



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



**PARTICIPACIÓN DE MIFEPRISTONA EN LA
RESISTENCIA A TEMOZOLAMIDA MEDIADA POR
GLICOPROTEÍNA-P Y APOPTOSIS EN UNA LÍNEA
CELULAR DE GLIOBLASTOMA**

TESIS

Que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN:

Grifaldo Maldonado Daniel Manuel
López Rosas Jesús

Directora de Tesis:
Dra. Patricia García López

Asesora de Tesis:
M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara



Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, 2018



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.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 DATOS ESTADÍSTICOS.....	3
2.2 TRATAMIENTO.....	5
2.3 TEMOZOLAMIDA (TMZ).....	5
2.3.1 REPARACIÓN DEL DAÑO.....	6
2.3.2 RESISTENCIA A TEMOZOLAMIDA	8
2.4 GLICOPROTEÍNA-P (PGP).....	8
2.4.1 REPOSICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	9
2.5 MIFEPRISTONA	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVO GENERAL	13
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
6.2 CULTIVO CELULAR	14
6.2.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	15
6.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PGP POR WESTERN BLOT	16
6.4 FUNCIÓN DE PGP POR CITOMETRÍA DE FLUJO	16
6.5 EVALUACIÓN DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	17
7. RESULTADOS	18
7.1 VIABILIDAD	18
7.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PGP	19

7.3 RECAPTURA DE DOXORRUBICINA PARA EVALUAR LA FUNCIÓN DE PGP	22
7.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPTURA INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA.....	22
7.3.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RECAPTURA	23
7.4 FUNCIÓN DE PGP DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS DE TEMOZOLAMIDA Y MIFEPRISTONA	23
7.5 EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS	24
8. DISCUSIÓN	25
9. CONCLUSIÓN	29
10. PERSPECTIVAS.....	29
11. REFERENCIAS.....	29

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Valentín Islas Pérez
Vocal: Dra. Patricia García López
Secretario: M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara
1er suplente: M. en C. Evangelina López Nieto
2° suplente: Q.F.B. Carolina Jiménez López

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología de la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología y fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de proyecto: CB-258823.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, nuestra *alma mater*, por brindarnos la oportunidad de formar parte de ella y darnos el conocimiento y herramientas necesarias para enfrentar nuestra vida profesional y personal.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por permitirnos utilizar sus instalaciones para adquirir y perfeccionar nuestros conocimientos y a **nuestros profesores** que nos guiaron y formaron a través de la carrera para egresar como profesionistas íntegros y con ética a la vida laboral.

Al **laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cancerología** y sus investigadores que nos apoyaron con su amplio conocimiento y recursos para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Patricia García López** por brindarnos la oportunidad de realizar el proyecto, por la paciencia, apoyo y confianza durante nuestra estancia en su laboratorio.

A la **M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara**, por brindarnos su confianza y estar pendiente de cada revisión de este proyecto.

Al **Biólogo Francisco Rafael Jurado**, por la paciencia, consejos y apoyo técnico durante cada experimento.

A la **Q.F.B. Monserrat Llaguno Munive**, por el apoyo y consejos que nos brindó en cada experimento gracias a su experiencia en el área.

DEDICATORIAS

Daniel Manuel Grifaldo Maldonado:

A **Dios** por permitirme seguir en esta vida hasta este momento con plena salud.

A **mis padres** por darme la vida, su cariño, amor, apoyo y consejos durante todos estos años que me han servido para poder ser una persona de bien y lograr esta meta.

A **mis hermanos** por ser un ejemplo a seguir, motivarme a hacer lo que me gusta, apoyarme en todos los sentidos y siempre estar ahí cuando los necesito.

A **Montserrat Cerqueda** por convertirte en mi compañera de vida, mi alma gemela. Por siempre apoyarme incondicionalmente y creer en mí, incluso en los momentos en que había perdido la confianza en mí mismo.

A **Jesús López** por brindarme tu amistad, ser mi compañero de trabajo durante todos estos años y apoyarnos en esta experiencia llamada "Tesis" que está por terminar.

Jesús López Rosas:

A mis padres **Tere y Raúl** y mi hermano **Pablo**, porque con su ejemplo de esfuerzo, dedicación y vocación me motivaron a cumplir esta meta. Gracias por acompañarme en todo el camino, por depositar su confianza en mí y convertirme en el ser humano que hoy soy, este logro también es de ustedes.

A mi novia **Fernanda Zárate**, gracias por brindarme tu amor, por estar conmigo en los momentos en los que desistía, por darme ánimos y alentarme a ser mejor siempre.

A mi amigo **Daniel Grifaldo**, por la confianza para realizar este proyecto, pero sobre todo por la amistad y el apoyo en todo momento durante la carrera.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central controla varias funciones importantes del organismo, entre ellas funciones sensitivas, motoras e integradoras como memoria y pensamiento. Éste puede dividirse en varias partes, siendo las tres más importantes: cerebro, cerebelo y tronco encefálico.

El cerebro es la parte más grande del encéfalo y controla el pensamiento, el aprendizaje, la solución de problemas, las emociones, el habla, la lectura, la redacción y el movimiento voluntario. Es por esto que los tumores cerebrales se consideran los más agresivos y mortales al afectar funciones primordiales para la supervivencia¹.

Un tumor es una masa anormal de tejido, cuando éste se forma en las células gliales o en tejido de sostén del cerebro, se le denomina “glioma”. Un tipo de glioma son los astrocitomas, que toman su nombre de las células en forma de estrella en las cuales crecen².

Los astrocitomas se pueden clasificar en grados para describir su malignidad. El sistema de clasificación se basa en el ritmo de crecimiento; el grado I se considera de crecimiento lento y es benigno; el grado II se considera de crecimiento lento, pero con tendencia a reaparecer, por lo cual se necesita un monitoreo constante mediante resonancia magnética o tomografías después de su extracción quirúrgica; el astrocitoma de grado III se considera de crecimiento moderado y maligno, ya que se puede infiltrar en el neoplasma de forma difusa; por último, el de grado IV, considerado de crecimiento rápido, también llamado glioblastoma, que es la forma más maligna de los astrocitomas².

Los glioblastomas se diferencian de los demás tumores debido a la presencia de necrosis y aumento de vasos sanguíneos alrededor del tumor², por lo tanto, es uno de los cánceres más vascularizados que existen. En este tumor se encuentran altos niveles de expresión del factor pro-angiogénico, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)³.

El tratamiento convencional para esta neoplasia consiste en la administración de temozolamida (TMZ) en conjunto con radioterapia; sin embargo, la supervivencia media es de aproximadamente 14.6 meses⁴ con un índice de supervivencia a los dos años del 30%².

El bajo índice de supervivencia se debe a la tendencia de las células de glioblastoma a volverse resistentes al tratamiento con temozolamida, esto puede deberse a distintos mecanismos de protección como la expresión de la enzima O6-Metil-Guanina-Metil-Transferasa (MGMT), la cual se encarga de reparar el daño ocasionado en el ADN por la temozolamida⁵. Otro de los mecanismos que participan en la resistencia a la terapia es la sobreexpresión de una bomba de eflujo; La temozolamida ingresa a la célula por difusión pasiva y es expulsada al exterior por la glicoproteína P (PGP).⁶

Existen pocos antecedentes de fármacos empleados como coadyuvantes en la terapia para glioblastoma, así como pocas alternativas de tratamiento contra esta enfermedad, a nivel preclínico se han estudiado algunos fármacos como mifepristona (RU-486), un agente anti progestágeno. En un estudio realizado en nuestro laboratorio en 2013, se evaluó el efecto de este agente anti hormonal en combinación con temozolamida más radiación en xenotrasplantes de glioblastoma desarrollados en ratones atímicos Balb-C Nu/Nu, observando un aumento significativo en el efecto antitumoral con la administración simultánea de mifepristona-temozolamida-radiación en comparación con radiación sola o radiación-temozolamida, sugiriendo que Mifepristona puede ser un potente quimio-radio sensibilizador en glioblastoma; sin embargo, el estudio sugiere varios mecanismos posibles para la disminución significativa en el tamaño del tumor por efecto de la Mifepristona en combinación con Temozolamida y Radioterapia⁷.

La mifepristona utilizada comúnmente como abortivo, ha sido estudiada en diversos tipos de cáncer dependientes de hormonas como el cáncer de mama, ovario y próstata, sin embargo, otro estudio realizado también en nuestro laboratorio en 2015, se demostró que los agentes antihormonales como Mifepristona e ICI 182,780 (Fulvestrant), fármacos anti-progestágeno y anti-

estrogénico respectivamente, usados en combinación con la terapia de cisplatino y radiación, incrementan significativamente la citotoxicidad y el efecto antitumoral en líneas celulares de cáncer de cérvix⁸, un tipo de cáncer no dependiente de hormonas.

A la fecha se desconocen los mecanismos que participan en la sensibilización de las células tumorales expuestas a mifepristona, en el presente estudio se evaluó la participación que tiene la proteína de eflujo PGP en la resistencia a temozolamida en una línea celular de glioblastoma caracterizando los niveles de expresión de PGP, así como la apoptosis y la función de PGP mediante la captación de un fármaco fluorescente como doxorubicina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DATOS ESTADÍSTICOS

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el “cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo”, este crecimiento descontrolado de las células suele producir un tumor el cual invade el tejido circundante y dependiendo de las características propias del tipo de cáncer, puede desarrollar metástasis en el organismo.

En el mundo es preocupante la incidencia del cáncer, ya que de acuerdo a la OMS en 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos⁹, lo que ha llevado a una investigación extenuante para poder tratar los principales tipos de cáncer (Fig.1).

