Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Grado

Efecto del antiprogestágeno mifepristona sobre la barrera hematoencefálica en el tratamiento quimioterápico de metástasis cerebrales de cáncer de mama

Rubin, Ayelen

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Rubin, Ayelen. (2017). Efecto del antiprogestágeno mifepristona sobre la barrera hematoencefálica en el tratamiento quimioterápico de metástasis cerebrales de cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001615_Rubin

Cita tipo Chicago:
Rubin, Ayelen. "Efecto del antiprogestágeno mifepristona sobre la barrera hematoencefálica en el tratamiento quimioterápico de metástasis cerebrales de cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001615_Rubin

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. **Contacto:** bibliotecadigital.exactas.uba.ar
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

EFECTO DEL ANTIPROGESTÁGENO MIFEPRISTONA SOBRE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN EL TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO DE METÁSTASIS CEREBRALES DE CÁNCER DE MAMA

-Tesis para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas-

Autora: Ayelen Rubin

Directora: Paola A. Rojas

Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal
Instituto de Biología y Medicina Experimental
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Buenos Aires, Argentina

-14 de Agosto, 2017-

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar esta tesis especialmente a mi hermana Jorgelina, quién con solo 16 años luchó contra un cáncer en cerebro y en especial contra los terribles efectos secundarios de la quimio y radioterapia, pudo salir adelante y ahora tiene tres hijos, sanos, inteligentes y hermosos. Recién ahora puedo apreciar lo valiente que fue, siendo tan chica. Ojalá algún día los resultados de este pequeño trabajo den fruto y le sirvan a la hermana de alguien.

A mi mamá, quien cómo mi hermana, sobrevivió al cáncer de mama cuando yo era chica, sos la mujer más fuerte que conozco. A mi papá que desde chica me incentivó a preguntarme cómo funcionaban todas las cosas y me hizo aprender el nombre científico de muchos árboles y plantas (como el *paspalum dilatatum*). A ellos que me apoyaron cuando decidí dejar mi ciudad e irme a vivir a 1000 km de distancia para estudiar esta carrera, gracias por preguntarme cómo me fue, cada vez que salía de un parcial, y escucharme, bancarme y aconsejarme a lo largo de esta tesis. Gracias por confiar en que podía.

Gracias a mis amigas, Tati, Ale (que me ayudó con la estadística de este trabajo), Mar y Ursu por escucharme y compartir conmigo cada aprendizaje a lo largo de la carrera y la tesis, por sufrir conmigo las peores materias y disfrutar, maravillándonos al aprehender cada dato interesante (como buenas nerds que somos).

Gracias a mi hermana Mariel, por escucharme, aconsejarme, compartir tu experiencia a lo largo de estos 5 años que estudié en Buenos Aires.

Gracias a mi hermana Nicole, quien estuvo a mi lado toda mi vida.

Gracias a mis abuelos, por haberles dado a mis padres la oportunidad de estudiar.

Gracias a Paola Rojas, mi directora de tesis, que me enseñó tanto. Si no hubiese hecho una tesina, habría terminado la carrera sin saber lo que es el verdadero trabajo en un laboratorio. Aprendí muchas técnicas, pero también aprendí a leer muchos papers antes de ir a la mesada, aprendí a planificar un experimento de principio a fin, a considerar todas las variables, a nunca olvidarme de los controles, a pensar como una científica y plantear ideas en voz alta, porque con el tiempo, las opiniones deberían ser cada vez más fundamentadas, pero nadie es perfecto y siempre hay lugar para nuevas ideas. Me enseñaste a tolerar las frustraciones y seguir adelante, una gran lección de vida.

Gracias a todos los chicos del laboratorio: Gonza, Marín, Ceci Pérez, Lau, Ani, Caro, Vicky, María, Michelle, Sol, Jime, Virgi, Ceci Perrone, Andrés, Maru, Flor, Claudia y Virgi Novaro por

hacerme sentir parte del grupo, por ser tan buena onda y crear un ambiente hermoso para trabajar, por salvarme las papas cada vez que lo necesité, por aconsejarme y enseñarme lo que es la vida de un científico.

Gracias a Claudia Lanari en especial, por aceptarme en su laboratorio y por corregir esta tesis.

Gracias a Verónica de la Fuente, Edgardo Salvatierra, Pablo Carabias, Fernanda Troncoso, y Silvia Vanzulli. Sin su ayuda muchos de los experimentos no habrían sido posibles.

Gracias a la Universidad de Buenos Aires, por darme la oportunidad de estudiar gratis, ya que, en muchos países, esto no es posible.

Gracias a los profesores como Omar Coso, Diana Rubel, Carlos Calvo, Rita Ulloa y Gabriel Rabinovich que enseñan cada tema con el entusiasmo de la primera clase, siempre incentivándonos a pensar.

Gracias a Laboratorios Roemmers y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que financiaron este trabajo de investigación.

ÍNDICE

Resumen 1
Abreviaturas 3
Introducción 5
Capítulo 1: Cáncer de mama 5
Incidencia, mortalidad y tendencias 5
Factores de riesgo 7
Clasificación del cáncer de mama 7
Capítulo 2: Introducción a las metástasis cerebrales 9
Metástasis cerebrales de cáncer de mama 10
Incidencia 10
Tendencias 11
Diagnóstico y pronóstico 12
Capítulo 3: Permeabilidad vascular luego de la formación de metástasis cerebrales 13
Barrera hematoencefálica 13
Barrera hemato-tumoral 14
Cambios en la permeabilidad en metástasis cerebrales y en tumores cerebrales primarios 15
Efecto de la permeabilidad incrementada en la acumulación de drogas y en el tratamiento de metástasis cerebrales 15
Capítulo 4: Actuales tratamientos de metástasis cerebrales 16
Radioterapia en metástasis cerebrales 16
Cirugía para las metástasis cerebrales 18
Quimioterapia sistémica en el tratamiento de metástasis cerebrales 18
Terapia dirigida 23
Capítulo 5: Glicoproteína P 25
P-gp y resistencia multidrogas 25
P-gp en la barrera hematoencefálica 26
Modulación transcripcional 28
Modulación por transporte rápido 29
Modulación por inhibición 29
Capítulo 6: Mifepristona (MFP) 31
Propiedades estructurales y fisicoquímicas 31
Metabolismo de la droga y farmacocinética 31
Afinidad de unión 32
Estudios antitumorales con MFP 32

Efecto antitumoral de la MFP en cerebro 34
Capítulo 7: Mifepristona y P-gp 35
Antecedentes 39
Modelo murino de cáncer de mama 39
Efecto de la MFP en tumores de mama creciendo en cerebro 40
Efecto combinado de la MFP con doxorrubicina en tumores de mama del modelo murino . 41
Hipótesis 44
Objetivo general 44
Objetivos específicos 44
Materiales y métodos 45
Resultados 53
Desarrollar un modelo de metástasis de cáncer de mama en cerebro apropiado para el estudio del efecto de un tratamiento combinado. 53
Inyección intracardíaca 53
Inyección subcutánea 57
Inyección intracraneal 60
Evaluar si el tratamiento con MFP permite mejorar la respuesta terapéutica de la doxo sobre carcinomas mamarios creciendo en cerebro. 64
Línea tumoral MDA-Br 64
Línea tumoral C4-2-HI 66
Evaluar el efecto de la MFP sobre el ingreso de la doxo al cerebro de ratones sin tumor 69
Estudiar si la MFP afecta la funcionalidad de la P-gp cuantificando por fluorescencia la retención intracelular de doxorrubicina. 71
Discusión 73
Conclusiones 81
Anexo 82
Bibliografía 86

RESUMEN

El tratamiento de las metástasis cerebrales es limitado debido a la baja capacidad de las drogas, como la doxorrubicina, de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) a causa de la P-glicoproteína (P-gp) expresada en la membrana de las células endoteliales. La P-gp es una proteína de resistencia a multidrogas que bombea sustancias al lumen de los capilares. La mifepristona (MFP) es un antiprogestágeno que podría ser utilizado para el tratamiento de cáncer de mama con alta expresión de isoforma A del receptor de progesterona (PR). Se ha sugerido que en altas concentraciones podría inhibir a la P-gp por mecanismos hormono independientes. El objetivo de este trabajo fue investigar si la MFP, a través de la inhibición de la P-gp, podría permitir un mayor pasaje de doxorrubicina liposomal pegilada (doxo) al cerebro, mejorando el efecto terapéutico sobre metástasis cerebrales. Se seleccionaron modelos experimentales de cáncer de mama que no expresaran PR: 1- la línea celular humana de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231-BRM2 (MDA-Br), que expresa *Green Fluorescent Protein* (GFP) y Luciferasa, y ha sido seleccionada *in vivo* para aumentar sus probabilidades de metastatizar al cerebro; 2- un carcinoma mamario murino (C4-2-HI) cuyo crecimiento no se inhibe con el tratamiento con MFP.

En primer lugar se buscaron las mejores condiciones para poder estudiar los efectos de las drogas sobre el crecimiento tumoral intracerebral. En un modelo murino, se evaluó la generación de metástasis experimentales por inyección intracardíaca (ic.) de células MDA-Br y de metástasis espontáneas por inyección subcutánea (sc.) de las mismas. Asimismo se evaluó un modelo de crecimiento tumoral en cerebro por inyección intracraneal (icrl.) de células MDA-Br o C4-2-HI. En los dos primeros modelos se realizó un seguimiento de la progresión tumoral por bioluminiscencia. Los ratones presentaron metástasis en pulmón, hígado, riñón y bazo además de las metástasis cerebrales. En ambos modelos las metástasis cerebrales fueron pequeñas y dispersas. Debido a este motivo, no resultaron los más adecuados para estudiar el efecto de un tratamiento combinado sobre metástasis cerebrales, sin embargo, pueden utilizarse para confirmar los resultados obtenidos con el modelo icrl. En este modelo evaluamos el crecimiento tumoral, luego de la inyección de las células MDA-Br, por luminiscencia y citometría de flujo. Aunque una desventaja del modelo es que no es una metástasis *per se*, nos permitió obtener tumores cerebrales localizados y en animales en buen estado de salud general. De esta manera, luego de la cicatrización del tejido post inyección y de comprobar el crecimiento tumoral, tratamos los ratones con MFP (sc. con pellets de 6 mg),

doxo (iv., 4,5 mg/kg una vez a la semana) o el tratamiento combinado. El ensayo de citometría de flujo mostró diferencias significativas ($p<0,01$) en el número de células tumorales entre el grupo no tratado y el tratamiento combinado (MFP+doxo) sin mostrar diferencias cuando las drogas fueron administradas en forma individual. Los mismos resultados se obtuvieron por luminometría ($p<0,01$). En el caso del crecimiento del tumor C4-2-HI en cerebro, luego de los tratamientos, se realizaron cortes de todo el cerebro y se cuantificó el volumen tumoral. Los resultados obtenidos siguieron el mismo patrón observado en el modelo MDA-Br ($p<0,05$).

Finalmente se evaluó si la P-gp se encuentra involucrada en los fenómenos observados, estudiando en cultivos *in vitro* el efecto de la MFP sobre la acumulación intracelular de la doxo en células HepG2 que expresan P-gp. Observamos por fluorometría un aumento significativo ($p<0,001$) en la cantidad de doxo intracelular en las células con el tratamiento combinado con respecto al tratamiento con doxo sola. En forma preliminar, utilizando las células HUVEC que comparten características con la BHE, obtuvimos resultados similares. Nos resta repetir este ensayo con la línea celular de barrera hematoencefálica hCMEC/D3.

Nuestros resultados sugieren que la MFP, además de su efecto terapéutico en carcinomas mamarios con alta expresión de isoforma A del PR, podría utilizarse para el tratamiento de metástasis cerebrales de tumores que no expresen receptores hormonales, aumentando la disponibilidad intracerebral del quimioterápico.

ABREVIATURAS

ABC	*ATP-binding cassette*, del inglés
AR	*Androgen receptor*, del inglés
BCRP	*Breast cancer resistance protein*, del inglés
BHE	Barrera hematoencefálica
BHT	Barrera hemato-tumoral
CAR	*Constitutive Androstane Receptor*, del inglés
CM	Cáncer de mama
CT	Tomografía computada
doxo	Doxorrubicina liposomal pegilada
dpi.	Días post inyección
ER	*Estrogen Receptor*, del inglés
FDA	*Food and Drug Administration*, del inglés
GC-box	*Glucocorticoid box*, del inglés
GFP	*Green Fluorescent Protein*, del inglés
GR	*Glucocorticoid receptor,* del inglés
Gy	Gray
h	Horas
HER-2	*Human Epidermal growth factor Receptor-2*, del inglés
HI	Hormono independiente
H&E	Hematoxilina y Eosina
ic.	Intracardíaca
icrl.	Intracraneal
iv.	Intravenosa
MCCM	Metástasis cerebrales de cáncer de mama
MDA-Br	MDA-MB-231-BrM2
MFP	Mifepristona o RU486
min	Minutos
MPA	*Medroxyprogesterone Acetate*, del inglés
MRI	*Magnetic resonance imaging*, del inglés

MRP	*Multidrug resistance protein*, del inglés
NSG	*NOD/LtSz-scid/IL- 2Rgamma null mice*, del inglés
PFA	Paraformaldehído
P-gp	Glicoproteína P
PR	*Progesterone receptor*, del inglés
PRG	Progesterona
PXR	*Pregnane-receptor-X*, del inglés
RLU	*Relative light units*, del inglés
RFU	*Relative fluorescence units*, del inglés
sc.	Subcutánea/o, subcuctáneamente
SF	Solución fisiológica
SNC	Sistema nervioso central
SRT	*Stereotaxic radiotherapy*, del inglés
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*, del inglés
WB	*Western blot*, del inglés
WBRT	*Whole Brain Radiotherapy*, del inglés

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: Cáncer de mama

Incidencia, mortalidad y tendencias

El cáncer de mama es el segundo más diagnosticado en el mundo (140 países de 184); sólo en 2012 se reportaron 1,7 millones de casos nuevos entre hombres y mujeres, representando el 11,9 % de todos los cánceres. En mujeres, al 2012 constituye el 25,2 % de ellos siendo el de mayor incidencia, con más número de casos en los países menos desarrollados y alcanzando el 52,2 % en América del Sur (el estudio GLOBOCAN incluyó datos de Colombia, Ecuador y Brasil) (Ferlay J, 2015) (Fig. 1).

A pesar de esto, en mujeres, el cáncer de mama es superado por el de pulmón en cuanto a mortalidad relacionada al cáncer. Esto puede deberse a una mejor prognosis, con una sobrevida del 85,3 % en las mujeres que lo padecen (Ferlay J, 2015).

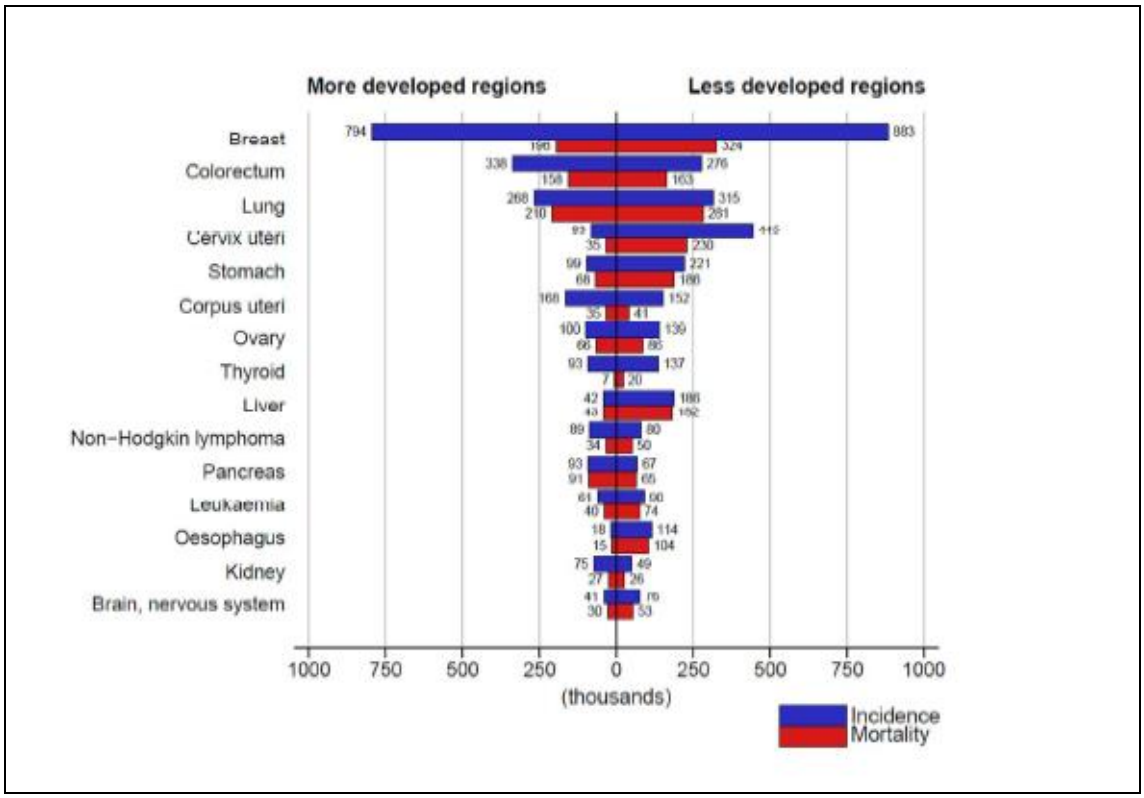

Figura 1. El cáncer de mama es el de mayor incidencia en el mundo en mujeres. Número estimado (miles) de casos nuevos (incidencia) y defunciones (mortalidad) en mujeres, en regiones desarrolladas y poco desarrolladas del mundo, en 2012 (Ferlay J, 2015).

Según el análisis realizado por DeSantis y col. (DeSantis CE, 2015) en el período que abarca desde 1993 hasta hoy, la incidencia mundial tiende a aumentar en 22 de los 39 países

analizados. En la región que abarca a América del sur y central la incidencia también ha aumentado, excepto en Brasil que se mantuvo constante. Sin embargo la mortalidad desde 1993 en esta región ha sido muy variable, aumentando en países como Colombia y Méjico pero disminuyendo en Chile, Uruguay y Argentina. En Brasil la mortalidad comenzó a aumentar un 0,9 % por año entre 2001 y 2012. Las grandes variaciones geográficas y temporales reflejan los patrones de factores de riesgo y acceso a la detección temprana de la enfermedad seguido de un tratamiento adecuado.

Según los datos de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, del inglés) para el año 2012, analizados por el Instituto Nacional del Cáncer (INC), el cáncer con mayor incidencia en ambos sexos en la República Argentina es el de mama, constituyendo el 18 % de todos los cánceres, y 36 % para las mujeres con una tasa de 71 casos cada 100.000 mujeres y un promedio de 19.386 casos por año (SIVER/INC, 2016).

En Argentina, el cáncer es la causa del 29 % del total de las defunciones, representando 60.000 muertes anuales. La mortalidad causada por el cáncer de mama ha disminuido sostenida y significativamente, a un ritmo de 0,8 % anual entre 2000-2011 y 2,1 % anual entre 2012 y 2014 (Fig. 2) (SIVER/INC, 2016). Esto podría reflejar un aumento en la concientización sobre la enfermedad que, a su vez, ha incentivado la realización de los estudios preventivos como mamografías y asistencia al ginecólogo, dado que la mortalidad por cáncer cervicouterino también ha disminuido significativamente.

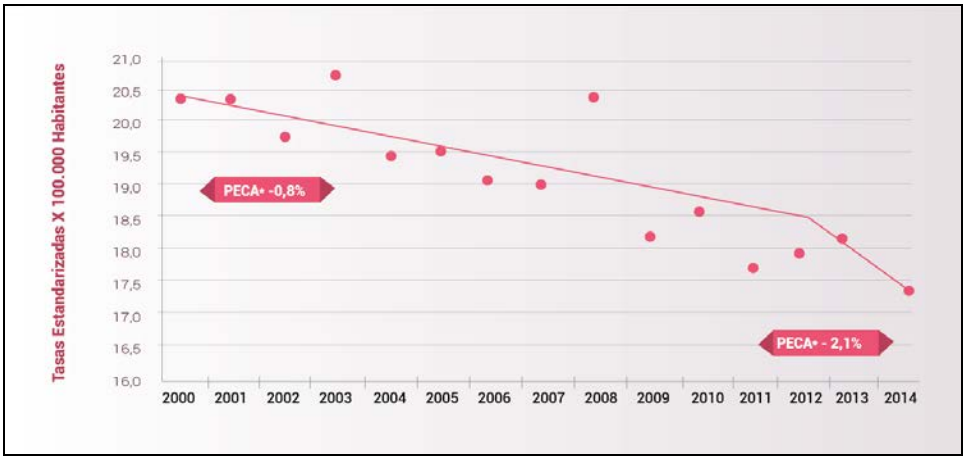

Figura 2. La mortalidad por cáncer de mama en mujeres ha disminuido sostenida y significativamente desde el año 2000. El gráfico representa la tasa estandarizada por edad, según la población mundial, cada 100.000 habitantes de Argentina entre los años 2000 y 2014 (SIVER/INC, 2016).

Si bien la tasa de mortalidad ha disminuido en los últimos años, el cáncer de mama aún ocasiona la muerte de 17,76 mujeres cada 100.000, según la tasa estandarizada por edad, es

por esto que es importante que se continúe avanzando con la investigación de nuevos tratamientos para el cáncer de mama.

Factores de riesgo

Numerosos factores de riesgo han sido identificados para el cáncer de mama. La edad es uno de los factores de riesgo más importantes en la mayoría de las enfermedades; en particular para el cáncer de mama, se ha demostrado que la incidencia es mayor en mujeres de entre 50-70 años de edad (Poorolajal J, 2010); (Lacey JV Jr, 2009). Pero ésto varía según las etnias, en Estados Unidos se observó que la incidencia de cáncer de mama es mayor antes de los 40 años para mujeres afro-americanas pero para mujeres blancas-no-Hispánicas la incidencia es mayor luego de los 40 años de edad (Clarke CA, 2012).

La historia familiar es uno de los factores de riesgo más importantes, el tener o haber tenido familiares con cáncer de mama incrementa el riesgo por un factor de 2 o 3 puntos. Esto se debe a la existencia de mutaciones heredables, en particular BRCA1, BRCA2 y p53, que aumentan significativamente la probabilidad de desarrollar cáncer. Algunas que han empezado a utilizarse recientemente como factores de riesgo son PALB2, CHEK2 1100delC, y mutaciones específicas de ATM (Shah PD, 2017).

También existen factores reproductivos relacionados con la exposición prolongada a hormonas, estos incluyen una menarca temprana, menopausia tardía (>55 años), primer embarazo tardío seguido de múltiples embarazos. Existe un factor de riesgo extra causado por la toma de anticonceptivos orales y terapia de reemplazo de hormonas (Lacey JV Jr, 2009). Por el contrario, se ha confirmado que el amamantamiento tiene un efecto protector para todas las mujeres independientemente de la etnia, edad o país en el que vivan (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002).

Hay otros factores de riesgo como consumo de alcohol, sobrepeso u obesidad, y poca actividad física que contribuyen en un 21 % a las muertes relacionadas al cáncer de mama en el mundo (Danaei G, 2005). Con una campaña de concientización mundial se podría prevenir una significativa cantidad de muertes causadas por el cáncer.

Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es una enfermedad heterogénea, con subtipos que se originan normalmente de células epiteliales ductales. Históricamente, la enfermedad se clasificaba según los análisis histopatológicos, pero hoy en día esto se combina con los análisis

moleculares para formar tres grandes subtipos: receptores de estrógeno positivos (que puede ser subdividido en Luminal A y Luminal B), HER-2 positivos (basado en la amplificación o sobreexpresión del gen HER-2, *Human Epidermal growth factor Receptor-2*, del inglés) y triple negativos (receptor de estrógenos negativo, receptor de progesterona negativo y HER-2 normal). Esta clasificación es importante ya que de ésta depende el tratamiento que se recomiende según si dicho subtipo es sensible a la quimioterapia, a la terapia con anticuerpos anti HER-2, o a la terapia endócrina. Además, estos subtipos presentan características biológicas distintas, como por ejemplo, diferente probabilidad de generar metástasis (Meattini I, 2017); (Lanari C, 2012).

Capítulo 2: Introducción a las metástasis cerebrales

Metástasis es la propagación del cáncer desde el sitio de crecimiento del tumor primario a órganos distantes, es la mayor causa subyacente de morbilidad y mortalidad en pacientes con cáncer (Nayak L, 2012). Las metástasis en el sistema nervioso central (SNC) tienen un impacto devastador en la calidad de vida.

