos (Deraedt et al., 1985 en Sitruk-Ware and Spitz., 2003). En estudios de toxicidad subcrónica el RU486 no mostró toxicidad cuando se administró a roedores durante 30 días y 26 semanas con dosis diarias de hasta 200 mg/kg o 125 mg/kg, pero

tuvo efectos relacionados con el compuesto antihormonal y en ratas macho se observó disminución en el peso de la vesícula seminal y próstata debido a los efectos antiandrogénicos (Sitruk-Ware and Spitz., 2003). En cambio, en humanos los efectos secundarios varían dependiendo del uso terapéutico, entre ellos son: hipertensión, prurito, rash, hipoglicemia, constipación, disminución del apetito, somnolencia, ansiedad, sinusitis, hipotensión, taquicardia, diarrea, anemia, discinesia, pérdida de la conciencia, fatiga, dolor abdominal, calambres, náusea y vómito (Sarkar., 2002).

Estudios *in vitro* e *in vivo* del RU486

En estudios *in vitro* se ha visto que el RU486 tiene efectos antiproliferativos cuando la concentración de progesterona es baja (10 y 20 $\mu\text{mol/L}$) y es mimético cuando es alta (40 y 80 $\mu\text{mol/L}$) con células SK-N-AS, de neuroblastoma humano (Atif et al., 2011). Adicionalmente, Tieszen et al., (2011), también encontraron que el RU486 inhibe el crecimiento de diferentes líneas celulares del sistema nervioso (meningioma y glioma), así como de líneas de cáncer de mama, próstata, ovario y hueso con un efecto citostático (inhibición de la multiplicación y crecimiento celular) a concentraciones de 5 y 10 μM y apoptótico (muerte celular programada desencadenada por señales controladas genéticamente) a concentraciones de 20, 30 y 40 μM .

Por otro lado, Bakker et al., (1987), encontraron que en los tumores mamarios inducidos en ratas así como, en el estudio de cultivo de células MCF-7, el tratamiento con el RU486 inhibió de manera importante el crecimiento tumoral. Se

ha reportado que el RU486 después del tratamiento disminuyó el volumen tumoral e incrementó de manera significativa el peso de los ratones con un tumor inducido con la línea celular de glioma de humano U87MG. Además, Pinski y colaboradores (1993), sugieren que el efecto antiproliferativo (inhibición de la multiplicación celular) del RU486 se debe a la inhibición del enlace de los glucocorticoides con sus receptores. De igual forma, Michna et al., (1992), mostraron que el RU486 redujo la actividad de los receptores a glucocorticoides e inhibió el crecimiento tumoral en modelos de tumores mamarios dependientes a hormonas. Así mismo, Tian et al., (2008), encontraron que el RU486 inhibe el crecimiento del cáncer de mama inducido en ratones desnudos, debido a que el RU486 promueve la apoptosis e inhibe la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes por medio de la secreción de factores del crecimiento) tumoral.

Wiehle et al., (2007), analizaron el efecto del RU486 en la regresión del tamaño tumoral y la inhibición en el desarrollo de nuevos tumores mamarios. El efecto inhibitorio de esta antiprogestina sobre el crecimiento tumoral se correlacionó con un aumento de la apoptosis y la disminución de la proliferación celular.

Goyeneche et al., (2007), mostraron que el RU486 también inhibe eficazmente el crecimiento de varios tipos de células de cáncer de ovario SK-OV-3, Caov-3, OV2008 y IGROV-1, tanto *in vitro* como *in vivo* sin causar efectos tóxicos aparentes a los animales.

Se ha visto que a una concentración de 70µM, el RU486 detiene la división del ciclo celular en la transición de la fase G1/G0, e induce apoptosis en células Ishikawa en cultivo, las cuales se derivan de cáncer de endometrio humano (Moe et al., 2009).

Recientemente, Llaguno-Munive y colaboradores (2013), mostraron que el RU486 mejoró la eficacia de la quimio-radio-terapia inhibiendo el crecimiento tumoral, en un modelo de xenoinjerto con células C6 (glioma de rata) inducidos en los flancos derecho e izquierdo en ratones desnudos.

A pesar de que se han realizado diversas investigaciones con diferentes tipos de tratamientos para mejorar la sobrevida de pacientes con Glioblastoma Multiforme; hasta ahora, no existen muchos estudios de modelos intracerebrales donde realicen la administración del fármaco *in situ*. Es por esto, que decidimos realizar la administración del fármaco *in situ* para observar los efectos del fármaco directamente en el sitio del tumor.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, no existen reportes del análisis conductual y motriz en el GBM. A pesar de que éste tipo de tumor es un problema de salud pública, la mayoría de las investigaciones se han centrado en el tratamiento farmacológico. De esta manera, la aplicación del RU486 en tumores cerebrales de alto grado de malignidad como el GBM, no ha sido desarrollada. Debido a lo antes mencionado, surge el interés de observar la posible alteración motriz, resultado de un tumor inducido en corteza motora primaria de rata, así como determinar el efecto de la administración del RU486 sobre el crecimiento del tumor

HIPÓTESIS

Si el modelo experimental de Glioblastoma Multiforme ocasiona una alteración motriz en la rata. Entonces, debido a los efectos apoptóticos, antiproliferativos, angiogénicos y citostáticos del RU486, la aplicación de este fármaco provocará la disminución del tamaño tumoral. Por lo tanto, mejorará el desempeño conductual en las ratas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Observar la alteración motriz en un modelo experimental de Glioblastoma Multiforme en ratas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Observar el crecimiento de un tumor experimental en ratas.

Observar el efecto de la administración del RU486 sobre un GBM inducido en ratas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 170 a 190 gr. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (5 ratas por caja), en condiciones estándar de Bioterio, las cuales son: alimento y agua *ad libitum*; con un ciclo luz oscuridad 12:12 hrs y una temperatura promedio de 22-22.3°C (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO., 1999).

Cultivo Celular

Para realizar este trabajo se hizo el cultivo de las células C6 el cual consistió en la obtención y proliferación de las células C6 como sigue:

Se realizó el cultivo de la línea celular C6 de glioma de rata (ATCC, CCL-107) a partir de un vial con 1×10^6 células (donado por el Laboratorio de Neuroinmunología del Instituto de Neurología y Neurocirugía, INNN), las cuales fueron descongeladas, y se lavaron por centrifugación a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a 4° C para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) el cual está suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (Penicilina 10000 UI/L y Estreptomina 10 µg/ml). Las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 mm² y se dejaron crecer hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 80%. Posteriormente, se desechó el DMEM y se lavaron con solución salina 9%, se retiró la solución salina y se añadieron 800 microlitros (µL) de tripsina [0.25% de ácido

tetraacéticodietilendiamino (EthyleneDiamineTetraacetic Acid, EDTA)] para separar las células; la reacción enzimática de la tripsina se detuvo añadiendo 1200µL de DMEM, con una micropipeta se colectaron las células en un volumen de 1 ml y se volvieron a centrifugar a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Al terminar, se desechó el sobrenadante, se añadió 1ml de DMEM al botón celular y se resuspendieron cuidadosamente. A partir de este mililitro, se contaron las células por el método de exclusión con azul tripano a una dilución de 1:10 y se contaron 1×10^6 células C6 en la cámara de Neuvauer. Por otro lado, se hizo una solución de agar al 2% (10mg/5ml) en agua desionizada estéril. Con una micropipeta se colocaron las células (1×10^6 en 1µl) en 1 µl de la solución de agar (2%) para obtener un volumen total de 2µl.

Cirugía estereotáxica

Los animales fueron anestesiados usando una mezcla de Ketamina (80mg/kg) y Xilazina (10mg/kg) administrada vía intraperitoneal (IP). Posteriormente, los animales fueron colocados en el aparato estereotáxico; se realizó una incisión (del inicio de la cavidad orbital al inicio del cuello de la rata) de 2 cm con el bisturí para exponer el cráneo. Se limpió y se realizó un trépano en la corteza motora primaria izquierda según las coordenadas del Atlas de Paxinos (Paxinos and Watson., 1998): Anteroposterior (AP)=+1.6 y Lateral (L)=+3.0. Se realizó la microinyección del vehículo (DMEM, 2 μ l) y de las células (grupo con agar y sin agar) durante 2 minutos (min), al terminar la microinyección se esperó 5 min y después se sacó la cánula de microinyección, se retiró lentamente. Al terminar la microinyección se cubrió el trepano con cera de hueso (mezcla de cera de abeja e isopropilo palmitato que sirve para controlar la pérdida de sangre en actos quirúrgicos que impliquen al tejido óseo) y se administró gentamicina *in situ* para evitar una posible infección y se suturó la piel. Al terminar la cirugía, los animales fueron colocados en jaulas para su recuperación.

Fase I: estandarización del modelo experimental de GBM en ratas

La fase I consistió en la estandarización de la microinyección de células C6 con agar y células sin agar. Después de la cirugía los animales se sacrificaron por perfusión intracardiaca a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días. Se diseccionó el cerebro con tumor. Se realizó el análisis histopatológico con la tinción de Hematoxilina-Eosina. Se adquirieron las imágenes con el microscopio estereoscópico (Leica), aumento 1.6X. Posteriormente, se realizó la medición del área tumoral mediante el software IM500 (Fig. 4).

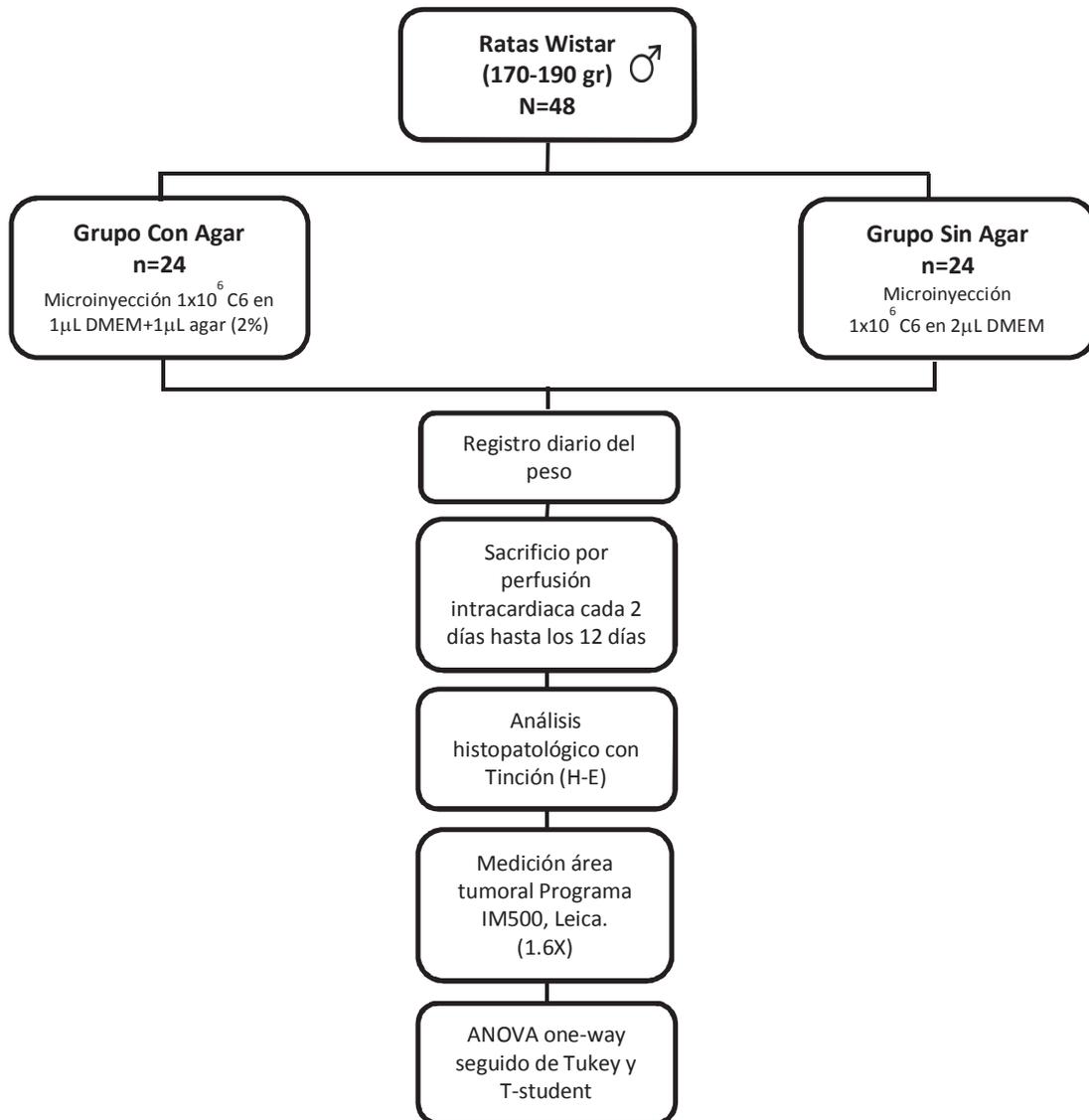


Figura 4. Esquema de la metodología de la Fase I.