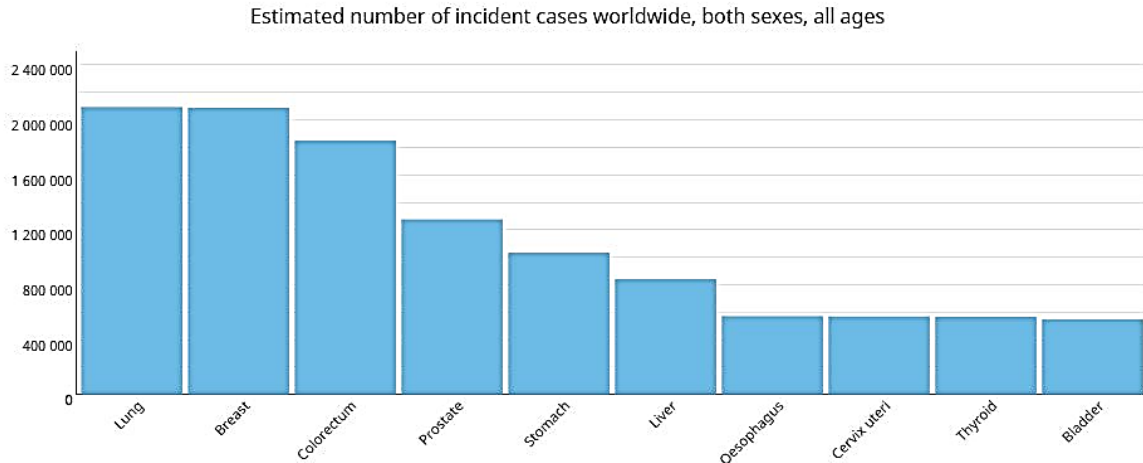


Figura 1. Número estimado en incidencia de casos a nivel mundial en 2018, tomado de GLOBOCAN 2018.

El glioma es un tipo de “cáncer cerebral que se inicia en las células neurogliales (células que rodean y sostienen las células nerviosas)”¹⁰.

Dentro de la clasificación de Gliomas se encuentran subtipos que conforme a la OMS se clasifican en grados (Cuadro 1), siendo los de grado IV o glioblastomas los tumores de rápido crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo preservar vasos de neoformación y áreas de necrosis¹¹.

De acuerdo al Instituto Nacional de la Salud de E.E.U.U. el glioma es un tipo de tumor cerebral de crecimiento rápido del sistema nervioso central que se forma a partir del tejido glial (de sostén) del cerebro y la médula espinal; tiene células cuyo aspecto es muy diferente al de las células normales. También se llama astrocitoma de grado IV o glioblastoma multiforme (GMB).

El tiempo de sobrevivencia promedio de los pacientes con GBM es de 14.6 meses cuando se emplea cirugía, radioterapia y el tratamiento adyuvante de Temozolamida¹².

En el año 2017 los gliomas representaron el 24.7% de todos los tumores cerebrales primarios y el 74.6% de todos los tumores malignos. Los astrocitomas, incluido el glioblastoma, representaron aproximadamente el 75% de todos los gliomas, y el glioblastoma representó el 14.9% de todos los tumores cerebrales primarios y el 55.4% de todos los gliomas. El glioblastoma es el tipo de tumor que

tiene el mayor número de casos de todos los tumores malignos, con un estimado de 12,390 nuevos casos previstos en 2018.¹³

GLIOMAS DE BAJO GRADO	DIAGNÓSTICO OMS 2016	GRADO OMS
Astrocitoma difuso	Astrocitoma difuso IDH mutado	Grado II
	Astrocitoma difuso IDH nativo	Grado II
	Astrocitoma difuso NOS	Grado II
Oligodendroglioma	Oligodendroglioma IDH mutado y 1p19q codeletado	Grado II
	Oligodendroglioma NOS	Grado II
Oligoastrocitoma	Oligoastrocitoma NOS	Grado II
GLIOMAS ALTO GRADO		
Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma anaplásico IDH mutado	Grado III
	Astrocitoma anaplásico IDH nativo	Grado III
	Astrocitoma anaplásico NOS	Grado III
Oligodendroglioma anaplásico	Oligodendroglioma anaplásico IDH mutado y 1p/19q codeletado	Grado III
	Oligodendroglioma anaplásico NOS	Grado III
Oligoastrocitoma anaplásico	Oligoastrocitoma NOS	Grado III
Glioblastoma	Glioblastoma IDH mutado	Grado IV
	Glioblastoma IDH nativo	Grado IV
	Glioblastoma NOS	Grado IV

Cuadro 1. Extracto clasificación de tumores del sistema nervioso central, OMS, 2016. Isocitrato Deshidrogenasa (IDH); No especificado (NOS).

2.2 TRATAMIENTO

El tratamiento de primera línea para gliomas, como ya se mencionó anteriormente es cirugía, temozolamida y radioterapia¹⁴, el cual se recomienda administrarse de dos formas:

- Radioterapia seguida de Temozolamida 150-200 mg/m² x 5 días cada 4 semanas x 6 ciclos.
- Temozolamida 75 mg/d + RT seguido de temozolamida 150-200 mg/m²/día x 5 cada 28 días x 6 ciclos. La temozolamida sola se inicia un mes después de finalizar la radioterapia.¹⁵

2.3 TEMOZOLAMIDA (TMZ)

La temozolamida es un pro-fármaco alquilante del ADN, entre sus características más importantes están:

- Molécula pequeña (194 Da) y lipofílica.
- Atraviesa la barrera hematoencefálica en un 30%.
- Estable a valores de pH ácidos.
- Lábil a pH alrededor de 7.0
- Vida media plasmática de 1.8 horas a pH 7.4
- Eliminación por heces y orina.

Este fármaco se absorbe rápidamente de manera intacta y sufre una descomposición espontánea para formar el compuesto monometil triazeno 5-(3-methyltriazen-1-yl)-imidazole-4-carboxamide (MTIC). MTIC reacciona con el agua para liberar 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) y el catión altamente reactivo metildiazonio (Fig. 2). El catión metildiazonio metila preferentemente el ADN en las posiciones N7 de guanina en regiones ricas en guanina (N7-MeG; 70%), pero también metila la adenina en la posición N3 (N3-MeA; 9%) y posición O6 de los residuos de guanina (O6-MeG; 6%)¹².

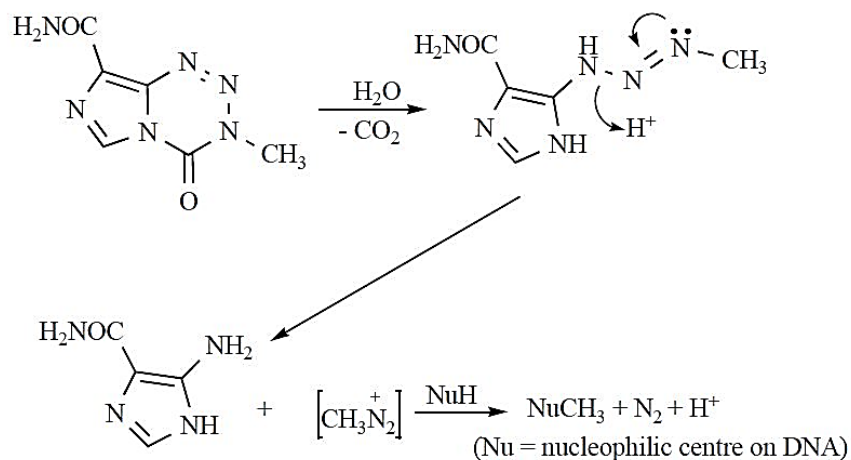


Figura 2. Estructura y ruta de activación del pro-fármaco Temozolamida.

2.3.1 REPARACIÓN DEL DAÑO

A pesar de que TMZ es el fármaco de elección debido a su biodisponibilidad cercana al 100% y su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (30%), al tratarse de un fármaco alquilante del ADN produce daño en las células no tumorales, lo que conlleva a su citotoxicidad mediada principalmente por O6-MeG, una lesión carcinógena, mutagénica y tóxica. Además, los grupos metilos

incorporados por temozolamida al ADN son reparados mediante mecanismos mencionados a continuación.

Los tres mecanismos de reparación mayormente estudiados se dividen en reparación directa (mediada por MGMT), por Mismatch Repair (MMR) o Base Excision Repair (BER), ver Fig. 3.

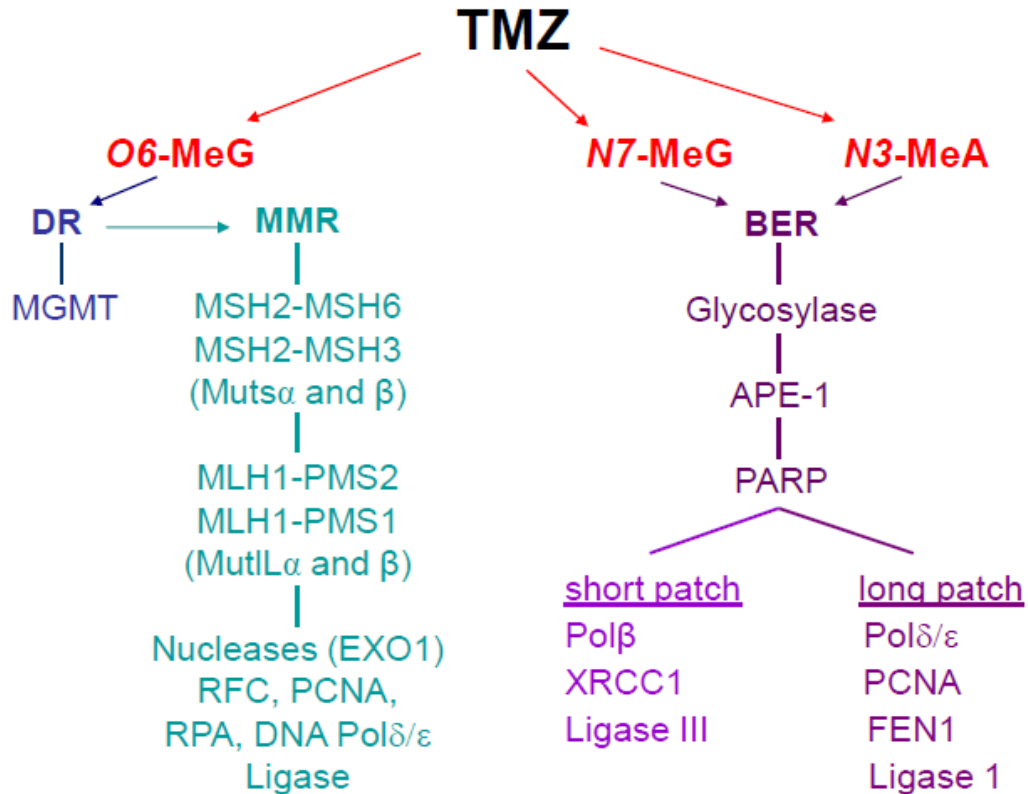


Figura 3. Mecanismos de reparación de daño por TMZ, tomado de Zhang J (2012).