El proceso de metástasis es complejo e ineficiente, primero las células cancerosas deben invadir el entorno del tejido local, rompiendo la membrana basal, si la hay. Luego, deben intravasar hacia los vasos sanguíneos o linfáticos y sobrevivir en circulación hasta que puedan adherirse a la pared de un vaso distante. Después de extravasar, las células deben poder adaptarse al nuevo medioambiente del tejido y proliferar para colonizar el órgano. Además, las células pueden adquirir capacidades para colonizar un tejido específico. A pesar de que cada órgano provee un microambiente específico, el cerebro es distinto al resto ya que es inmunológicamente privilegiado y está protegido por la barrera hematoencefálica (BHE). Para colonizar el cerebro, las células deben atravesar esta barrera (Carbonell W, 2009).

El cerebro de los mamíferos está formado por una densa matriz de neuronas y células gliales, un término amplio que incluye microglía, astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales. Estos componentes celulares forman regiones discretas dentro del cerebro asociadas a funciones específicas. El cerebro mamífero adulto consiste en dos regiones principales: el parénquima y la leptomeninge. Ésta última consiste en 3 membranas de tejido conectivo que lo rodean y protegen (Palmieri, 2012); (Fidler, 2011).

El 80 % de las metástasis ocurren en la corteza cerebral, el 15 % en cerebelo y el 5 % en el tallo encefálico, esto concuerda con el nivel de vascularización de cada zona (Delattre JY, 1988). En un estudio más reciente se observa que ésta distribución no ha variado mucho (69,4 % en corteza, 26 % en cerebelo y 4,1 % en tallo encefálico) (Wu SG, 2016).

Algunos tipos de cáncer (pulmón, melanoma) solían asociarse a múltiples metástasis cerebrales, mientras que otros (cáncer de mama y gastrointestinal) sólo a una (Delattre JY, 1988). Sin embargo, recientemente en un estudio retrospectivo de Evans y col. (Evans A, 2004) de pacientes con MCCM, se ha determinado que el 78 % de las pacientes presentaban múltiples metástasis intracerebrales, un 14 % sólo presentaba una sola lesión, mientras que el 8 % presentaba lesiones en la leptomeninge.

Se han descripto al menos 3 microambientes favorables para el desarrollo de metástasis parenquimales: el nicho perivascular, el parénquima neuro-inflamatorio y el fluido cerebroespinal o nicho leptomeningeo.

Metástasis cerebrales de cáncer de mama

Pacientes con CM tienden a desarrollar metástasis recurrentes al SNC luego del desarrollo de metástasis sistémicas y múltiples rondas de quimioterapia. Las metástasis cerebrales de cáncer de mama (MCCM) se pueden desarrollar tanto en el parénquima como en leptomeninge, normalmente como lesiones aisladas, raramente asociadas a edema (Palmieri, 2012).

Incidencia

A pesar que la incidencia exacta y prevalencia de metástasis cerebrales (MC) no es conocida, se estima que entre 170.000 y 200.000 casos de MC son diagnosticados cada año en los Estados Unidos. La mayor parte de esta información proviene de estudios poblacionales y de resultados de autopsias. Aunque probablemente subestime significativamente la verdadera incidencia, los resultados obtenidos de un estudio poblacional llevado a cabo entre 1935 y 2001 reportaron que los rangos de incidencia varían desde 8,3 a 14,3 cada 100.000 personas, y de 8,5 a 9,6 % dentro de pacientes con cáncer (Nayak L, 2012). Los estudios de autopsia normalmente muestran valores más altos que los poblacionales, esta diferencia podría reflejar la diferencia entre enfermedad sintomática y asintomática (Palmieri, 2012).

La incidencia de MC en mujeres con cáncer de mama es del 15-20 % históricamente. Sin embargo, este rango puede subestimar la cantidad de mujeres con MCCM ya que un estudio de autopsias de 1044 mujeres que murieron de CM encontró evidencia histológica de MC en el 29 % de los casos. Reportes más recientes han estimado hasta una incidencia del 30 % para CM avanzado y aún mayor para ciertos subtipos de CM (Miller KD, 2003).

Los subtipos HER-2 positivo y triple negativo han sido reportados con un índice de incidencia de MC que supera el 35 % de las pacientes con enfermedad avanzada (Costa R, 2017).

Diversos factores de riesgo para el desarrollo de MCCM han sido reportados. En una cohorte de 9.524 pacientes, que han sido diagnosticadas con enfermedad en etapa temprana, la incidencia de MC en 10 años fue de 5,2 %, asociadas a ganglios linfáticos positivos, tumores ER negativo, pacientes jóvenes, y HER-2 positivo. En una población de pacientes con CM metastásico, la incidencia de MC fue de 21 % dentro de los 10 años, con similares factores de riesgo (Palmieri, 2012).

Para pacientes diagnosticadas con el subtipo HER-2 positivo de CM, las MC se están incrementando como sitio primario de progresión metastásica y amenazan con limitar los avances logrados con terapia sistémica. Se sabe menos acerca de la incidencia de MC en pacientes triple negativos. En un estudio con más de 15.000 mujeres con CM, realizado por el National Comprehensive Cancer Network, se observó que aquellas con CM triple negativo son más propensas a desarrollar MC que aquellas con subtipo HER-2 positivo (Palmieri, 2012). De los cánceres de mama hereditarios, muchos son triple negativos. En un pequeño estudio, el 67 % de las pacientes con mutaciones confirmadas en BRCA1 desarrollaron metástasis cerebrales (Albiges L, 2005).

A pesar de que las MC son poco frecuentes en pacientes con CM ER positivos, en un estudio retrospectivo de 400 pacientes con MC, las pacientes Luminal A tuvieron una media de supervivencia de 9,7 meses luego del diagnóstico, muchos menos que los 20,7 meses de las pacientes Luminal B y que los 13,8 de toda la cohorte (Sperduto PW, 2012).

Existen diversos casos de metástasis cerebrales ocultas o asintomáticas en pacientes con CM avanzado. Resultados de un estudio de autopsia mostraron que, de aquellas pacientes con MC, sólo el 31 % habían sido diagnosticadas con síntomas asociados a metástasis cerebrales antes de fallecer. Cuando la imagenología fue utilizada como criterio de admisión en estudios clínicos de pacientes sin síntomas de MC, el 15 % de las pacientes tenían MC ocultas (Palmieri, 2012). La relevancia clínica de estas lesiones ocultas aún es desconocida.

Tendencias

La incidencia de MC parece estar incrementando. Las causas son desconocidas, pero diversas teorías han sugerido tener en cuenta la biología subyacente y las nuevas terapias y tecnologías de diagnóstico por imagen. Por una parte, las nuevas terapias extienden la vida de los pacientes permitiendo el tiempo suficiente para el desarrollo de las MC. Esto ha sido observado en pacientes con cáncer de mama HER-2 positivo tratadas con trastuzumab (Tonyali O, 2016).

El cerebro representaría un sitio preferencial para el desarrollo de metástasis debido a que muchas de las nuevas terapias moleculares y la mayoría de los quimioterápicos tradicionales no atraviesan la BHE, o lo que queda de ella una vez formado el tumor: la barrera hemato-tumoral (BHT). Para migrar al cerebro, las células tumorales deben comenzar a expresar o inhibir una serie de genes, marcadores y eventos que favorezcan la migración hacia el cerebro. Estos eventos cerebro-específicos pueden dispararse por presiones de selección debidas a las terapias moleculares, mediadas por una población específica de células tumorales o del

microambiente, o por alguna vía de señalización aún desconocida. Se cree que la incidencia de MC incrementaría a medida que se diseñan nuevas terapias contra el cáncer.

Por otro lado, la incidencia de las MC podría no estar incrementándose *per se*, sino que las mejoras en la imagenología y una mayor atención a los síntomas neurológicos incrementarían la detección de las mismas (Palmieri, 2012).

Diagnóstico y pronóstico

El diagnóstico de las MC se basa normalmente en los síntomas del paciente, que incluyen desde dolores de cabeza hasta convulsiones. Estos síntomas pueden estar exacerbados por alguna de las medicinas prescriptas. Los diagnósticos son confirmados por neuroimagenología, usualmente por resonancia magnética que puede detectar con fidelidad lesiones en el rango de 3-5 mm (Palmieri, 2012).

El número y ubicación de las MC diagnosticadas es esencial para la prognosis y plan de tratamiento.

Capítulo 3: Permeabilidad vascular luego de la formación de metástasis cerebrales

El cerebro es el órgano más vascularizado del cuerpo. La densa red de capilares asegura que prácticamente cada neurona esté perfundida por su propio vaso sanguíneo. Estos capilares son distintos a los del resto del cuerpo (Palmieri, 2012).

Barrera hematoencefálica

La BHE es una interfase vascular única que restringe la difusión paracelular de diversas drogas desde la circulación sanguínea al cerebro. Una característica específica de la BHE es el completo sellado del endotelio vascular luminal por medio de los complejos proteicos llamados uniones estrechas (*tight junctions*) entre las células, así como la ausencia de fenestraciones y baja actividad pinocítica. Es por esto que para que una droga ingrese al cerebro debe atravesar la membrana plasmática de las células endoteliales por difusión o con la ayuda de proteínas transportadoras. Rodeando al endotelio se encuentran los pericitos y las prolongaciones tipo pies de los astrocitos (Fig. 3) (Adkins CE, 2012).

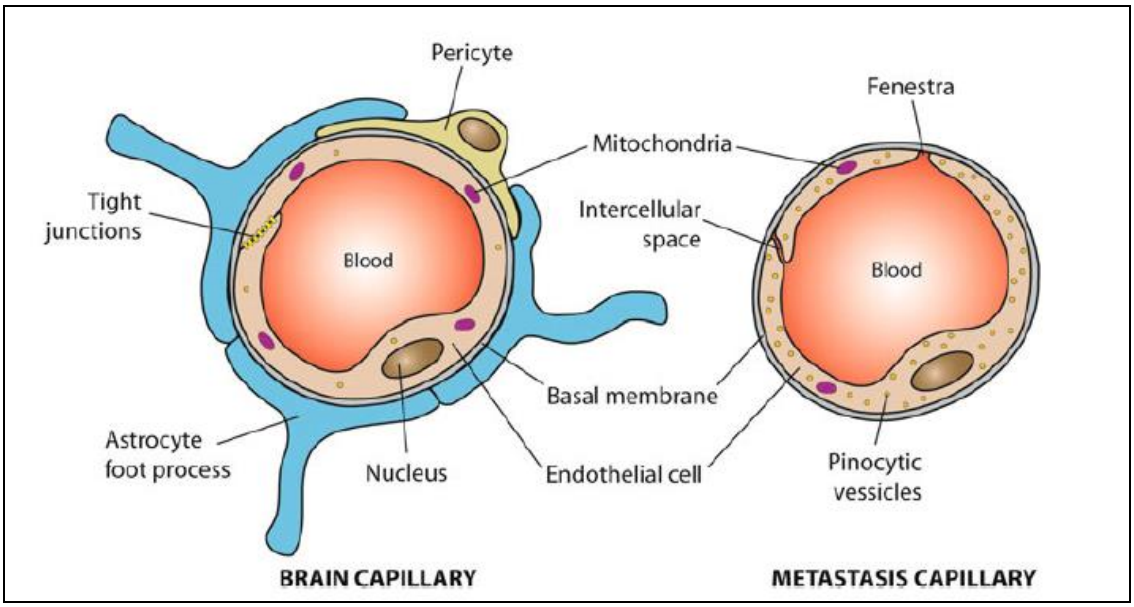

Figura 3. Ilustración de la BHE (izq.) versus la BHT (der). Una diferencia importante entre los dos tipos de vasos es la menor expresión de las proteínas *tight-junctions* en la BHT, que lleva a un cierre incompleto de la vasculatura metastásica y a una incrementada permeabilidad en la lesión (Adkins CE, 2012).

Para complementar la BHE, en la membrana del endotelio existe un gran número de transportadores que, al bombear sustratos desde el cerebro hacia el sistema circulatorio, restringen aún más el ingreso de moléculas al parénquima cerebral. Numerosos quimioterápicos son sustrato de estas bombas. Algunos de éstos transportadores son la

glicoproteína P (P-gp), la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP) y la familia de proteínas de resistencia multidroga (MRP). Asimismo, la BHE es rica en numerosas enzimas (por ej. fosfatasas) que provocan la biotransformación o inactivación de diversas moléculas al intentar cruzar la barrera hacia el parénquima cerebral (Adkins CE, 2012).

Todos estos componentes forman la BHE que contribuye a que el cerebro sea un órgano inmunológicamente privilegiado y farmacológicamente protegido de sustancias tóxicas e incluso de quimioterápicos y algunas nuevas terapias moleculares dirigidas.

Barrera hemato-tumoral

La presencia de metástasis intracraneales altera la integridad vascular de la BHE dentro y alrededor de las lesiones. Estos vasos sanguíneos (BHT) generalmente tienen permeabilidad incrementada, flujo sanguíneo reducido y un incremento o disminución de los transportadores de influjo y eflujo.

Los cambios en la permeabilidad de la BHT no son homogéneos a lo largo de la lesión. Es aceptado que si hay necrosis dentro de la lesión metastásica, ésta tiene vasos sanguíneos altamente permeables. En contraste, los vasos sanguíneos que están inmediatamente adyacentes a la lesión tienen permeabilidad similar a la de la BHE (Adkins CE, 2012). La permeabilidad vascular tampoco es homogénea entre diferentes lesiones dentro del mismo cerebro (Zhang RD, 1992); (Adkins CE, 2012). En un estudio de permeabilidad comparativo entre cerebro con y sin lesiones metastásicas se demostró que, a pesar de que las lesiones tienen cierto grado de permeabilidad aumentada, este incremento no supera las 10 veces (Adkins CE, 2012). Del mismo modo, dentro de una sola lesión los valores de permeabilidad son muy variables. Es interesante notar, que de las 2.000 lesiones metastásicas preclínicas evaluadas previamente en dicho estudio, no hay una correlación clara entre permeabilidad aumentada e incremento del tamaño de la lesión.

Una segunda característica estructural que contribuye al aumento de permeabilidad es el crecimiento de nuevos vasos dentro de la lesión y el recambio de las células endoteliales. Dentro del cerebro normal, el endotelio vascular es un tejido quiescente con baja tasa de apoptosis, aunque puede dividirse y reparar vasos sanguíneos dañados frente a la presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) expresado por células gliales. En las metástasis en desarrollo, hay áreas dentro de la lesión que se volverían hipóxicas ya que superan su abastecimiento de sangre, por lo que las células tumorales incrementan la secreción de VEGF para iniciar la formación de nuevos vasos sanguíneos (o elongar los existentes) (Kim LS, 2004). Esto también aumenta el recambio de las células endoteliales y

contribuiría al incremento en la permeabilidad. Pero, dado que la secreción de VEGF es concentrada e inmediata, la red de nuevos vasos resultante sería tortuosa e inefectiva con un flujo de sangre disminuido (Jain RK, 2007).

Cambios en la permeabilidad en metástasis cerebrales y en tumores cerebrales primarios

Existe una gran variabilidad en la permeabilidad entre los distintos tipos de tumores cerebrales primarios (en un factor de 200), sin embargo se puede establecer que los astrocitomas y oligodendrogliomas tienen una baja permeabilidad mientras que los meningiomas y glioblastomas en general tienen valores más altos. El trabajo de Adkins y col. (Adkins CE, 2012) compara estudios de permeabilidad en tumores primarios y metástasis cerebrales con la técnica de tomografía computada (CT) con perfusión. Se observó que los valores de permeabilidad en las metástasis cerebrales son un décimo de los valores en tumores cerebrales primarios. Del mismo modo, otro estudio que compara la permeabilidad entre glioblastomas y metástasis cerebrales por resonancia magnética (MRI) concluye que la permeabilidad de las metástasis es el 65 % de la observada en glioblastomas (Server A, 2011). En conclusión, las metástasis cerebrales presentan menos permeabilidad que los tumores cerebrales primarios.

Por último, se demostró que las metástasis grandes y más compactas presentan, por lo general, mayor permeabilidad que las lesiones metastásicas pequeñas y más dispersas (Fidler, 2011).

Efecto de la permeabilidad incrementada en la acumulación de drogas y en el tratamiento de metástasis cerebrales

En un trabajo se demostró que agentes quimioterápicos estándar (paclitaxel y doxorrubicina) se acumulan limitadamente en las metástasis cerebrales porque la BHE permanece en parte intacta dentro de estas lesiones (Lockman PR, 2010).

Para estudiar si esta acumulación restringida de la droga resulta en un efecto limitado sobre las metástasis, el trabajo de Lockman y col. (Lockman PR, 2010) evaluó esto en modelos preclínicos de MCCM. Encontraron que había una gran heterogeneidad entre lesiones respecto a permeabilidad, pero que en general ésta no presentaba un gran incremento y sólo el 10 % de las lesiones presentaba signos de toxicidad causada por los quimioterápicos. Esto sugiere que la vasculatura de las MC, a pesar de verse comprometida, está lo suficientemente intacta para limitar el acceso de una cantidad de quimioterápico necesaria como para producir un efecto citotóxico.

Capítulo 4: Actuales tratamientos de metástasis cerebrales

Actualmente, los tratamientos para las MC incluyen resección quirúrgica, cuando una o un bajo número de lesiones están localizadas en una región accesible; quimioterapia sistémica limitada; y radioterapia. La radioterapia puede ser en todo el cerebro (*Whole Brain Radiotherapy*, WBRT) o radiocirugía estereotáctica (*Stereotactic Radiosurgery*, SRS). WBRT consiste en una relativamente pequeña dosis de radiación (hasta 3 Gy) a todo el cerebro en múltiples dosis para tratar lesiones múltiples y prevenir la colonización por parte de células tumorales ocultas. WBRT ha sido aprobado como tratamiento para MC múltiples en cáncer de pulmón. La radiocirugía estereotáctica consiste en una alta dosis de radiación (>4 Gy) en un área puntual. A esto se le adicionan cuidados paliativos como esteroides y medicamentos anticonvulsivos. En el área de terapias moleculares dirigidas, el desarrollo de moléculas pequeñas inhibidoras, permeables a la BHE, que dirigidas a las metástasis cerebrales puedan mejorar la supervivencia, es un intenso foco de investigación.

Radioterapia en metástasis cerebrales

La radioterapia es utilizada como tratamiento localizado tanto en la terapia definitiva como en la paliativa. La dosis total de radiación y el número de tratamientos en los cuales la dosis total es suministrada (fraccionamiento), varían según las indicaciones.

El mecanismo de acción de la radiación ionizante es múltiple, el efecto principal es causado por la capacidad de los fotones de rayos x y γ (gamma) de causar daño directo al ADN y también por efecto indirecto a través de la radiólisis del agua produciendo la ruptura de uniones químicas y generando radicales libres. La fijación de la ruptura en la doble cadena del ADN que lleva a la disrupción mitótica, es el mecanismo más aceptado de muerte celular en tumores sólidos. Además de las lesiones en el núcleo, existe evidencia creciente que sugiere que hay otros blancos subcelulares de la radiación ionizante, como la oxidación de la bicapa lipídica, cambios en la permeabilidad microvascular, rearreglos en los complejos de unión célula-célula y alteraciones mitocondriales que inducen estrés oxidativo adicional. Debido a todos estos efectos la radiación tiene la capacidad de alterar el microambiente tumoral, la arquitectura celular, la permeabilidad de la vasculatura tumoral y penetración de las drogas en el tumor, y producir alteraciones bioquímicas que permiten el efecto aditivo o sinérgico con los agentes farmacológicos (Smart, 2012).

La habilidad de la radiación ionizante de tratar exitosamente el cáncer yace en inducir la muerte de las células neoplásicas malignas sin destruir el tejido normal que atraviesa. La

respuesta de los tumores sólidos a la radiación depende de 3 factores: 1-la radiosensitividad intrínseca de las células tumorales, 2- la oxigenación de las células tumorales y 3- el número de células tumorales en división.

Las células hipóxicas requieren de dosis más altas para producir la misma cantidad de muerte celular. A mayor volumen de la metástasis, mayor es el número de células hipóxicas y relativamente radioresistentes (Smart, 2012).

En el cerebro, los distintos tipos celulares responden de forma diferente a la radiación, siendo el cerebro el tejido que más tarda en responder debido a su baja tasa de renovación, observando los efectos meses o años luego del tratamiento. Luego de un año se comienzan a observar las lesiones vasculares y de la materia gris. Los efectos cognitivos, como deficiencia de atención y concentración son impredecibles e individualizados, típicamente no se manifiestan hasta 1 o 2 años después. La necrosis por radiación, cuando ocurre, se observa entre 6 meses a 2 años luego del tratamiento, y es seguida por edema, que causa distorsión del tejido y los posibles cambios cognitivos. Las vasculopatías, infarto cerebral y endocrinopatías son otros posibles efectos secundarios que dependen del área del cerebro afectada y de la dosis de radiación (Lawrence YR, 2010).

Basados en el actual entendimiento de los mecanismos moleculares de la respuesta celular a la radiación, se están intentando desarrollar estrategias que incrementen la radiosensitividad de las células tumorales utilizando agentes que intervengan en las vías de señalización que regulan la muerte celular en respuesta a la radiación. Algunos ejemplos de estos radiosensibilizadores son el 5-fluorouracilo, metotrexato, cisplatino y taxanos (paclitaxel), pero estos quimioterápicos también afectan al tejido normal. Los radioprotectores mitigan el efecto de la radiación en células normales, haciendo uso de las diferencias entre células tumorales y normales. Sin embargo, ninguno de ellos logran ingresar al SNC en suficiente dosis para causar su efecto (Smart, 2012).

- <u>Radiación y BHE</u>

Se ha sabido por más de 80 años que la radiación craneal aumenta la toxicidad de las drogas sistémicas, pero recientemente se ha comprobado que la administración de ciertos agentes terapéuticos (metotrexato) puede alterar la BHE, potenciando el efecto de la radiación y causando encefalopatías (DeAngelis LM, 2002). Aunque aún no se sabe cómo se ve afectada la permeabilidad de la BHE, sí se estableció que la administración de corticoesteroides estabiliza tanto la BHE como la BHT, disminuyendo la permeabilidad (Jarden JO, 1989).

Cirugía para las metástasis cerebrales

Con el aumento en la incidencia debido al incremento en la sobrevida causada por las nuevas terapias, más pacientes son considerados para resección quirúrgica. A principios del siglo veinte, los resultados obtenidos con cirugía no eran esperanzadores, prefiriendo el tratamiento con WBRT y corticoesteroides. Sin embargo, avances recientes en neurocirugía, neuroanestesia y técnicas de localización mejoradas, permitieron que un mayor número de lesiones fueran accesibles a la vez que disminuyeron la mortalidad y morbilidad quirúrgica (Stofko DL, 2012). Estudios comparativos demostraron que la resección quirúrgica combinada con WBRT aumenta la sobrevida, la calidad de vida y disminuye la recurrencia en comparación con WBRT o sólo cirugía (Patchell RA, 1990). La cirugía es importante para conocer el origen histológico de la metástasis, y así poder elaborar un plan de tratamiento, y para aliviar inmediatamente síntomas como edema y aumento de presión intracraneal.

Se ha comprobado que la cirugía resulta beneficiosa en metástasis de diversos tipos de cáncer, tanto para los casos en donde hay una sola lesión metastásica como para múltiples lesiones (<4), si se remueven todas, siempre y cuando estén accesibles (Bindal RK, 1993). La cirugía también incrementa la sobrevida y calidad de vida de pacientes con MC recurrentes, lo cual ocurre en el 31-48 % de los casos (Weinberg JS, 2001).

Con el advenimiento de la asistencia computacional, estereotaxis guiada por imágenes, ultrasonografía intraoperatoria y la disponibilidad de la tomografía computada e imágenes por resonancia magnética dentro de la sala de operaciones, la habilidad de localizar el tumor ha incrementado significativamente en los últimos años, permitiendo la resección quirúrgica de tumores antes inaccesibles (Stofko DL, 2012).

Respecto a la WBRT como adyuvante post-cirugía, no existe un acuerdo en la comunidad científica respecto de si los beneficios de incremento en supervivencia e independencia funcional superan a los posibles efectos secundarios como demencia y degeneración neurocognitiva (Aoyama H, 2015); (Kocher M, 2011).

Quimioterapia sistémica en el tratamiento de metástasis cerebrales

Existen diversos problemas al momento de tratar las MCCM con quimioterapia, la dificultad de las drogas de atravesar la BHE, la resistencia adquirida a las drogas debido al tratamiento previo del tumor primario, la enfermedad sistémica recurrente, la heterogeneidad de los tipos tumorales y la medida de la eficacia del tratamiento. Este último parámetro se dificulta debido

a que la sobrevida global no sólo se ve influenciada por las MC sino por la presencia de tumores en otros órganos, entonces es necesario medir otros parámetros (como la respuesta radiográfica, función neurológica y calidad de vida), lo que incrementa la complejidad de los estudios. La resistencia adquirida a los quimioterápicos de primera línea deja sólo unos pocos disponibles para tratar las MC. Por último, los ensayos con quimioterapia hasta la fecha, se han realizado con MC de múltiples orígenes, dificultando la observación del efecto en un tipo histológico particular (Chamberlain, 2012) (Gavirlovic & Posner, 2005). Dos factores influencian la eficiencia de la quimioterapia: la quimiosensibilidad intrínseca del tumor y la capacidad del quimioterápico de acceder y actuar sobre su blanco. El ingreso de la droga al parénquima del cerebro está determinado por las características lipofílicas, el estado de ionización y el peso molecular de la droga, así como por la BHE. La mayoría de los quimioterápicos no son lipofílicos, son solubles en agua y de gran tamaño molecular; debido a esto, el tratamiento óptimo de MC con quimioterápicos es diferente al de la terapia sistémica (Peerboom, 2005).