Fase II: Efecto del RU486 sobre el crecimiento del tumor inducido en ratas.

La fase II consistió en realizar la microinyección de las células C6 como se describió anteriormente (Ver página. 31). Adicionalmente, para realizar esto se prepararon las cánulas de microinyección de la siguiente manera: a partir de una aguja hipodérmica (23G x 25mm), se quitó el bisel y se cortó a 1 cm. El tapón de la cánula guía se realizó con una aguja desechable (30G x 25mm); se le quitó el bisel y se recortó a 1.5 cm haciendo un doble en un extremo.

En esta fase, las ratas se agruparon de la siguiente forma:

Grupo control (n=5): a este grupo se le administró 1 μ l de propilenglicol (100%) como vehículo.

Grupo de ratas con tumor: Después de la microinyección de células C6 se dejaron transcurrir 20 días de evolución tumoral. La administración del RU486 (1 μ l) fue *in situ* y en las siguientes concentraciones: 10 micromolar (μ M) (n=5), 20 μ M (n=5), 40 μ M (n=5) y 100 μ M (n=5) durante 7 días (Fig. 5).

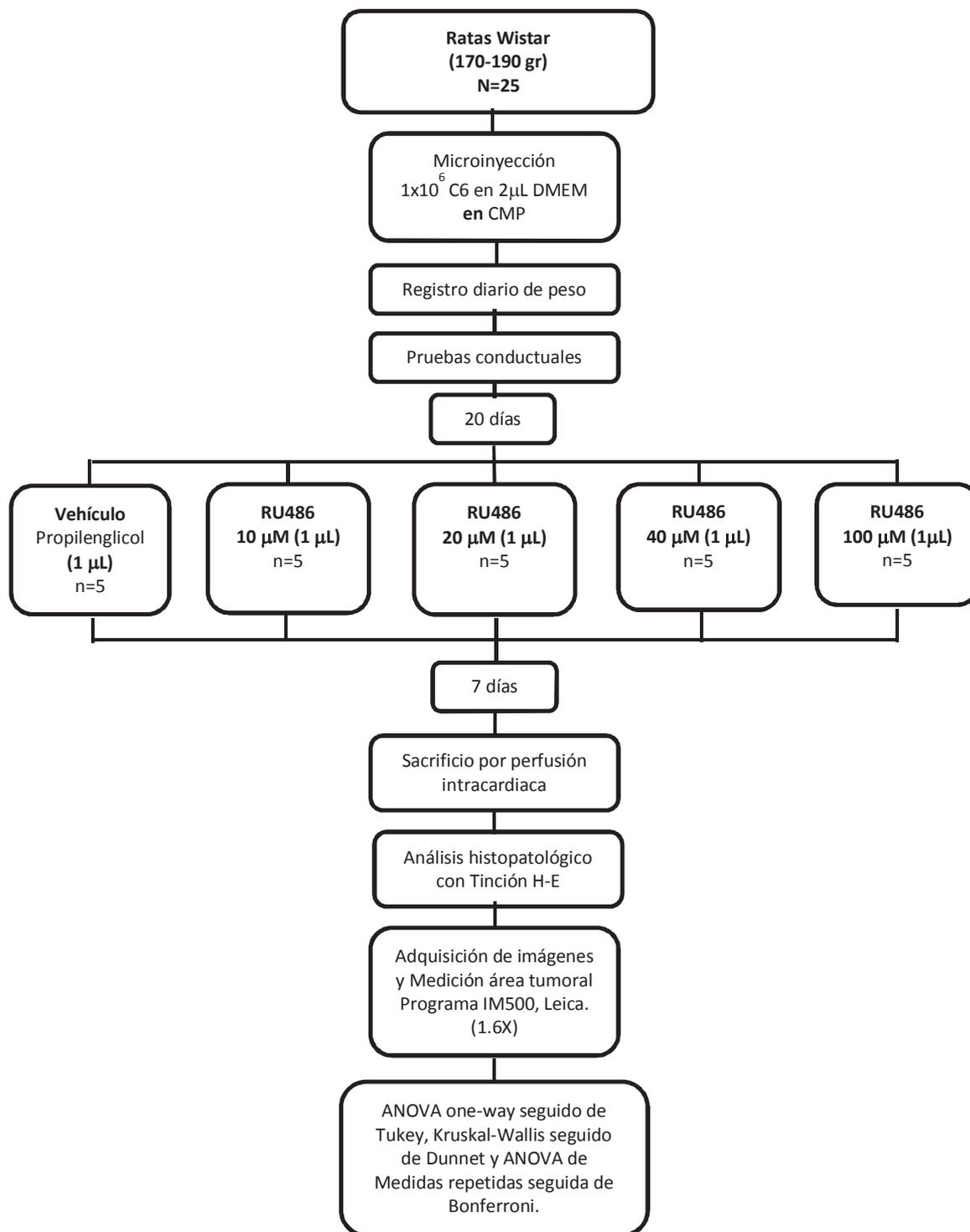


Figura 5. Esquema de la metodología de la Fase II.

Administración del RU486 en CMP (*in situ*)

Para la microinyección del fármaco, la cánula guía se colocó por cirugía estereotáxica después de 10 días de crecimiento tumoral. Los animales fueron anestesiados vía IP usando una mezcla de Ketamina (80 mg/kg) y Xilazina (10 mg/kg). Los animales se colocaron en el aparato estereotáxico. Se hizo una incisión en la piel de los animales de 2 cm de largo para exponer el cráneo; se realizó un trépano del lado contralateral al tumor para colocar un tornillo de acero inoxidable que servirá de soporte para fijar la cánula con acrílico dental. Después, del lado ipsilateral (tumor) se colocó la cánula guía, justo por encima de la corteza. Se suturó la piel y los animales se colocaron en jaulas hasta su recuperación. Después de la cirugía se dejaron transcurrir 10 días, y a través de la cánula de microinyección se administró 1µl del RU486 durante un minuto y se dejó 5 minutos más en el sitio. Para facilitar la administración del RU486 cada rata se colocó en una caja de acrílico donde permaneció en libre movimiento durante 6 minutos (1 min de administración y los 5 min adicionales). Al finalizar la administración, se retiró la cánula de microinyección, se colocó el tapón en la cánula y las ratas se regresaron al bioterio hasta la siguiente administración.

Pruebas conductuales

Dado que la microinyección de las células C6 se realizó en la corteza motora primaria del hemisferio izquierdo en la zona que controla el movimiento de la pata inferior derecha y que los impulsos motores viajan de manera contralateral, se realizaron las pruebas conductuales a las ratas para evaluar la posible alteración motriz de la pata derecha. Al día siguiente de la microinyección de las células, se realizaron las pruebas de fuerza, reflejo y equilibrio en las ratas (Peterson y Albertson, 1998).

La prueba de trepado consistió en colocar a la rata en una rejilla en posición vertical y observar de qué manera usó su pata inferior para trepar y sostenerse (Fig. 6). La segunda prueba de fuerza consistió en sujetar la pata inferior derecha y se valoró la fuerza con la que intentó retirarla (Fig. 7). Finalmente, para evaluar el equilibrio de la rata, ésta se volteó de forma que sus extremidades quedaron hacia arriba y se consideró cualitativamente la rapidez con la que recuperó su posición (Fig. 8).

La calificación de todas las pruebas se realizó de forma cualitativa con una escala arbitraria de 1, 2 y 3. Cada una correspondió a un pobre, mediano y alto desempeño, respectivamente (Peterson y Albertson, 1998).

En la primer prueba, la calificación se asignó de acuerdo a la utilidad de la pata derecha, calificando a las ratas con el número 1 a las que utilizaron torpemente su pata derecha, 2 a las ratas que utilizaron muy poco su pata y 3 a las que no tuvieron ninguna dificultad para trepar la rejilla.

Para la segunda prueba, la calificación se asignó de acuerdo a la fuerza. Se les dio el número 1 a las ratas que ejercieron poca fuerza, 2 a las que ejercieron una fuerza intermedia y 3 a las que tenían mayor fuerza.

En la tercera prueba, se asignó la calificación 1 a las ratas que tardaron más tiempo en voltearse, o aquellas que no utilizaron sus extremidades para regresar a su posición sino que simplemente rodaron para incorporarse, con el número 2 a aquellas ratas que se incorporaron utilizando únicamente la pata izquierda y 3 a las que no tuvieron ninguna dificultad para incorporarse y que lo hicieron de forma inmediata.

Finalmente, en todos los ensayos, se realizó un registro diario del peso de las ratas. Al finalizar cada fase, los animales fueron sacrificados por perfusión intracardiaca y se obtuvo el cerebro con tumor etiquetando cada uno. Se dejaron en formalina (3.7%) para su post-fijación. Posteriormente, todos los cerebros fueron procesados para el análisis histopatológico.



Figura 6. En esta fotografía se muestra a una rata experimental realizando la prueba de trepado.



Figura 7. En esta fotografía se muestra una rata experimental a la cual se le está valorando la fuerza de la pata derecha.



Figura 8. En esta fotografía se muestra a una rata experimental colocada boca arriba para evaluar la prueba de reflejo de enderezamiento.

Análisis histopatológico

Los cerebros se colocaron en casetes de inclusión, con su respectiva etiqueta y se lavaron con agua para quitar el exceso de la formalina. Se introdujeron en un procesador de tejidos (Histoquinet, Leica TP1020), 1 hr en cada solución (alcohol 70, 80, 90,100, alcohol-xilol y xilol, después se preincluyeron en parafina). Posteriormente, se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes seriados de 6 micras con un micrótopo (Histocut, Reichert-Jung 820-II) y se colocaron en portaobjetos previamente pasados por el medio adhesivo poli-L-lisina (1%). Para hacer la tinción de hematoxilina-eosina, los cortes se desparafinaron durante 20 min en una estufa de laboratorio a 60° C; después se rehidrataron a partir de xilol, xilol-alcohol y alcohol absoluto hasta llegar al agua destilada durante 3 minutos y se hicieron 3 lavados en cada cambio. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina durante 5 min; después se lavó el excedente de la hematoxilina con alcohol ácido y se viró el color con agua amoniacal. Se colocaron durante 30 segundos en una solución de Eosina, y se pasaron por alcohol 96%, alcohol absoluto, xilol-alcohol y xilol. Finalmente, los portaobjetos se cubrieron con medio de montaje rápido para microscopia (Entellan) y se dejaron secar. Las imágenes fueron adquiridas a través del microscopio estereoscópico (Leica), con el software IM500 se midió el área tumoral a un aumento de 1.6X.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de la medición del área tumoral fueron analizados con el *software* Graphpad Prism 6 y todos los resultados fueron expresados como promedio mas-menos error estándar ($X \pm E.E$). Se realizó ANOVA one-way seguido de una comparación múltiple de Tukey. En la fase I se utilizaron 600 mediciones del área tumoral para ambos grupos. Se realizó la prueba T-student para los datos del peso corporal.

En la fase II se realizó ANOVA one-way seguido de una comparación múltiple de Tukey para los datos de la medición del área tumoral. Se realizó Kruskal-Wallis seguido de una comparación múltiple de Dunnet para los datos del peso corporal. Para los datos de las pruebas conductuales antes del tratamiento se realizó un ANOVA de medidas repetidas seguido de una comparación múltiple de Bonferroni y para los datos de las pruebas conductuales después del tratamiento se realizó Kruskal-Wallis seguido de una comparación múltiple de Dunnet (Hernández et al, 2006).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Fase I: Estandarización de un Modelo experimental de GBM en ratas

En las figuras 9 y 10 se observan los cortes del tejido cerebral de las ratas con tumor con agar y sin agar de los 2 a 12 días, el área tumoral fue delimitada con una línea morada. Cuando se comparan los grupos por separado se observó un incremento estadísticamente significativo ($F_{11, 1188}=40.51$, $P<0.0001$) en el área tumoral del grupo sin agar a los 2 días (0.292 ± 0.029) con respecto a los 4 días (0.526 ± 0.029); de los 6 días (0.512 ± 0.029) con respecto a los 8 días (0.717 ± 0.029); de los 8 días con respecto a los 10 días (0.558 ± 0.029) y de los 10 días con respecto a los 12 días (0.368 ± 0.029). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas de los 4 días (0.526 ± 0.029) con respecto a los 6 días (0.512 ± 0.029) (Gráf. 1).