El reparo directo de la metilación es mediado por la enzima metilguanina-ADN metiltransferasa (O6-MGMT) que remueve el grupo metilo restaurando la guanina (Fig. 4). Los aductos O6-MeG se aparean erróneamente con timina en lugar de citosina durante la replicación del ADN, alertando al sistema “mismatch repair del ADN” (MMR), éste reconoce la timina mal emparejada de la cadena hija y la remueve, mientras la O6-MeG persiste en la cadena molde. Por lo tanto, los ciclos de reinsertión y eliminación de timina resultan en rupturas persistentes de la cadena del ADN, causando el colapso de la horquilla de replicación.¹²

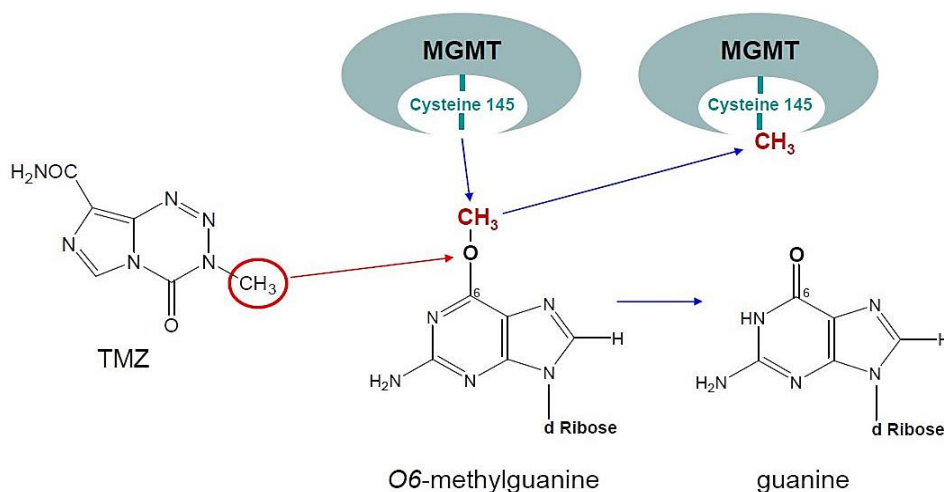


Figura 4. Reparación de los aductos O6-metilguanina por MGMT, tomada de Zhang J (2012).

2.3.2 RESISTENCIA A TEMOZOLAMIDA

Existen diversos mecanismos por los cuales las células de glioblastoma pueden mostrar resistencia a TMZ; sin embargo, dos vías son las más estudiadas: 1) la reparación directa por MGMT y 2) la resistencia mediada por la Glicoproteína-P (PGP), la cual actúa como una bomba de eflujo expulsando el fármaco hacia el exterior de la célula, disminuyendo la disposición del fármaco y reduciendo así su efectividad.^{16h}

La resistencia mediada por MGMT se manifiesta mediante una sobreexpresión de la proteína. En diversas líneas celulares de glioblastoma se ha observado que un aumento en los niveles de MGMT se acompaña con un incremento en la concentración inhibitoria 50 (CI50) de TMZ⁴; el efecto contrario se ha observado con la hipermetilación del promotor del gen codificante para MGMT¹⁷; esta hipermetilación es considerada como un marcador pronóstico de quimioterapia para gliomas¹⁸ observándose un aumento en la supervivencia media de los pacientes, la cual se reporta hasta 21.7 meses en los pacientes que presentan el promotor metilado de la proteína MGMT¹⁹.

2.4 GLICOPROTEÍNA-P (PGP)

Los ATP- Binding Cassete (ABC) o transportadores dependientes de ATP son proteínas integrales de membrana que típicamente utilizan energía para mover

solutos a través de la membrana celular²⁰, esta familia de transportadores está involucrada en diversos procesos celulares como el mantenimiento de la homeostasis y resistencia a xenotoxinas.

El tipo de transportador de ATP que está involucrado en la resistencia a múltiples fármacos antineoplásicos en humanos es la glicoproteína-P (PGP; MDR1; o ABCB1).²⁰

PGP, es una proteína de 170 KDa encargada del transporte de varios xenobióticos, no solamente fármacosnn antineoplásicos ²¹, consiste de 1276-1280 aminoácidos acomodados en 12 α -hélices transmembranales, repartidos en dos estructuras homólogas, cada una conteniendo un dominio de unión a nucleótido (NBD), un extremo amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH) intracelulares (Fig.5). ²²

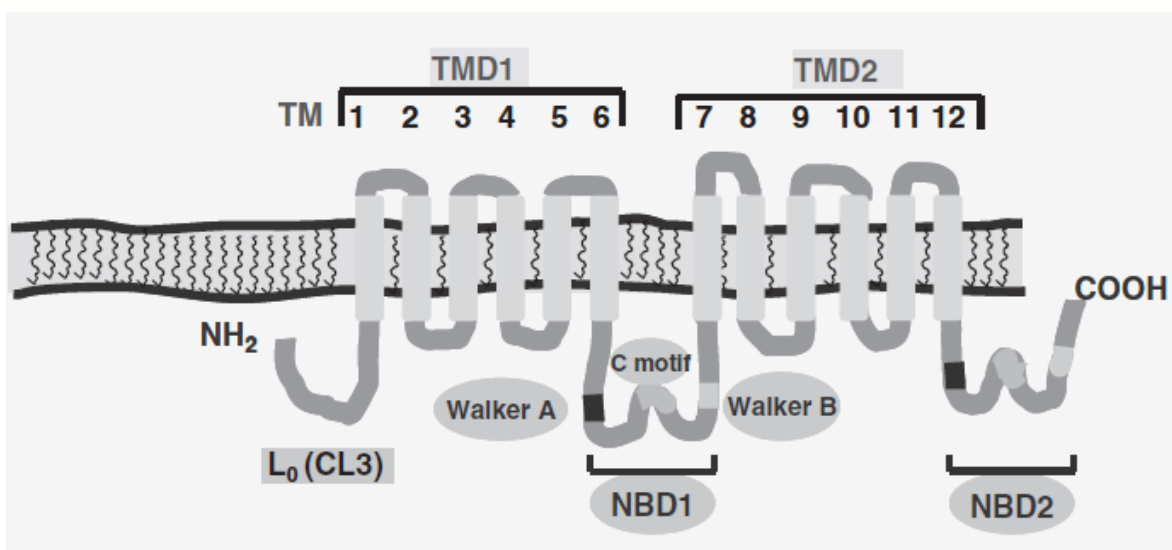


Figura 5. Tipología típica de glicoproteína-P, tomada de Zhou S (2007).

Este transportador se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, principalmente en la membrana apical en intestino, en la membrana apical de células epiteliales del túbulo proximal, en la membrana luminal de células endoteliales en barrera hematoencefálica, testículos y placenta. ²¹

2.4.1 REPOSICIONAMIENTO FARMACOLÓGICO

El reposicionamiento farmacológico es el proceso de reubicar un compuesto para el uso en una enfermedad diferente. Este enfoque se sostiene con el hecho de

que fármacos aprobados y algunos compuestos abandonados, han sido estudiados en humanos e información detallada de su farmacología, formulación, dosis y toxicidad potencial está disponible.²³ Las vías moleculares comunes en diferentes enfermedades y las indicaciones pueden proporcionar una forma mejorada y eficiente de seleccionar medicamentos más seguros para nuevas indicaciones.²⁴

Se estima que el tiempo requerido para el desarrollo de un nuevo fármaco se ha incrementado de 9.7 años a 13.9 años a partir del año 2000.²⁵ El reposicionamiento farmacológico tiene ventajas sobre el desarrollo de nuevos fármacos debido a que reduce significativamente el costo y tiempo de desarrollo, ya que estos compuestos han sido estudiados previamente permitiendo que, en algunos de ellos, se evite la fase 1 de pruebas clínicas.²³

Con el reposicionamiento de un fármaco se busca ampliar su uso a diferentes áreas terapéuticas como tratamientos potenciales para cáncer, enfermedades infecciosas, Alzheimer, diabetes o enfermedad cerebrovascular.²⁶ Al reposicionar un fármaco para el tratamiento del cáncer, se busca eliminar o atenuar los mecanismos de resistencia que presentan las células contra el fármaco de primera línea, principalmente contra aquellos que involucren: la inducción de angiogénesis, activadores de metástasis e invasión, promotores de inflamación tumoral, resistencia a la apoptosis y las señales sostenidas de proliferación, entre otros.²⁷

Los fármacos no oncológicos, por lo general tienen perfiles de seguridad conocidos en los seres humanos lo cual favorece su reposicionamiento y sirven como una fuente cada vez mayor para el descubrimiento de nuevos tratamientos contra el cáncer.²⁸

En un estudio realizado por Lee H et al. en 2006 se evaluó el reposicionamiento farmacológico en Glioblastoma, los fármacos seleccionados fueron evaluados con respecto a su actividad antineoplásica; entre ellos Ivermectin, un antiparasitario que mostró una buena actividad, sin embargo, su defecto es su incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.²⁹

Un fármaco que en los últimos años ha creado interés en sus propiedades antineoplásicas es mifepristona, su uso se ha extendido a diversos tipos de cáncer, principalmente aquellos relacionados con actividad hormonal elevada.

2.5 MIFEPRISTONA

Mifepristona, conocida también como RU486, fue descubierta por primera vez en 1982 por investigadores de la compañía Roussel-Uclaff (París, Francia) ³⁰. Mifepristona es un antiprogéstágeno y antagonista de hormonas glucocorticoides. Es principalmente usado como un abortivo al competir con la función de la hormona progesterona. Como antagonista de receptores a glucocorticoides, mifepristona ha sido ampliamente usada para el tratamiento de pacientes con el síndrome de Cushing que se caracteriza por un incremento de los niveles de cortisol; además, se ha utilizado en el tratamiento de depresión con características psicóticas y en el tratamiento de glaucoma.³¹

Mifepristona bloquea receptores de progesterona (PR), receptores de glucocorticoides (GR) y receptores de estrógenos (ER), los cuales están sobreexpresados en algunas células tumorales³².