La BHE, normalmente, es una barrera contra la entrada de agentes xenobióticos al cerebro, pero, como se evidencia por radiografía de contraste, en pacientes con MC la barrera está alterada y los quimioterápicos pueden atravesarla. Sin embargo en el cerebro adyacente al tumor y en el caso de micrometástasis (tumores de entre 1-3 mm) la BHE se mantiene intacta (Fidler, 2011). Además, la co-administración de corticoesteroides (más frecuentemente dexametasona) con el objetivo de disminuir el edema vasogénico en pacientes con MC, re-establece la BHE y por ende limita el acceso de los quimioterápicos al cerebro (Hue CD, 2015); (Narang VS., 2008).

Según la bibliografía, la respuesta a quimioterapia comparada con WBRT o SRT es inferior y menos duradera en pacientes con MC de CM, SCLC (*small cell lung cancer*, del inglés), NSCLC (*non-small cell lung cancer*, del inglés) y melanoma. El uso de quimioterápicos por lo general está limitado a pacientes en los cuales la WBRT y/o SRT han fallado, presentan lesiones múltiples o en instancias específicas como por ejemplo pacientes con una sola MC que ha sido resecada y tratada con quimioterapia intracavidad. La mayoría de los estudios con quimioterapia han utilizado un solo agente como temozolomida o quimioterapia multi-agente histológico-específica. Frecuentemente, la respuesta de las MC a la quimioterapia es menor a la sistémica (Chamberlain, 2012).

A pesar de todo esto, la quimioterapia sigue siendo una de las pocas herramientas que existen para el tratamiento de las metástasis sistémicas, incluyendo las MC. Es por esto que es crucial que continúen las investigaciones para mejorar el ingreso de los quimioterápicos al cerebro.

- Tratamiento con un solo agente

Temozolomida (TMZ) es el quimioterápico más estudiado y utilizado en las metástasis cerebrales refractarias (Boogerd W, 2007). Atraviesa la BHE, tiene una toxicidad favorable y es el agente de primera elección para pacientes con gliomas, sin embargo, hay pocos estudios con MCCM y los resultados no son satisfactorios. Topotecan es otro agente bien estudiado que atraviesa la BHE, pero en un estudio con 16 pacientes se obtuvo un 6 % con respuesta completa, 31 % con respuesta parcial y 31 % con respuesta estable (Oberhoff C, 2001), aunque estudios más recientes indican que podría tener un gran futuro en el tratamiento de MC de diversos tumores sólidos que no han sido expuestas previamente a este quimioterápico, con una respuesta del 33-63 % (Wong ET, 2004).

- Doxorrubicina vs Doxorrubicina liposomal pegilada

La topoisomerasa II es una enzima que corta transientemente la doble cadena del ADN para mantener su apropiada estructura durante la replicación semiconservativa. La doxorrubicina tiene como blanco a la topoisomerasa II, siendo muy efectiva en oncología.

El mecanismo de acción de estas enzimas consiste en el ataque de un residuo tirosina al enlace fosfodiéster del ADN, creando un enlace que mantiene unida la enzima al ADN mientras ocurren los cambios en la macromolécula. Las drogas que tienen como blanco a la topoisomerasa II, como las antraciclinas, detienen a la enzima cuando está unida covalentemente al ADN, inhibiendo su actividad luego de haber cortado las cadenas. Esto genera daño al ADN, llevando al arresto celular y eventualmente a la muerte celular programada.

Está bien establecido que algunas de las drogas anti-topoisomerasa II son eliminadas de las células efectivamente por transportadores como los de la familia ABC, principalmente P-gp. Las células que expresan altos niveles de estos trasportadores podrían tener resistencia intrínseca a la terapia anti-topoisomerasa II. La selección de células resistentes frente a estas drogas puede provocar el aumento de expresión de estos transportadores, frecuentemente por amplificación del gen. La doxorrubicina es uno de los principales sustratos de la P-gp (Walker JV, 2004).

Este quimioterápico es ampliamente utilizado para la terapia sistémica, sin embargo se ha demostrado que puede provocar cardiotoxicidad en humanos. Los resultados de Zhang y col. (Zhang S, 2012) sugieren que esto se debe a que, en presencia de la topoisomerasa II, la doxorrubicina activa las vías de apoptosis y desencadena una marcada alteración del

transcriptoma que afecta selectivamente a la fosforilación oxidativa y a la biogénesis mitocondrial en los cardiomiocitos.

Por esta razón, se han buscado métodos que permitan el ingreso diferencial de la droga a las células tumorales, sin dañar el tejido normal. Uno de ellos es encapsular la droga en liposomas, nanopartículas formadas por una doble capa lipídica. Los vasos tumorales tienen uniones endoteliales amplias, alto número de fenestraciones, canales transendoteliales formados por vesículas, y membrana basal discontinua o ausente. Los liposomas pueden atravesarlos si tienen un tamaño ≤100 nm, sin embargo, no se observa extravasación en capilares normales. Los liposomas en circulación sanguínea no pierden su contenido. Se encuentran liposomas en el espacio intersticial y perivascular, pero no dentro de la célula. Los liposomas atraviesan el endotelio intactos hacia el espacio intersticial del tumor (Huang SK, 1992).

La exposición sistémica y la prolongada circulación provista por las nanopartículas liposómicas podría permitir mayor penetración de las mismas al tumor a través de la microvasculatura "comprometida" por la presencia del tumor vía convección pasiva (Anders CK, 2013). La doxorrubicina liposomal pegilada (Doxil, Caelyx, Alza Pharmaceuticals, San Bruno, CA, USA) ha logrado el tiempo de circulación más prolongado entre todos los tipos de liposomas en el mercado, con una vida media terminal de 55 h en humanos (Park, 2002). Estos son liposomas pequeños (~100 nm) y rígidos a los que se les ha agregado una capa polimérica de polietilenglicol. También son llamados STEALTH o liposomas estéricamente estabilizados. Presentan una disminuida interacción con las proteínas plasmáticas y fagocitos mononucleares lo que permite un tiempo de circulación prolongado.

La biodistribución y farmacocinética alteradas logran mitigar significativamente muchas de las toxicidades producidas por la administración en bolo de doxorrubicina, como la náusea, alopecia y eritrodisestesia palmo-plantar. Esta última complicación es límite tóxico para la administración de Doxil, haciendo problemático el posible aumento de la dosis encapsulada en liposomas. En estudios de fase III de CM metastásico administrando Doxil como primera o segunda-línea se ha observado un rango de respuesta de 31 %. Una respuesta del 65 % se observó en estudios combinados de Doxil y ciclofosfamida. La biodistribución de los liposomas puede reducir los efectos cardiotóxicos de las antraciclinas (Park, 2002).

Anders y col. (Anders CK, 2013) utilizaron un modelo de cáncer de mama triple negativo inyectado intracranealmente en cerebro de ratón, y trataron con doxorrubicina libre o doxorrubicina en liposomas pegilados (doxo). Los resultados indican que el perfil farmacológico y de eficiencia de la doxo es mayor que el de la doxorrubicina libre logrando 20

veces más penetración al cerebro. La doxo demostró una permanencia prolongada en plasma, siendo detectable por HPLC hasta 96 h post inyección, mientras que la doxorrubicina libre resultó indetectable luego de sólo 24 h. Los tiempos de concentración elevada de doxorrubicina en plasma fueron equivalentes a los del tumor icrl.

En el trabajo de Uster y col. (Uster PS, 1998) comparan y contrastan por *Confocal Laser scanning*, la distribución tumoral de la doxorrubicina en solución y la encapsulada (CAELYX o DOXIL) inyectada iv. en ratones. Se observó por fluorescencia que la droga encapsulada permanece más tiempo en circulación. La consecuencia directa de este lento *clearance* es que se provee un abastecimiento prolongado de estos liposomas a través de la vasculatura tumoral con permeabilidad aumentada (Huang SK, 1992). La doxorrubicina libre se distribuye por el estroma y el tumor con un pico que alcanza su máximo inmediatamente luego de inyectada. La droga encapsulada se focaliza inicialmente en la zona perivascular y dentro de las 24-48 h difunde al estroma y tumor. La droga libre se elimina dentro de las 24 h, mientras que la liposomada persiste hasta 7 días post inyección. Se observó que la doxorrubicina se localiza en el núcleo, pero las bicapas lipídicas de la cápsula no, esto concuerda con resultados anteriores (Huang SK, 1992) donde se localizaron entre las células de la zona perivascular pero no intracelularmente, respaldando la hipótesis de que la droga deja a los liposomas al ingresar a la célula.

El tiempo que reside una droga en el tejido es importante para el impacto en el efecto terapéutico. El *clearance* de las drogas del cerebro ocurre a través del sistema “glinfático” (por medio de las células de la glía). Este sistema, junto con el de las bombas de expulsión multidrogas, como P-gp, hacen del cerebro un ambiente químico altamente regulado (Park J, 2016).

- <u>Quimioterapia de múltiples agentes</u>

Una serie de estudios no aleatorios que evalúan quimioterapia combinada han sido realizados en pacientes con MC. En el estudio más numeroso en pacientes con MCCM, 100 mujeres fueron tratadas con quimioterapia multi-agente usando una variedad de regímenes y se observó un 50 % de rango de respuesta con una media de duración de 7 meses. En otro trabajo se obtuvo un 59 % de rango de respuesta con un régimen de quimioterapia similar. En ambos casos se trataron mujeres sin quimioterapia previa, esto sugiere que este tipo de pacientes tiene mejor rango de respuesta (Chamberlain, 2012). La combinación de cisplatino y etopósido fue estudiada en 107 pacientes con MC recientemente desarrolladas, 56 de las

cuales tenían cáncer de mama sin tratamiento previo con WBRT (Franciosi V, 1999). El 38 % de las pacientes lograron respuesta completa o parcial. La sobrevida media para estas pacientes fue de 8 meses, tiempo comparable a los resultados con WBRT, sugiriendo que un subgrupo de pacientes se beneficiaría con quimioterapia múltiple.

- Tratamiento conjunto de quimioterapia y radioterapia

Se estudiaron 52 pacientes con MC de tumores sólidos (40 con cáncer de pulmón y 5 con cáncer de mama) en el cuál los pacientes se dividieron en grupos que recibieron WBRT con o sin tratamiento con TMZ. La respuesta radiográfica fue del 96 % en el grupo con TMZ comparado con el 67 % en el grupo sin TMZ.

Estos estudios sugieren que podría haber un efecto sinérgico entre la quimioterapia y WBRT en el tratamiento de MC observado por medio de respuesta radiográfica, sin embargo no está claro si hay un beneficio en la función neurológica o calidad de vida y sobrevida (Antonadou D, 2002).

Terapia dirigida

La radioterapia de cerebro completo lleva a una relevante neurotoxicidad y la quimioterapia sistémica enfrenta el obstáculo de la BHE/T, es por esto que es sumamente importante el estudio de nuevas terapias moleculares. Sin embargo, debido a la prognosis desfavorable de las MC, los pacientes que las padecen son excluidos de la mayoría de las investigaciones clínicas (Winkler, 2012).

Las terapias contra MC enfrentan el reto de actuar sobre las células tumorales sin dañar el delicado órgano que éstas colonizan. Además estas terapias deberían actuar de forma sistémica tratando múltiples macro- y micrometástasis que los pacientes desarrollan a lo largo de la enfermedad. Idealmente una terapia sistémica debería prevenir las MC o arrestar células colonizadoras y micrometástasis (Winkler, 2012).

El reto más importante para las terapias sistémicas consiste en atravesar la BHE/T (Fidler, 2011). Muchas terapias que tienen como blanco vías de señalización de la célula tumoral y son efectivas en el tumor primario, como es el caso de trastuzumab (anticuerpo monoclonal recombinante humano contra HER2), no penetran la BHE y por ende no tienen efectos sobre las metástasis cerebrales de cáncer de mama (Steeg PS, 2011). Otro ejemplo es el de Lapatinib, que es un inhibidor reversible de HER2 y EGFR, y cuya penetración al cerebro se ve comprometida por los transportadores de eflujo de la BHE y depende de la permeabilidad de la BHT (Polli JW, 2009). Estas terapias deben acceder a la célula tumoral para hacer efecto,

superando la BHE, el heterogéneo flujo de sangre y la incrementada presión del fluido intersticial, y si lo logran, no llegan a la lesión en cantidades suficientes (Winkler, 2012).

Sin embargo, existen terapias que no necesitan cruzar la BHE, como por ejemplo las terapias antiangiogénicas contra la vía de VEGF, que actúan sobre las células endoteliales. Existen pocos trabajos clínicos que estudien el efecto de un inhibidor de esta vía en las MCCM, sin embargo en un estudio preclínico con modelos murinos, utilizando el inhibidor PTK787/Z 222584, se observó angiogénesis reducida y restricción del crecimiento de estas metástasis (Kim LS, 2004). Recientemente, ensayos con diversas drogas que tienen como blanco esta vía comenzaron a incluir pacientes con MC (Winkler, 2012).

Dado que las terapias dirigidas pueden ser aplicadas durante un largo período de tiempo, son activas en todo el cuerpo y no producen neurotoxicidad como la WBRT, parecen ser perfectos candidatos para la prevención de MC. Por ejemplo Bevacizumab, que inhibe sólo VEGF-A, ha probado ser un agente profiláctico, disminuyendo la formación de MC de cáncer de pulmón, pero no de melanoma. Aún no hay resultados para los ensayos con MCCM (Winkler, 2012).

En base a la información recolectada, es evidente que ninguno de los tratamientos actuales para las MC es completamente efectivo. En el caso de la resección quirúrgica no sólo es operador-dependiente, sino que también son factores relevantes la ubicación del tumor en el cerebro y la disponibilidad de equipos de imagenología de última generación. Por otro lado, la radiación y la quimioterapia no son capaces de inhibir el crecimiento tumoral sin provocar severos efectos secundarios. En particular, uno de los principales obstáculos para la efectividad de la quimioterapia o la terapia dirigida es la BHE, especialmente la presencia de la P-gp en ésta, que impide el ingreso de un amplio rango de drogas al cerebro en cantidades suficientes para ser efectivas.

Capítulo 5: Glicoproteína P

P-gp y resistencia multidrogas

Un reducido ingreso de drogas anticáncer en células tumorales llevó al descubrimiento de la resistencia multidrogas (MDR) mediada por el transportador P-gp hace unos 30 años (Broxterman HJ, 2009). La MDR es un fenómeno intrínseco o inducido en el que una célula tumoral expuesta a una única droga anticáncer se vuelve resistente a un amplio rango de drogas no relacionadas estructural o funcionalmente a ésta (Li YC, 2004). La P-gp o ABCB1 es una glicoproteína fosforilada de peso molecular aparente de 170 kDa, con 12 dominios transmembrana. Presenta sitios de unión de nucleótidos, sitios de glicosilación y fosforilación y al menos dos sitios de unión a drogas (Ford, 1990). La fosforilación mediada por PKC disminuye la acumulación intracelular de vinblastina y por ende incrementa la actividad de la P-gp (Chambers TC, 1990). En roedores se han identificado tres isoformas: Mdr1a, Mdr1b y Mdr2, en humanos sólo dos: MDR1 y MDR2. Los productos del gen *Mdr1* y *MDR1* confieren resistencia multidrogas, mientras que Mdr2 y MDR2 secretan fosfatidilcolina al canalículo biliar en los hepatocitos. Las isoformas exhiben una gran superposición estructural y los productos de los genes humanos y de rata muestran una homología del 80 % (Bauer, 2005).

La P-gp transporta productos de 300 a 2000 Da, incluyendo cationes orgánicos, bases orgánicas débiles, compuestos no-cargados, polipéptidos y derivados de polipéptidos. Los tipos de drogas transportados varían entre opioides, esteroides, antibióticos, bloqueantes de canales de calcio, quimioterápicos, inmunosupresores, drogas contra el HIV, antagonistas β-adrenérgicos y otras (Miller DS B. B., 2008). Hasta el momento, pocos sustratos fisiológicos de la P-gp han sido identificados, entre ellos hormonas esteroideas y algunos fosfolípidos (Ford JM, 1996). Han sido propuestas algunas otras funciones para la P-gp, como reguladora de la apoptosis y diferenciación celular, modulación indirecta de la actividad del canal de cloro, y estearificación del colesterol. Además, se vio que responde a procesos inflamatorios e inmunomodulación (Bauer, 2005).

Dado que la P-gp está sobreexpresada en células tumorales, se exploró el desarrollo de inhibidores (no citotóxicos) de estos transportadores, comenzando por la identificación del verapamilo por el Dr. Takashi Tsuruo hasta el ensayo de fase 1 con Tariquidar, un inhibidor de P-gp de tercera generación. Sin embargo, como en estudios previos de moduladores de P-gp, este último no ha sido exitoso en mejorar el efecto terapéutico de la quimioterapia (Broxterman HJ, 2009).

Nuevos descubrimientos han incrementado el interés en el estudio de transportadores de eflujo: 1- los inhibidores de receptores tirosin-kinasa como imatinib, nilotinib, erlotinib y sunitinib podrían ser sustrato de la P-gp; 2- se observó que las *cancer-stem cell* son más resistentes a las drogas y expresan niveles más altos de P-gp, BCRP o ABCB8 (transportador de doxorrubicina en melanoma) (Broxterman HJ, 2009).

La evaluación confiable de la capacidad de un transportador de eflujo en particular, en células tumorales de pacientes no es simple. Un factor que aporta complejidad es que los niveles de expresión del ARNm del gen *MDR1* no necesariamente se correlacionan con el número de moléculas P-gp en la membrana o con la capacidad de expulsar la droga (Broxterman HJ, 2009).

P-gp en la barrera hematoencefálica

En el parénquima cerebral, se estima que los microvasos sanguíneos que forman la BHE tienen una longitud de 600 Km y un área de 10 a 30 m^2, esto hace que sea el tercer área discreta más importante de intercambio de agua y solutos después del intestino y pulmones. Sin embargo, el intercambio de solutos entre sangre y cerebro está severamente restringido por las propiedades físicas/estructurales y bioquímicas de la BHE. Los principales componentes que forman parte de la barrera bioquímica y que le aportan la característica de selectividad son las proteínas transportadoras de drogas (Bauer, 2005) y (Miller DS B. B., 2008). Éstas se ubican en las membranas luminal y basal de las células endoteliales y permiten la entrada de nutrientes esenciales mientras evitan el paso al cerebro de sustancias xenobióticas (entre otras), protegiendo al SNC de infecciones y toxicidad (Miller DS B. B., 2008).

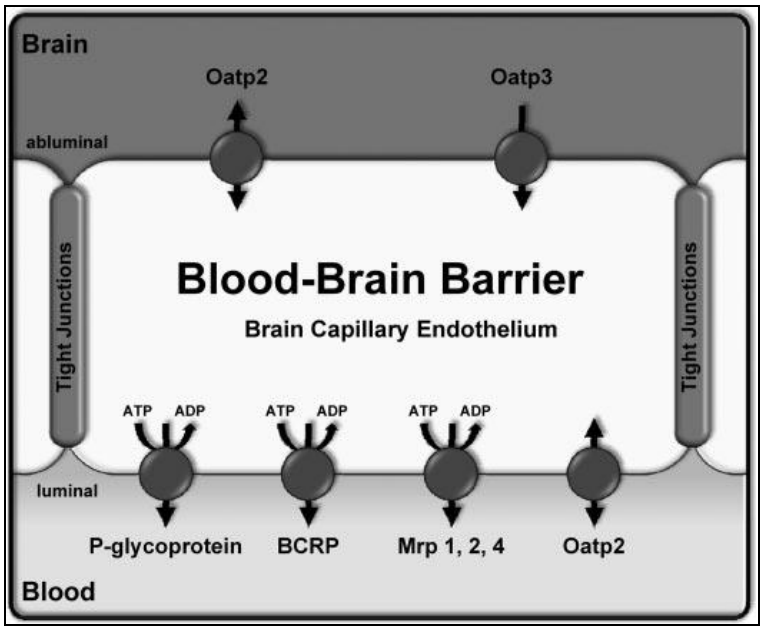

Figura 4. Ubicación de los transportadores de eflujo en la BHE. Ha sido demostrado a nivel proteico que los transportadores mostrados se expresan en el endotelio capilar del cerebro. Las flechas indican la dirección de transporte del sustrato, los transportadores ABC están marcados con la hidrólisis ATP/ADP. La P-gp se expresa en la membrana luminal. Imagen obtenida de Miller y col. (Miller DS B. B., 2008).

La P-gp, en particular, se ubica en la membrana luminal de las células endoteliales. Algunos estudios (Miller DS B. B., 2008), utilizando microscopía electrónica, también localizaron a la P-gp en membranas internas dentro de las células endoteliales de la BHE (retículo endoplasmático, vesículas y envoltura nuclear). Además, este transportador ATP-dependiente puede ser asociado a elementos de tráfico intracelular (*rafts* lipídicos y *caveolas*) (Tome ME, 2016). Hasta el momento, no está claro qué rol puede tener este *pool* de proteínas internalizadas en la BHE, aunque se podría hipotetizar que juegan un rol en la rápida inserción en la membrana luminal, protegiendo de sustancias xenobióticas, secuestrándolas en vesículas y limitando su entrada al núcleo.

La importancia de la función de la P-gp se evidencia al comparar el ingreso de drogas al SNC en ratones *wild-type* contra ratones *knock-out* de P-gp, siendo de 10 a 50 veces el incremento de las drogas en cerebro en el último caso (Miller DS B. B., 2008). Sin embargo, a pesar de que este transportador se expresa también en hígado, intestinos y riñones, no se observa un extremado aumento de diversas drogas en sangre en ratones *knock-out*, esto puede deberse a que existen otros transportadores excretorios en hígado y riñón, lo que refleja la redundancia del sistema.

Idealmente, el objetivo sería reducir temporal y específicamente la actividad de la P-gp antes de administrar una droga terapéutica que normalmente no ingresaría al cerebro, aprovechando la ventana de tiempo donde la actividad bombeadora de la P-gp está reducida.

Modulación transcripcional

La regulación transcripcional del gen *MDR1*, que codifica para la P-gp, aún no se comprende por completo. Han sido identificados diversos elementos promotores: GC-box, Y-box, elemento p53, elemento receptor pregnano X (PXR), elemento MED1 inverso, elemento AP-1, NF-κβ, y un elemento de proteína *heat-shock*. Estos elementos son sitios de unión de factores de transcripción que responden a diversos factores como estrés oxidativo, inflamación, hipoxia, xenobióticos (como drogas y toxinas), sales metálicas pesadas, y otros. Además, la expresión de este gen puede ser afectada por factores epigenéticos, incluyendo metilación del ADN y acetilación de histonas (Miller DS B. B., 2008).

El receptor de glucocorticoides (GR) es capaz de unirse al GC-box, alterando la expresión de muchos genes. En los trabajos de Miller y col. (Miller, 2010) y Narang y col. (Narang VS., 2008) se comprobó que la dexametasona, actuando a través de GR aumenta la expresión de P-gp y BCRP en células de la BHE.

PXR es miembro de la superfamilia de los factores de transcripción activados por ligando, es activado tanto por esteroides naturales, como pregnenolona, progesterona (PRG), glucocorticoides y antiglucocorticoides sintéticos, como por un alto rango de xenobióticos, incluyendo compuestos dietarios, toxinas, y un gran número de drogas prescriptas comúnmente (esteroides, agentes quimioterapéuticos, inhibidores de proteasas de HIV, glucocorticoides y anticonvulsivos). Es por esto que PXR es considerado un "regulador maestro" de excreción xenobiótica. Utilizando RT-PCR, Bauer y col. (Bauer, 2004) detectaron ARNm de PXR en capilares de cerebro de rata, así como por inmunomarcación se observaron receptores PXR dentro de las células endoteliales de microvasos del cerebro de rata. Consistente con este descubrimiento, dos ligandos de PXR, pregnenolona 16α-carbonitrilo (PCN) y dexametasona, incrementaron los niveles de expresión de P-gp (WB e inmunomarcación cuantitativa) y de actividad de P-gp (transporte de un compuesto fluorescente) (Bauer, 2004). Pero no se puede descartar que al menos algunos de estos efectos sean mediados por el receptor de glucocorticoides (Miller DS B. B., 2008).