En el grupo con agar no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área tumoral de los 2 días (0.275 ± 0.029) con respecto a los 4 días (0.356 ± 0.029); de los 4 días con respecto a los 6 días (0.336 ± 0.029); de los 6 días con respecto a los 8 días (0.364 ± 0.029); de los 8 días con respecto a los 10 días (0.331 ± 0.029) y de los 10 días con respecto a los 12 días (0.393 ± 0.029). Sin embargo, cuando se hace la comparación entre los grupos se observó un incremento estadísticamente significativo en el grupo sin agar a los 4 días (0.526 ± 0.029) con respecto al grupo con agar a los 4 días (0.326 ± 0.029); del grupo sin agar a los 6 días (0.512 ± 0.029) con respecto al grupo con agar a los 6 días

(0.336 ± 0.029); del grupo sin agar a los 8 días (0.717 ± 0.029) con respecto al grupo con agar a los 8 días (0.364 ± 0.029) y del grupo sin agar a los 10 días (0.558 ± 0.029) con respecto al grupo con agar a los 10 días (0.331 ± 0.029). Finalmente, no se observaron diferencias significativas en el área tumoral del grupo sin agar a los 2 días (0.292 ± 0.029) con respecto al grupo con agar a los 2 días (0.275 ± 0.029) y del grupo sin agar a los 12 días (0.368 ± 0.029) con respecto al grupo con agar a los 12 días (0.393 ± 0.029) (véase tabla 1).

Crecimiento Tumoral				
	Con agar		Sin agar	
Días	Promedio	Error Estándar	Promedio	Error Estándar
2	0.275	0.029	0.292	0.029
4	0.356	0.029	0.526*	0.029
6	0.336	0.029	0.512*	0.029
8	0.364	0.029	0.717*	0.029
10	0.331	0.029	0.558*	0.029
12	0.393	0.029	0.368	0.029

Tabla 1. Esta tabla muestra el promedio del área de tumores con agar y sin agar cada dos días. Los datos marcados con un asterisco fueron estadísticamente significativos ($P < 0.0001$).

Tumores con agar

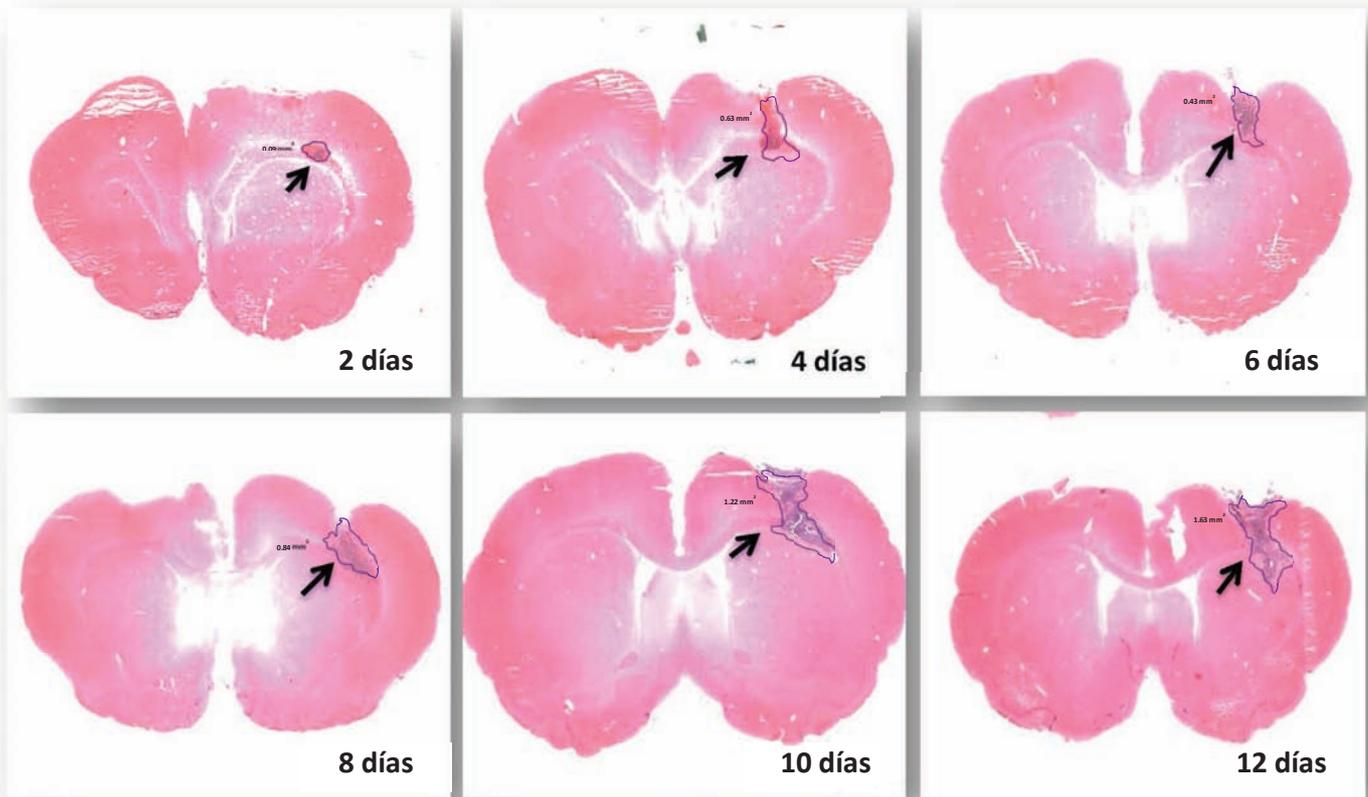


Figura 9. Panel de microfotografías que muestran los cortes de cerebro de 6 μm, teñidos con H-E. Grupo con agar a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días de crecimiento tumoral; el tumor se señala con las flechas negras. Aumento 1.6X.

Tumores sin agar

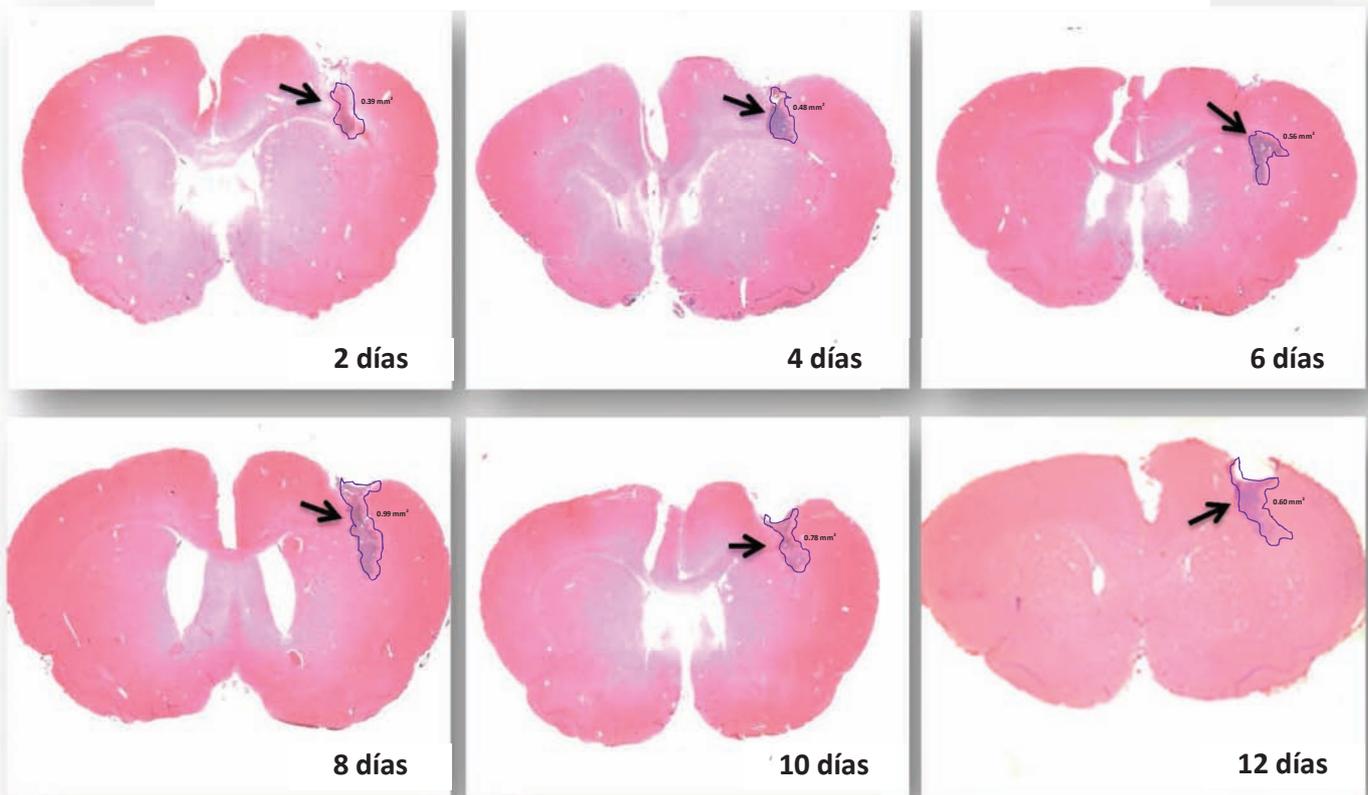
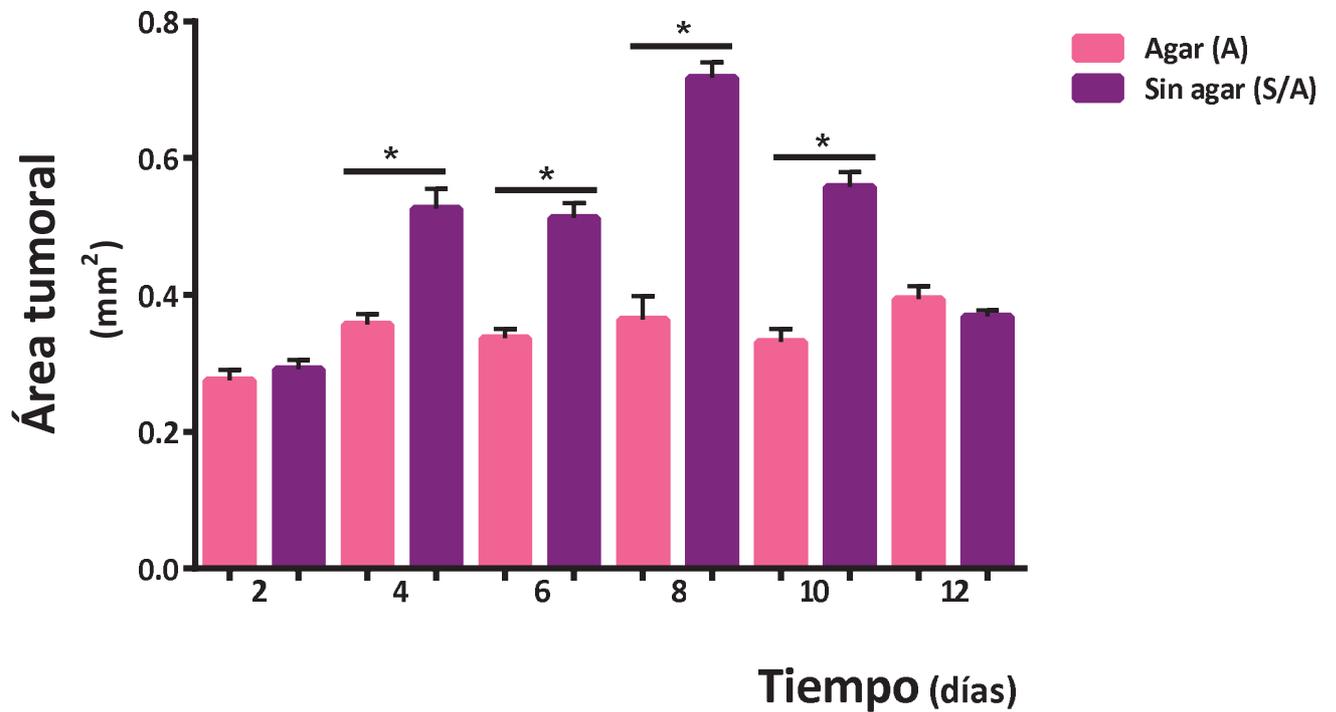