Debido a lo anterior se ha planteado su uso en diversos tipos de cáncer como cáncer de mama³³, próstata³⁴, ovario³⁵, hueso³³, estómago³⁶ y cervix ³⁷, entre otros.

Diversos estudios han demostrado que mifepristona participa en la reorganización de los filamentos de actina y tubulina, produciendo así cambios en la morfología típica de cada línea celular; pérdida en la capacidad de la adherencia y disminución de la viabilidad celular.³⁴

En un estudio realizado por Ramaswamy R. et al. en 2012³⁸ se utilizó mifepristona en diversas líneas celulares de Glioma, mostrando un efecto supresor en el crecimiento de las células tumorales solo en dos líneas, U257/7 y IN1265, de una manera dosis dependiente a partir de la dosis terapéutica 1 µg/mL y hasta 4 veces más esta dosis.

También ha sido utilizada en las líneas celulares U373 y D54 por González-Agüero en 2007³⁹ mostrando que es capaz de disminuir significativamente el número de células después de 5 días de tratamiento a una concentración de 10 μM , que es la concentración que se alcanza de manera sistémica⁴⁰. Sin embargo, esta disminución está relacionada a un arresto del ciclo celular en fase G0-G1 y no a un aumento en la apoptosis.

En 2005, Li A. et al. realizó un estudio del efecto de Mifepristona sobre la apoptosis en adenocarcinoma de células endometriales de Ishikawa, en el cual no se observó diferencia significativa con concentraciones menores a 10 μM con respecto al control, pero la apoptosis aumentó de manera significativa con las concentraciones de 10 μM y 100 μM después de una incubación durante 24 horas.⁴¹

Este efecto sobre la apoptosis también se presenta sobre células de cáncer de próstata DU-143 y PC-3 en una concentración de 10 μM al incubarse durante 24 y 48 horas, mostrando tasas apoptóticas de 15.3% y 30.4% en el caso de DU-145 y 22.2% y 32% para PC-3.⁴²

En un reporte de caso clínico publicado en 2014 por Check J et al. sugirió que Mifepristona tiene un efecto positivo sobre la sintomatología del paciente al ser administrada a una dosis de 200 mg vía oral diariamente en un paciente de 43 años con Glioblastoma grado IV, ya que antes de iniciar el tratamiento se encontraba paralizado desde el cuello hacia abajo y pasaba la mayor parte del día durmiendo; después de dos semanas de iniciado el tratamiento el paciente se mostró más alerta, era capaz de entablar conversaciones y recuperó la movilidad de sus manos.⁴³

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El glioblastoma es considerado el cáncer cerebral con mayor mortalidad y con una tendencia a desarrollar resistencia al fármaco utilizado como primera línea, temozolamida. Es por esto que se buscan nuevas alternativas para incrementar la respuesta a su tratamiento contrarrestando los mecanismos de quimioresistencia.

En una investigación realizada en el laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cancerología⁷ donde se desarrolló el presente trabajo, se encontró que el anti-hormonal Mifepristona, actúa de manera sinérgica con temozolamida y radiación en xenotrasplantes de glioma desarrollados en ratones atómicos disminuyendo el tamaño del tumor. A la fecha aún no se conocen los mecanismos de acción de mifepristona que permite retardar la aparición de la quimioresistencia en células de glioma. En este trabajo se propone investigar la participación de la proteína de eflujo PGP y la promoción de la Apoptosis.

4. HIPÓTESIS

Las células de glioblastoma expuestas al esquema combinado de temozolamida y mifepristona mostrarán una disminución en la viabilidad celular y aumento de la apoptosis, modulados por un decremento en los niveles de la glicoproteína-P.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de mifepristona en combinación con temozolamida sobre la viabilidad celular, los niveles de glicoproteína-P y la apoptosis en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar la viabilidad celular de la línea C6 después de la exposición de temozolamida sola o temozolamida combinada con mifepristona.
2. Determinar los niveles de glicoproteína-P y su actividad después de la exposición individual y combinada de los tratamientos en la línea celular C6.
3. Evaluar la apoptosis en los grupos después de la exposición individual y combinada a los tratamientos en la línea celular C6 de glioblastoma.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio de acuerdo con la clasificación de Méndez:

Experimental, prolectivo, longitudinal y comparativo.

Universo de estudio:

Línea celular de glioma de rata (C6) obtenida de la American Type Cell Culture (ATCC).

Criterios de inclusión: células con morfología propia de C6, con al menos 3 pases de cultivo antes de utilizarse.

Criterios de exclusión: células con morfología diferente a la propia de C6, células con matriz extracelular abundante que dificulten desprendimiento y separación individual.

Criterios de eliminación: células que se hayan contaminado con bacterias o que se encuentren en tratamiento con antibiótico.

Variabes:

- Independientes: Cantidad de células sembradas por caja, concentración de los fármacos administrados por grupo, esquema de administración de los fármacos.
- Dependientes: Viabilidad celular, cantidad de proteína extraída, niveles de expresión de PGP, cantidad de células apoptóticas.

6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de datos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 23 para Windows. Para cada ensayo se realizaron tres experimentos independientes y para el ensayo de la evaluación de la función de PGP se realizaron dos experimentos independientes, para la comparación entre grupos se usó ANOVA con una Post-Hoc de Tukey. La significancia estadística fue determinada con $p < 0.05$.

6.2 CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular C6 de glioma de rata, la cual fue mantenida en condiciones estériles en cajas de 75 cm² hasta una confluencia aproximada del 90% utilizando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado

con suero fetal bovino a una concentración final del 2.5%, bajo una atmósfera con 5% de CO₂ y un nivel elevado de humedad en una incubadora Nuair vs Autoflow UN4750 a 37°C, para su posterior siembra en cajas de 25 cm² bajo las mismas condiciones y su posterior exposición a los fármacos conforme al cuadro 2.

Para la administración de Temozolamida se empleó una solución stock del fármaco en 60% DMSO-40% solución salina a una concentración de 12.5 mg/mL a partir de la cual se preparó una solución de trabajo de 0.5 mg/mL.

Grupos	Concentración TMZ (μM)	Concentración MF (μM)
Control	Vehículo	Vehículo
TMZ	10	-
TMZ	33.3	-
TMZ	100	-
MF	-	10
TMZ + MF	10	10
TMZ + MF	33.3	10
TMZ + MF	100	10

Cuadro 2. Esquema de aplicación de fármacos temozolamida (TMZ) y mifepristona (MF) en los grupos experimentales.

En el caso de Mifepristona se empleó una solución stock de 2 mg/mL en etanol y con ésta se preparó diariamente la solución de trabajo de 1mM en etanol.

Los tratamientos se aplicaron diariamente por 5 días continuos adicionando medio fresco con la cantidad de fármaco correspondiente de acuerdo al cuadro 2 y aplicando, en las cajas control, el vehículo.

6.2.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Al final de los tratamientos, a las células, de cada grupo, se les tomó una imagen representativa del crecimiento utilizando un microscopio invertido con contraste de fases (OLYMPUS DP73 IX51 con filtro CK40-SL).

Para determinar la viabilidad celular, las células de cada caja se despegaron y contaron con una cámara de Neubauer y con el equipo TC20 Automated cell counter de Bio Rad®, realizando una dilución 1:1 de células con azul tripano.

6.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PGP POR WESTERN BLOT

Al final de los tratamientos, las células fueron lisadas y se cuantificó la concentración de proteínas totales utilizando un kit comercial (Ensayo de Proteínas de Ácido bicinconínico de Sigma-Aldrich ®) que emplea la reducción de un complejo de cobre como medio de cuantificación, realizando a su vez una curva de calibración con una solución de albúmina a una concentración de 1 µg/µL.

Para el corrimiento electroforético de las proteínas se utilizaron geles de gradiente de acrilamida con concentraciones desde 4 a 20% utilizando una cámara de electroforesis tetra vertical Mini-Protean®, posteriormente utilizando una cámara de transferencia semihúmeda (Trans Blot SD semi Dry-transfer cell de Bio Rad ®) se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Polyvinylidene difluoride) previamente activada en metanol. Para la identificación de la proteína de interés se emplearon los anticuerpos contra PGP (Cell Signal #13978) y β- actina (SC 69879) y para su detección se utilizó un equipo de fluorescencia (ODYSSEY CLX LI-COR) realizando un análisis de las bandas de cada proteína.

6.4 FUNCIÓN DE PGP POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para evaluar la función de PGP se ha utilizado por diversos autores, el seguimiento de la captación intracelular del fármaco antineoplásico doxorubicina debido a que es un compuesto altamente fluorescente, el cual puede fácilmente ser determinado con técnicas como la citometría de flujo.

Para esto se realizó la estandarización de las condiciones de concentración y tiempo de exposición del fármaco utilizando células C6 con doxorubicina y utilizando diferentes cantidades de ésta (10, 50, 100 y 250 µg/mL), incubando el fármaco durante 1 hora a 37°C. Posteriormente el mejor resultado de fluorescencia se evaluó a dos tiempos de incubación 1 y 2 horas.

Una vez determinada la mejor concentración y el mejor tiempo de exposición de doxorubicina, se realizó la exposición de las células con los tratamientos de temozolamida sola o combinada, como se describió en el cuadro 2.

Al final de los tratamientos las células fueron expuestas a una concentración de 100 µg/mL de doxorubicina e incubados a 37°C por 1 hora en un ambiente de CO₂ al 5%. Después del periodo de incubación las células fueron lavadas con PBS, despegadas y contadas para obtener 100,000 células, las cuales fueron resuspendidas en 200 µL de PBS frío para obtener la lectura de la fluorescencia en 10,000 eventos utilizando el citómetro de flujo Guava easycyte Merck Millipore®, el análisis se realizó utilizando en el programa Incyte (Guava Millipore).