Es interesante notar que muchos ligandos activadores de PXR son sustratos de P-gp, por ende los ligandos activan su propia resistencia multidrogas cuando son administrados crónicamente, llevando a una especie de *feedback negativo* (Bauer, 2005).

Modulación por transporte rápido

Para terapias del SNC, sería ventajoso poder modular la actividad de la P-gp por períodos cortos, pero el resto del tiempo retener la protección que este transportador le confiere. No se sabe mucho de la regulación de la P-gp en la BHE, y lo que se sabe concierne a mecanismos que funcionan durante horas o días en vez de minutos (Bauer, 2005). Se encontró que señales intracelulares afectaban la actividad del transportador sin variar la expresión de la proteína, sugiriendo regulación post-transcripcional como: tráfico de la proteína, degradación, fosforilación y defosforilación del transportador y asociación específica con otras proteínas de membrana (ej.: caveolinas) (Miller DS B. B., 2008). En un trabajo (Tome ME, 2016) sugieren que el núcleo podría ser un compartimiento de almacenamiento de la P-gp y que es transportada a la membrana luminal, como una proteína madura, en caveolas. El mecanismo por el que son exportadas del núcleo aún es desconocido, pero podría ser mediado por la proteína Hsc70 ya que co-inmunoprecipita con la P-gp y se sabe que la Hsc70 es una proteína *shuttle* núcleo-citoplasma en otros tipos celulares. Estudios en cultivo celular indican que un alto contenido de colesterol en las caveolas y los *rafts* lipídicos pueden modificar la actividad de la P-gp (Tome ME, 2016). En un estudio *in vitro* se demostró que la hormona polipeptídica endotelina 1 (ET-1) es capaz de reducir la actividad de la P-gp hasta los niveles del inhibidor PSC833 cuando la dosis administrada es de 1-100 nM, y esta inhibición es rápida, seguida de una rápida recuperación de su actividad cuando el estímulo es removido. La utilización de ET-1 o sus agonistas en pacientes no es práctica, y aún no se sabe si la manipulación de esta vía en la clínica es efectiva (Bauer, 2005).

Modulación por inhibición

En algunas instancias, la inhibición de la P-gp en la BHE ha demostrado mejorar el efecto terapéutico de drogas co-administradas. Factores como la afinidad del inhibidor, su habilidad de alcanzar al transportador en el tejido a una concentración suficiente como para afectar su actividad, la reversibilidad del inhibidor, etc., pueden determinar hasta qué punto un inhibidor influenciará al transportador (Bauer, 2005).

Dado el importante rol que tiene la P-gp como limitante del ingreso de quimioterápicos al SNC, existen, actualmente, potentes y específicos inhibidores con perfiles de toxicidad aceptables, así como estudios en modelos animales que han reportado nuevos inhibidores que prueban que el aumento del ingreso de quimioterápicos al cerebro incrementa su eficiencia contra tumores humanos implantados (Fellner S, 2002); (Kemper EM, 2004). Los primeros intentos de incorporar inhibidores de P-gp de primera generación (Ej.: ciclosporina A, verapamilo,

tamoxifeno) a protocolos de quimioterapia fueron prometedores para pacientes con tumores fuera del SNC (Miller DS B. B., 2008).

Por ejemplo, el verapamilo es un bloqueante del canal de calcio que inhibe la actividad transportadora de la P-gp al antagonizar la unión de otros sustratos disminuyendo el fenotipo MDR. En concentraciones de entre 2-6,6 µM aumentó 10 veces la acumulación intracelular *in vitro* de vincristina (quimioterápico sustrato de P-gp), aumentando 3 veces su efecto antiproliferativo en la línea celular murina de leucemia (Ford, 1990). Un efecto similar se observó al ser combinada con doxorrubicina (Lecureur V, 1994). Pero a concentraciones mayores a 6,6 µM tuvo efecto citotóxico propio *in vitro*. También resultó que produce efectos cardiovasculares severos en humanos a concentraciones plasmáticas de entre 2 a 6 µM, rango en el que ejerce su efecto MDR. A concentraciones mayores, tiene efecto citotóxico en tejidos tumorales y normales (Ford, 1990).

Estudios posteriores con inhibidores de primera, segunda y tercera generación tuvieron resultados desalentadores o contradictorios. En los pocos estudios en donde se evaluó la respuesta de tumores cerebrales a inhibidores de la P-gp, no se observaron resultados positivos. Las posibles explicaciones de las diferencias entre los estudios con animales y los decepcionantes resultados en la clínica pueden ser debido a una mala adaptación de las dosis o de la combinación justa de inhibidor y quimioterápico que causen el mayor efecto sin resultar tóxicas. Además puede que la inhibición de la P-gp estimule el incremento de expresión o actividad compensatoria de otros transportadores de eflujo (Miller DS B. B., 2008).

En un trabajo posterior, Miller y col. (Miller, 2010) sugieren que los inhibidores de P-gp fallan al llegar al estadío de ensayo clínico porque la BHE humana expresa un mayor número de transportadores P-gp de lo estimado, resultando en un efecto más moderado por parte de los inhibidores. Resultados preliminares de ensayos clínicos sugieren que la toxicidad sistémica causada por los inhibidores específicos de la P-gp limita la capacidad de lograr una concentración libre en plasma suficiente para abolir la actividad del transportador en BHE.

Es por esto que es imperioso encontrar un inhibidor capaz de modificar la actividad de la P-gp, que permita, durante una ventana de tiempo, el ingreso al cerebro de suficiente quimioterápico para disminuir el crecimiento tumoral de las metástasis cerebrales, y cuya concentración en plasma no genere importantes efectos secundarios.

Capítulo 6: Mifepristona (MFP)

La MFP, también conocida como RU486 bloquea la acción de los glucocorticoides y de la PRG. En un principio se utilizó como abortivo con eficiencia del 64 % hasta los 49 días de gestación. Hasta el 2014 esta droga ha sido aprobada en 55 países para: 1- la terminación temprana del embarazo (TTE), 2- dilatación cervical previo a cirugía para TTE, 3- manejo de pérdida temprana de embrión o muerte fetal (Chen J, 2014).

Recientemente, la MFP ha sido aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*, del inglés) para tratar hiperglucemia en pacientes con Síndrome de Cushing (Zhang H, 2016).

Propiedades estructurales y fisicoquímicas

La MFP es un derivado sintético de la norethindrona, estructuralmente similar a la PRG y glucocorticoide. Su fórmula es $C_{29}H_{35}NO_2$ (PRG: $C_{21}H_{30}O_2$, cortisol: $C_{21}H_{30}O_5$) y su peso molecular es 429. Su característica estructural principal es un grupo dimetilaminofenil en la posición 11-β, lo que le confiere actividad de antiprogestágeno y antiglucocorticoide. Es soluble en ácido (pH: 1,5), metanol, etanol, cloroformo, etilacetato, jugos gástricos y acetona, pero es poco soluble en agua (Chen J, 2014).

Metabolismo de la droga y farmacocinética

Estudios en humanos han demostrado que luego de 0,5-1 h de ingerida, es metabolizada a metapristona, RU42848 y RU42698.

Luego de la absorción, del intestino a la vena portal del hígado la MFP es transformada principalmente a metapristona por medio de una mono-demetilación, llevada a cabo por el citocromo p450 3A4. Luego de una sola dosis de 100 mg, la MFP puede ser detectada en plasma hasta 4 o 10 días a una concentración máxima (Chen J, 2014).

La MFP se une a la proteína transportadora α-1-glicoproteína ácida (AAG) en suero, la cual se satura a una concentración de 2,5 µM de MFP. Dosis de MFP que saturen a la AAG podrían aumentar la cantidad de droga que es excretada o que difunde a los tejidos periféricos. El suero de rata contiene AAG pero de menor afinidad por la MFP. Al comparar la concentración en tejido adiposo/suero de rata respecto de humanos es 40 veces mayor, por lo que cuando hay una menor afinidad a la proteína de transporte la distribución de la MFP está gobernada por su capacidad lipofílica (Heikinheimo O, 1993). La diferencia de afinidad a AAG de rata con

la de humanos podría ser relevante a la hora de elegir las dosis con las que tratar a los pacientes.

Afinidad de unión

La MFP se une reversiblemente al receptor de progesterona (PR) y al GR. La MFP tiene mayor afinidad por el PR de endometrio, miometrio y mama que la PRG (Chen J, 2014); (Lanari C, 2012). La afinidad de unión relativa al GR de MFP y todos sus metabolitos es mayor que la de dexametasona y cortisol. A su vez, la afinidad de metapristona por PR y GR es de 2 a 5 veces menor que la de MFP. Además, la MFP tiene afinidad, aunque menor, por el receptor de andrógenos (AR), sin embargo no es capaz de unirse al receptor de mineralocorticoides.

El PR tiene dos isoformas, A y B que forman homo o heterodímeros y translocan a núcleo donde actúan como factores de trascripción al unirse al ADN. La MFP se une a PR, promueve su dimerización y unión al ADN, pero la unión MFP-dímero A:A es transcripcionalmente silenciosa, MFP-B:B es transcripcionalmente activa, mientras que la unión MFP-A:B puede inhibir la activación de la transcripción. Estas consecuencias de unión pueden ser modificadas por la concentración de AMPc (Chen J, 2014) (Lanari C, 2012).

Estudios antitumorales con MFP

Estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado recientemente un rol del PR en la carcinogénesis de mama; el estudio *"The Women´s Health Iniciative Study"* y el *"Million Women Study"* reportaron un incremento en el riesgo de cáncer de mama en mujeres bajo terapia hormonal con estrógeno y progestágenos (Acetato de Medroxiprogesterona, MPA). Muchos tratamientos tienen como blanco al ER, utilizando antagonistas o inhibidores de la síntesis de estrógenos, pero algunas pacientes no responden al tratamiento o adquieren resistencia a éste. Las terapias que tienen como blanco al PR incluyen al tratamiento con MFP, que funciona como un modulador selectivo de PR tipo II, ya que al unirse al PR con mayor afinidad que su ligando natural, la PRG, induce la dimerización de PR y permite la unión al ADN (Lanari C, 2012). Entonces, la terapia con MFP sólo es efectiva para tumores que expresan altos niveles de PR-A respecto de PR-B, ya que al unirse al ADN el dímero A:A recluta co-represores, inhibiendo la transcripción de sus genes blanco (Michna H, 1989); (Wargon V, 2015); (Rojas PA, 2017). Actualmente se está llevando a cabo un estudio clínico con MFP como tratamiento de cáncer de mama para pacientes con expresión PR-A>PR-B (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT01138553).

Yu y col. (Yu S, 2015) utilizando métodos computacionales y bioinformáticos, identificaron funciones y vías de señalización de potenciales moléculas que se relacionen con MFP e intervengan en la terapia contra cáncer. Se encontraron 44 genes centrales que podrían interaccionar con MFP, dentro de los cuáles se encuentran la *CCNDI* (ciclina D1), *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidermal), *JUN* (oncogén jun), *MYC* (oncogén homólogo viral v-myc mielocitomatosis), *VEGFA* (factor A de crecimiento endotelial vascular), *RELA* (oncogén homólogo viral v-rel reticuloendoteliosis) e *IGF1R* (receptor del factor de crecimiento insulínico 1). Particularmente se demostró el potencial de la MFP para prevenir la migración y adhesión celular en la línea MDA-MB-231, principalmente reduciendo la formación del complejo FAK/Src/Paxillin requerido para la activación de integrinas. FAK, también conocido como PTK2 (proteína tirosin-kinasa 2) es la molécula señalizadora clave asociada a metástasis, y frente a tratamiento con MFP se redujo su expresión de ARNm y proteínas, pero no la de β-actina. No se observó una citotoxicidad significativa ni siquiera a 100 µM; no se alcanzó el IC_{50} (Yu S, 2015).

En el trabajo de Zhang y col. (Zhang L, 2016) en tres líneas celulares de cáncer de ovario PR negativas comprueban *in vitro* que la MFP inhibe el crecimiento de las mismas, induce la transcripción de genes asociados a las vías de señalización relacionadas al estrés del retículo plasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*, del inglés). Además, demuestran que la MFP incrementa la autofagia y lleva a la muerte de las células neoplásicas cuando son tratadas en combinación con inhibidores de la actividad de lisosomas; y cuando se combina con inhibidores de proteasomas que interfieren con la vía ERAD (degradación asistida por el retículo endoplasmático), evitando que las células degraden las proteínas no plegadas o mal plegadas vía el sistema ubiquitin-proteasoma, las células mueren.

Basados en numerosos estudios *in vitro*, en modelos animales experimentales y en ensayos clínicos, Chen y col. (Chen J, 2014) establecieron que la MFP es capaz de inhibir significativamente el crecimiento tumoral en 24 líneas celulares tumorales, incluyendo a las líneas celulares humanas MDA-MB-231 (triple negativa) y MCF-7 (PR positiva) de cáncer de mama.

Estudios *in vitro* con MFP (30 µM) en la línea celular MDA-MB-231 demostraron un efecto citostático y letalidad apoptótica, arresto del crecimiento y cambios morfológicos. Los mecanismos moleculares propuestos incluyen: inhibición de *CDK2*, incremento de ADN hipodiploide y desorganización de actina. Luego de una revisión de diversos estudios, se piensa

que PR es necesario pero no suficiente para las respuestas anticáncer en pacientes con cáncer de mama (Chen J, 2014).

Efecto antitumoral de la MFP en cerebro

Los meningiomas son tumores del tejido aracnoideo usualmente benignos que expresan ER y PR. Responden a MFP, que inhibe el crecimiento de las líneas tumorales *in vitro* e incluso disminuye el volumen tumoral en experimentos con modelos animales y en ensayos clínicos a 200 mg/día por 2-31 meses. El efecto secundario más común en pacientes fue la fatiga. Pocos pacientes experimentaron sofocos de calor, cese de la menstruación, ginecomastia, y alopecia parcial. Estos ensayos concluyeron que la terapia a largo plazo con MFP es segura y efectiva para el tratamiento de meningiomas no quirúrgicos (Chen J, 2014). Éstos efectos secundarios podrían ser disminuidos si se aumenta la biodisponibilidad de la droga, por ejemplo bloqueando su unión con el transportador AAG (Zhang H, 2016).

Los gliomas son importantes tumores cerebrales malignos con opciones limitadas de tratamiento que expresan receptores esteroideos pero, a diferencia de los meningiomas, responden sólo a GR. Se demostró que la MFP inhibe el crecimiento tumoral en una línea celular creciendo *in vivo*, y en otras dos *in vitro*. Un trabajo reporta que la terapia estándar de radiación-TMZ combinada con MFP puede mejorar la eficiencia de la quimioterapia en glioblastomas. Aún no ha sido reportado ningún ensayo clínico (Chen J, 2014).

Heikinheimo y col. (Heikinheimo O, 1993) informan que la concentración de MFP en el tejido cerebral de rata fue del 28 % respecto a la del suero, lo que indica que existe un efecto de la BHE. Las concentraciones de los metabolitos de MFP en cerebro fueron 4 veces mayores. Ha sido demostrado que tanto dosis únicas de 400 mg de MFP como múltiples dosis de 5-100 mg/día son suficientes para estimular el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, evidenciado por el aumento de secreción de ACTH y cortisol sólo en los picos del ritmo circadiano. En cultivo, la MFP sola no tuvo efecto en la liberación de ACTH inducida por el factor liberador de corticotrofinas (CRF), pero cuando el sistema está reprimido por el tratamiento con dexametasona, la MFP revierte el proceso (Heikinheimo O, 1993).

Basados en los resultados de los estudios *in vivo* se puede concluir que la MFP es una molécula lipofílica capaz de atravesar la BHE, aunque en concentraciones no muy elevadas, y cuya concentración en plasma genera efectos secundarios tolerables.

Capítulo 7: Mifepristona y P-gp

La expresión en membrana de la P-gp confiere a las células resistencia a compuestos pequeños e hidrofóbicos pero de estructura muy variable como alcaloides Vinca (vinblastina y vincristina), antraciclinas (daunomicina, doxorrubicina), colchicina, taxol y puromicina, y péptidos hidrofóbicos como gramacidina (Gruol DJ, 1994). Líneas celulares MDR presentan un incremento en la expresión del gen *MDR1* que codifica para P-gp.

Se ha observado que la P-gp también es capaz de transportar esteroides, como corticoesteroides con un grupo hidroxilo en la posición 11-β, en especial aquellos con un hidroxilo extra en el carbono 17, por ende el cortisol, dexametasona, aldosterona y otros similares son expulsados de la célula. Esteroides como PRG y cortexolona, que no tienen el hidroxilo en la posición 11-β, no son transportados; sin embargo, se ha demostrado que la PRG se une a la P-gp de ratón y humana (Gruol DJ, 1994).

Ciertos estudios demostraron que la PRG es capaz de revertir el fenotipo MDR e inhibir la unión de vinblastina y azidopina (dos sustratos fuertes) a la P-gp. El marcado por fotoafinidad de la P-gp con [3H]PRG fue capaz de comprobar la unión de la PRG a este transportador (Safa, 1992).

La MFP se desarrolló como antiprogestágeno y tiene una sustitución 11β-(dimetil-amino-fenil) que le confiere la propiedad antagonista de PR y GR. Esta estructura podría mejorar la unión a P-gp inhibiendo el transporte hacia el exterior aún más que la PRG.

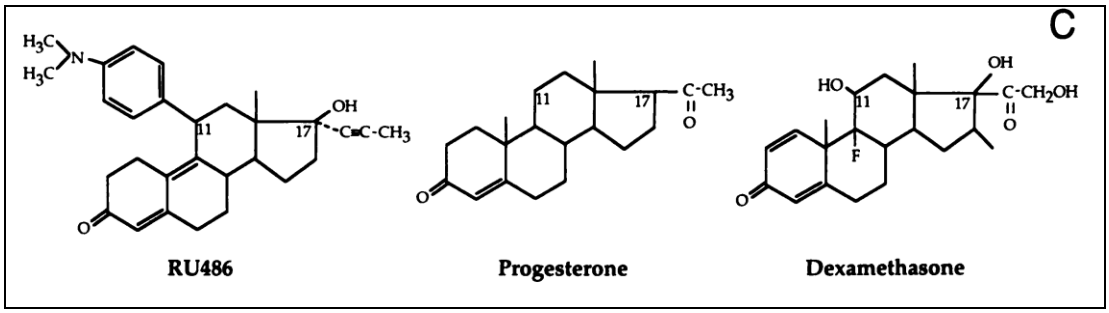

Figura 5. Similitud entre la estructura química de la Mifepristona (RU486), Progesterona y dexametasona. Imagen obtenida de Gruol y col. (Gruol DJ, 1994).

Gruol y col. (Gruol DJ, 1994) estudiaron si la MFP es capaz de revertir el fenotipo MDR comparando los resultados con los del tratamiento con verapamilo, un potente inhibidor de la P-gp, en la línea celular de timoma WEHI-7 y otra que deriva de ésta, la S7CD-5, ambas resistentes a dexametasona y colchicina, y por ende con resistencia cruzada a puromicina y daunomicina. Tanto la MFP como el verapamilo logran sensibilizar a las células frente a

puromicina y daunomicina, esto lleva a pensar que la MFP inhibe la actividad de la P-gp de forma similar al verapamilo, pero a concentraciones levemente más altas.

Además, utilizaron la acumulación intracelular de rhodamina 123 (un colorante de membranas mitocondriales de células vivas) como medida del efecto de los inhibidores de P-gp, dado que este colorante es sustrato del transportador y puede observarse por citometría de flujo (Chaudhary PM, 1991). Encontraron que, sin inhibidores, el 50 % de la rhodamina es expulsada de la célula en 3,4 minutos. A 10 µM de MFP este tiempo incrementa a 10,3 minutos (3 veces). El mismo experimento fue realizado con 10 µM de PRG pero fue dos veces menos efectiva que la MFP. La dexametasona no afectó la actividad transportadora (Gruol DJ, 1994).

Sin embargo, en el trabajo de Narang y col. (Narang VS., 2008) demostraron que la dexametasona de hecho si incrementa la actividad funcional de la P-gp en células endoteliales de los microvasos extraídos del cerebro de ratas. Ellos observaron una disminución en la acumulación intracelular de Ho342 luego de tratamiento con dexametasona 250 nM por 24 h, ya que este colorante fluorescente es sustrato del transportador.

Dado que la dexametasona generalmente es administrada junto con quimioterápicos para el tratamiento de tumores cerebrales, es importante conocer cómo es que esta droga afecta la expresión de los transportadores multidroga en la BHE.

En este trabajo también observaron que la dexametasona incrementa la expresión de las proteínas transportadoras P-gp, BCRP y MRP2 en forma dependiente de la concentración y del tiempo del tratamiento.

Se investigó también el rol del GR en la regulación de los transportadores. Se observó que el tratamiento con dexametasona en combinación con MFP (250 nM) disminuyó la expresión y la actividad de P-gp respecto del tratamiento sólo con dexametasona. En este caso utilizaron a la MFP como un inhibidor específico de GR. *Este trabajo establece que el tratamiento con MFP sola no tuvo ningún efecto en la expresión o funcionalidad de las proteínas estudiadas, aunque no muestran los resultados.*

Por otro lado, Lecureur y col. (Lecureur V, 1994) hicieron uso de la autofluorescencia de la doxorrubicina y su rol como sustrato de la P-gp y demostraron que, en células MDR de hepatoma de rata, la MFP incrementó la retención intracelular de doxorrubicina a partir de una concentración de 5 µM. A 10 µM la retención de doxorrubicina fue 4 veces mayor a la del control sin tratamiento. La retención a 10 µM con MFP fue similar a la del verapamilo a 10 µM pero mayor a la obtenida con la misma concentración de PRG. Es interesante recalcar que la

concentración plasmática en humanos luego de una dosis de administración oral de entre 100-800 mg de MFP no supera los 2,5 µM luego de 24 h (Heikinheimo, Kekkonen, & Lähteenmäki, 2003).

La MFP también incrementó la retención intracelular de doxorrubicina en un cultivo primario de hepatocitos de rata, lo que sugiere que podría inhibir la actividad de la P-gp en células normales, no tumorales (Lecureur V, 1994).

Algunos de los inhibidores impiden el marcado de la P-gp por drogas relacionadas a MDR, lo que sugiere que actúan compitiendo por los sitios de unión del transportador. El efecto de la MFP en la unión de drogas a la P-gp fue analizado con [^{3}H]azidopina, que tiene fotoafinidad por la P-gp y reacciona con una banda a 150 kDa que corresponde a la P-gp, según lo corroborado por WB en hepatocitos de rata. Se observó que el tratamiento con MFP disminuyó la marca radioactiva en forma dosis dependiente, indicando que el antiprogestágeno compite con la azidopina (Lecureur V, 1994).

Todos estos resultados muestran que la acción quimiosensibilizadora de la MFP está restringida a células resistentes a multidrogas, por ende el incremento del efecto de la droga antineoplásica no afectaría al resto de las células.

Un gran obstáculo en el uso de quimiosensibilizadores en ensayos clínicos es el hecho de que actúan en grandes concentraciones y éstas son difíciles de lograr *in vivo*, en parte debido a los efectos adversos. Por ejemplo, el uso de verapamilo a concentraciones necesarias para inhibir el efecto MDR está limitado por la toxicidad cardíaca; en cambio, la MFP a 10 µM tiene efectos anti-MDR y es una concentración tolerable por los pacientes (Lecureur V, 1994) (Chen J, 2014).

Bauer y col. (Bauer, 2004) y Miller y col. (Miller DS B. B., 2008) confirman que la activación del receptor nuclear PXR (SXR en humanos) incrementa la expresión de la P-gp en la barrera hematoencefálica. Además, Bauer y col. demuestran que la dexametasona activa a PXR lo que provoca un incremento en la transcripción de P-gp.

Los resultados de Teng y col. (Teng S, 2003) son muy interesantes, ya que demuestran que la MFP es un activador directo de PXR y éste, por autorregulación, produce un aumento de la transcripción de ARNm de PXR en hepatocitos. Sin embargo, en los ensayos del trabajo de Narang y col. (Narang VS., 2008) no se observó incremento en la transcripción de PXR o de ninguno de los transportadores al tratar sólo con MFP. No muestran los resultados, pero aclaran que éstos fueron obtenidos a concentraciones menores a las utilizadas en el trabajo de

Teng y col. (Teng S, 2003). En este último, se trataron células de hepatoma humano (HuH7) con 25 µM de MFP y se logró una activación de PXR de 4 veces respecto del control.

Todos estos resultados indican que no existe un consenso en la comunidad científica respecto del efecto que podría tener la MFP sobre la actividad de la proteína transportadora de drogas, P-gp, en la BHE, ni sobre su mecanismo de acción.