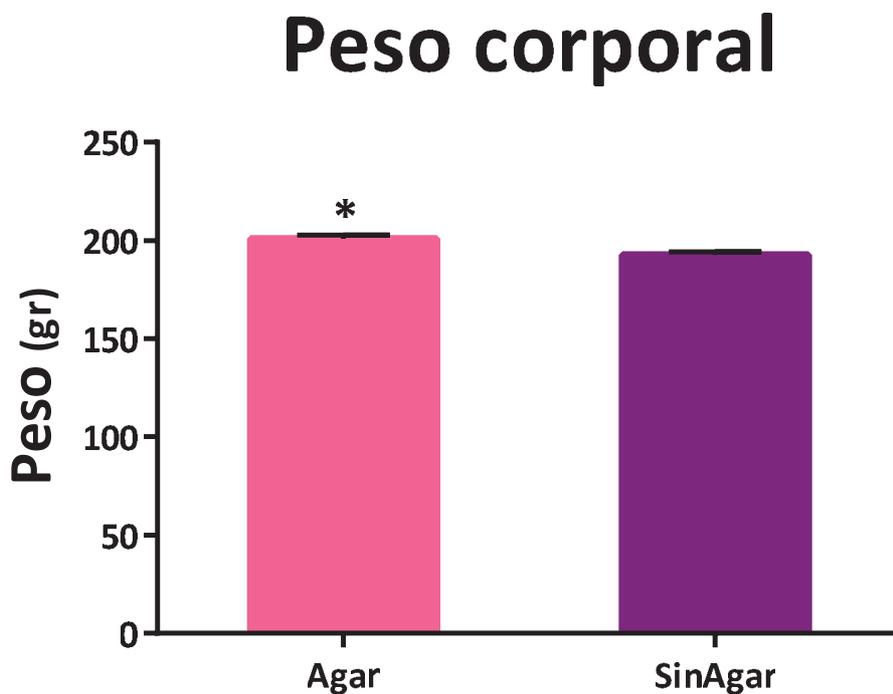
Figura 10. Panel de microfotografías que muestran los cortes de cerebro de 6 μ m del grupo sin agar, teñidos con H-E a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días de crecimiento tumoral. Los tumores se señalan con las flechas negras. Aumento 1.6X.

Crecimiento Tumoral



Gráfica 1. Promedio del área tumoral en el grupo con agar y sin agar a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días. Los valores se expresan en mm². ANOVA one-way seguido de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.0001$).

En el grupo de células con agar y el grupo de células sin agar se observaron diferencias estadísticamente significativas ($t_{303}=3.317$, $P=0.001$). Como puede observarse en la gráfica 2, el grupo de células con agar tuvo un promedio más alto (200.9), al compararlo con el grupo de células sin agar (192.8).



Gráfica 2. Registro del peso de las ratas del grupo con agar y sin agar durante 12 días. Los valores se expresan en gramos (gr). T-student ($P=0.001$).

Fase II: Efecto del RU486 sobre el crecimiento de un tumor inducido en ratas

En la figura 11 se observan los cortes del tejido cerebral de las ratas con tumor en el grupo vehículo y el grupo con RU486 a las diferentes concentraciones, fue delimitado el tumor con una línea morada. Se observa el área necrótica en el corte del vehículo y RU486 10 y 20 μM . Por otro lado, en la gráfica 3 se muestra que la administración del RU486 provocó una disminución estadísticamente significativa del área tumoral en todas las concentraciones del RU486 ($F_{4, 4337}=239.4$, $P<0.0001$). El área tumoral incrementó de manera estadísticamente significativa en la concentración de RU486 10 μM (7.34 ± 0.201), 20 μM (7.56 ± 0.215), 40 μM (5.42 ± 0.208) y 100 μM (5.96 ± 0.203) cuando fueron comparados con el vehículo (11.12 ± 0.201). No se observó una diferencia estadísticamente significativa en el área tumoral a la concentración 10 μM (7.34 ± 0.22) con respecto a 20 μM (7.56 ± 0.22). Además, se observó una reducción estadísticamente significativa en el área tumoral a la concentración 40 μM (5.42 ± 0.21) con respecto al grupo RU486 10 μM (7.34 ± 0.21) y 20 μM (7.56 ± 0.22). De igual forma, se observó una reducción estadísticamente significativa en el área tumoral a la concentración 100 μM (5.96 ± 0.208) con respecto al grupo 10 μM (7.34 ± 0.208) y 20 μM (7.56 ± 0.22). Finalmente, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en el área tumoral a la concentración 40 μM (5.42 ± 0.21) con respecto a 100 μM (5.96 ± 0.21). Se observaron diferencias en todas concentraciones (véase tabla 2).

Efecto del RU486		
Grupos	Promedio	Error Estándar
Vehículo	11.12	0.201
RU486 10 μ M	7.34*	0.201
RU486 20 μ M	7.56*	0.215
RU486 40 μ M	5.42*	0.208
RU486 100 μ M	5.96*	0.203

Tabla 2. Esta tabla muestra las diferencias en el área tumoral de las concentraciones del RU486 comparadas con el vehículo. Los datos marcados con un asterisco fueron estadísticamente significativos ($P < 0.0001$).

Efecto del RU486 sobre el crecimiento de un tumor inducido en ratas

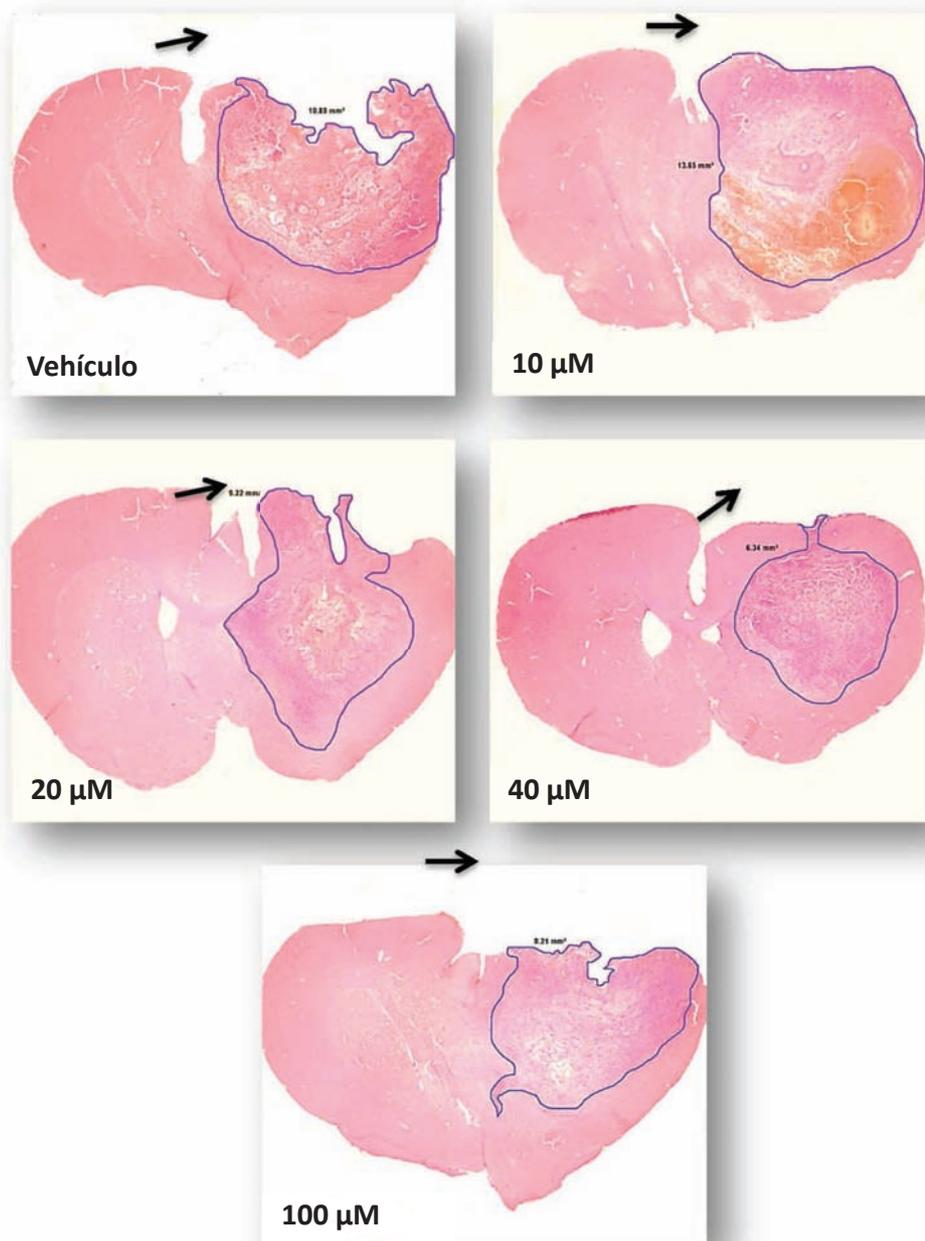
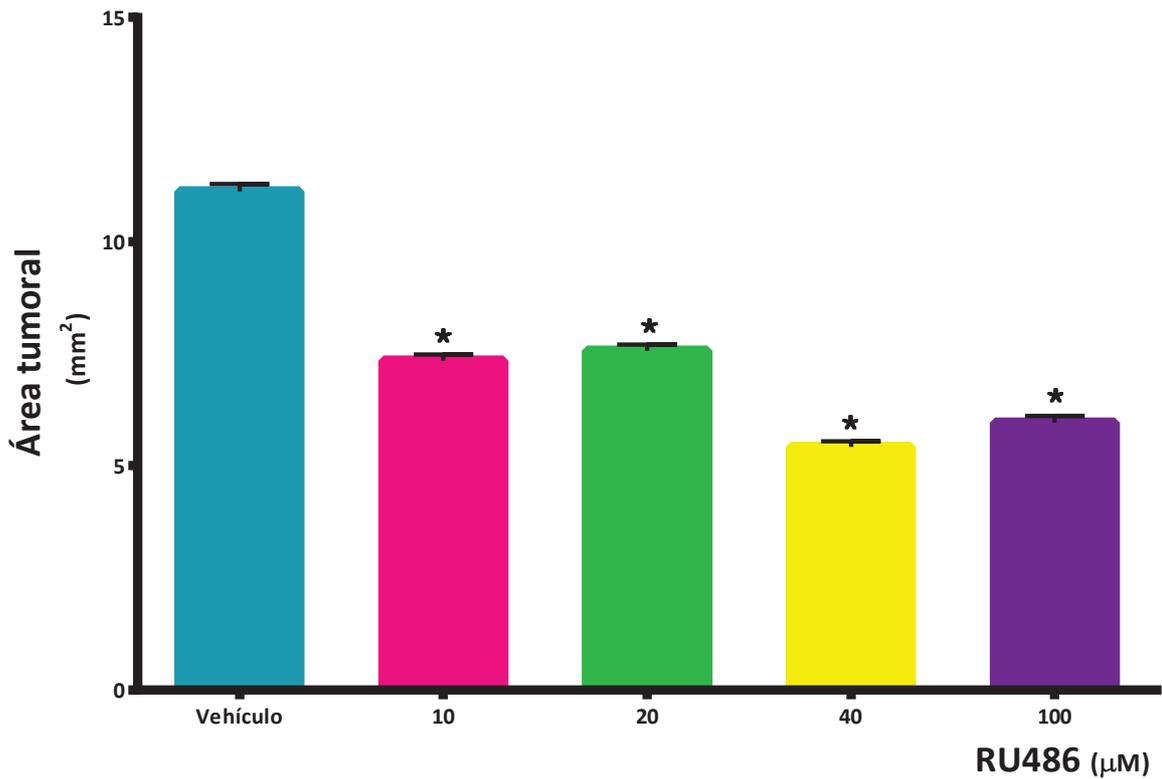