6.5 EVALUACIÓN DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células C6 fueron expuestas a los tratamientos de temozolamida sola o temozolamida combinada con mifepristona como se describió anteriormente (cuadro 2). Al final del período de los tratamientos las células fueron levantadas utilizando PBS-EDTA, y contadas en una cámara de Neubauer, una alícuota de 100,000 células fueron colocadas en tubos eppendorf, centrifugadas y resuspendidas en 100 µL del reactivo Guava Nexin Reagent y las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 20 min en la oscuridad.

Finalmente se cuantificó la fluorescencia, se adquirieron 10,000 eventos en el citómetro de flujo calibrando previamente y ajustando el tamaño celular. La apoptosis total se tomó como la suma de la apoptosis temprana, tardía y necrosis

El Reactivo Guava Nexin permite la diferenciación de las células de acuerdo a la captación del colorante impermeable a la membrana celular 7-AAD y la proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio con alta afinidad a fosfatidilserina Anexina V.

La proteína fosfatidilserina se encuentra orientada hacia el interior de la membrana celular y es translocada al exterior durante un estado de apoptosis temprana, permitiendo la conjugación con Anexina V.

En un estado de apoptosis tardía las células además pierden la integridad de la membrana celular, por lo que el colorante 7-AAD entra a las células.

En el estado de necrosis es tanto el daño a la membrana que las células pierden la fosfatidilserina de la membrana y solo se observa la señal del colorante.

De este modo el histograma (Dot Plot, Fig.6) obtenido se interpreta como:

- Esquina inferior izquierda: No apoptóticas 7-AAD (-) Anexina V (-)
- Esquina inferior derecha: Apoptosis temprana 7-AAD (-) Anexina V (+)
- Esquina superior derecha: Apoptosis tardía 7-AAD (+) Anexina V (+)
- Esquina superior izquierda: Necrosis 7-AAD (+) Anexina V (+)

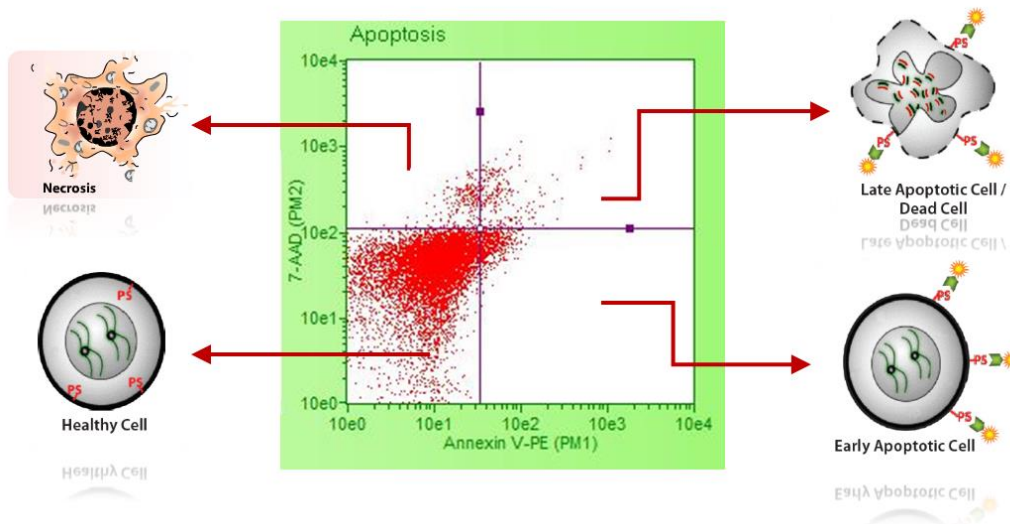


Figura 6. Histograma representativo de apoptosis, donde se observan los cuadrantes correspondientes al tipo de apoptosis y sus marcadores.

7. RESULTADOS

7.1 VIABILIDAD

Para observar el efecto de temozolamida sola o combinada con mifepriestona, se muestran las imágenes de la confluencia celular al final de los tratamientos (Fig. 7). Se observa una disminución de la población celular en los grupos tratados con TMZ y MF; sin embargo, esta disminución fue mayor cuando los tratamientos fueron aplicados en combinación.

El número total de células determinadas con la cámara de Neubauer y la viabilidad de éstas utilizando el contador T20 se presentan en la Fig. 8 y Fig. 9

respectivamente. En ambos ensayos se observa una tendencia en la disminución en el número de células con los diferentes tratamientos.

Tanto el número total de células, como la viabilidad celular, disminuyeron de manera dosis dependiente con las concentraciones de temozolamida (10, 33.3 y 100 μM) con respecto al control. Además, esta disminución fue significativamente mayor con la aplicación combinada de temozolamida y mifepristona (10 μM).

7.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PGP

Al final de los tratamientos las células fueron lisadas y las proteínas fueron extraídas, y se evaluaron los niveles de PGP por Western blot como se describió en la metodología.

En la Fig. 10-A se observa un aumento de los niveles de PGP al incrementar las concentraciones de temozolamida alcanzando significancia estadística con la concentración de 100 μM , este incremento disminuyó cuando se aplicó mifepristona en combinación con temozolamida. Como control de carga se muestran los niveles de la proteína actina.

Al realizar la densitometría de la relación PGP/actina (Fig. 10-B) se observó una disminución de la cantidad de PGP en los tratamientos combinados con respecto a los tratamientos individuales, sin alcanzar una significancia estadística.

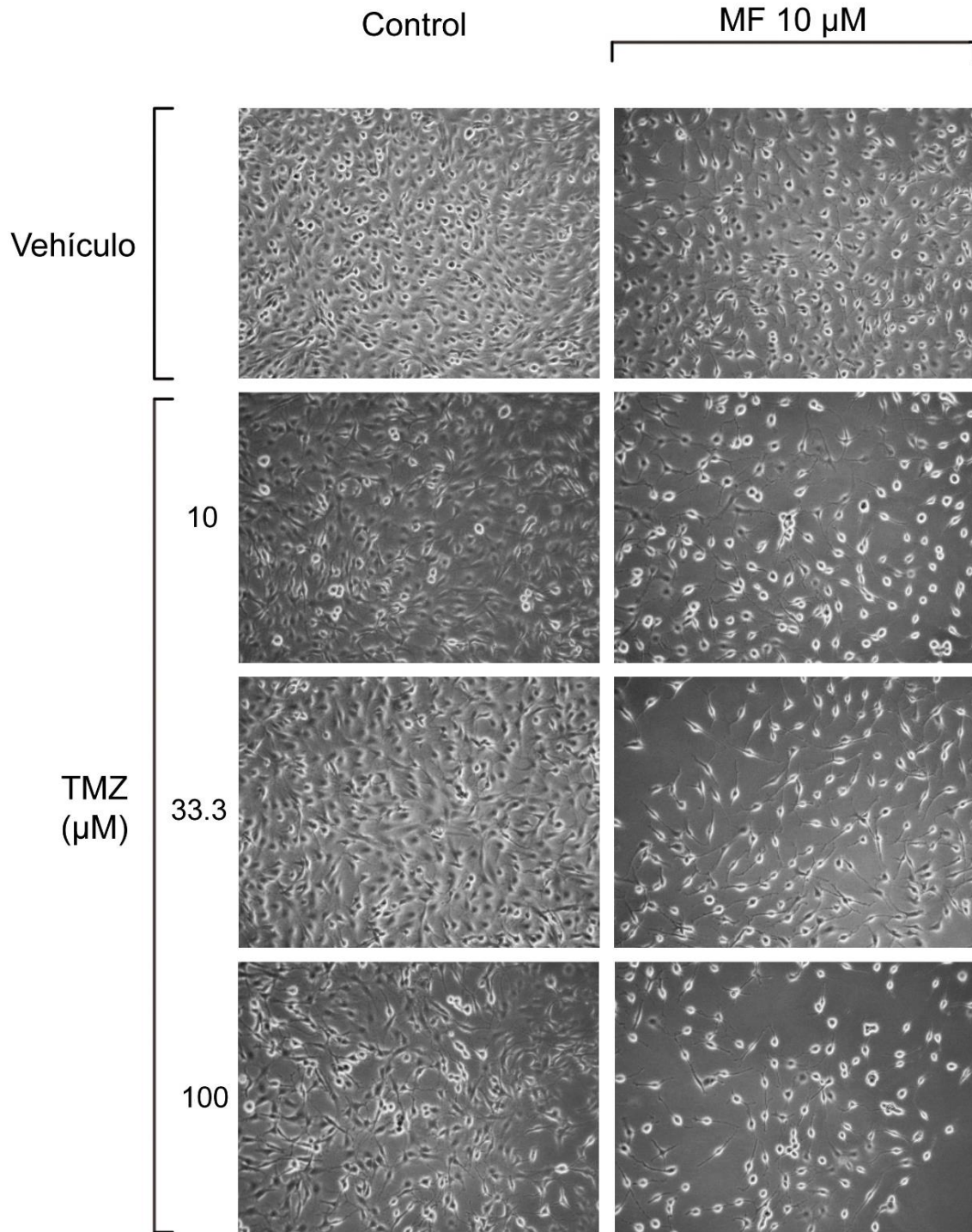


Figura 7. Imágenes representativas de cada grupo tratado con temozolamida sola o combinado con mifepristona después de 5 días de tratamiento.

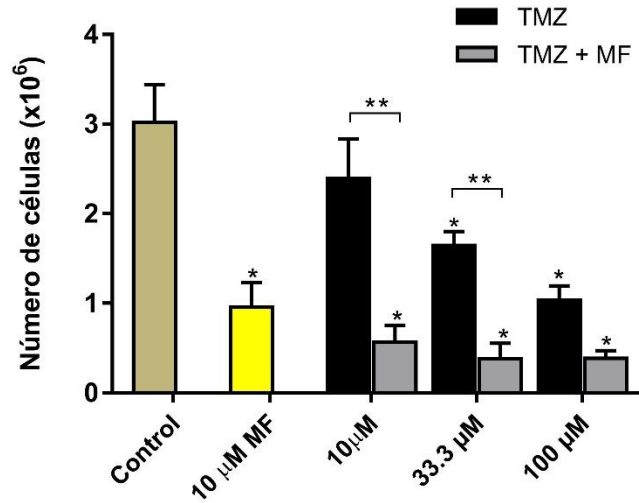


Figura 8. Número de células por conteo en una cámara de Neubauer. $n = 3 \pm D.S.$ *Diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$; ** Diferencia significativa con respecto al tratamiento individual $p < 0.05$.