ANTECEDENTES

Modelo murino de cáncer de mama

En el Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal del IBYME se trabaja con un modelo murino de tumores mamarios inducido por la administración prolongada de MPA en ratones hembra BALB/c (Lanari, 1986); (Molinolo AA, 1987). Los carcinomas son en su mayoría de histología ductal, con capacidad de generar metástasis en pulmón y ganglios linfáticos, poseen un comportamiento hormono-dependiente (HD) cuando se trasplantan en ratones singeneicos y expresan altos niveles de ER y de PR (Molinolo AA, 1987). A partir de los tumores HD se obtuvieron variantes tumorales hormono-independientes (HI), que comenzaron a crecer en forma similar, tanto en presencia como en ausencia de la hormona. La administración de estrógenos, antiestrógenos y antiprogestágenos, como la MFP, ZK98299 y ZK2320211, inhibió el crecimiento e indujo regresión tumoral en tumores HD y en algunas variantes HI (Kordon E, 1991). En base a su respuesta a los antiprogestágenos, las variantes fueron clasificadas en respondedoras (C4-HI y 59-2-HI) o no respondedoras, (C4-2-HI). Por presión selectiva, mediante tratamientos prolongados de las variantes respondedoras C4-HI y 59-2-HI con antiprogestágenos, se obtuvieron los tumores con resistencia adquirida (C4-HIR y 59-2-HIR). El estudio de las isoformas del PR en estos tumores y sus metástasis espontáneas mostró que aquellos que tenían una mayor expresión de la isoforma PR-A que de PR-B eran los que respondían a un tratamiento con antiprogestágenos (Helguero LA, 2003); (Wargon V, 2015) (Fig. 6). Estos resultados se corroboraron posteriormente cuando se analizaron muestras de carcinomas de mama humano y se evaluó *ex vivo* el efecto de MFP (Rojas PA, 2017).

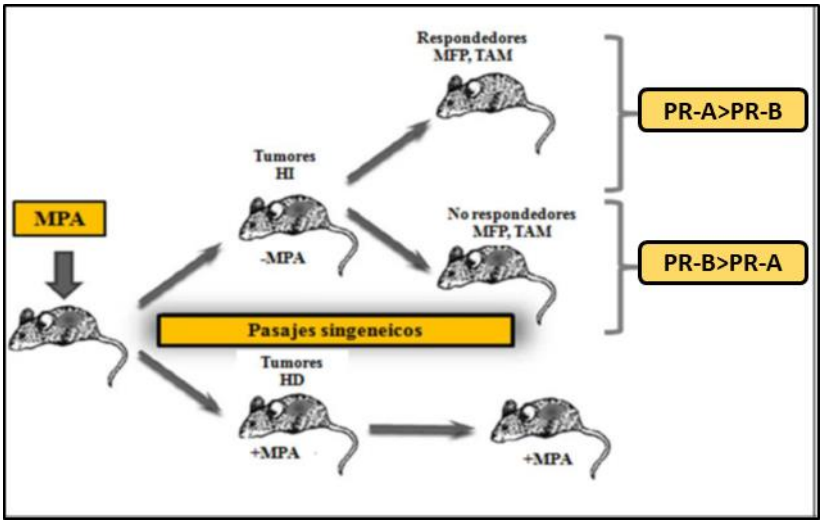

Figura 6. Modelo experimental de carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA. Se muestran las variantes tumorales del modelo, según su dependencia hormonal.

Efecto de la MFP en tumores de mama creciendo en cerebro

Dado que uno de los órganos en los cuales metastatiza el cáncer de mama es el cerebro, se decidió utilizar el modelo murino del laboratorio para evaluar si el crecimiento tumoral en este órgano conservaba las características del tumor primario. Para ello, y siendo que los tumores del modelo murino no metastatizan al cerebro, se diseñó un modelo de crecimiento intracraneal haciendo uso de un estereotáctico (Rojas P, 2009). En esa ocasión, se utilizó el tumor respondedor C4-HI, trasplantando piezas de 2 mm^2 en el cerebro de ratones hembra BALB/c; más específicamente en el hemisferio izquierdo en las coordenadas A −1.94, L -1.2 determinadas según el atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos G, 2001). Se separaron los ratones en tres grupos, según si fueron tratados con MFP por 10 (MFP-10), 15 (MFP-15) días o no tratados. A los 20 días de realizado el trasplante los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el cerebro. Los resultados mostraron que los tumores C4-HI crecen en el cerebro de los ratones BALB/c (Fig. 7). Cuando se evaluó el efecto del antiprogestágeno MFP en el crecimiento de los tumores se observó macroscópicamente que los tumores tratados tanto por 10 como por 15 días presentaban regresión tumoral. El análisis histopatológico mostró que los tumores controles, no tratados, son tumores semi-diferenciados con nidos sólidos y pequeñas áreas cribiformes. A lo largo del tratamiento con MFP el tumor comienza a regresionar y se puede observar una reducción del parénquima tumoral, un aumento en la fibrosis y en la diferenciación que lleva a la formación de glándulas y conductos (Fig. 7). También se observó un efecto citostático y un incremento en la apoptosis.

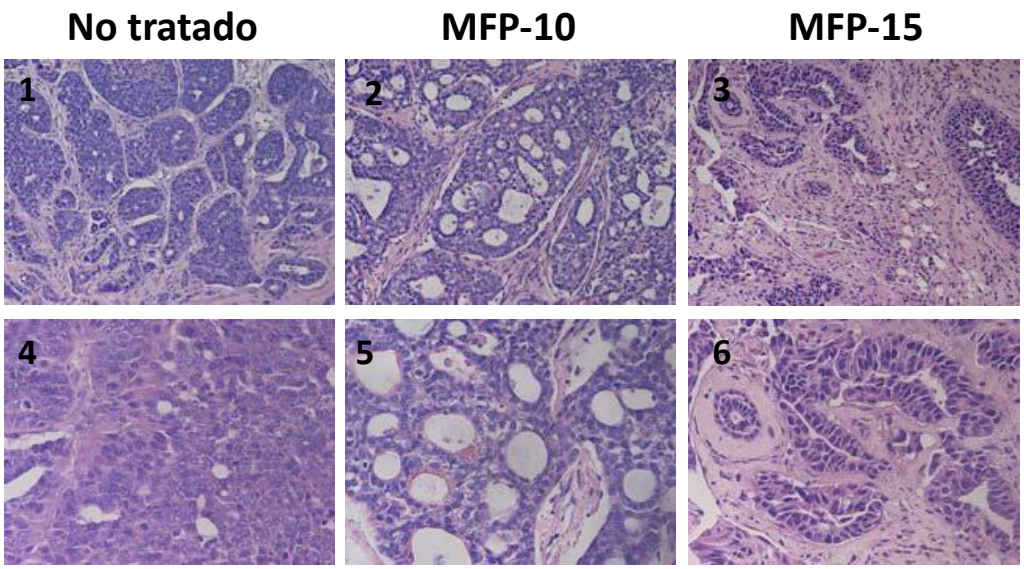

Figura 7. La MFP inhibe el crecimiento del tumor respondedor C4-HI en cerebro. Cortes coloreados con H&E de tumores C4-HI creciendo en cerebro no tratados o tratados con MFP durante 10 días (MFP-10) o 15 días (MFP-15). Magnificación 1-3: 200X, 4-6: 400X.

El hecho de que los ratones trasplantados en el cerebro con el tumor C4-HI hayan respondido al tratamiento con el antiprogestágeno MFP, sugiere que este antiprogestágeno podría ser efectivo también para el tratamiento de metástasis cerebrales. Se concluyó que la MFP podría ser una droga relevante en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama con metástasis en cerebro.

En el caso de tumores respondedores a MFP, este podría ser un beneficio extra que se adiciona al posible efecto de la MFP sobre la P-gp de BHE, que permitiría un mayor ingreso de un quimioterápico al cerebro.

Efecto combinado de la MFP con doxorrubicina en tumores de mama del modelo murino

Dado que la doxorrubicina es un quimioterápico ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyendo el CM, y que a pesar del surgimiento de nuevas terapias la quimioterapia aún se sigue utilizando en los carcinomas resistentes a la terapia endócrina (Barni S, 2010); se evaluó el efecto de esta droga combinada con la MFP en carcinomas mamarios murinos del modelo experimental del laboratorio. Para realizar este experimento se utilizó un tumor respondedor (C4-HI) y uno no respondedor (C4-2-HI) que se trasplantaron en forma subcutánea (sc.) en ratones BALB/c. Como quimioterápico se utilizó doxo (en la figura denominada como PEG-LD; Doxopeg de Laboratorios Raffo). Los resultados mostraron que con

doxo se obtuvo una regresión del crecimiento tumoral, y el tratamiento combinado con MFP (pellets sc. 6 mg/kg, anexo) mejoró el efecto del antineoplásico en los tumores respondedores que a su vez expresan mayores niveles de PR-A que de PR-B (Fig. 8). Esto se debió a que la MFP induce una remodelación tisular en los tumores con mayor expresión de PR-A que incluye un aumento en el número de vasos que facilita la acumulación de los quimioterápicos dentro del tumor (Sequeira G, 2014).

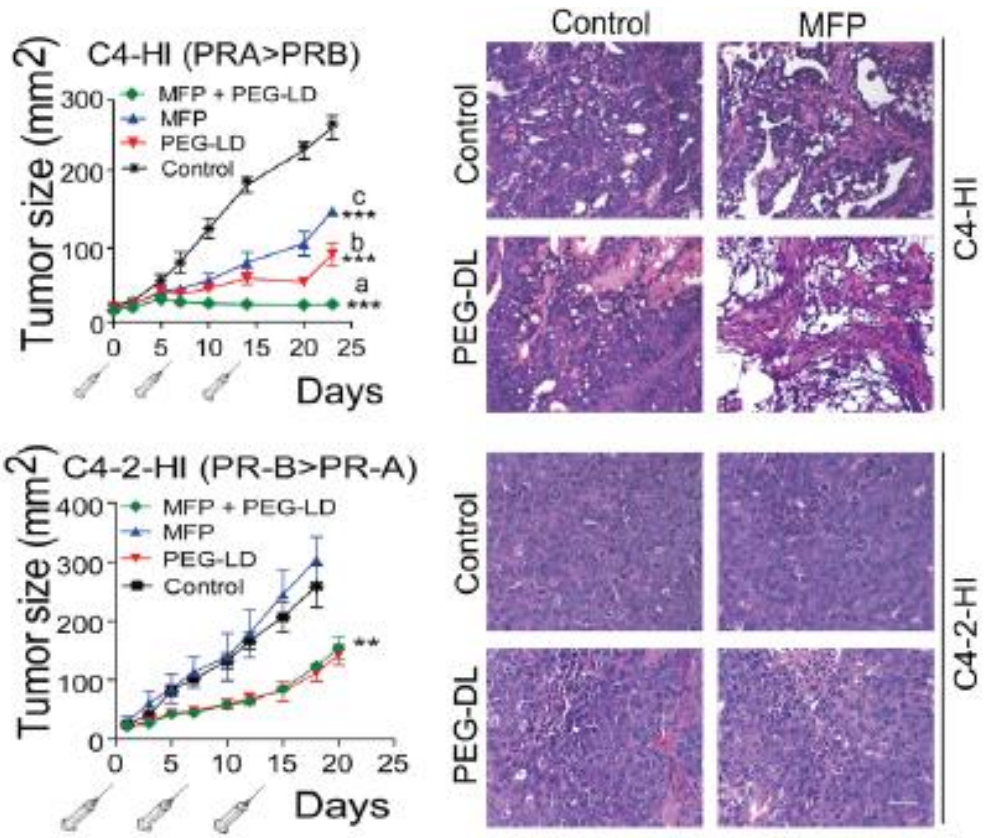

Figura 8. Efecto del tratamiento de MFP combinado con doxo (PEG-LD) en carcinomas mamarios murinos del modelo inyectados sc. Curvas de crecimiento de los tumores C4-HI y C4-2-HI. Los tratamientos con doxo (0,9 mg/kg) inhibieron el crecimiento respecto del control (***: p<0,001, **:p<0,01) en ambos modelos tumorales. El tratamiento combinado con la MFP solo mejoró el efecto de los quimioterápicos en los tumores respondedores con mayores niveles de PR-A que de PR-B (a vs. b o c: p<0,001). A la derecha se observan imágenes de cortes de tejido tumoral (luego de 28 días de tratamiento) coloreados con H&E. Barra: 40 µm.

En el trabajo de Sequeira y col. (Sequeira G, 2014) se inyectaron sc, el tumor respondedor 59-2-HI y el no respondedor C4-2-HI y se trataron con MFP por 5 días y luego con doxo (18 mg/kg) durante 24 h. El ingreso de la doxo a los tumores se cuantificó utilizando la autofluorescencia de la doxorrubicina (Fig. 9). Los resultados muestran que el tratamiento combinado incrementó el ingreso de la doxorrubicina sólo en el tumor 59-2-HI, que expresa más isoforma PR-A que PR-B. Esto se atribuye a la remodelación del tejido tumoral e incremento de angiogénesis producida por la MFP en los tumores.

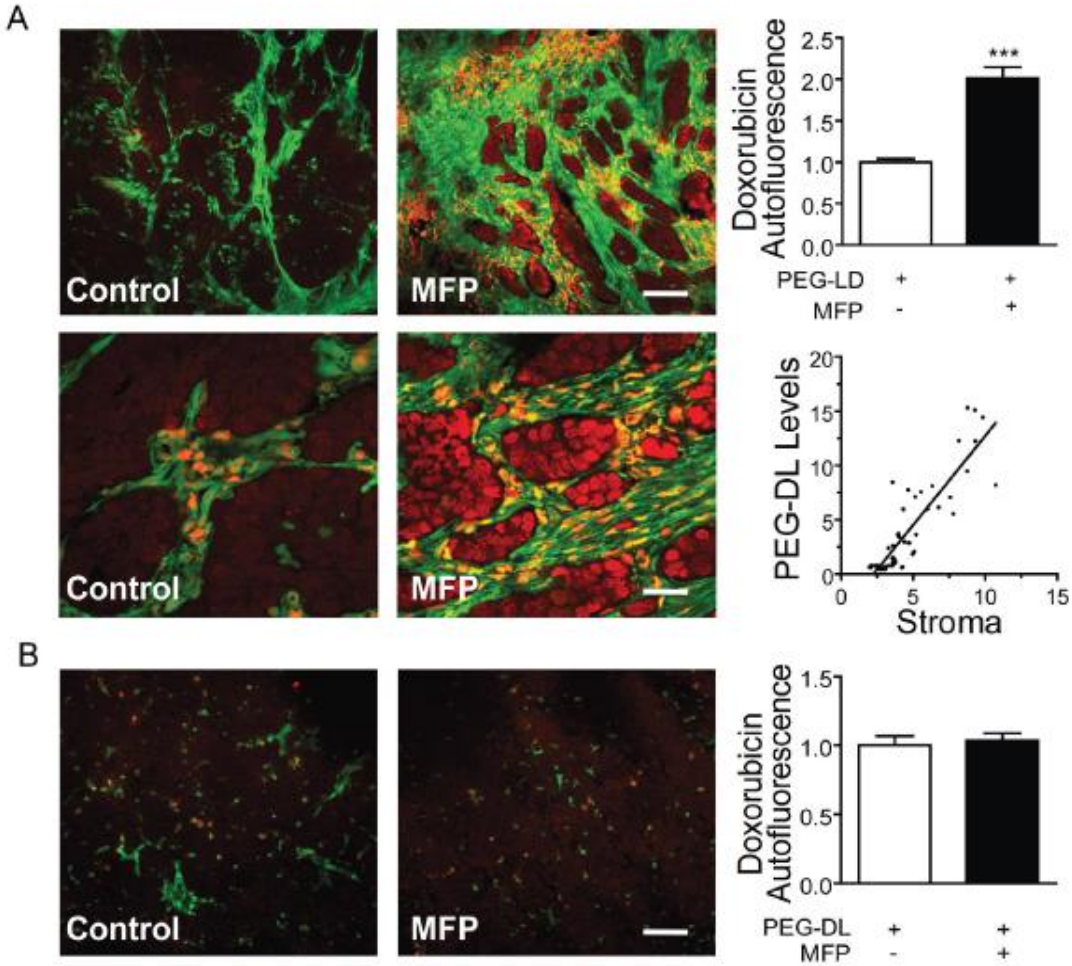

Figura 9. La MFP incrementó el ingreso de doxo en tumores con mayores niveles de isoforma PR-A que PR-B. A: El tumor 59-2-HI fue trasplantado en ratones BALB/c-GFP que luego se trataron o no con MFP y doxo (18 mg/kg). Después de 24 h de tratamiento los tumores se procesaron para microscopía confocal. El marcado rojo corresponde a la autofluorescencia de la doxorrubicina. Barra superior: 120 µm, barra inferior: 30 µm. **B:** Los tumores C4-2-HI fueron tratados de forma similar pero no se observaron diferencias entre los tratamientos; barra: 120 µm. ***: p<0,001.

Estos resultados indican que en el tumor primario C4-2-HI no respondedor a hormonas la MFP no mejora el efecto de la doxo en el crecimiento tumoral ni facilita el ingreso de la doxo al tumor, ya sea por incremento de la angiogénesis o por inhibición de la P-gp de las células tumorales. Es por esto que es un modelo tumoral ideal para el estudio del efecto de la MFP sobre la P-gp de BHE ya que, si se observa un efecto del tratamiento combinado MFP+doxo en cerebro, entonces podemos descartar que éste se deba al efecto de la MFP sobre la P-gp de las células tumorales.

En base a la bibliografía expuesta y a los antecedentes experimentales descriptos en los párrafos anteriores planteamos la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

La MFP disminuye la actividad de la P-gp de la barrera hematoencefálica mejorando el acceso y, por lo tanto, la eficacia de las drogas antineoplásicas en metástasis cerebrales, independientemente de la expresión de receptores hormonales y de P-gp en las células tumorales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la MFP sobre el crecimiento de las metástasis cerebrales de carcinomas mamarios resistentes a la terapia endócrina. Estudiar la capacidad de este antiprogestágeno de facilitar el pasaje del quimioterápico doxorrubicina al cerebro incrementando la acción terapéutica del mismo.

Objetivos específicos

A) Desarrollar un modelo de metástasis de cáncer de mama en cerebro apropiado para el estudio del efecto de un tratamiento combinado.
B) Evaluar si el tratamiento con MFP permite mejorar la respuesta terapéutica de la doxo sobre carcinomas mamarios creciendo en cerebro.
C) Evaluar el efecto de la MFP sobre el ingreso de la doxo al cerebro de ratones sin tumor.
D) Investigar en forma indirecta si la MFP afecta la funcionalidad de la P-gp cuantificando por fluorescencia la retención intracelular de doxorrubicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembras y machos NOD/LtSz-scid/IL- 2Rgamma null mice (NSG) (The Jackson Laboratory) vírgenes de dos meses de edad para los experimentos con la línea celular humana y ratones BALB/c de dos meses de edad para los experimentos con el tumor C4-2-HI. Además, se utilizaron ratones BALB/c transgénicos que sobreexpresan GFP. Todas las cepas son criadas en el Bioterio del IBYME. Los animales fueron mantenidos con una dieta a base de alimento balanceado *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 h de luz, 12 h de oscuridad) a una temperatura entre 20 y 23 ºC. Los animales fueron manipulados según las normas internacionales las cuales están acordes con la Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996). Los protocolos están aprobados por el CICUAL del IBYME.

Cultivo celular

Utilizamos en este trabajo las siguientes líneas celulares:

La línea celular MDA-MB-231-BrM2 (MDA-Br), desarrollada en el laboratorio del Dr. Massagué, se originó de una selección *in vivo* de células MDA-MB-231 con el objetivo de incrementar su capacidad de metastatizar en cerebro (Bos PD, 2009). Estas células han sido transfectadas establemente con un lentivirus expresando el reportero de triple fusión que codifica para la timidin kinasa 1 del herpes virus simple, GFP y *Firefly* luciferasa.

Las células HepG2 (células de carcinoma hepatocelular humano) que expresan altos niveles de P-gp (Li YC, 2004) nos fueron cedidas por el laboratorio de la Dra. María Fernanda Troncoso (Facultad de Medicina, UBA).

Las células HUVEC (Human Umbilical Vein Endotelial Cells) cedidas por Luis Durand, del laboratorio del Dr. Baldi (IBYME).

Las células HUVEC se mantuvieron en medio DMEM F12 con el agregado de 10 % SFB (apéndice), VEGF 10 ng/ml y bFGF 2 ng/ml (Sigma), mientras que las células MDA-Br y HepG2 se mantuvieron en cultivo enriquecido de medio DMEM F12 sólo con el agregado de 10 % SFB, a una temperatura de 37 °C y 5 % CO_2. Los cultivos semiconfluentes se tripsinizaron y las células se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer. Las células MDA-Br se resuspendieron en la cantidad necesaria de solución fisiológica (SF) estéril, según el método de inyección.

Obtención de células tumorales C4-2-HI

El carcinoma mamario murino, que no se inhibe con antiptogestágenos, C4-2-HI, desarrollado en el laboratorio de la Dra. Lanari se mantiene *in vivo* por pasajes en ratones BALB/c. Luego de extraer el tumor subcutáneo (sc.), se disgrega mecánicamente, y se incuba 15 min en baño maría a 37 °C con solución enzimática 25 % en medio DMEM-F12 (anexo). Se realizan 3 decantaciones de 15 min en medio con suero (DMEM-F12 con 10 % SFB) para separar células epiteliales tumorales de fibroblastos. Por último, se cuentan las células en cámara de Neubauer y se resuspenden 200.000 células en 2 µl de SF.

Inyección intracardíaca

Se anestesiaron ratones NSG con una dosis combinada de ketamina (50 mg/ml) y xilacina (20 mg/ml), luego fueron inmovilizados en posición horizontal con las extremidades delanteras en un ángulo de 90 ° respecto del tronco, con el objetivo de expandir el tórax. Luego de ubicar el segundo espacio intercostal del lado izquierdo, se posicionó la jeringa (1 ml/ 25 G), cargada con $1x10^6$ células MDA-Br en 100 µl de SF, perpendicularmente al cuerpo y después de observarse un pulso de sangre ascendiendo por la jeringa, se inyectaron las células en no menos de 10 segundos. Los ratones se mantuvieron en observación hasta despertarse.

Inyección subcutánea

$2x10^6$ células MDA-Br se resuspendieron en 200 µl de SF y fueron inyectadas sc. (1 ml/ 25 G) en el flanco derecho de ratones NSG. El crecimiento de los tumores fue medido con calibre vernier 3 veces por semana y el tamaño tumoral se calculó por la fórmula (base x altura).

Inyección intracraneal

200.000 células del tumor C4-2-HI en 2 µl de SF fueron inyectadas en ratones BALB/c-GFP, mientras que la misma cantidad de células MDA-Br se inyectó en ratones NSG. Luego de anestesiar a los ratones con ketamina (50 mg/ml) y xilacina (20 mg/ml), se los inmoviliza en el estereotáxico y se les realiza una incisión de 0,5 cm en la piel, en la zona superior del cráneo. Luego se localiza la zona del hipocampo en el hemisferio derecho 1,9 mm posterior y 2,4 mm ventral respecto al punto de Bregma, y 1,2 mm lateralmente hacia la derecha a la línea media según las coordenadas del atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos G, 2001) y se perfora el cráneo con un torno. Se introduce la aguja Hamilton en la perforación a la profundidad indicada y se inyectan las células a una velocidad de 0,2 µl/min, con la ayuda de una bomba inyectora. Luego de finalizada la inyección, se espera 1 min para evitar reflujo y se extrae la aguja. La herida es suturada, se les inyecta sc. antibiótico (enrofloxacina 10 mg/kg) y calmante (tramadol 5 mg/kg) y se monitorean los ratones hasta que se despiertan de la anestesia.

Bioluminiscencia

Con el objetivo de observar la progresión tumoral de las células MDA-Br inoculadas intracardíacamente, y comprobar si los tumores sc. desarrollaron metástasis, los ratones fueron anestesiados por inhalación de 2 % isofluorano, y se inyectaron en forma endovenosa con 150 µl de D-luciferina (150 mg/kg, Xenogen). Entre 2-5 min post inyección, se tomaron fotografías de cuerpo entero y cabeza para detectar luminiscencia utilizando el Sistema de Bioluminiscencia *in vivo* IVIS 50 (Xenogen) y el software Living Image 2.20.1 (Xenogen). Este procedimiento se llevó a cabo pre y post-tratamiento. Luego de sacrificados los ratones, se observó la luminiscencia *ex vivo* de los cerebros.