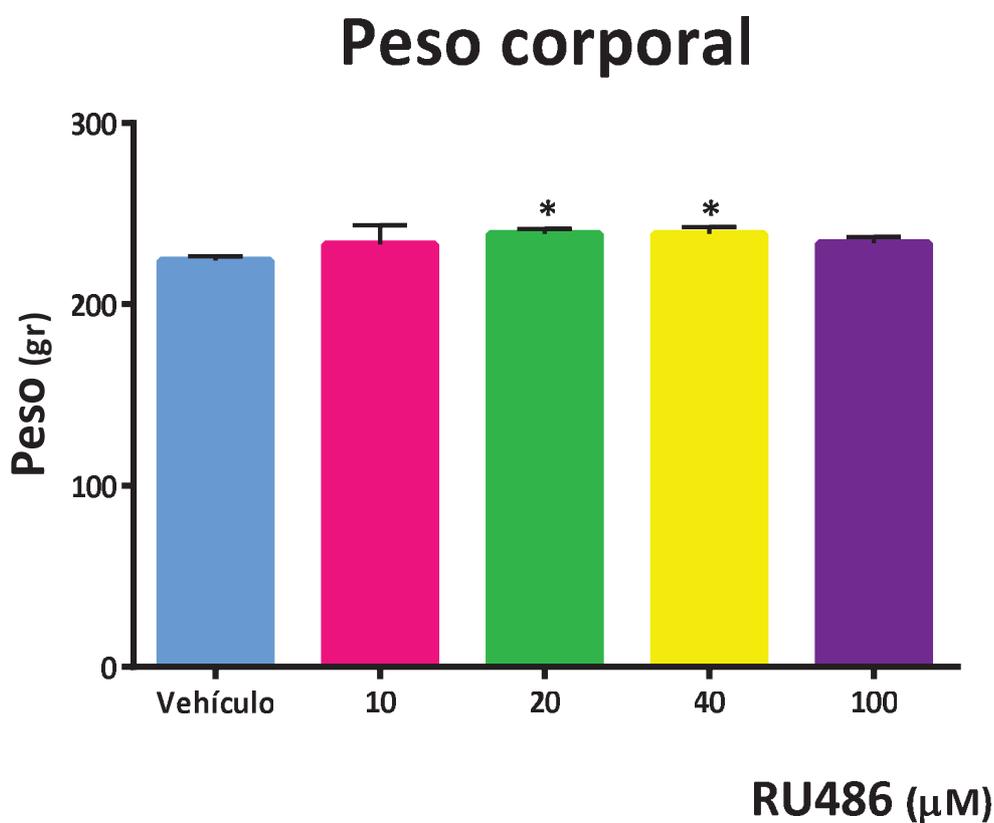
Figura 11. Microfotografías que muestran el crecimiento de los tumores inducidos con células C6 donde se observa el efecto del Vehículo (Propilenglicol) y RU486 (1 μ L) a las diferentes concentraciones. Se utilizó la técnica de tinción H-E. El área del tumor se delinea con color morado. Aumento 1.6 X.

Efecto del RU486



Gráfica 3. Esta gráfica muestra el efecto del RU486 a diferentes concentraciones (10, 20, 40 y 100 µM) sobre los tumores. Los valores se expresan en mm². ANOVA one-way seguido de comparación múltiple de Tukey (P<0.0001).

En la gráfica 4 se muestra el peso corporal de las ratas con respecto al vehículo y del RU486 a las diferentes concentraciones en la cual se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2_{500}=24.62$, $P<0.0001$) entre el grupo administrado con RU486 20 μ M (284 ± 74.38) y 40 μ M (278.3 ± 68.68) con respecto al vehículo (209.6).



Gráfica 4. Peso de las ratas durante la administración del RU486. Kruskal-Wallis seguido de comparación múltiple de Dunnet ($P<0.0001$).

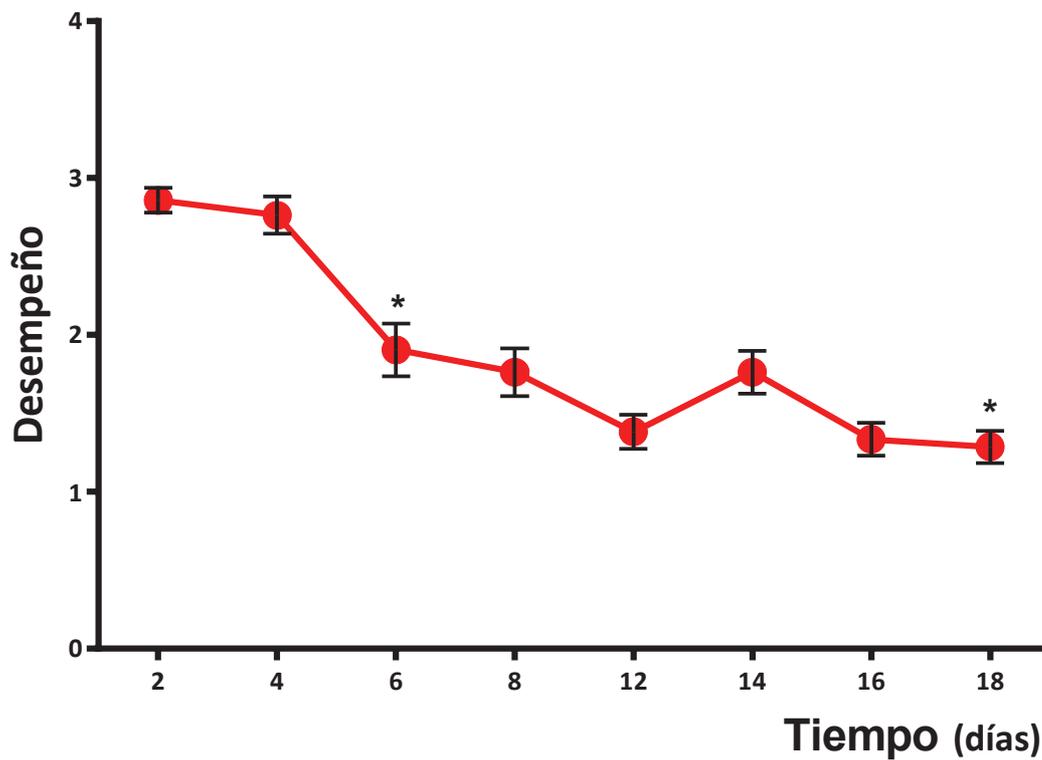
Efecto del RU486 sobre la actividad motriz

En las gráficas 5 a 7 se muestra el registro del desempeño de las ratas en las pruebas conductuales (trepado, fuerza y reflejo de enderezamiento) antes del tratamiento en la curva concentración-respuesta. En la gráfica 5 se muestra el desempeño de las ratas en la prueba de trepado en la cual se observó una diferencia estadísticamente significativa ($F_{4,56, 91.37}=26.40$, $P<0.0001$) en el desempeño de las ratas a los 4 días (2.76 ± 0.210) con respecto a los 6 días (1.90 ± 0.210) y de los 2 días (2.85 ± 0.130) a los 18 días (1.28 ± 0.130). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el desempeño de las ratas de los 2 días (2.85 ± 0.136) a los 4 días (2.76 ± 0.136), de los 6 días (1.90 ± 0.231) a los 8 días (1.76 ± 0.231), de los 8 días a los 12 días (1.38 ± 0.212), de los 12 días a los 14 días (1.76 ± -0.161), de los 14 días a los 16 días (1.33 ± 0.176) y de los 16 días a los 18 días (1.28 ± 0.108) (véase tabla 3).

Por otro lado, en la gráfica 6 se muestra el desempeño de las ratas en la prueba de fuerza de la pata derecha en la cual se puede observar que hubo diferencias estadísticamente significativas ($F_{3,55,71.10}=7.216$, $P=0.0001$) en el desempeño de las ratas de los 2 días (2.00 ± 0.218) a los 6 días (1.00 ± 0.218) y de los 2 días a los 8 días (1.09 ± 0.227), de los 6 días a los 14 días (1.61 ± 0.128) y de los 8 días (1.09 ± 0.131) a los 14 días (1.61 ± 0.131). No hubo diferencias estadísticamente significativas de los 2 días (2.0 ± 0.270) a los 18 días (1.33 ± 0.270). Sin embargo, se observó una tendencia a la baja en el desempeño de las ratas durante los 18 días antes de la administración del RU486 (véase tabla 4).

Finalmente, en la gráfica 7 no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($F_{4.81, 96.26}=0.289$, $P=0.912$) en el desempeño de las ratas en la prueba de reflejo de enderezamiento. Sin embargo, se observó que el desempeño de las ratas se mantuvo constante durante los 18 días antes del tratamiento (véase tabla 5).

Trepado (Antes del tratamiento)

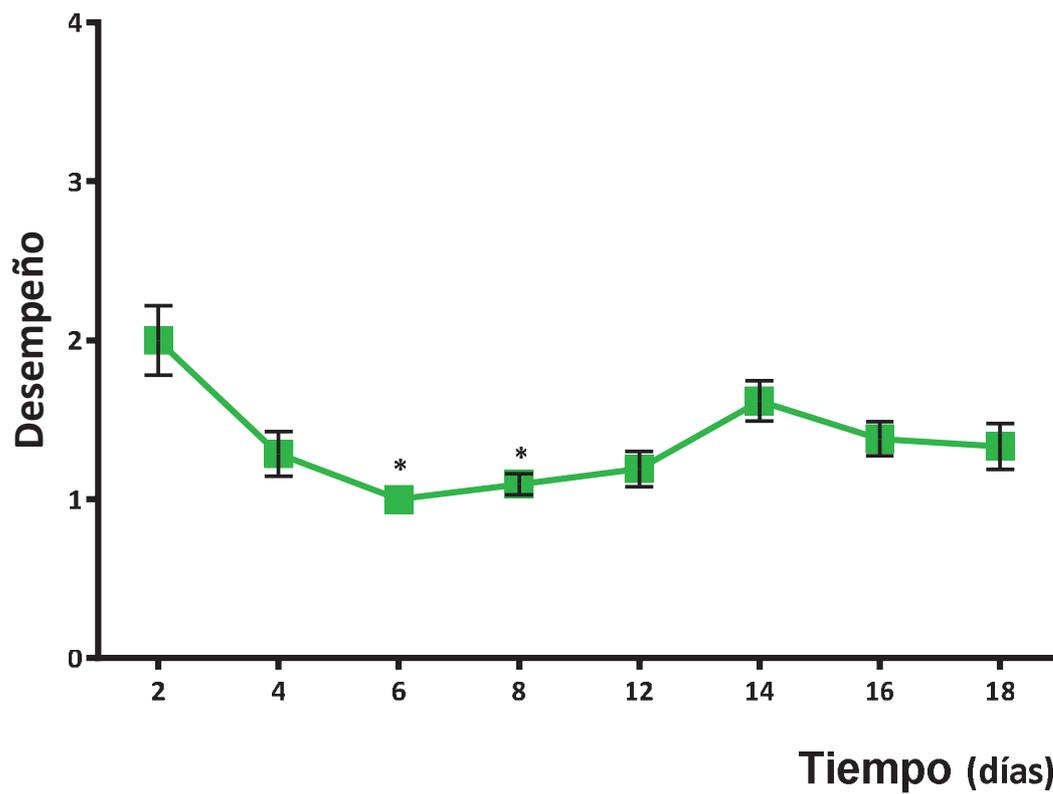


Gráfica 5. Desempeño de las ratas en la prueba de trepado durante el crecimiento tumoral. ANOVA de medidas repetidas seguido de comparación múltiple de Bonferroni ($P < 0.0001$).

Pruebas conductuales antes del tratamiento		
Trepado		
Días	Promedio	Error estándar
2	2.85	0.136
4	2.76	0.210
6	1.90*	0.210
8	1.76	0.231
12	1.38	0.212
14	1.76	0.161
16	1.33	0.176
18	1.28*	0.130

Tabla 3. Esta tabla muestra el promedio del desempeño de las ratas en la prueba de trepado durante los 18 días antes de la administración del RU486. Los datos marcados con un asterisco fueron estadísticamente significativos ($P < 0.0001$).