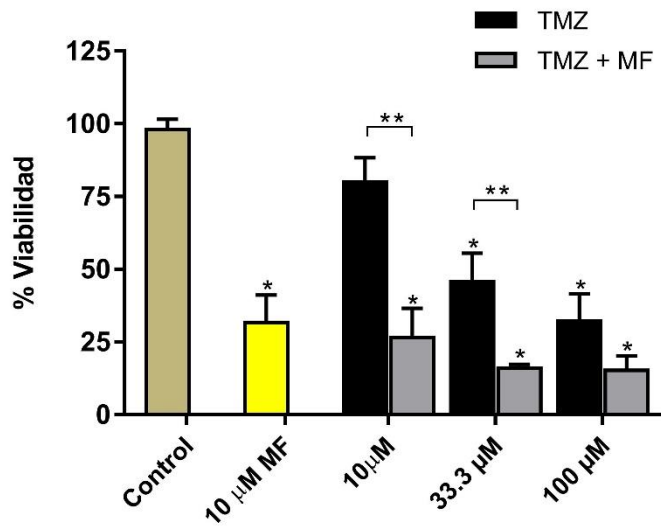


Figura 9. Viabilidad celular por conteo en equipo TC20 Automated cell counter. $n = 3 \pm D.S.$ *Diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$; ** Diferencia significativa con respecto al tratamiento individual $p < 0.05$

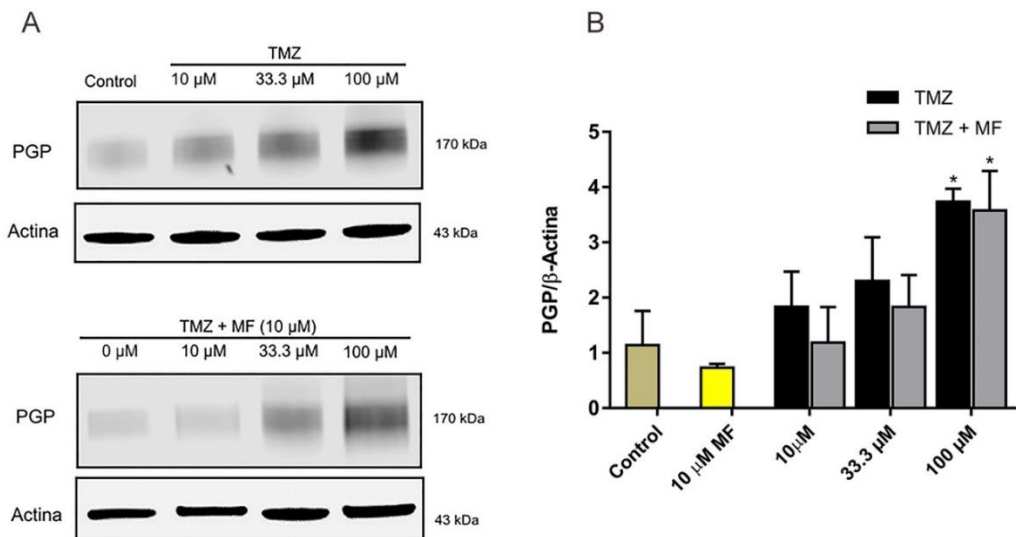


Figura 10. **A)** Niveles de expresión PGP/Actina después de los tratamientos de temozolamida sola o combinada con mifepristona; **B)** Relación de la expresión de PGP con respecto a la expresión de actina. $n=3 \pm$ D.E. *Diferencia significativa con respecto al control $p<0.05$

7.3 RECAPTURA DE DOXORRUBICINA PARA EVALUAR LA FUNCIÓN DE PGP

7.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPTURA INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA

En la Fig. 11-A se muestran los histogramas correspondientes a la captación de doxorubicina (0, 10, 50, 100 y 250 μg/mL) medida como la intensidad media de fluorescencia (IMF). Podemos observar una relación entre el incremento de la IMF con respecto al aumento de la concentración de doxorubicina (Fig. 11-B).

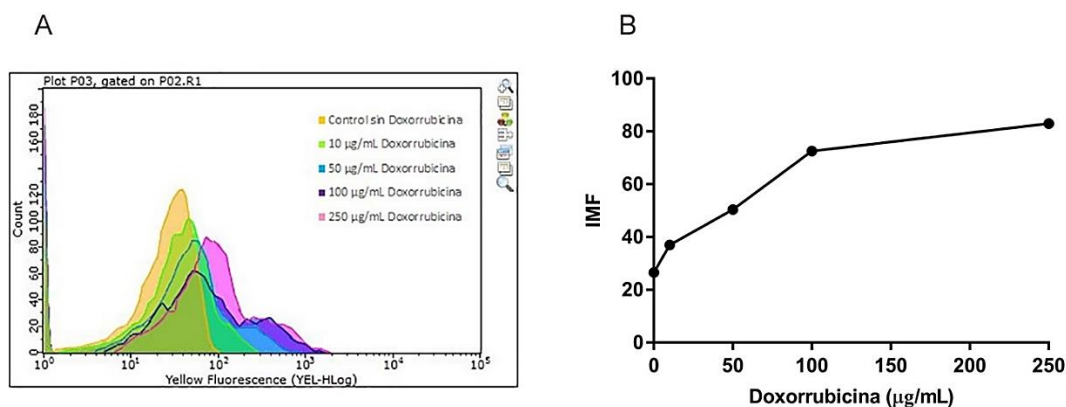


Figura 11. **A)** Histogramas de captación de doxorubicina a diferentes concentraciones; **B)** Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) con respecto a concentración de doxorubicina.

7.3.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RECAPTURA

En la Fig. 12-A se muestran los histogramas de la IMF correspondientes a la recaptura de doxorrubicina después de 1 y 2 horas de incubación. Se puede observar un incremento en la IMF con respecto al aumento del tiempo de incubación. (Fig. 12-B).

A pesar de que la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestra un incremento mayor en la IMF, al igual que el tiempo de recaptura de 2 horas, se observó un cambio en la morfología de las células debido a las características citotóxicas de la doxorrubicina por lo cual se escogió la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el tiempo de exposición de 1 hora para realizar el ensayo de recaptura de doxorrubicina después de los tratamientos.

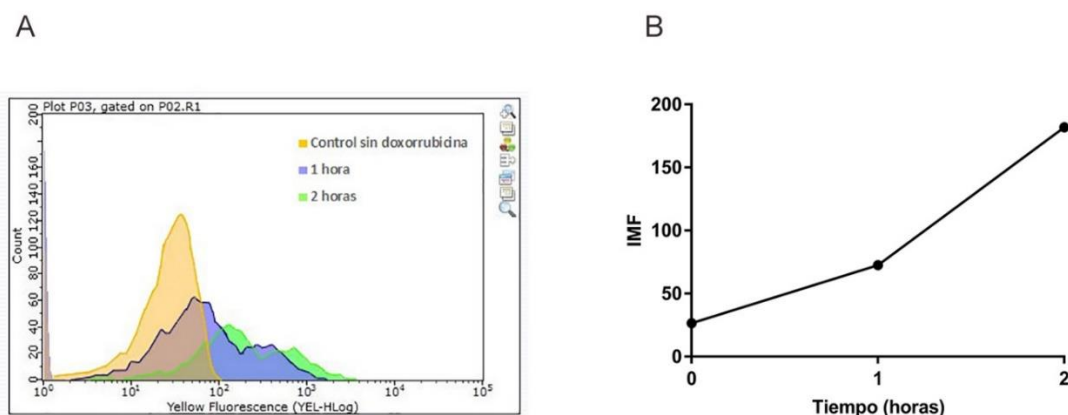


Figura 12. A) Histogramas de doxorrubicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a diferentes tiempos de incubación a 37°C; B) Curva de tiempo de incubación de doxorrubicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs IMF.

7.4 FUNCIÓN DE PGP DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS DE TEMOZOLAMIDA Y MIFEPRISTONA

Al final de los tratamientos, con temozolamida sola o temozolamida con mifepriestona, las células fueron expuestas por 1 hora a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxorrubicina. La Fig. 13 muestra un ligero incremento en la IMF con la exposición de mifepriestona 10 μM , traducido en una disminución en la función de PGP sin alcanzar significancia estadística. Sin embargo, no se observó ningún cambio cuando las células fueron expuestas a TMZ sola o combinada con MF.

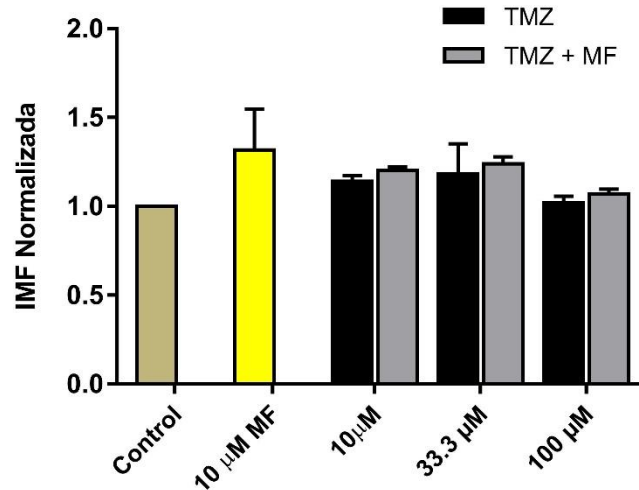


Figura 13. Intensidad Media de Fluorescencia Normalizada que representa la recaptura de doxorubicina después de cada tratamiento. $n=2 \pm D.S.$

7.5 EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS

En los Dot Plots se representan las células que captan Anexina y/o 7-AAD (Fig. 14-A), se observan las células que indican un aumento global de la apoptosis. En la Fig. 14-B se muestra un aumento significativo en la apoptosis total para la cual se realizó la suma de la apoptosis temprana, tardía y necrosis de las células expuestas a temozolamida 33.3 y 100 μM con respecto al control, aumentando este efecto al combinarse con mifepristona, sin embargo, solo alcanza significancia estadística, con respecto a su tratamiento individual, la combinación con mayor concentración de temozolamida.