Tratamientos *in vivo*

Se utilizó MFP (Sigma Aldrich) para hacer *pellets* de 6 mg según protocolo Sahores y col. (Sahores A, 2013). La doxo (Doxplax, Clorhidrato de Doxorrubicina liposomal pegilada, 20 mg/10 ml, LKM) fue donada gentilmente por el laboratorio LKM. Una vez detectada la presencia de focos tumorales y/o metastásicos por histopatología del cerebro de un ratón control o citometría de flujo y luminometría, éstos se dividieron en 4 grupos: control (sin tratamiento), MFP (pellet sc. de 6 mg de liberación continua), doxo (una dosis de 4,5 mg/kg de Doxplax cada 5 o 7 días, dos dosis en total) y el grupo MFP+doxo que recibió el tratamiento combinado. Las dosis de los tratamientos se eligieron en base a bibliografía y antecedentes del laboratorio (Sequeira G, 2014); (Sahores A, 2013); (Anders CK, 2013). Los ratones se pesaron antes de la inyección de células, previo al inicio del tratamiento y al finalizar el experimento para comprobar que la dosis de quimioterápico administrada no provocase la disminución de más del 20 % del peso inicial, ya que esto indicaría niveles de toxicidad no aceptables según las normas del CICUAL.

Procesamiento de muestra para citometría y luminiscencia del modelo intracraneal

Una vez terminado el tratamiento, se sacrificaron los ratones por inhalación de CO_2 y se tomaron muestras de hígado, pulmón, riñón, bazo, ganglios (sólo si su tamaño superaba el normal), y ovario o testículos. Éstas se fijaron en PFA 4 % y se enviaron a un técnico para obtener cortes por micrótomo de 10 µm teñidos con hematoxilina-eosina. El cerebro fue extraído por completo, se cortó y se pesó la sección dónde se inocularon las células, de modo que todas las muestras tuvieran pesos similares. Posteriormente se disgregaron mecánicamente (tijera y jeringa con aguja 23 G) en PBS 1X. Se centrifugó 5 min a 300 G, y después de resuspender en PBS se filtró dos veces por MESH de poro de 100 µm. Por último, se centrifugó y resuspendió toda la muestra en 300 µl de PBS 1X, de los cuáles se tomó una

muestra de 30 µl para luminometría y el resto fue fijado con PFA 1 % para estudios de citometría de flujo.

Luminometría

La muestra de 30 µl se centrifugó 5 min a 300 G, se descartó el sobrenadante y atravesó un ciclo de congelación a -80 °C *overnight* y descongelado a temperatura ambiente. Luego se incubó a temperatura ambiente con 80 µl de Reporter Lysis 5X Buffer (E4030, Promega) por 20 min en agitación seguido de 10 segundos de vortexeado y 2 min de centrifugación a 13000 rpm (Centrifuga 5415 R, Eppendorf) a 4 °C. Se transfirieron 15 µl del sobrenadante a un pocillo de una placa blanca de 96 wells y se les agregó 15 µl de luciferina (Luciferasa Assay System, E4030, Promega). Inmediatamente después, se midió la luminiscencia en el GloMax™ 96 Microplate Luminometer (Promega) con un tiempo de integración de 10 segundos. La actividad de luciferasa fue expresada como RLU (del inglés, unidades relativas de luz).

Citometría de Flujo

Los 300 µl de muestra se conservaron a 4 °C hasta el momento de cuantificación. Se tomaron 100 µl y se diluyeron en 900 µl de PBS 1X, se pasaron por el citómetro BD Facs Canto II (láseres 488 y 633 nm) de modo de cuantificar las células tumorales, GFP positivas (espectro de excitación a 489 nm y emisión a 509 nm) en 500.000 eventos a una velocidad de 120 µl/min. La información fue adquirida por BD Facs Diva software 6.0 y analizada por el programa FlowJo 10.0. Además, se pasó una muestra de células MDA-Br provenientes de cultivo como control positivo y una muestra de cerebro de ratón sin tumor como control negativo, teñida con ioduro de propodio (IP) para diferenciar células de detrito. Para analizar las muestras, se armó un *gate* (Población 1, P1) abarcando todos los eventos excepto los detritos en el gráfico dot-plot SCC vs. FSC-A, luego se descartaron los dupletes formando un *gate* (Población 2, P2) en el gráfico FSC-H vs FSC-A y a partir de esta población se visualizó el histograma de FITC, ubicando el límite de células GFP positivas en base al control negativo, para descartar la autofluorescencia. Estos *gates* se aplicaron a todas las muestras de homogenato de cerebro.

Procesamiento de cerebros para medición de tamaño tumoral por microscopía de fluorescencia

Los ratones BALB/c-GFP fueron inyectados intracranealmente con células tumorales C4-2-HI. Luego de finalizado el tiempo de tratamiento, los animales fueron anestesiados con una dosis combinada de ketamina (50 mg/ml) y xilacina (20 mg/ml), y luego perfundidos con 10 ml de SF seguido de 10 ml de PFA 4 %. Se tomaron muestras de hígado, pulmón, riñón, bazo, ganglios (sólo si su tamaño superaba el normal), y ovario o testículos. Éstas se fijaron en PFA 4 % y se

enviaron a un técnico para obtener cortes por micrótomo de 10 µm teñidos con hematoxilina-eosina. Los cerebros se fijaron por 2 h en PFA 4 % y luego se sumergieron en una solución de sacarosa 20 % por 24 h a 4 °C después de lo cual fueron congelados a -80 °C en O.C.T (Optimal Cutting Temperature Compound) hasta el momento de corte. Los cerebros se cortaron con crióstato por completo obteniéndose 5 cortes de 10 µm luego de 3048 µm y 5 cortes cada 1016 µm. Se tiñeron con DAPI los núcleos (0,2 ng/µl, SIGMA) y se observaron los cortes con el microscopio de fluorescencia Nikon TE 2000, tomando fotos con el programa Arcturus XT. El área tumoral fue medida con el programa ImageJ. El cálculo de el volumen tumoral se realizó por medio de la fórmula del volumen de un elipsoide: $V = \frac{4\pi}{3} abc$, donde a, b, c son las longitudes de los semiejes del elipsoide respecto de los ejes cartesianos x, y, z. Es una fórmula adaptable, ya que si dos de estos semiejes son iguales, el elipsoide es un esferoide; y si los tres son iguales, es una esfera (Lockman PR, 2010). Las imágenes, de mejor calidad, mostradas en este trabajo fueron tomadas con el microscopio Olympus IX83 y su correspondiente cámara y programa.

Procesamiento de cerebros para medición de ingreso de doxo al cerebro por microscopía de fluorescencia

13 ratones BALB/c-GFP fueron tratados con pellets de MFP 6 mg 3 días antes de que a 6 de ellos se les inyectara por vía endovenosa 18 mg/kg de doxo. 3 ratones tratados sólo con doxo y 3 con MFP+doxo fueron sacrificados a las 12 h post inyección de doxo. Los 7 ratones restantes se sacrificaron a las 48 h post inyección de doxo, uno de ellos no se trató, para ser utilizado como control de fluorescencia basal. La perfusión y el procesamiento de los cerebros para corte de crióstato se realizaron en forma similar al experimento mencionado anteriormente. Los cerebros se cortaron por completo con crióstato obteniéndose un corte de 10 µm cada 1016 µm. Los cortes se tiñeron con DAPI (0,2 ng/µl, Sigma) y se tomaron fotos con el microscopio de fluorescencia Nikon TE 2000, ArcturusXT observando la autofluorescencia de la doxo (488 nm/590 nm). Se tomaron 12 fotos por cerebro al azar y la cuantificación de fluorescencia de la doxo se realizó con el programa ImageJ, calculando la intensidad total del color rojo en la foto tomada con espectro de excitación a 450-490 nm y filtro a partir de los 515 nm, y relativizando a la intensidad de rojo basal detectada en las fotos tomadas del cerebro del ratón control.

Tratamientos *in cultivo*, procesamiento de las muestras para fluorometría y Bradford

Las células HepG2, que expresan altos niveles de P-gp (Kong, 2004), se crecieron en cultivo en medio DMEM con 10 % SFB (anexo) hasta el 80 % de confluencia en placas p35. La mitad de las

placas se pre-incubaron por 30 min con 10 µM de MFP (anexo) en medio sin suero. Luego se trataron todas las placas con 20 µM de doxo (anexo) por 0, 60 o 120 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron dos lavados con PBS 1X frío y se incubaron las placas a -20 °C por 20 min. Se les agregó 400 µl de *buffer* de Lisis (anexo) a cada placa y se levantaron las células usando un *scrapper*. El lisado se incubó 45 min en hielo *vortexeando* cada 10 min, tras lo cual se traspasaron 100 µl a un *well* de una placa opaca (por triplicado) y se midió la fluorescencia a un espectro de excitación 488 nm y emisión 590 nm con un equipo de medición de fluorescencia (fluorómetro). Se realizó una curva de calibración por medio de la cual se calculó la cantidad de doxorrubicina (picomoles) que tenía cada muestra.

Luego se cuantificó la cantidad de proteínas de los 100 µl restantes de las muestras por el método Bradford (Sigma-Aldrich) (Bradford, 1976). Los resultados se presentan en picomoles de doxorrubicina por µg de proteínas de la muestra.

El mismo experimento se realizó con las células HUVEC. Primero se verificó por WB que expresaran P-gp y luego se crecieron a una confluencia del 70 % en placas p40 para realizar el experimento. En ningún caso se superó el pasaje 9, para evitar la pérdida de características, como la expresión de P-gp.

Extracción de proteínas y Western Blot

Las líneas celulares de HepG2 y HUVEC crecieron en cultivo hasta una confluencia del 80 % en pocillos de placa p6, luego de realizar dos lavados con PBS se les agregó 100 µl de *buffer* RIPA (anexo) por pocillo. Luego de levantar las células con *scrapper* y traspasar el lisado a tubos de 1,5 ml se les agregó un *cocktail* de inhibidores de proteasas y PMSF al 1 % (anexo). Para obtener el extracto proteico total se incubaron los tubos por 30 min a 4 °C con agitación cada 5 min. Luego se centrifugaron a 13000 G por 15 min. El sobrenadante con la parte proteica se guarda a -20 °C.

La cantidad de proteína en el extracto se midió utilizando un Nanodrop (A280).

Se resuspendió la cantidad de extracto equivalente a 40 µg (HepG2) y 200 µg (HUVEC) de proteínas totales en *buffer* de siembra (anexo) de manera que este último quedase en una concentración final de 1X. Los extractos proteicos fueron incubados a 37 °C durante 30 min para desnaturalizar las proteínas junto con la acción del β-mercaptoetanol. Las muestras se resolvieron en geles desnaturalizantes de acrilamida al 6 %, utilizando el *buffe*r de corrida adecuado (anexo). La corrida se realizó a 50 mA constantes hasta que cayera el frente de corrida. Luego, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham

Biosciences). La transferencia se realizó durante 2 horas a voltaje constante (80 V). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas en leche al 5 % en TBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavaron con TBS-Tween y se incubaron ON en agitación a 4° C con los anticuerpos primarios anti-P-gp (Santa Cruz, Mdr-1 D-11 sc 55510, 1:250) y el control de carga ERK1 (Santa Cruz, K-23, 1/1000) en TBS-Tween.

A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min con TBS-Tween, y se llevó a cabo la incubación por 1 h en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Finalmente se hicieron 3 lavados de 10 min de dichas membranas con TBS-Tween para ser reveladas mediante la técnica de ECL (*Enhanced Chemiluminescence*), (Mruk DD, 2011). Para visualizar la señal, las membranas se expusieron a una placa radiográfica tipo AGFA durante el tiempo necesario, el cual varió dependiendo de la intensidad de la señal observada. Las placas reveladas fueron escaneadas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado para comparar entre tratamientos en el caso del tamaño tumoral MDA-Br subcutáneo, ensayo de luciferasa, citometría de flujo y volumen tumoral del tumor C4-2-HI en cerebro fue ANOVA de un factor de comparaciones múltiples. El tamaño tumoral MDA-Br subcutáneo fue analizado por el último punto y por diferencias entre pendientes. En este caso, con el programa Infostat versión 2016 se realizó un análisis de varianza para obtener los residuos, residuos absolutos y predichos. Luego, se analizó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks modificada, en base a los residuos y el análisis de varianza con los residuos absolutos para poner a prueba la homocedasticidad. Si los resultados de estas pruebas resultan no significativos ($p>0,05$) significa que no se rechazan las hipótesis que establecen que las observaciones de cada tratamiento provienen de una población con distribución normal y que las varianzas de las subpoblaciones son homogéneas. Si alguna de las hipótesis se rechaza, se transforman los datos según la distribución de la muestra (por ejemplo, si los datos presentan una distribución con asimetría negativa se aplica $\sqrt{x}$ o $\ln x$) y se ponen a prueba los supuestos nuevamente. Una vez verificados los supuestos, se realiza un análisis de varianza de comparaciones múltiples, utilizando el test de Tukey y los datos transformados, si los hubiera.

En el caso del ensayo de acumulación de doxo intracelular *in vivo* la comparación entre tratamientos a 12 y 48 h se realizó por ANOVA de dos factores de comparaciones múltiples. Por último, se utilizó ANOVA de dos factores para comparar la acumulación de doxo intracelular in cultivo a 0, 60 y 120 minutos y entre los tratamientos. En estos casos, en

Infostat primero se realiza el análisis de varianza utilizando ambos, los tiempos y los tratamientos, como variables de clasificación, agregando la interacción entre ellas como variable. Luego se pone a prueba la normalidad con el test de Shapiro-Wilks modificado, descripto anteriormente. Para poder poner a prueba la homocedasticidad, primero se debió cruzar las variables y luego realizar el Test de Levene, analizando la variable residuos absolutos como dependiente y utilizando la variable de cruce de los dos factores como la variable de clasificación. Si se cumplen estos supuestos ($p>0,05$) se analizan los resultados del análisis de varianza inicial, chequeando si existe interacción entre las variables o no.

Finalmente, los análisis por ANOVA se chequearon y graficaron con el programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Desarrollar un modelo de metástasis de cáncer de mama en cerebro apropiado para el estudio del efecto de un tratamiento combinado.

Con el objetivo de obtener modelos experimentales de tumores mamarios creciendo en cerebro, utilizamos distintas estrategias:

- Inyección intracardíaca
- Inyección subcutánea
- Inyección intracraneal

Inyección intracardíaca

Utilizamos la línea celular MDA-Br (materiales y métodos) que fue seleccionada por su mayor capacidad de generar metástasis cerebrales experimentales. Para incrementar la probabilidad de que las células tumorales MDA-Br ingresen al cerebro, y dado que este fue el método utilizado por el Dr. Massagué (Bos PD, 2009), quien desarrolló esta variante celular, se inyectaron las mismas directamente al torrente sanguíneo, por el ventrículo izquierdo del corazón. La técnica resultó ser complicada dado que no se tuvo ninguna referencia por imagenología para guiar el ingreso de la aguja al ventrículo izquierdo, y asegurar que las células ingresan a circulación sistémica y no sólo a circulación pulmonar. A los 22 días post inyección (dpi) algunos ratones comenzaron a presentar signos de deterioro en su salud, como el pelaje en mal estado, poca movilidad y espalda curvada, por lo que se sacrificaron. Otros ratones no presentaron éstos síntomas hasta los 28 días. Por medio de un análisis histopatológico de cortes realizados al azar, se observó que los tumores creciendo en cerebro eran pequeños, y estaban distribuidos formando focos de pocas células (Fig. 10). Por este método se concluyó que sólo el 30 % de los cerebros presentaban tumores. Sin embargo, dadas las características de los carcinomas y del hecho que no se obtuvieron cortes seriados del cerebro completo, no se puede asegurar que los ratones que consideramos libres de tumores cerebrales, realmente no los presentaran.

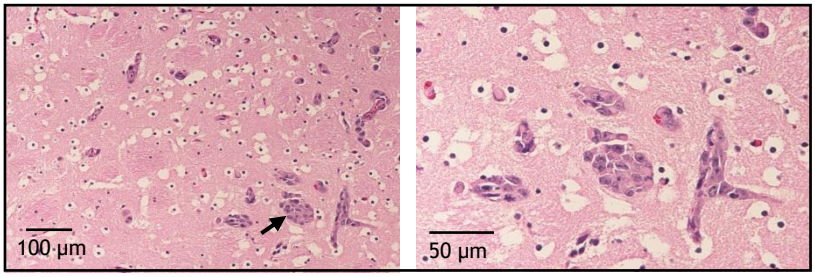

Figura 10. Focos tumorales en cerebro de ratones inyectados intracardíacamente con células MDA-Br. Imagen representativa de cerebro de ratón con focos tumorales (flecha) pequeños y dispersos. Tinción hematoxilina-eosina. Izquierda: 100X, derecha: ampliación 400X.

El análisis de los cortes de pulmón, hígado, riñón y bazo confirmó la presencia de tumores de mama en dichos órganos (Fig. 11). En casos como hígado y pulmón los tumores eran macroscópicos (Fig. 12). El desarrollo de estos tumores deteriora la salud de los ratones lo que imposibilita extender los tiempos del experimento con el objetivo de aumentar las probabilidades de que los ratones presenten tumores cerebrales.

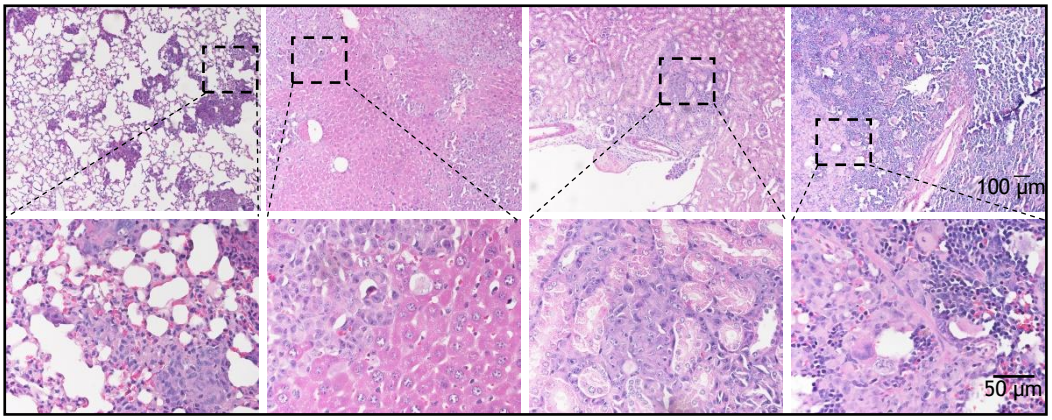

Figura 11. Focos tumorales en ratones inyectados intracardÍacamente con células MDA-Br. Imágenes representativas de cortes histológicos de pulmón (izq.), hígado (centro-izq.), riñón (centro-der) y bazo (der) de ratón con focos tumorales. Tinción hematoxilina-eosina. Panel superior: 100X, panel inferior: ampliación 400X.

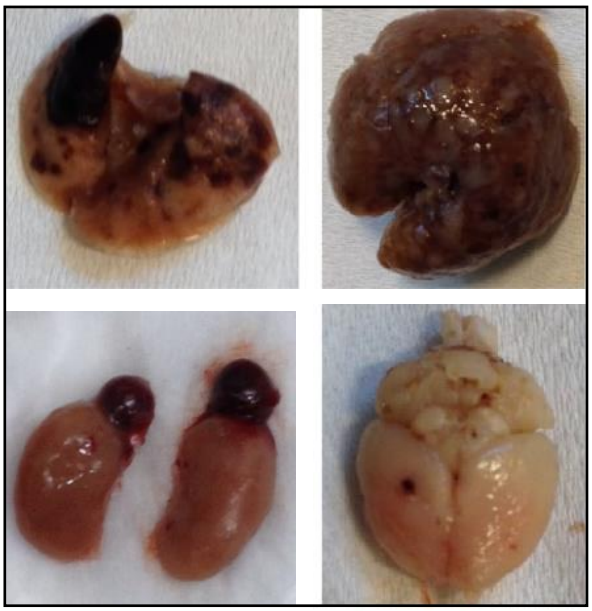

Figura 12. Tumores macroscópicos en ratones inyectados intracardiacamente con células MDA-Br. Imágenes representativas de pulmón (izquierda, superior), hígado (derecha, superior), riñón (izquierda, inferior) y cerebro (derecha, inferior) de ratón con focos tumorales. Se puede observar además que las glándulas adrenales son más grandes de lo normal.

En un segundo experimento, se evaluaron los ratones por bioluminiscencia, haciendo uso de la capacidad de esta línea tumoral de expresar luciferasa. Se tomaron imágenes de cuerpo completo a los 12, 19 y 33 dpi. (Fig. 13) observándose grandes focos de células tumorales en la zona torácica-ventral de los ratones, lo que nos permitió evaluar el progreso tumoral en el tiempo en esta zona. Sin embargo, las fotos con acercamiento y foco en la cabeza del animal no revelaron células tumorales en el cerebro, esto nos impediría asegurar que los ratones presenten tumores en cerebro antes de iniciar los tratamientos y observar el efecto de los tratamientos en el tamaño tumoral.

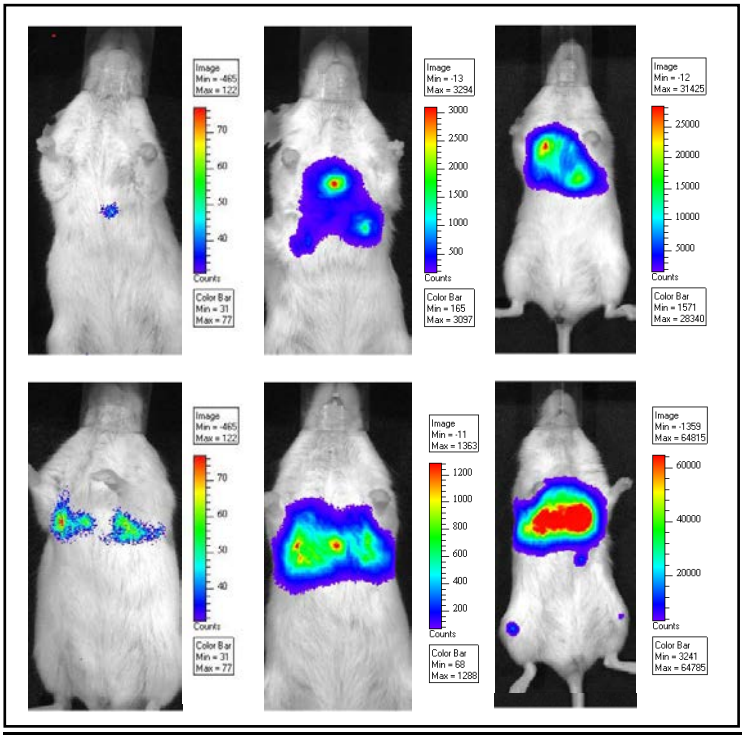

Figura 13. Focos tumorales observados por bioluminiscencia en ratones inyectados intracardíacamente con células MDA-Br. Imágenes representativas de 2 ratones con focos tumorales a los 12 (izq.), 19 (centro) y 33 (der.) días post inyección de las células. Se observa la progresión de los tumores en el tiempo, tanto en distribución como en cantidad de células dado el aumento de la intensidad de bioluminiscencia (escala de colores). Las imágenes de la izquierda y centro fueron tomadas a 20 cm del lector mientras que las de la derecha fueron tomadas a 30 cm del lector para evitar la saturación de la imagen.

Por lo tanto, a los 33 dpi se tomaron fotos de los cerebros *ex vivo* (en ausencia del cráneo, Fig. 14) y los resultados revelaron que sólo el 16,6 % de los ratones presentaron focos de células luminiscentes, pequeños y dispersos.

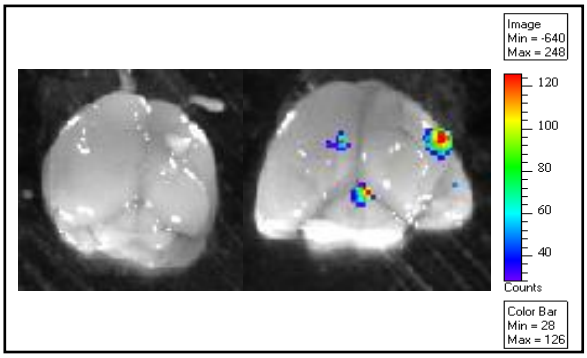

Figura 14. Focos tumorales observados por bioluminiscencia en cerebros de ratones inyectados intracardíacamente con células MDA-Br. Imágenes representativas de cerebros de ratones tomadas *ex vivo* a los 33 días post inyección de las células. Sólo en el cerebro de la derecha se observan focos tumorales.

Éstos resultados sugieren que el equipo de bioluminiscencia utilizado no es lo suficientemente sensible para detectar pequeñas cantidades de células tumorales en el cerebro, en especial teniendo en cuenta la interferencia que pueda generar el cráneo. En base a los resultados expuestos, descartamos este modelo para el desarrollo de los objetivos propuestos.

Inyección subcutánea

Dado que la línea celular MDA-Br fue seleccionada para metastatizar a cerebro, se decidió inyectar las células sc. para obtener un modelo de metástasis espontáneas. Se monitoreó el crecimiento de los tumores sc. (Fig. 15).