Fuerza (Antes del tratamiento)

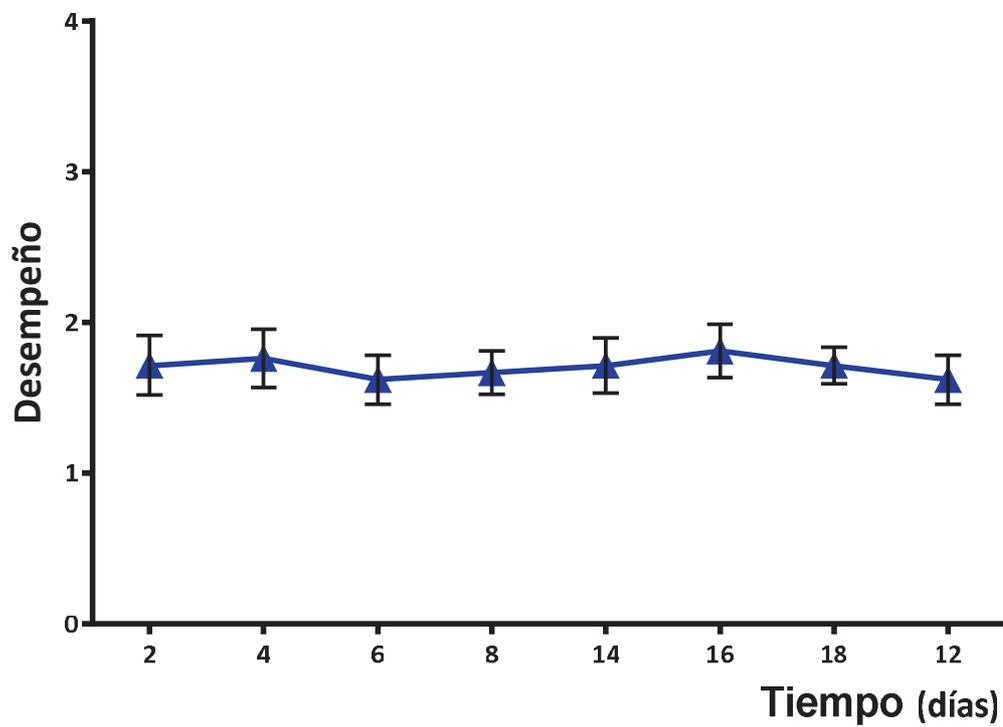


Gráfica 6. Desempeño de las ratas en la prueba de fuerza de la pata derecha durante el crecimiento tumoral. ANOVA de medidas repetidas seguido de comparación múltiple de Bonferroni ($P=0.0001$).

Pruebas conductuales antes del tratamiento		
Fuerza		
Días	Promedio	Error estándar
2	2.00	0.218
4	1.28	0.240
6	1.00*	0.218
8	1.09*	0.227
12	1.19	0.224
14	1.61	0.128
16	1.38	0.243
18	1.33	0.270

Tabla 4. Esta tabla muestra el promedio del desempeño de las ratas en la prueba de fuerza durante los 18 días antes de la administración del RU486. Los datos marcados con un asterisco fueron estadísticamente significativos ($P < 0.0001$).

Reflejo (Antes del tratamiento)



Gráfica 7. Desempeño de las ratas en la prueba de reflejo de enderezamiento durante el crecimiento tumoral. ANOVA de medidas repetidas seguido de comparación múltiple de Bonferroni ($P=0.9122$, NS).

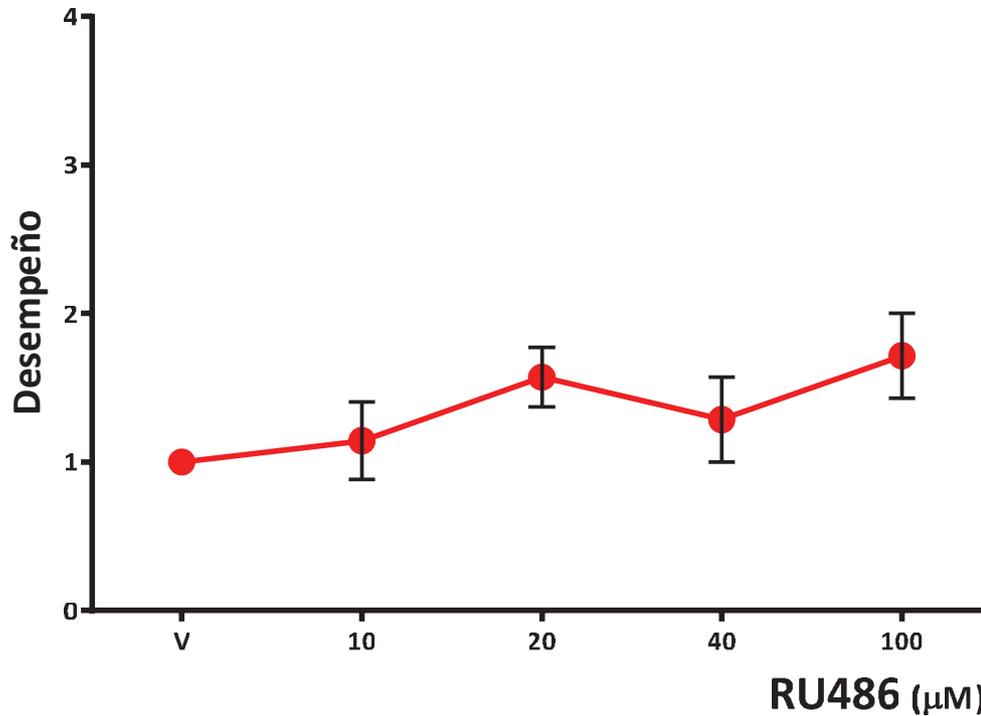
Pruebas conductuales antes del tratamiento		
Reflejo de enderezamiento		
Días	Promedio	Error estándar
2	1.71	0.223
4	1.76	0.181
6	1.61	0.158
8	1.66	0.128
12	1.61	0.152
14	1.71	0.136
16	1.81	0.136
18	1.71	0.136

Tabla 5. Esta tabla muestra el promedio del desempeño de las ratas en la prueba de fuerza durante los 18 días antes de la administración del RU486.

En las gráficas 8 a 10 se muestra el desempeño de las ratas en las pruebas conductuales (trepado, fuerza y reflejo de enderezamiento) después del tratamiento.

En la gráfica 8 se muestra el desempeño de las ratas en la prueba de trepado en la cual se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el desempeño de las ratas en todos los grupos ($H_{4, 35}=6.095$, $P=0.192$). Sin embargo, se observó una tendencia a la mejoría en el desempeño de las ratas a las diferentes concentraciones del RU486 con respecto al vehículo (véase tabla 6). Por otro lado, en la gráfica 9 se muestra el desempeño de las ratas en la prueba de fuerza de la pata derecha en la cual se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el desempeño de las ratas en todos los grupos ($H_{4, 35}=4.641$, $P=0.326$). Sin embargo, se observó que el desempeño se mantuvo constante después de la administración del RU486 (véase tabla 7). Finalmente, en la gráfica 10 se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el desempeño de las ratas en la prueba de reflejo de enderezamiento en las diferentes concentraciones del RU486 con respecto al vehículo. Sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa en el desempeño de las ratas del grupo RU486 ($H_{4, 35}=9.611$, $P=0.047$) a la concentración de $100\mu\text{M}$ (27.36 ± 14.21) con respecto al grupo de $40\mu\text{M}$ (13.14 ± 14.21) (véase tabla 8).

Trepado (Post-tratamiento)

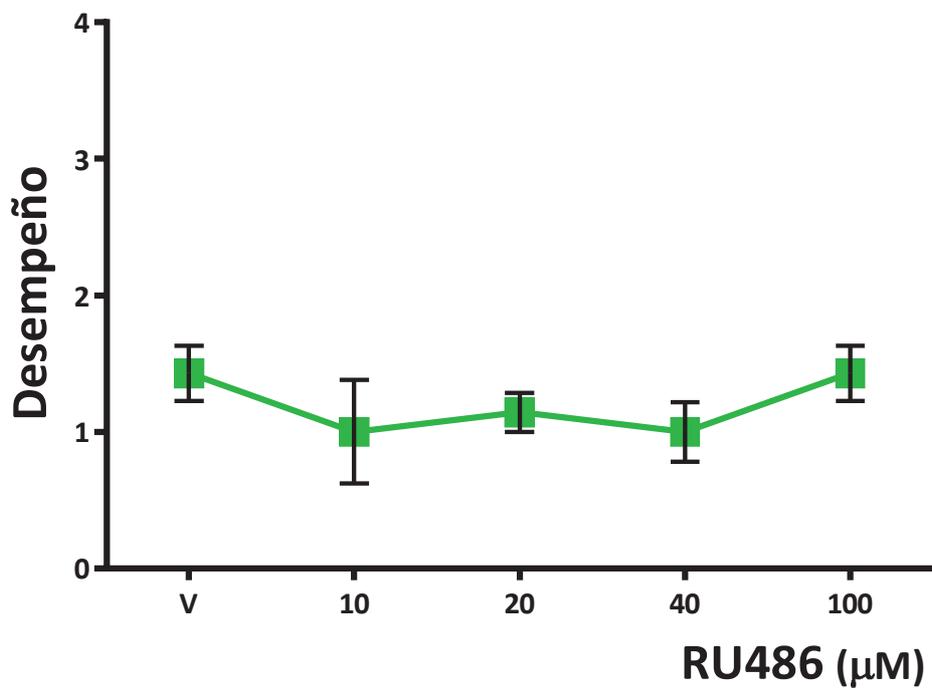


Gráfica 8. Desempeño de las ratas en la prueba de trepado después de la administración del RU486. Kruskal-Wallis seguido de comparación múltiple de Dunnet ($P=0.192$, NS).

Pruebas conductuales Post-tratamiento		
Trepado		
Grupos	Promedio	Error estándar
Vehículo	12.50	3.00
RU486 10 μ M	15.50	0.143
RU486 20 μ M	21.64	9.14
RU486 40 μ M	17.79	5.28
RU486 100 μ M	22.57	10.07

Tabla 6. Esta tabla muestra el promedio del desempeño de las ratas en la prueba de trepado después de la administración del RU486 y Propilenglicol como vehículo.

Fuerza (Post-tratamiento)

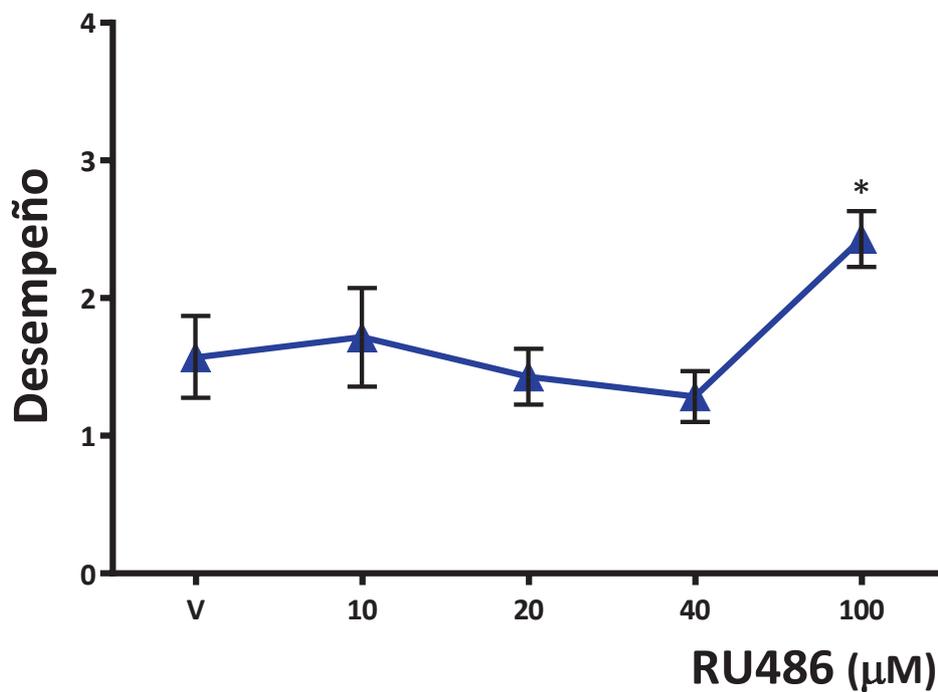


Gráfica 9. Desempeño de las ratas en la prueba de fuerza de la pata derecha después de la administración del RU486. Kruskal-Wallis seguido de comparación múltiple de Dunnet (P=0.326, NS).