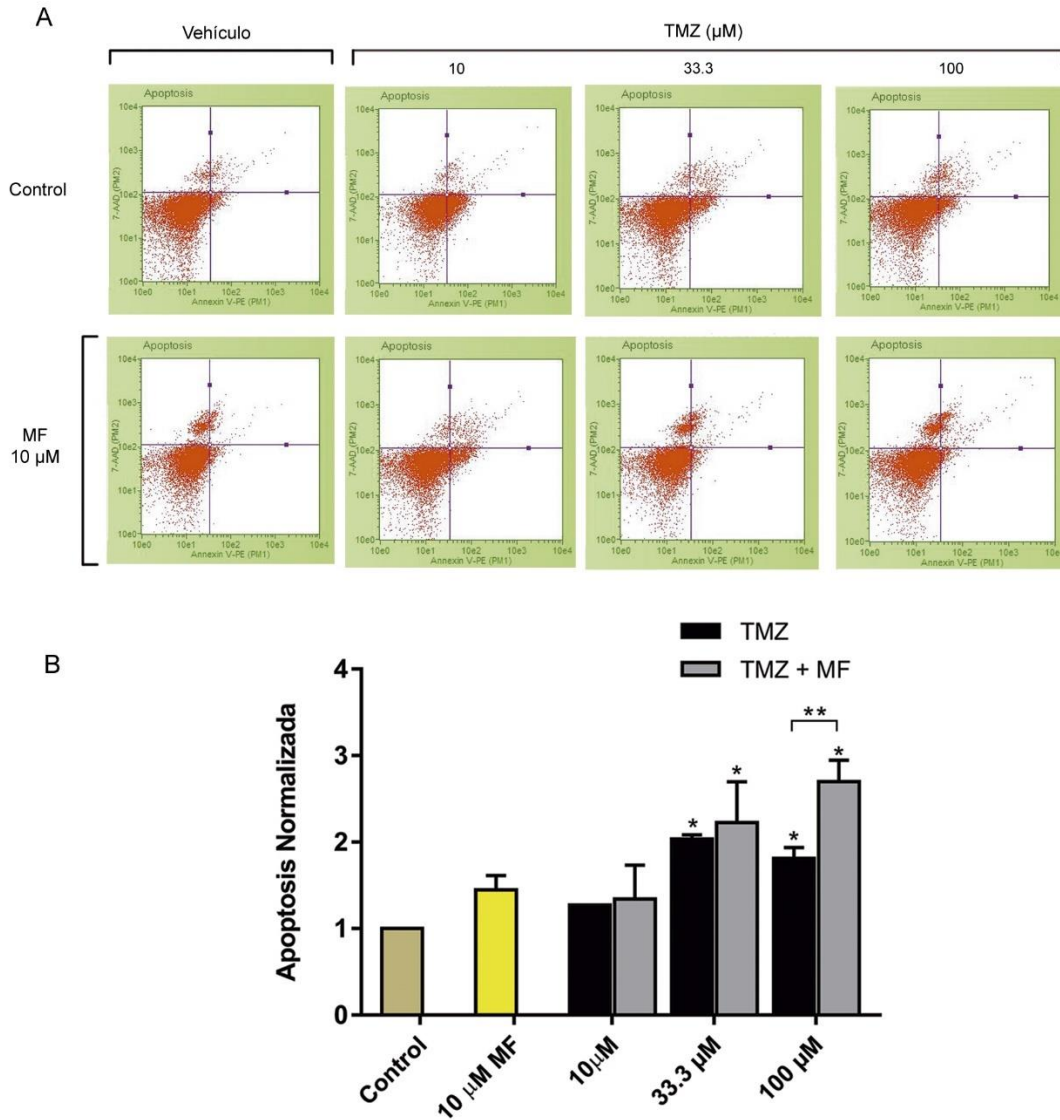


Figura 14. **A)** Dot Plots representivos de la apoptosis después de cada tratamiento. **B)** Apoptosis normalizada en cada grupo después de la exposición a los diferentes tratamientos. $n=3\pm$ D.S. *Diferencia significativa con respecto al control $p<0.05$

8. DISCUSIÓN

El tiempo medio de supervida de los pacientes con GBM es de 14.6 meses después de cirugía, radioterapia y el tratamiento adyuvante de Temozolamida⁴. Sin embargo, la supervida global y la calidad de vida de los pacientes no mejora debido al carácter recurrente de este astrocitoma grado IV².

Así que se busca investigar fármacos que puedan mejorar la respuesta del tratamiento de temozolamida.

En este trabajo evaluamos si mifepristona, con una concentración similar a la alcanzada de manera sistémica ($10 \mu\text{M}$)⁴³, era capaz de incrementar el efecto de temozolamida en una línea celular de glioblastoma al disminuir la viabilidad celular y aumentar la apoptosis mediante un decremento en los niveles de la glicoproteína-P.

Los resultados de viabilidad mostraron una disminución significativa en el número de células y viabilidad celular con respecto al control al final de los tratamientos individuales de temozolamida de manera dosis dependiente; mientras que mifepristona mostró por sí sola una disminución similar a la obtenida por el grupo tratado con TMZ $100 \mu\text{M}$, esta disminución fue similar a la observada por González-Agüero³⁹ en otras líneas celulares de glioblastoma. Además, en los tratamientos combinados de TMZ y MF se observó una disminución mayor al 70% la cual fue estadísticamente significativa con respecto al tratamiento individual con TMZ, estos resultados correlacionan con los obtenidos por Ampudia S.⁴⁴ quien utilizó un esquema de tratamiento que consistió en una aplicación diaria durante 3 días de TMZ y MF. Nuestros resultados reflejaron una mayor muerte celular comparados a la de Ampudia, esto probablemente debido al esquema de tratamiento.

Después de observar la disminución de la viabilidad celular se propuso determinar si la inhibición de la proteína PGP podría ser uno de los mecanismos participantes, por lo cual nuestro siguiente objetivo fue investigar el efecto que tenían los fármacos sobre la expresión de esta proteína de eflujo.

En el estudio realizado por Riganti y col. en 2013⁴⁵, en el cual se aplicó una dosis de $50 \mu\text{M}$ de TMZ por 72 h se observó una disminución en los niveles de este transportador. Por el contrario, en nuestro trabajo observamos una sobreexpresión de PGP con un comportamiento dosis-dependiente en los grupos tratados únicamente con TMZ, alcanzando significancia estadística con la concentración de $100 \mu\text{M}$. Este hallazgo de sobreexpresión correlaciona con estudios realizados por Muñoz y col. en 2014⁴⁶ en el cual se utilizó una dosis de $200 \mu\text{M}$ TMZ con incubación por 72 h. A pesar de que las dosis utilizadas por nosotros (10 , 33.3 y

100 μ M TMZ) son cercanas a las usadas por estos autores, existen diferencias importantes con los hallazgos que nosotros encontramos, como son el uso de células no adherentes tipo células madre por parte de Riganti, y el uso de las líneas celulares U87 y T98G, las cuales son resistentes a TMZ, por parte de Muñoz. Además del esquema de tratamiento diario por 5 días utilizado por nosotros, fue diferente a la aplicación de una sola concentración por 72 h utilizada por ellos. Por otro lado, en diversas líneas celulares de glioblastoma empleadas por Perazzoli y col. en 2015¹⁶ se observó variación del efecto de TMZ sobre los niveles de PGP aumentando su expresión en las líneas A172 y SK-N-SH; sin embargo, la expresión disminuyó en las líneas LN229 y SF268 después de una segunda aplicación de 100 μ M aplicado por 3 días y evaluando la expresión a los 3 días sin tratamiento. Lo cual nos indica un posible efecto dual de temozolamida dependiendo el tipo de esquema de tratamiento y de la línea celular.

Mifepristona fue capaz de disminuir la sobreexpresión de PGP en los grupos con el tratamiento de TMZ y MF en comparación a la expresión de PGP con TMZ sola. Este hallazgo en la disminución de los niveles de PGP por parte de MF se ha observado en diferentes líneas celulares de cáncer, como el de pulmón⁴³, donde se demuestra un aumento de la concentración intracelular de calceína después de exponerlas a MF. En linfoma⁴⁷, MF fue capaz de aumentar la retención de rodamina 123 sugiriendo así un mecanismo de inhibición en PGP que media una reversión de la resistencia a fármacos; Li y col. en 2004 también demostraron resultados similares en cáncer gástrico⁴⁸.

Una vez observada la disminución en los niveles de PGP se propuso evaluar su funcionalidad mediante un sustrato de PGP (doxorubicina). Sin embargo, no se observó diferencia significativa de la captación de doxorubicina después de los tratamientos individuales o combinados; inicialmente se planteó una posible falta de saturación del sistema; así que se incrementó la concentración de doxorubicina y el tiempo de exposición a ésta; sin embargo, se observó un efecto directo en la morfología típica de la línea celular, lo que llevó a considerar que las células utilizadas para el ensayo de funcionalidad se encontraban dañadas de la

membrana debido al carácter citotóxico de doxorubicina, esto aunado al daño provocado por el tratamiento continuo con TMZ, MF o la combinación, causaría una permeabilidad en la membrana celular debido al daño, permitiendo que doxorubicina saliera del medio intracelular, en vez de únicamente por la acción del transportador. Así que, de acuerdo al diseño experimental utilizado, no fue posible evaluar el efecto de saturación con doxorubicina. Este problema de citotoxicidad debida a doxorubicina, podría evitarse sí utilizáramos otro compuesto como Rodamina 123, el cual es un colorante fluorescente transportado por PGP que ha mostrado buenos resultados en ensayos de acumulación⁴⁹, además de no provocar citotoxicidad a concentraciones altas.

Otro de los mecanismos evaluados en el presente trabajo fue la participación de la apoptosis total en la disminución de la viabilidad y número de células de los tratamientos solos o combinados de TMZ y MF.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la apoptosis total de los grupos tratados con TMZ 33.3 y 100 μ M con respecto al control, sin embargo, no se puede determinar si el incremento es dependiente de la concentración, ya que no existe diferencia significativa entre éstas. El aumento observado en el grupo tratado solo con MF fue mínimo, similar a lo observado por González-Agüero³⁹, quién atribuyó el efecto a un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular en vez del incremento en la apoptosis. Nuestros resultados demostraron que MF fue capaz de incrementar la apoptosis únicamente en las células con 100 μ M de TMZ. En las combinaciones solo se observó diferencia significativa con respecto a su tratamiento individual en la concentración de 100 μ M de TMZ.