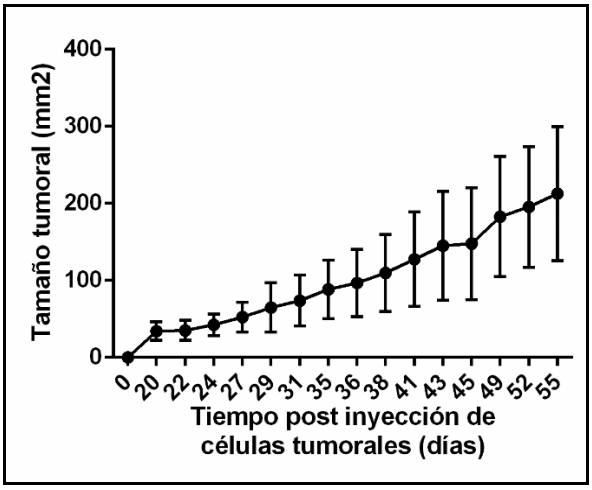

Figura 15. **Curva de crecimiento de tumores MDA-Br inoculados sc.** Se grafica la media y el SD para cada medición, n=20.

A los 55 dpi los ratones presentaban signos de salud deteriorada por lo que se debió finalizar el experimento. El análisis histopatológico determinó la presencia de focos tumorales en pulmón, hígado y riñón (Fig. 16).

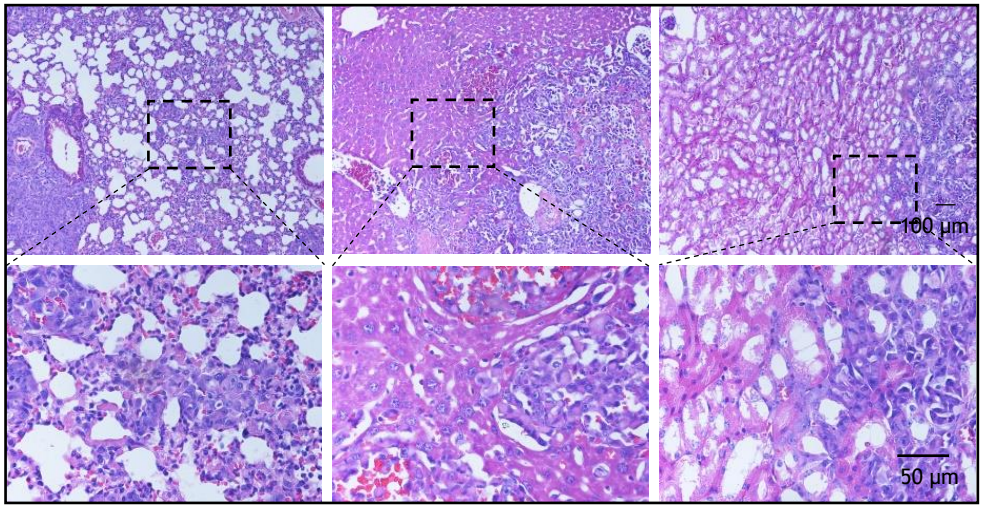

Figura 16. Metástasis tumorales en ratones con tumores sc. de células MDA-Br. Imágenes representativas de cortes histológicos de pulmón (izq.), hígado (centro) y riñón (der.) de ratón con metástasis tumorales. Tinción hematoxilina-eosina. Panel superior: 100X, panel inferior: ampliación 400X.

El análisis histopatológico de cortes de cerebro tomados al azar confirmó que el 66,6 % de los ratones presentaron metástasis en cerebro. Si bien esto fue alentador, las MC eran pequeñas y aisladas, lo que dificultaría nuestro objetivo de evaluar el efecto de una combinación de drogas en el tamaño o número de las metástasis cerebrales respecto del tratamiento con un solo agente (Fig. 17).

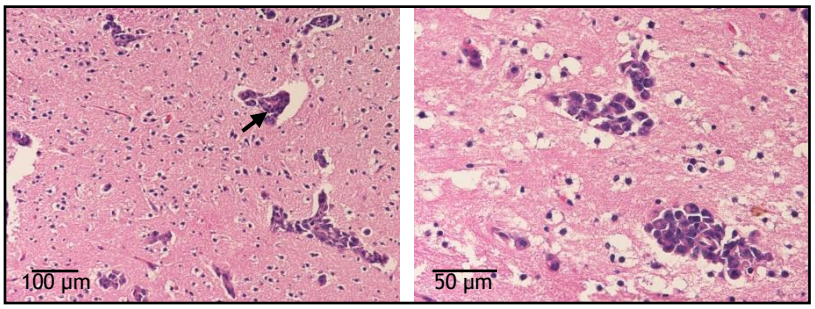

Figura 17. Metástasis tumorales en cerebro de ratones con tumores sc. de células MDA-Br. Imagen representativa de un corte de cerebro de ratón (10 µm) con focos tumorales (flecha) pequeños y dispersos. Tinción hematoxilina-eosina. Izquierda: 100X, derecha: 400X.

Dado el alto porcentaje de ratones con metástasis cerebrales, se repitió el experimento realizando un seguimiento de la progresión tumoral por bioluminiscencia y posteriormente se obtuvieron cortes seriados del cerebro. Las fotos de bioluminiscencia se tomaron a los 55 y 63 dpi, observándose el desarrollo de metástasis en la zona torácica-ventral del ratón, pero no en cerebro (Fig. 18).

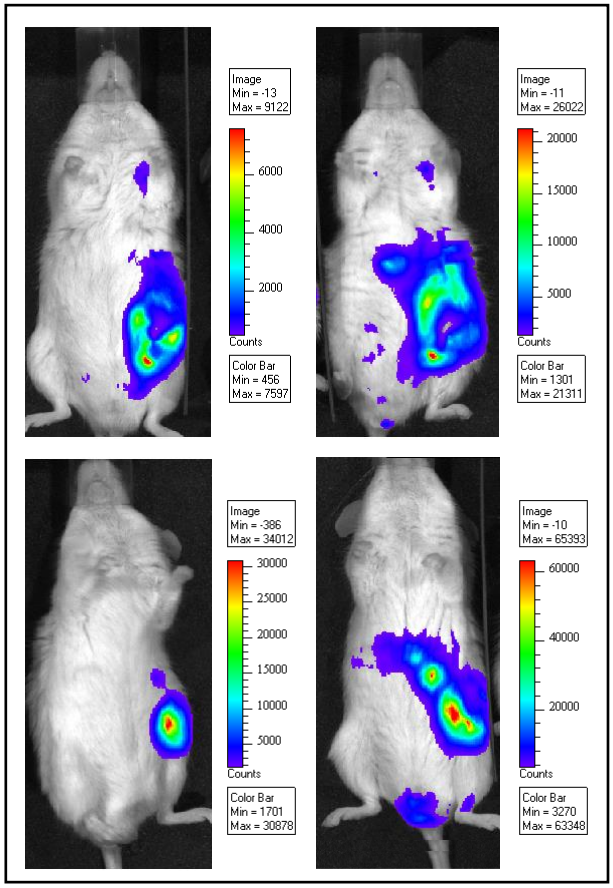

Figura 18. Focos tumorales observados por bioluminiscencia en ratones con tumores sc. de células MDA-Br. Imágenes representativas de 2 ratones con focos tumorales en el pecho a los 55 (izq.) y 63 (der.) días post inyección de las células. Se observa la progresión tumoral en el tiempo, tanto en distribución como en cantidad de células dado el aumento de la intensidad de bioluminiscencia (escala de colores).

A los 63 dpi se finalizó el experimento, tomándose imágenes *ex vivo* de los cerebros (Fig. 19). El 50 % de los cerebros presentaron metástasis, pero el 70 % de éstas fueron pequeñas (derecha).

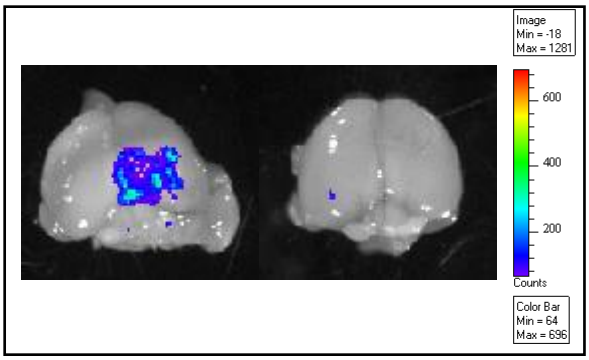

Figura 19. Focos tumorales observados por bioluminiscencia en cerebros de ratones inyectados sc. con células MDA-Br. Imágenes representativas de cerebros de ratones tomadas *ex vivo* a los 63 días post inyección de las células. Se observan focos tumorales muy con baja densidad de células.

Los cerebros se cortaron por completo con un vibrátomo en láminas de 50 µm, el mayor grosor que permitiría evaluar por histopatología la presencia de células tumorales en el cerebro. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la morfología de las células no se pudo distinguir lo suficiente como para confirmar la presencia de metástasis.

Dado que las células tumorales suelen expresar altos niveles de P-gp y, con el objetivo de determinar si la MFP afecta el crecimiento de los tumores primarios, parte de los ratones inyectados sc. fueron tratados con MFP, doxo o su combinación. Observamos que no hubo diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre los distintos tratamientos (Fig. 20). Si bien debemos tener en cuenta la alta variabilidad en el tamaño tumoral entre ratones y el tamaño tumoral al comenzar los tratamientos, los resultados sugieren que la MFP no afectaría el crecimiento de este tumor triple negativo, y que el tratamiento combinado con doxo no incrementaría su efectividad. Por lo tanto, si esto se confirma indica que, si hubiera un efecto del tratamiento combinado sobre el crecimiento de las metástasis cerebrales, éste no se debería a una inhibición directa de la P-gp presente en las células tumorales MDA-Br.

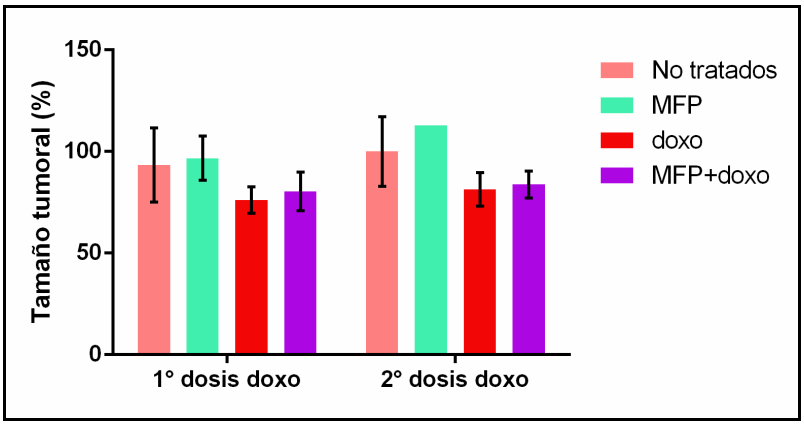

Figura 20. Efecto del tratamiento combinado en el crecimiento del tumor sc. MDA-Br. 56 días luego de la inyección sc. de las células, los ratones se dividieron en 4 grupos (n=3): control (sin tratamiento), MFP, doxo y MFP+doxo, recibiendo una dosis iv. de doxo a los 56 y 61 dpi de las células (1° y 2° dosis). Las mediciones del tumor sc. fueron tomadas con un calibre vernier 3 veces por semana. Las diferencias entre tratamientos no fueron significativas ($p>0,05$).

Inyección intracraneal

Este modelo permite controlar el sitio de inyección de las células en el cerebro y el número de células que ingresan a él. De este modo es posible asegurar que todos los ratones presentan tumores en el cerebro, previo al inicio del tratamiento. Además, se puede inferir que estos tumores tendrán aproximadamente el mismo tamaño, lo que facilitaría observar variaciones

de este parámetro causadas por una droga. Este método de inyección permite incluso utilizar líneas tumorales, como la C4-2-HI, que no desarrollan metástasis a cerebro.

- Línea tumoral MDA-Br

Dado que los métodos de cuantificación del tamaño de los focos metastásicos en cerebro utilizados anteriormente no fueron efectivos, se utilizó la capacidad de las células MDA-Br de expresar GFP y luciferasa para cuantificar el número de células neoplásicas en cerebro por medio de citometría de flujo y luminometría. Luego de poner a punto el método por el cual se disgrega mecánicamente el cerebro para poder analizar las muestras con un citómetro y por luminometría, se inyectaron las células tumorales en cerebro con la ayuda de un estereotáctico. Seis dpi intracraneal (icrl.) se sacrificó un ratón y luego de obtener el homogenato del cerebro, se comprobó que el número de células tumorales obtenido era el suficiente para ser detectado por citometría de flujo y luminometría. A los 26 dpi, los ratones (n=6) presentaban un estado de salud deteriorado, por lo que se finalizó el experimento. Macroscópicamente, no se observaron tumores en los cerebros ni en ningún otro órgano. Sin embargo, por citometría de flujo y luminometría se confirmó que el 100 % de los ratones presentaban tumores en cerebro. Los resultados de citometría (342.850,00 ± 3.991,95 células GFP positivas), a diferencia de los de luminometría (835.120,00 ± 110.100,00 RLU) fueron poco variables entre los animales, esto se evidencia en el reducido desvío estándar.

- Línea tumoral C4-2-HI

Dado que el método de inyección icrl. permite la utilización de tumores que no metastatizan al cerebro, se decidió desarrollar un modelo de crecimiento en cerebro del tumor de mama murino C4-2-HI, no respondedor a MFP, inyectado en ratones BALB/c-GFP.

En base a nuestra experiencia previa negativa con los cortes seriados de cerebro, desarrollamos un método de corte diferente, detallado en materiales y métodos. La cuantificación del tamaño tumoral se realizó midiendo la superficie del tumor en fotos de microscopía de fluorescencia luego de cortar todo el cerebro con crióstato y calculando el volumen tumoral según lo indicado en materiales y métodos. A los 7 dpi, se sacrificó un ratón y se logró observar el tumor en cerebro (Fig. 21).

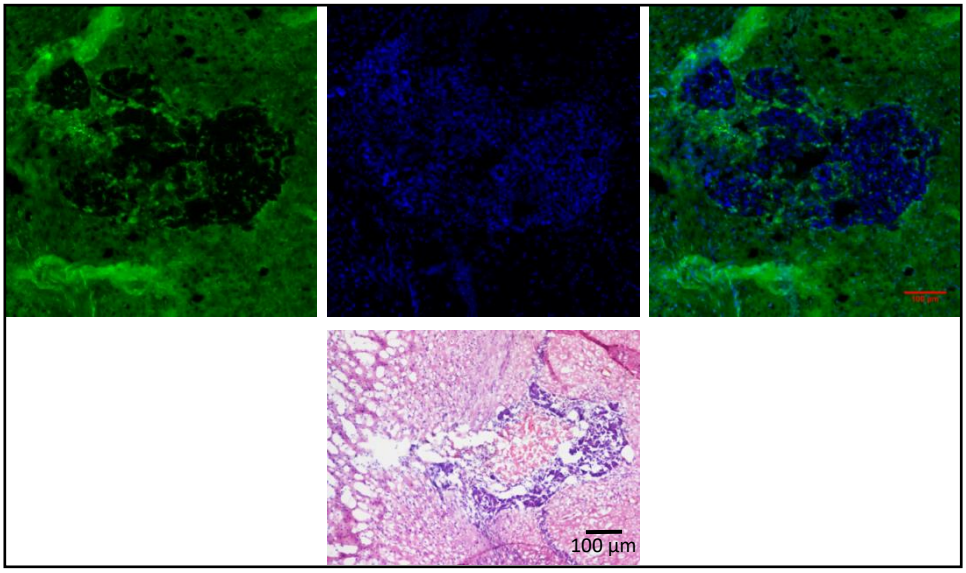

Figura 21. Imagen del tumor C4-2-HI en cerebro de ratón a los 7 dpi icrl. Por microscopía de fluorescencia se observa el corte de cerebro donde se distingue el tejido normal de cerebro (izquierda, verde: GFP), los núcleos del tejido y del foco tumoral en azul (centro, tinción azul: DAPI) y el merge (derecha) en el que se observa un área GFP negativa que corresponde a la superficie del tumor en dicho corte. En la imagen de abajo al centro se observa la histología del tumor por tinción con hematoxilina-eosina. Barra: 100 µm.

A los 20 dpi se finalizó el experimento dado que los ratones comenzaron a presentar signos de salud deteriorada. En este caso se pudo observar macroscópicamente el tumor en los cerebros (Fig. 22).

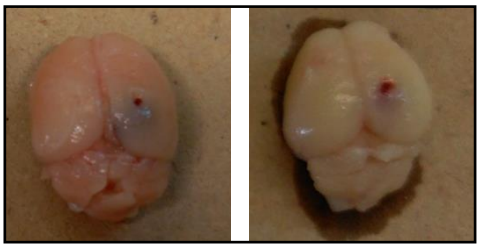

Figura 22. Tumor C4-2-HI macroscópico 20 dpi intracraneal.

El 100 % de los ratones presentaron tumores en cerebro. El valor promedio del volumen de los tumores (n=5) fue de 47,42 ± 24,38 mm^3 (Fig. 23).

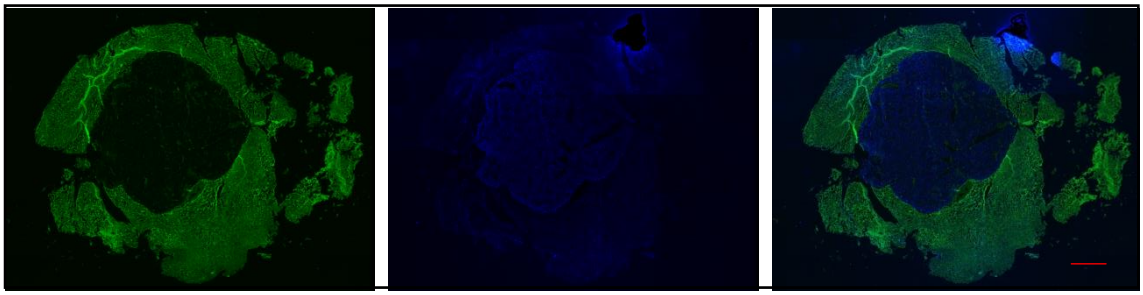

Figura 23. Imagen representativa de tumores C4-2-HI en cerebro 20 dpi icrl. en ratones BALB/c-GFP. Por microscopía de fluorescencia se observa el corte de cerebro donde se distingue el tejido normal de cerebro (izquierda, verde: GFP), los núcleos del tejido y del foco tumoral en azul (centro, tinción azul: DAPI). A la derecha se observa el merge de ambas imágenes. Barra: 1000 µm.

Dado que este método consiste en inyectar las células directamente al cerebro se podría producir una ruptura de la BHE, sin embargo según Cunningham y col. (Cunningham Tracy L., 2014) y Kim y col. (Kim LS, 2004), dicho daño en la BHE se repararía por completo en 5 días. Es por esto que con ambas líneas tumorales el tratamiento se iniciaría luego de los 5 dpi.

De los tres modelos ensayados para estudiar el crecimiento tumoral de mama en cerebro, la inyección icrl. fue la más efectiva y la que permitió, tanto para las células MDA-Br como para el tumor C4-2-HI, poner a punto métodos de cuantificación del tamaño del tumor creciendo en el cerebro. Por este motivo fue elegido para evaluar si el tratamiento con MFP permite mejorar la respuesta terapéutica de la doxo sobre carcinomas mamarios creciendo en cerebro.

Evaluar si el tratamiento con MFP permite mejorar la respuesta terapéutica de la doxo sobre carcinomas mamarios creciendo en cerebro.

Los ratones se pesaron y fueron inyectados intracranealmente en la zona del hipocampo derecho como se describe en materiales y métodos. Luego de diez dpi los ratones se pesaron nuevamente y se dividieron en 4 grupos: no tratado, MFP, doxo y MFP+doxo, las dosis fueron elegidas de acuerdo a la bibliografía y antecedentes.

Línea tumoral MDA-Br

A los 7 días post administración de la segunda dosis de doxo, los ratones fueron pesados y sacrificados.

Un parámetro que se utiliza para evaluar la toxicidad de las drogas de los tratamientos es la pérdida de peso. Una pérdida de peso mayor al 20 % implica una alta toxicidad. Las dosis utilizadas en estos experimentos no provocaron disminuciones de peso mayores al 20 % (Fig. 24).

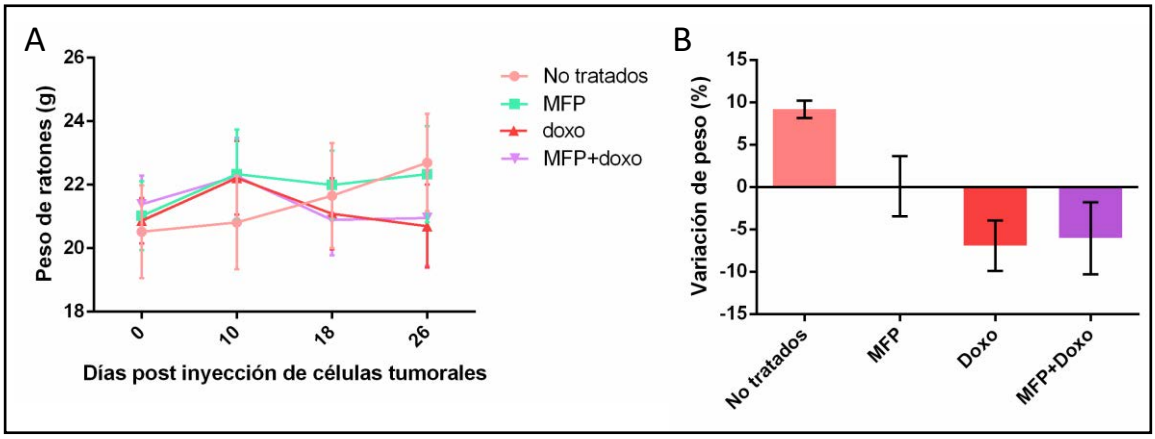

Figura 24. Control de peso de los ratones sometidos a tratamiento. A) Peso de los ratones a diferentes tiempos post inyección intracraneal. **B)** Variación (en %) del peso de los ratones de los diferentes grupos a partir del inicio del tratamiento (10 dpi). Se presenta la media y el SEM de las mediciones.

Los cerebros se procesaron y analizaron por luminometría y citometría de flujo. En el caso de los resultados del análisis por luminometría se observó una gran variabilidad entre los ratones. Sólo el grupo que recibió el tratamiento combinado presentó una actividad de luciferasa significativamente menor a la observada en el grupo no tratado. El grupo tratado con MFP mostró una tendencia a tener tumores más grandes que el grupo no tratado, los tratamientos con doxo y MFP+doxo mostraron una actividad de luciferasa significativamente menor a la del grupo MFP (Fig. 25).

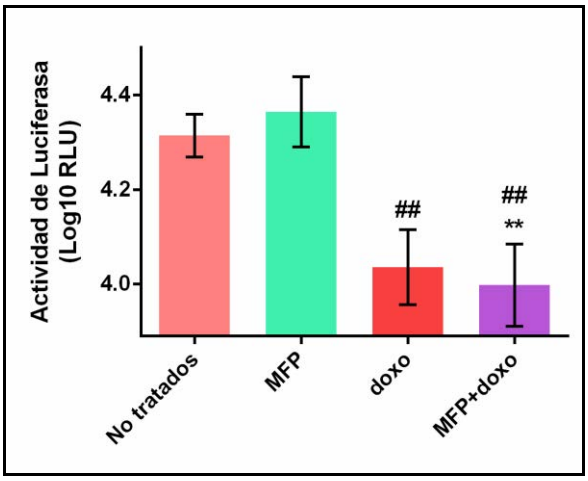

Figura 25. El tratamiento combinado con MFP y doxo disminuye el tamaño tumoral de MDA-Br en cerebro. Se presentan los resultados del análisis por luminometría en Unidades Relativas de Luz (RLU) producidas por el 10 % de la muestra de homogenato de cerebro de ratones tratados con mifepristona (MFP), doxorrubicina liposomal pegilada (doxo), el tratamiento combinado (MFP+doxo) o no tratados. Los datos fueron transformados con logaritmo en base 10 para que cumplan los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los ** representan una diferencia significativa ($p<0,01$) respecto del grupo no tratado, los ## representan diferencias significativas ($p<0,01$) respecto del tratamiento con MFP, n=5. El experimento se realizó por duplicado con resultados similares.

Al igual que por luminometría, el análisis por citometría de flujo demostró que los tumores que recibieron el tratamiento combinado fueron significativamente más pequeños que los del grupo no tratado. Esto se evidenció por la cuantificación de un número menor de células tumorales que expresan GFP en este grupo. Estas diferencias también se observaron con el grupo tratado solo con MFP (Fig. 26).