Pruebas conductuales Post-tratamiento		
Fuerza		
Grupos	Promedio	Error estándar
Vehículo	21.64	7.50
RU486 10 μ M	14.14	7.50
RU486 20 μ M	17.21	4.42
RU486 40 μ M	15.36	6.28
RU486 100 μ M	21.64	0.0

Tabla 7. Esta tabla muestra el promedio del desempeño de las ratas en la prueba de fuerza después de la administración del vehículo y RU486 a las diferentes concentraciones.

Reflejo (Post-tratamiento)



Gráfica 10. Desempeño de las ratas en la prueba de reflejo de enderezamiento después de la administración del RU486. Kruskal-Wallis seguido de comparación múltiple de Dunnet ($P=0.047$).

Pruebas conductuales Post-tratamiento		
Reflejo de enderezamiento		
Grupos	Promedio	Error estándar
Vehículo	16.50	1.28
RU486 10 μ M	17.79	1.28
RU486 20 μ M	15.21	1.28
RU486 40 μ M	13.14	3.35
RU486 100 μ M	27.36*	10.86

Tabla 8. Esta tabla muestra el promedio del desempeño de las ratas en la prueba de reflejo de enderezamiento después de la administración del vehículo y RU486 a las diferentes concentraciones.

CAPÍTULO V

Discusión

Actualmente, los tumores cerebrales son una de las principales causas de mortalidad en nuestro país (Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática, 2012). El desarrollo de terapias nuevas ha mostrado un gran interés por la agresividad y las alteraciones conductuales que ocasiona el GBM. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones tratan de disminuir los efectos secundarios del tratamiento farmacológico y radiológico dejando de lado las alteraciones conductuales. Recientemente, varios investigadores comprobaron que el RU486 es efectivo contra células tumorales en modelos animales y en cultivo celular de líneas de diversos tipos de cáncer (Atif et al., 2011, Tieszen et al., 2011, Bakker et al., 1987, Pinski et al., 1993, Michna et al., 1992, Wiehle et al., 2007, Goyeneche et al., 2007, Tian et al., 2008, Moe et al., 2009 y Llaguno-Munive et al., 2013); es por esto, que se observó la alteración motora de la rata ocasionada por el tumor inducido en CMP, así como la relación del efecto sobre el crecimiento del tumor con la administración del RU486 en nuestro modelo.

En la primera fase del presente trabajo se estandarizó el modelo experimental del GBM en ratas. Chicoine y Silbergeld (1995) determinaron la invasividad y migración de las células C6 inyectadas con agar en ratas Sprage-dawley y Wistar; encontraron que el tumor de las ratas Sprage-Dawley fue ligeramente mayor que el de las ratas Wistar. Estos autores, observaron que el agar hizo que el tumor creciera de forma bien delimitada pero no hicieron análisis histopatológico de su modelo para determinar las características histopatológicas. Por otra parte, en

1990, Bernstein y colaboradores, encontraron que 7 días después de que las células C6 fueran implantadas en la corteza cerebral habían emigrado e invadido sustancia gris y blanca; debido a esto, sugirieron que las células C6 migraban como células individuales y que generaban una invasión en forma de masa. Así mismo, investigaciones anteriores (Peterson et al., 1994), han reportado que el crecimiento de las células C6 inducidas en ratas Wistar mostraron características similares al glioma humano como invasión parenquimal, angiogénesis y necrosis. En nuestro modelo, a diferencia del modelo de Chicoine y Silbergeld (1995), observamos que hubo un incremento significativo ($P < 0.0001$) en el crecimiento de los tumores inducidos sin agar hasta los 10 días en comparación con el grupo con agar de los 2 a los 10 días (Gráf. 1). Sin embargo, hubo un ligero crecimiento no significativo en los tumores inducidos con agar a los 12 días en comparación con los tumores inducidos sin agar. Esto podría deberse, a que el agar fue fagocitado por los macrófagos y astrocitos permitiendo la proliferación y migración celular que había sido controlada durante los primeros 10 días de evolución tumoral. Adicionalmente, con base en lo demostrado por Berstein y colaboradores (1990); así como, Peterson y colaboradores (1994), establecimos que nuestro modelo es similar al GBM en humanos debido a que, el crecimiento de los tumores mostraron diferentes formas, tamaño y progresión presentando cambios histopatológicos como pleomorfismo celular, atipia celular y nuclear, así como área necrótica con células en pseudoempalizadas en la periferia. En el peso, se observaron diferencias significativas en el peso de las ratas del grupo con agar con respecto al grupo células microinyectadas sin agar. Esto podría deberse a una relación proporcional tamaño-peso, debido a que los tumores del grupo con agar fueron

significativamente menores que los tumores sin agar ($P=0.001$). Sin embargo, serían necesarios más estudios para afirmar esta relación así como para determinar que la disminución del peso de las ratas del grupo sin agar sea debido a metástasis, ya que el GBM por ser un tumor maligno de grado IV generalmente ocasiona metástasis en los pacientes (Portellano, 2005).

La segunda fase consistió en administrar diferentes concentraciones del RU486 y observar el efecto que ejerce sobre el GBM. En este estudio observamos que el RU486 provocó una disminución significativa del área tumoral en todas las concentraciones con respecto al grupo del vehículo ($P<0.0001$). Estos resultados concuerdan con lo observado en varios estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* de diferentes líneas celulares en los que se demostró la efectividad del RU486 (Atif et al., 2011, Tieszen et al., 2011, Bakker et al., 1987, Pinski et al., 1993, Michna et al., 1992, Wiehle et al., 2007, Goyeneche et al., 2007, Tian et al., 2008, Moe et al., 2009 y Llaguno-Munive et al., 2013). No obstante, la mayoría de las investigaciones sobre tumores se han realizado en modelos *in vitro* y muy pocas investigaciones se han realizado con modelos *in vivo*, las cuales han realizado la microinyección de células en la pata (Trejo-Solís et al., 2005 y Tian et al., 2008) o en los flancos de las ratas (Llaguno-Munive et al., 2013 y Dave et al., 2015). Por esta razón, en este trabajo se estandarizó el modelo de GBM intracerebral, con el fin de realizar un modelo que replique las condiciones con las cuales los pacientes llegan a consulta. Por otra parte, la administración de diversos tratamientos farmacológicos en modelos de tumores en la pata (Trejo-Solís et al., 2005) o en los flancos (Dave et al., 2015) la han realizado vía

periférica. En cambio, en este trabajo realizamos la administración *in situ*, la cual nos permitió ver el efecto directo del fármaco sobre el tumor sin pasar por todas las barreras por las que atraviesa al ser administrado por vía periférica.

En el peso de las ratas se observó un incremento significativo ($P < 0.0001$) en las ratas administradas con el RU486 a 20 y 40 μM cuando fueron comparadas con el vehículo. Nuestros resultados confirman los reportes realizados por Deraedt R y colaboradores (1985), Sitruk-Ware R y Spitz I (2003) y Goyeneche A, Carón R y Telleria (2007), quienes refirieron que el RU486 no tiene efectos tóxicos aparentes, por lo tanto, no ocasiona una disminución significativa del peso de las ratas tratadas con éste fármaco.

Por otro lado, las pruebas conductuales realizadas antes y post-tratamiento. Sólo se observó una disminución significativa en el desempeño de las ratas en la prueba de trepado antes del tratamiento de los 4 a los 6 días y de los 2 a los 18 días ($P < 0.0001$). De igual forma, se observó una disminución significativa ($P = 0.0001$) en el desempeño de las ratas en la prueba de fuerza de los 2 a los 6 y 8 días. Finalmente, se observó un incremento significativo ($P = 0.0475$) en el desempeño de las ratas en la prueba de reflejo de enderezamiento post-tratamiento de la concentración 100 μM con respecto a RU486 40 μM . Mientras que, en las otras pruebas conductuales realizadas antes y después de la administración del RU486 durante la fase II no se observaron diferencias significativas. Esto sugiere que el RU486 no mejoró el desempeño de las ratas en las pruebas conductuales, aunque se observó una disminución significativa del tumor en todas las concentraciones. Sin embargo, en las pruebas conductuales

antes del tratamiento se observó una tendencia a la baja en el desempeño de las ratas en las pruebas de trepado (Graf. 5) y fuerza (Graf. 6), posiblemente derivado del efecto del tamaño del tumor. En cambio, el desempeño de las ratas en la prueba de reflejo de enderezamiento se mantuvo constante. Por el contrario, en las pruebas conductuales post-tratamiento se observó una tendencia a la mejoría en todas las pruebas conductuales. Es por esto, que surge la incógnita si ¿esta mejoría podría ser ocasionada por el fármaco?, pero no lo podemos asegurar, ya que las pruebas conductuales sólo se realizaron durante 7 días después de la administración del RU486. Así mismo, las pruebas conductuales realizadas no son muy sensibles a los cambios. Es por esto, que es necesario realizar las pruebas conductuales con instrumentos más sensibles a los cambios (por ejemplo, utilizar un dinamómetro para medir la fuerza de la pata) y utilizar pruebas cuantitativas (campo abierto y rotarod). También, es necesario realizar por más tiempo las pruebas conductuales después del tratamiento, para determinar si la tendencia a la mejoría en el desempeño es ocasionada por el tratamiento con el RU486; así como, observar si la mejoría es transitoria o de forma permanente.

Por otro lado, Rosenzweig y Leiman (1992) observaron que los trastornos causados por cualquier daño en la CMP en roedores suelen ser pasajeros en comparación con otros mamíferos. Pinel (2006) refirió que las lesiones ocasionadas en la corteza motora primaria tienen un efecto menor al esperado, ya que no se suprimen los movimientos voluntarios debido a que existen otras vías que envían la información motora sin pasar por la CMP. Por lo tanto, podría ser la corteza premotora, el área motora suplementaria, la corteza motora cingulada, los

ganglios basales, el cerebelo o la corteza motora primaria contralateral los que estén asumiendo el papel de la CMP lesionada; adaptándose a los cambios y reemplazando las funciones de la CMP para minimizar los efectos estructurales y funcionales ocasionados por el tumor. De acuerdo con Rosenzweig y Leiman (1992) y Pinel (2006), esta podría ser la razón por la cual no se observaron diferencias significativas en el desempeño de las ratas en las pruebas conductuales; ya que, a pesar del tamaño de los tumores las ratas no disminuyeron su desempeño durante el crecimiento tumoral y tampoco mejoraron el desempeño en las pruebas después del tratamiento como se esperaba, sino que se mantuvieron constantes durante todo el experimento.

Finalmente, el hallazgo más importante del presente trabajo fue haber estandarizado un modelo del GBM similar al humano que permitirá que futuras investigaciones lo utilicen para seguir probando fármacos (como las casiopeínas) que puedan ayudar al tratamiento de éste tumor para mejorar la calidad de vida, aumentar la sobrevida de los pacientes, así como, disminuir el costo del tratamiento y los efectos secundarios.

Conclusiones

Se estandarizó el modelo experimental de GBM bajo las condiciones del Laboratorio, que permitirá seguir realizando investigaciones con diversos tratamientos farmacológicos.

El RU486 podría ser un fármaco coadyuvante para el tratamiento de pacientes con Glioblastoma Multiforme debido a que observamos que la administración *in situ* del RU486 disminuyó el área tumoral en todas las concentraciones así como, no hubo cambios en el peso corporal después de la administración del fármaco de nuestro modelo.

La motricidad en las ratas se vio poco alterada debido a que, sólo las pruebas de trepado y fuerza realizadas antes del tratamiento farmacológico resultaron afectadas.

Limitaciones

Una de las limitaciones más claras fueron las pruebas conductuales realizadas ya que no fueron lo suficientemente finas para reflejar un daño, además de que la escala de calificación fue muy estrecha y no permitió que hubiera variabilidad entre los resultados. Adicionalmente, la evaluación del desempeño fue arbitraria debido a que fue de un solo observador.

Otra de las limitaciones es la medición del área tumoral ya que de igual forma que en las pruebas conductuales fue de un solo observador. Sin embargo, actualmente los investigadores del Laboratorio de la Formación Reticular se encuentran haciendo una colaboración con el Instituto de Física de la UNAM, en el cual realizarán una reconstrucción tridimensional del tumor para compararlo con las mediciones de nuestro modelo. Se pretende contrastar las posibles variaciones en la medición del área tumoral por medio del análisis morfométrico con la obtención de imágenes con un microPET y un software especial que realizará la reconstrucción tridimensional del tumor.