A pesar de la tendencia a incrementar la cantidad de células apoptóticas en los tratamientos combinados en comparación con los tratamientos individuales, no se observó una diferencia tan clara como en el caso de la viabilidad celular; lo que sugiere que esta vía influye en la explicación del efecto observado, pero probablemente no sea el único mecanismo participante debido a que en glioblastoma se llevan a cabo una serie de cambios en la regulación de las células que generalmente provoca evasión de los puntos de revisión durante la división

celular y por lo tanto evasión a la apoptosis.⁵⁰ Para evaluar de una mejor manera la intervención de la apoptosis y determinar si efectivamente se relaciona con la viabilidad celular, es necesario evaluar las proteínas apoptóticas involucradas en la vía extrínseca e intrínseca mediante Western blot con los diferentes tratamientos, como lo reportado por Liu L y Zhang M en 2015⁵¹ observando una apoptosis independiente de caspasa.

9. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos se concluye que:

Mifepristona sensibiliza a las células de glioblastoma al efecto citotóxico de temozolamida modulando la sobreexpresión de PGP y aumentando la apoptosis.

10. PERSPECTIVAS

Es necesario implementar métodos más sensibles que permitan analizar la funcionalidad de PGP, como el seguimiento por radiofármacos; evaluar proteínas apoptóticas como Bcl-2, Bax y Caspasas para determinar su participación, así como evaluar otros mecanismos de resistencia a temozolamida como la participación de las proteínas de reparación como MGMT, reparación del desajuste de ADN (Miss Match Repair) y reparación de escisión de bases (Base Excision Repair), para explicar de una forma más integral los procesos involucrados en la acción de MF y TMZ en glioblastoma. Finalmente se necesita corroborar el efecto de la participación de la combinación de fármacos en un modelo *in vivo* y evaluar sus mecanismos de acción.

11. REFERENCIAS

1. NIH [Internet]. Consultado 2 marzo de 2018. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cerebro/paciente/tratamiento-cerebro-adultos-pdq#link/_1
2. ABTA. Glioblastoma y astrocitoma maligno. Chicago: ABTA; 2012.
3. Valenzuela R. Nuevas terapias en el manejo de los gliomas de alto grado. 2017; 28(3): 401-408.

4. Lee S. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*. 2016; 3: 198-210.
5. Zhi-Kun, Q, et al. Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. *Chin J Cancer*. 2014; 33(2): 115-122.
6. Munoz J, et al. Temozolomide competes for P-glycoprotein and contributes to chemoresistance in glioblastoma cells. *Cancer Letters*. 2015; 367: 69-75.
7. Llaguno M, et al. Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer Cell International*. 2013; 13(29): 1-8.
8. Segovia M, et al. Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*. 2015; 15(21): 1-11.
9. Ferlay J, et al. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Lyon: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer; 2013.
10. NIH [Internet]. Consultado 2 Enero de 2018. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45700>
11. Sinning M, et al. Clasificación de los tumores cerebrales. *Med. Clin. Condes*. 2017; 28(3): 339-342.
12. Zhang J, Malcom S, Bradshaw T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*. 2012; 5: 102-114.
13. ABTA. Brain tumor statistics [Monografía en internet]. Consultado: 5 Enero de 2018. Disponible en: <http://www.abta.org/about-us/news/brain-tumor-statistics/>
14. Celis M. Primer consenso mexicano sobre recomendaciones de la atención multidisciplinaria del paciente con glioblastoma multiforme (GBM). Grupo Interdisciplinar Mexicano de Investigación en Neurooncología (GIMINO). *Gaceta Médica de México*. 2015; 151(3): 403-415.
15. Urtasun M, Larrea J, Villanúa J. Protocolo en el tratamiento de los gliomas malignos. Euskadi: Hospital Donostia; 2006: 19-21.

16. Perazzoli G et al. Temozolamide resistance in glioblastoma cell lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 expression. *PLOS ONE*. 2015; 10 (10): 1-23.
17. Rivera A et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2010; 12(2): 115-121.
18. Mellai M et al. MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. *J Neurooncol*. 2012; 107(3): 617-631.
19. Thon N, Kreth S, Kreth F-W. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. *Onco Targets Ther*. 2013; 6: 1363- 1372.
20. Jones P, George A. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *CMLS*. 2004; 61: 682-699.
21. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*. 2005; 5(30): 1-13.
22. Zhou S. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008; 38(7): 802-832.
23. Astin JW, et al. Innate immune cells and bacterial infection in zebrafish. *Methods in Cell Biology*. 2017; 138: 31–60.
24. Bhattarai D, Singh S, Jang Y, Hyeon Han S, Lee K, Choi Y. An Insight into Drug Repositioning for the Development of Novel Anti-Cancer Drugs. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(19):2156-2168.
25. Shim JS, Liu JO. Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. *Int J Biol Sci*. 2014; 10(7): 654–663.
26. Würth R, Thellung S, Bajetto A, Mazzanti M, Florio T, Barbieri F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug Discov Today*. 2016;21(1): 190-199.
27. Sleire L, Førde HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PØ. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res*. 2017;124(1): 74-91.

28. Yang EJ, Wu C, Liu Y, Lv J, Sup Shim J. Revisiting Non-Cancer Drugs for Cancer Therapy. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(19):2144-2155.
29. Haeseung lee, L.E.E.H, Seungmin kang, K.A.N.G.S, Wanky kim, K.I.M.W. Drug Repositioning for Cancer Therapy Based on Large-Scale Drug-Induced Transcriptional Signatures. *PLoS One.* 2016;11(3): e0150460.
30. Chen J, et al. The Unique Pharmacological Characteristics of Mifepristone (RU486): From Terminating Pregnancy to Preventing Cancer Metastasis. *Med. Res. Rev.* 2014; 34(5): 979-1000.
31. Yu s, et al. Systems pharmacology of mifepristone (RU486) reveals its 47 hub targets and network: Comprehensive analysis and pharmacological focus on FAK-Src-Paxillin complex. *Scientific Reports.* 2015; 5: 1-10.
32. Sommer P, et al. Glucocorticoid receptor over-expression promotes human small cell lung cancer apoptosis in vivo and thereby slows tumor growth. *Endocrinerelated Cancer.* 2010; 17: 203-213.
33. Tieszen CR, Goyeneche AA, Brandhagen BN, Ortbahn CT, Telleria CM. Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression. *BMC Cancer* 2011; 11: 207-218.
34. Brandhagen BN, Tieszen CR, Ulmer TM, Tracy MS, Goyeneche AA, Telleria CM. Cytostasis and morphological changes induced by mifepristone in human metastatic cancer cells involve cytoskeletal filamentous actin reorganization and impairment of cell adhesion dynamics. *BMC Cancer.* 2013; 13: 35-49.
35. Goyeneche AA, Seidel EE, Telleria CM. Growth inhibition induced by antiprogestins RU-38486, ORG-31710, and CDB-2914 in ovarian cancer cells involves inhibition of cyclin dependent kinase 2. *Invest New Drugs.* 2012; 30: 967–980.
36. Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Effects of mifepristone on invasive and metastatic potential of human gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1726–1729.

37. Jurado R, Lopez-Flores A, Alvarez A, Garcia-Lopez P. Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: An in vitro and in vivo study. *Oncol Rep.* 2009; 22: 1237–1245.
38. Ramaswamy R, Ashton K, Lea R, Roberts P, Davis C. Study of effectiveness of mifepristone for glioma cell line growth suppression. *British Journal of Neurosurgery.* 2012; 26(3): 336-339.
39. González-Agüero G et al. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocr.* 2007; 32: 129-135.
40. Payen L et al. Reversal of MRP-mediated multidrug resistance in human lung cancer cells by antiprogesterin drug RU486. *Biochemical and biophysical research communications.* 1999; 258: 513-518.
41. Li A, Felix JC, Minoo P, Amezcua CA, Jain JK. Effect of mifepristone on proliferation and apoptosis of Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *Fertility and sterility.* 2005; 84: 202-211.
42. Zhang H, Lü JJ, Gao QZ, Zhang J. Induction of apoptosis by mifepristone in androgen-independent prostate cancer cell lines in vitro. *Chinese journal of surgery.* 2006; 44(6); 382-385.
43. Check J, Wilson C, Cohen R, Sarumi M. Evidence that mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastoma multiforme grade IV. *Anticancer research.* 2014; 34:2385-2388.
44. Ampudia S. Participación de mifepristona en la respuesta a temozolamida en una línea celular de glioma. UNAM: 2016.
45. Riganti C et al. Temozolamide downregulates P-glycoprotein expression in glioblastoma stem cells by interfering with the Wnt3a/glycogen synthase-3 kinase/ β -catenin pathway. *Neuro-Oncology.* 2013; 15(11): 1502-1517.
46. Muñoz J, Rodríguez V, Greco S, Nagula V, Scotto K, Rameshwar P. Temozolamide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2014; 13(10): 2399-2411.

47. Gruol D, Zee M, Trotter J, Bourgeois S. Reversal of multidrug resistance by RU 486. *Cancer Research*. 1994; 54: 3088-3091.
48. Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Reversal of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR by antiprogestin drug mifepristone. *World J Gastroenterol*. 2014; 10(12): 1722-1725.
49. Jovan E, Vée M, Mayati A, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O. Evaluation of P-Glycoprotein inhibitory potential using a Rhodamine 123 Accumulation Assay. *Pharmaceutics*. 2017; 8(2): 1-13.
50. Valdés S, Casique D, Germán L, Velasco M, González A. Apoptotic signaling pathways in glioblastoma and therapeutics implications. *Biomed Research International*. 2017: 1-12.
51. Liu L, Zhang M. Caspase-independent programmed cell death induced by temozolamide in rat glioma c6 cell line. *Journal of Southern Medical University*. 2015; 35(2): 229-233.