Perspectivas

Es necesario ampliar la investigación con respecto al efecto ocasionado por las diversas concentraciones del RU486 para determinar el rango de seguridad del fármaco y a la par realizar estudios de toxicidad en cultivo primario. Así mismo, realizar la administración del tratamiento con la concentración que mejor efecto tuvo y realizar inmunohistoquímica con anticuerpos como Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), p53, protooncogén, B-cell Lymphoma 2 (Bcl-2), Ciclina-D3 (Cyc-D), Bcl-2-asociado a la proteína X (Bax) y valoración de la apoptosis por el método de marcaje del Ácido Desoxirribunocleico (DNA) fragmentado Tdt-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) para determinar el efecto angiogénico, apoptótico, antiproliferativo y citostático del RU486 sobre el GBM.

REFERENCIAS

- Atif, F., Sayeed, I., Yousuf, S., Ishrat, T., Hua, F., Wang, J., Brat, D., and Stein, D. (2011) Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: *In vitro* and *In vivo* evidence. *Mol Med* 17 (9-10) 1084-1094.
- Bakker, G., Setyono-Han, B., Henkelman, M., de Jong, F., Lamberts, S., van der Schoot, P. and Klijn, J. (1987) Comparison of the actions of the antiprogestin mifepristone (RU486), the progestin megestrol acetate, the LHRH analog buserelin, and ovariectomy in treatment of rat mammary tumors. *Cancer Treat Rep*; 71(11): 1021-1027.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*; 161: 3770-3771.
- Bernier, M., Paul, R., Dossou, K., Wnorowski, A., Ramamoorthy, A., Paris, A.,...Wainer, I. (2013) Antitumor activity of (R, R')-4-methoxy-1-naphthylfenoterol in a rat C6 glioma xenograft model in the mouse. *Pharmacology Research & Perspectives*, 1 (2): 1-12.
- Bernstein, J., Goldberg, W., Laws, E., Conger, D., Morreale, V. and Wood, L. (1990) C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting ultrastructure. *Neurosurgery*; 26 (4): 622-628.
- Cadepond, F., Ulmann, A. and Baulieu, M. (1997) RU486 (MIFEPRISTONE): Mechanisms of action and clinical uses. *Annu. Rev. Medical*; 48: 129-156.
- Camacho-Arroyo, I., González-Agüero, G., Gamboa-Domínguez, A., Cerbón, M. and Ondarza, R. (2000) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *Journal Neurooncology*; 49 (1): 1-7.
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. (2011) Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Secretaría de Salud, Subsecretaría de prevención y promoción de la salud y Dirección general de epidemiología. Recuperado de la red el 29 de agosto de 2014:

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LOS_TUMORES_MALIGNOS_M%C3%A9xico.pdf

Chicoine, M. and Silbergeld, D. (1995) Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *Journal Neurosurgery*; 83 (4): 665-671.

Chicoine, M. and Silbergeld, D. (1995) Assessment of brain tumor cell motility *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Neurosurgery*; 82 (4): 615-622.

Da Silva, A., Romero, F., Bustamante, J., Moraes, J., Saraiva, R., Tannus, A., ...Fernel, L. (2012) Monitoramento por imagem de ressonância magnética do crescimento tumoral no modelo C6 de glioblastoma com perspectivas de avaliação da terapia de magnetohipertermia. *Einstein*; 10 (1): 11-15.

Dave, N., Chow, L., Gudelesky, G., LsaSance, K., Qi, X., and Desai, P. (2015) Pre-clinical pharmacological evaluation of Letrozole as a novel treatment for gliomas. *Mol. Cancer. Ther.*, 0743.2014.

Deraedt, R., Vannier, B. and Fournex, R. (1985) Toxicological study on RU486. In: Sitruk-Ware, R. and Spitz, I. (2003) Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception*; 68: 409-420.

de Groot, M. and Yung, W. (2008) Bevacizumab and Irinotecan in the treatment of recurrent malignant gliomas. *The Cancer Journal*; 14(5): 280- 285.

Dijkema, R., Schoonen, W., Teuwen, R., van der Struik, E., de Ries, R., van der Kar, B. and Olijve, W. (1998) Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells, I. Stable transfection of receptor and receptor-responsive reporter gene: transcription modulation by (anti) progestagens. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biological*; 64(3-4): 147-156.

El-Zein, R., Bondy, M. and Wrensch. (2005) Epidemiology, Biology, Genetics, and pathology en Ali-Osman F (2005) *Brain tumors*. New Jersey: Humana Press, pp. 3-18.

- Fogh, S., Andrews, D., Glass, J., Curran, W., Glass, C., Champ, C.,... Werner-Wasik, M. (2010) Hypofractionated stereotactic radiation therapy: An effective therapy for recurrent high-grade gliomas. *Journal of Clinical Oncology*; 28 (18): 3048-3053.
- Gladson, C., Prayson, R and Liu, W. (2010) The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol*; 5: 33-50.
- Goyeneche, A, Carón, R and Telleria, C. (2007) Mifepristone inhibits ovarian cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res*; 13 (11): 3370-3379.
- Hayat, M. (2011) *Tumors of the Central Nervous System*. New York: Springer, pp. 3-8.
- Hardwick, A., Linton, E. and Rothwell, N. (1989) Thermogenic effects of the antigluocorticoid RU-486 in the rat: involvement of corticotropin-releasing factor and sympathetic activation of brown adipose tissue. *Endocrinology*; 124 (4): 1684-1688.
- Heikinheimo, Kekkonen, and Lahteenmaki. (2003) The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogestin action. *Contraception* 68(6):421-6.
- Hernández, R., Fernández, C y Baptista, P. (2006) *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw Hill.
- Holland, E. (2000) Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proc. Natl. Acad, Sci*; 97 (12): 6242-6244.
- Horwitz, K. (1992) The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer?. *Endocrinology Review*; 13 (2): 146-163.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI) (2012) Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Recuperado de la red el 07 de octubre de 2014:

<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>.

Jaramillo, S., Osorio, W. y Espitia, J. (2010) Avances en el tratamiento del glioblastoma multiforme. *Universidad Médica Bogotá*; 51 (2): 186-203.

Jelsma, R and Bucy, P. (1967) The treatment of Glioblastoma multiforme of the brain. *Journal of Neurosurgery*; 27(5): 388-400.

Kanu, O., Hughes, B., Di, C., Lin, N, Fu, J., Bigner, D., Yan, H., and Adamson, C. (2009) Glioblastoma multiforme oncogenomics and signaling pathways. *Clinical Medicine: Oncology*; 8 (3): 39-52.

Kaye, A., Morstyn, G., Gardner, I. and Pyke, K. (1986) Development of xenograft glioma model in mouse brain. *Cancer Research*; 46: 1367-1373.

Krishnan, K., Reed, D., Wilson, W., Saunders, W., Ritchie, J., Nemeroff, C. and Carroll, B. (1992). RU486 in depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 16 (6): 913-920.

Lapiente, F., Del Pino, M. y Rabadán, M. (2010) *Neuropsicología: Patología cerebral*. Madrid: Diego Marín, pp. 25-41.

Llaguno-Munive, M., Medina, L., Jurado, R., Romero-Piña, M. and García-López, P. (2013) Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer Cell International*, 13 (1): 29-37.

Lonn, S., Klaeboe, L., Hall, P., Mathiesen, T., Auvienen, A., Christensen, H., Johansen, C., Salminen, T., Tynes, T. and Feychting, M. (2004) Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries. *Int. J. Cancer*; 108(3): 450-455.

Michna, H., Nishino, Y., Neef, G., McGuire, W. and Schneider, M. (1992) Progesterone antagonists: tumor-inhibiting potential and mechanism of action. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biological*, 41 (3-8): 339-348.

- Moe, B., Vereide, A., Orbo, A. and Sager, G. (2009) High concentrations of progesterone and mifepristone mutually reinforce cell cycle retardation and induction of apoptosis. *Anticancer Research*, 29 (4): 1053-1058.
- Morrone, F., Oliveira, D., Gamermann, P., Stella, J., Wofchuk, S., Wink, M., Meurer, L., Edelweiss, M, Lenz, G. and Battastini, A. (2006) In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BioMed Central Cancer*, 23 (6): 226- 236.
- Moscote, L., Meneses, C., Sáenz, M., Penagos, P., Zubieta, C. y Romero, A.. (2010) Manejo actual del Glioblastoma Multiforme. *Revista Ciencias Biomédicas*; 1(2): 237-245.
- Munden, P. and Schmidt, T. (1992) Mifepristone blocks specific glucocorticoid receptor binding in rabbit iris-ciliary body. *Arch Ophthalmol*; 110(5):703-705.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO., (1999) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Coordinación General Jurídica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*, con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; artículos 4º. fracción III, 12 fracción XIV, 17 y 18 fracción VI de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 15 fracciones XXX y XXXI del Reglamento Interior.
- Opoku, J. and Kalimi, M. (1992) Role of the antigluocorticoid RU486 in the prevention of steroid-induced hypertension. *Acta Endocrinol.* 127(3): 258-261.
- Padros, M., Lamberton, K., Yung, W., Jaeckle, K., Robins, H., Mehta, M., ...Kunk, J. (2006) A phase 2 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro Oncology*; 8: 189-193.

- Paxinos, G. and Watson, C. (1998) *Atlas of the rat brain*. San Diego, California: Academic Press.
- Peterson, D., Sheridan, P. and Brown, W. (1994) Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *Journal of Neurosurgery*; 80 (5): 865-876.
- Peterson, S. y Alberston, T. (1998) *Neuropharmacology methods in epilepsy research*. London: CRC Press, pp. 171-192.
- Pinski, J., Halmos, G., Shirahige, Y., Wittliff, J. and Schally, A. (1993) Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77(5): 1388-1392.
- Portellano, J. (2005) *Introducción a la Neuropsicología*. Mc Graw Hill. Universidad computense de Madrid, pp. 49-54.
- Rosenzweig, M. y Leiman, A. (1992) *Psicología fisiológica: Movimientos y acciones*. Madrid: McGraw-Hill, pp. 374- 425.
- Salcman, M. (2001) Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. En Kaye A y Laws Jr. (Ed.), *Brain tumors: an encyclopedic approach*. Spain: Churchill Livingstone.
- Sarkar, N. (2002). Mifepristone: bioavailability, pharmacokinetics and use-effectiveness. *European Journal of Obstetrics y Gynecology and Reproductive Biology*, 101(2): 113-120.
- Secretaría de Salud. (2012) Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2010. Subsecretaría de prevención y promoción de la Salud; Dirección General de Epidemiología. Recuperado de la red el 07 de octubre de 2014: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/A_Morta_%202010_FINAL_Junio%202012.pdf.

- Serrano, J. (2008) Bases anatómicas, desarrollo del cerebro y blancos celulares de transformación neoplásica. En Aguirre M y Sotelo J, (Ed.) *Tumores Cerebrales*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Schaft, E. (2010) Mifepristone: ten years later. *Contraception*; 81: 1-7.
- Shankavaram, U., Bredel, M., Burgan, W., Carter, D., Tofilon C and Camphausen K. (2012) Molecular profiling indicates orthotopic xenograft of glioma cell lines simulate a subclass of human glioblastoma. *J Cell Mol Med*; 16 (3): 545-554.
- Sitruk-Ware, R. and Spitz, I. (2003) Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies. *Contraception*; 68: 409-420.
- Tian, X., Zhou, W., Wu, G., Sun, J. and Cong, M. (2008) Inhibitive effects of mifepristone on growth of breast cancer: experiment with animal model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*; 88 (8): 559-63.
- Tieszen, C., Goyeneche, A., Brandhagen, B., Ortbahn, C. and Telleria, C. (2011) Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BioMed Central Cancer*; 1471-2407 (11): 207-219.
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Sanchez-Torres, L.,...Sotelo, J. (2005) Cas Igly induces apoptosis in glioma C6 cells *in vitro* and *in vivo* through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*, 7 (6): 563-674.
- Wiehle, R., Christov, K. and Mehta, R. (2007) Anti-progestins suppress the growth of established tumors induced by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene: Comparison between RU486 and a new 21-substituted-19-nor-progestin. *Oncology Reports* 18 (1): 167-174.

Zhang, X., Guo, M., Shen, L. and Hu, S. (2014) Combination of photodynamic therapy and temozolamide on glioma in a rat C6 glioma model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11: 603-612.