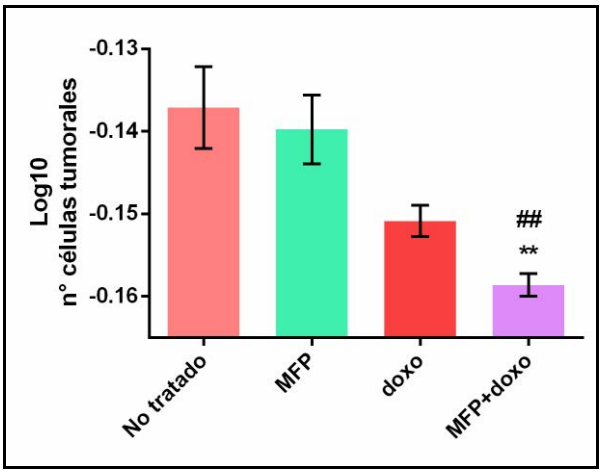

Figura 26. El tratamiento combinado con MFP y doxo disminuye el tamaño de los tumores cerebrales MDA-Br. Se presentan los resultados del análisis por citometría de flujo cuantificando el número de células tumorales GFP positivas en 500.000 eventos de muestra de homogenato de cerebro de ratones sometidos a los distintos tratamientos. Los datos fueron transformados tres veces con logaritmo en base 10 para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. **: $p<0,01$, respecto del grupo

no tratado, ##: p<0,01 respecto del grupo MFP, n=5. El experimento se realizó por duplicado con resultados similares.

Los resultados indican que en la línea celular MDA-Br, la MFP no reduce el tamaño tumoral; esto fue evaluado por dos técnicas diferentes (luminometría y citometría de flujo). Por otro lado, el tratamiento con doxo tiende a reducir el tamaño tumoral, sin embargo estas diferencias con respecto al grupo no tratado no son significativas con este número de ratones. El tratamiento combinado con MFP+doxo es el único que logra inducir una disminución significativa del tamaño tumoral respecto de los ratones que no recibieron tratamiento.

Línea tumoral C4-2-HI

Basados en nuestras observaciones a los 7 dpi intracraneal de las células del tumor C4-2-HI (sección Inyección intracraneal Fig. 21) y considerando la variación intra-ratón, se decidió iniciar el tratamiento a los 10 dpi. Sin embargo, se observó un rápido deterioro de los ratones BALB-c/GFP, por lo que la segunda dosis se administró a los 4 días de la primera y 2 días después (16 dpi) se sacrificaron los ratones. En este caso se pudieron observar diferencias macroscópicas entre los tratamientos (Fig. 27).

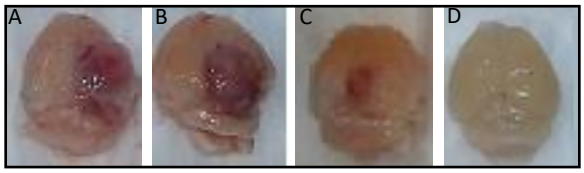

Figura 27. Efecto del tratamiento en tumores C4-2-HI creciendo en cerebro. Se presentan imágenes de los cerebros *ex vivo*, luego de los tratamientos con MFP (B), doxo (C), MFP+doxo (D) o sin tratar (A).

Los cerebros se cortaron por completo con crióstato y se tomaron fotos con microscopio de fluorescencia (Fig. 28).

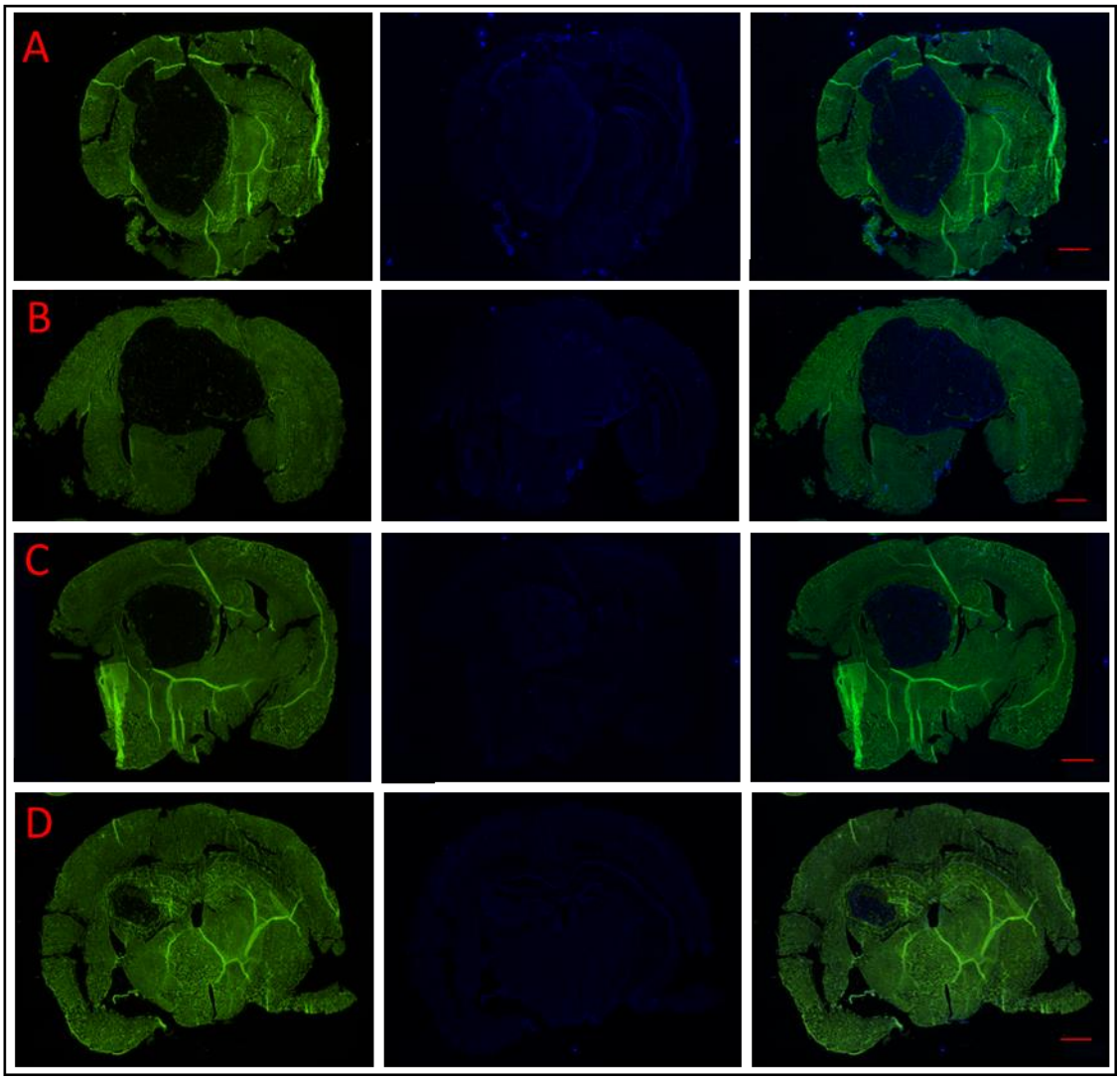

Figura 28. Imágenes representativas de tumores C4-2-HI en cerebro 16 dpi. Fotografías de fluorescencia de ratones BALB-c/GFP no tratados (panel A), tratados con MFP (B), doxo (C) o con el tratamiento combinado MFP+doxo (D). Barra: 1000 µm. Se observa en verde el tejido cerebral GFP positivo y en azul los núcleos teñidos con DAPI.

El análisis del volumen tumoral en las imágenes se representa en la Fig. 29 calculado según lo detallado en materiales y métodos.

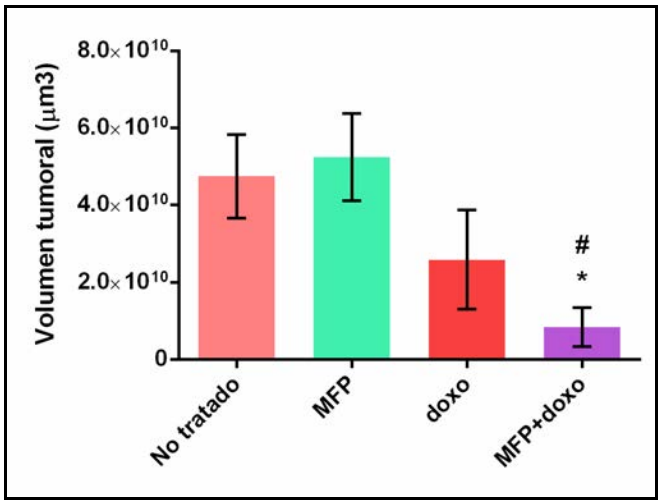

Figura 29. El tratamiento combinado disminuye el tamaño tumoral del tumor C4-2-HI en cerebro. Se presenta el volumen del tumor calculado con la fórmula del volumen de un elipsoide a partir de las imágenes de fluorescencia de cortes de cerebro completo de ratón no tratado o tratado con las distintas drogas (n=5). Siendo *: $p<0,05$ respecto al grupo no tratado y #: $p<0,05$ respecto al grupo MFP.

Se observa una diferencia significativa entre el tamaño tumoral del grupo no tratado y el MFP+doxo pero no entre el primero y el grupo doxo, o el tratamiento con MFP.

Estos resultados están en línea con aquellos obtenidos con la línea tumoral MDA-Br, que indican, en primera instancia, que la MFP no tiene efecto sobre el tamaño tumoral en éstos tumores no respondedores a hormonas; en segundo lugar se observa que la dosis 4,5 mg/kg de doxo utilizada, equivalente a la dosis 20 mg/m^2 en humanos, no es suficiente para disminuir significativamente el tamaño tumoral, pero al ser combinada con MFP, el tamaño tumoral en cerebro se reduce significativamente respecto del grupo de ratones no tratados.

Evaluar el efecto de la MFP sobre el ingreso de la doxo al cerebro de ratones sin tumor.

Según la bibliografía, el tratamiento combinado de MFP con doxorrubicina permite un mayor ingreso del quimioterápico a las células tumorales *in vitro* (Lecureur V, 1994). Nosotros proponemos que la MFP es capaz de disminuir la actividad bombeadora de la P-gp de la BHE, permitiendo una mayor acumulación intracerebral de la doxo. En este trabajo se decidió determinar, en nuestro modelo y por primera vez *in vivo*, si la administración de *pellets* de MFP 3 días previos a la inyección de doxo permitiría un mayor ingreso del quimioterápico al cerebro, cuantificando por microscopía de fluorescencia la cantidad de doxorrubicina en cortes cerebrales de ratón (Fig. 30). Los tiempos de tratamiento fueron elegidos en base a los antecedentes (Sequeira G, 2014) y a un experimento preliminar.

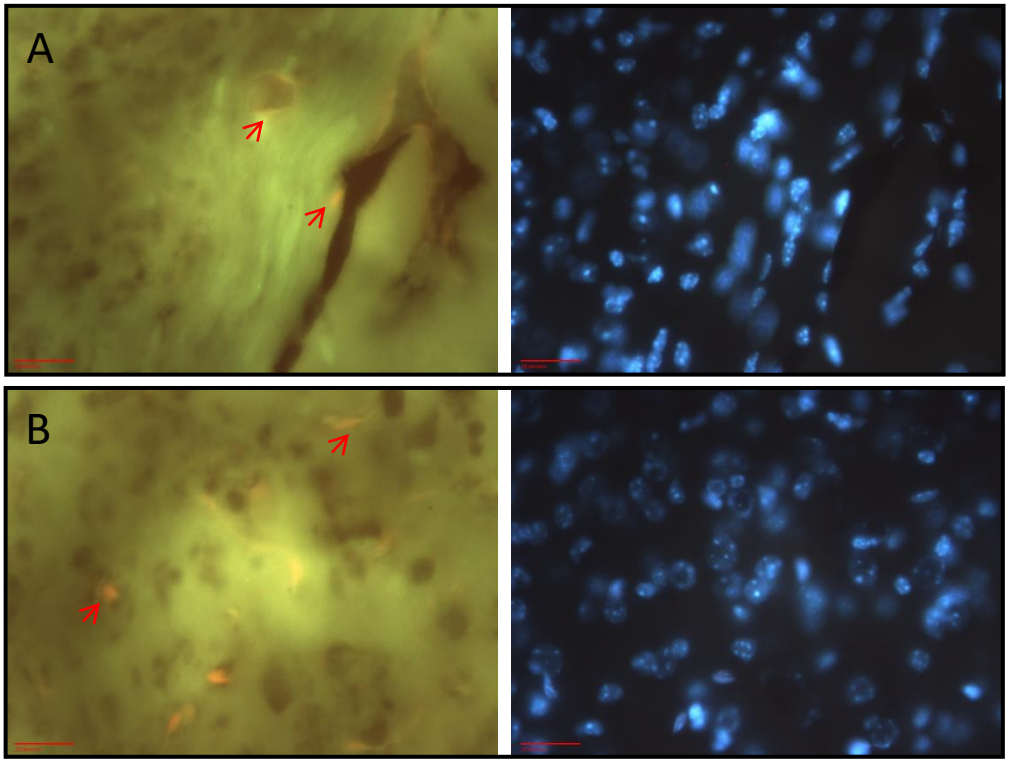

Figura 30. Imágenes representativas de cortes de cerebro de ratón BALB/c-GFP. Panel A (arriba) tratamiento con doxo, panel B (abajo) representa el tratamiento con MFP+doxo a las 48 h. Los cortes se tiñeron con DAPI (derecha) para distinguir los núcleos. Las flechas rojas indican los núcleos marcados con doxorrubicina (autofluorescencia, espectro 488/590 nm). Barra: 25 µm.

Los resultados obtenidos cuantificando 12 imágenes por cerebro (n=3) luego de 12 h o 48 h de administrada la dosis de doxo no mostraron una diferencia significativa entre los tratamientos (Fig. 31).

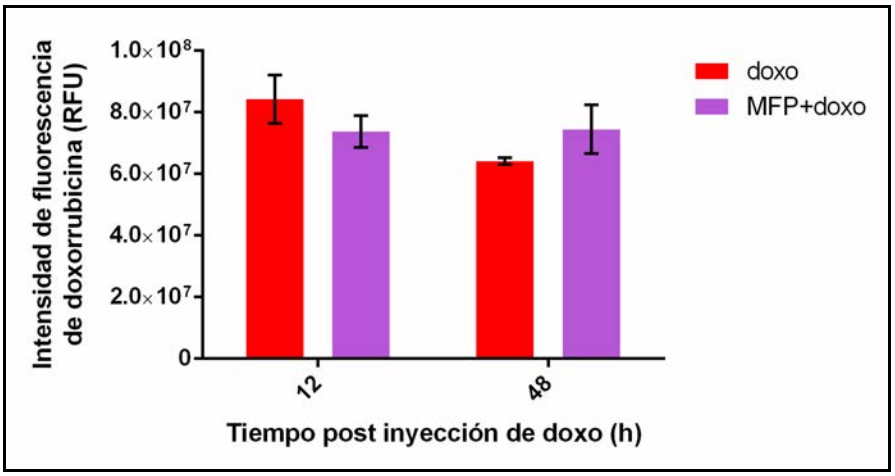

Figura 31. Cuantificación de la acumulación intracerebral de doxo. Luego de 3 días de administrado el *pellet* de MFP 6 mg/kg, se inyectaron por vía intravenosa 18 mg/kg de doxo en los ratones. Los cerebros se extrajeron a las 12 o 48 h. Los cortes de cerebro se tiñeron con DAPI y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la imagen (488/590 nm), n=3.

Estudiar si la MFP afecta la funcionalidad de la P-gp cuantificando por fluorescencia la retención intracelular de doxorrubicina.

La línea humana de carcinoma hepatocelular HepG2, es una línea celular que expresa altas proporciones de P-gp (Li YC, 2004). Utilizando esta línea celular, se decidió evaluar si la MFP permitía una mayor acumulación de doxorrubicina en las células al actuar sobre la P-gp. Para ello, se trataron los cultivos celulares con doxorrubicina y MFP+doxorrubicina a dos tiempos diferentes y se evaluó por fluorometría la cantidad intracelular del quimioterápico. Los resultados mostraron que la acumulación de doxorrubicina aumentó significativamente con el tratamiento combinado con MFP (Fig. 32).

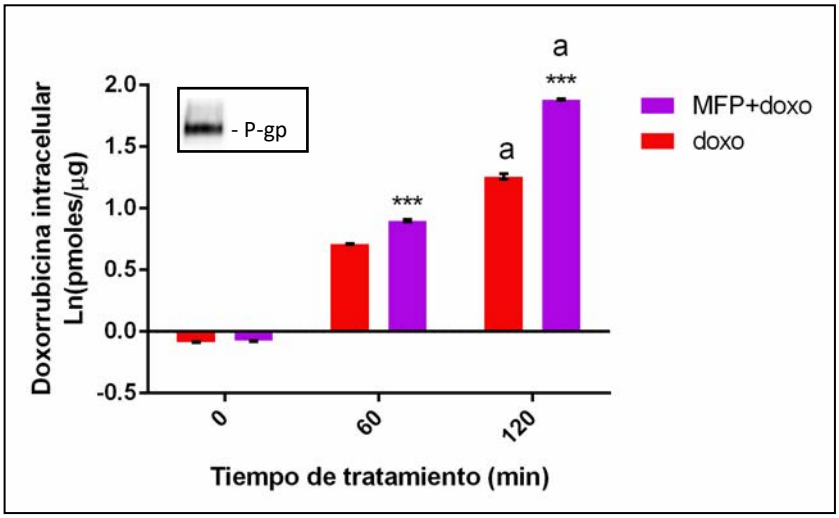

Figura 32. La MFP incrementa la acumulación intracelular de doxorrubicina en células tumorales HepG2. Tratamientos de 60 o 120 minutos con 20 µM doxorrubicina con o sin 10 µM de MFP. La fluorescencia de la doxorrubicina fue medida por fluorometría (488/590) y convertida a picomoles (pmoles) por medio de una curva de calibración. Esta concentración fue relativizada a la cantidad de proteínas (µg) de la muestra medida por Bradford. Cada punto representa una medición por triplicado. Los datos se transformaron con logaritmo natural para que cumplan con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. ***: $p<0,001$ respecto del tratamiento sólo con doxorrubicina al mismo tiempo, **a**: $p<0,001$ respecto del tiempo a 60 min del mismo tratamiento. Este experimento fue realizado por triplicado confirmando estos resultados. **Arriba izquierda:** Expresión de P-gp en extractos totales de células HepG2 analizada por WB.

Se observa que una concentración de 10 µM de MFP es suficiente para incrementar la acumulación de doxorrubicina intracelular, sugiriendo que MFP podría actuar inhibiendo la actividad de la P-gp y que esta inhibición es rápida porque se evidencian sus efectos a los 60 min de incubación. Además se observa que la inhibición se mantiene por al menos 2 h durante el tratamiento y la acumulación intracelular de la doxorrubicina incrementa con el tiempo, lo que podría tener una gran relevancia terapéutica.

El experimento se repitió utilizando la línea celular HUVEC que, al formar parte de la barrera hemato-placentaria, presenta características similares a las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, entre ellas la expresión de P-gp en membrana (Eugenin EA, 2003); (Bos PD, 2009). Primero, se analizó por WB si estas células expresan el transportador P-gp y luego se realizó el experimento de acumulación intracelular de doxorrubicina (Fig. 33).

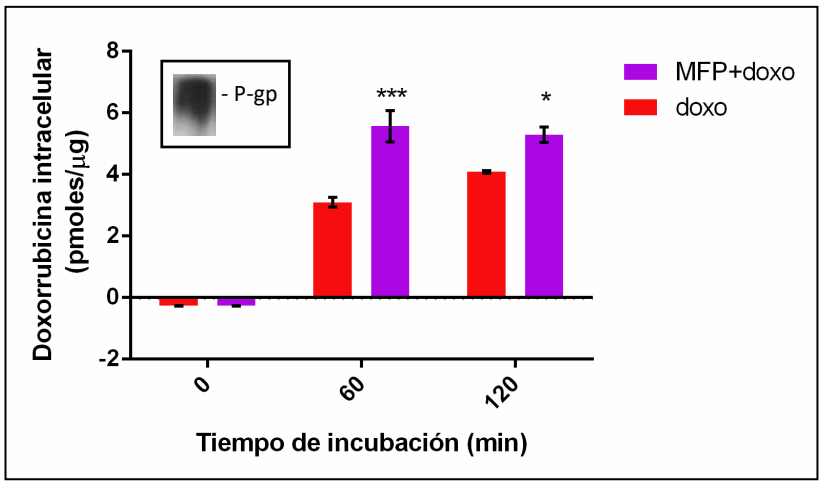

Figura 33. El tratamiento con MFP incrementa la acumulación intracelular de doxorrubicina en células HUVEC. Tratamiento de 60 o 120 min con 20 µM doxorrubicina con o sin 10 µM de MFP. La fluorescencia de la doxorrubicina fue medida por fluorometría (488/590) y cuantificada del mismo modo que para HepG2. Cada punto representa una medición por triplicado. *: $p<0,05$ y ***: $p<0,001$ respecto del tratamiento sólo con doxorrubicina. **Arriba izquierda:** Expresión de P-gp en extractos totales de células HUVEC analizada por WB.

Como resultado preliminar se observó que, al igual que en las células HepG2, el tratamiento combinado con MFP aumentó significativamente la acumulación intracelular de doxorrubicina. Además, se observa que en esta línea celular ambos tratamientos llegan a una meseta a los 60 min ya que, a diferencia de los resultados con HepG2, no son significativas las diferencias entre la acumulación de doxorrubicina intracelular a 60 y 120 min dentro de los mismos tratamientos. Sin embargo, éstos resultados aún deben ser corroborados repitiendo el experimento.

DISCUSIÓN

Dada la gran mortalidad provocada por las MC en pacientes con CM (Ferlay J, 2015) (SIVER/INC, 2016) y a su vez los severos efectos secundarios causados por las terapias utilizadas en su tratamiento (Aoyama H, 2015) (Chamberlain, 2012) (Boogerd W, 2007) (DeAngelis LM, 2002) (Lawrence YR, 2010), en este trabajo nos planteamos la posibilidad de inhibir temporal y específicamente la actividad de la proteína transportadora de drogas P-gp de la BHE previo a la administración de una droga terapéutica, que normalmente es expulsada del cerebro por esta molécula, aprovechando la ventana de tiempo donde la actividad bombeadora de la P-gp está reducida (Bauer, 2005); (Ford JM, 1996); (Polli JW, 2009); (Lecureur V, 1994).

Desde que la función de la P-gp fue descubierta, se han desarrollado múltiples inhibidores de su actividad, pero ninguno ha sido utilizado en la clínica con efectividad (Miller DS B. B., 2008); (Fellner S, 2002); (Kemper EM, 2004); (Ford JM, 1996). En la búsqueda de un inhibidor temporal de la P-gp hemos decidido utilizar la MFP, que se desarrolló como antiprogestágeno siendo también un fuerte antagonista de GR (Chen J, 2014). Luego, Gruol y col. (Gruol DJ, 1994) y Lecureur y col. (Lecureur V, 1994) comprobaron que la MFP es capaz de revertir el fenotipo MDR de células tumorales *in vitro*, inhibiendo la actividad de la P-gp de forma similar al verapamilo, potente inhibidor de P-gp (Ford, 1990); (Lecureur V, 1994). Sin embargo, y a diferencia de este inhibidor de primera generación, la MFP no provoca cardiotoxicidad u otro efecto secundario severo (Chen J, 2014).

Para poder evaluar si existe algún beneficio terapéutico en la utilización de un tratamiento combinado de MFP con un quimioterápico que, por lo general no ingresa al cerebro en cantidades suficientes como para reducir el tamaño de las metástasis cerebrales de cáncer de mama (Chamberlain, 2012); (Peerboom, 2005); (Lockman PR, 2010), se decidió desarrollar un modelo murino de la enfermedad.

El quimioterápico elegido para el estudio del efecto combinado con MFP *in vivo* fue la doxo, ya que se sabe que la doxo además de ser uno de los quimioterápicos más utilizados en terapias sistémicas, es sustrato de la P-gp (Walker JV, 2004); (Park J, 2016). En especial, decidimos utilizar la droga en la formulación de liposomas pegilados ya que permanece más tiempo en circulación (menor clearance) que la doxorrubicina libre, lo que permite un mayor ingreso de la droga al cerebro (Anders CK, 2013).

Para lograr el objetivo planteado decidimos utilizar como modelo la línea celular de cáncer de

mama humano triple negativo MDA-MB-231-Br, ya que el subtipo triple negativo tiene un alto índice de metástasis a cerebro (Costa R, 2017) y, en especial, porque esta línea celular fue seleccionada *in vivo* por el laboratorio del Dr. Masagué para incrementar sus probabilidades de metastatizar a cerebro (Bos PD, 2009). Además, dado que la MFP es un antiprogestágeno con efectos anti-neoplásicos en tumores que presentan mayor proporción de isoforma A de PR que de isoforma B (Rojas PA, 2017); (Wargon V, 2015), evitamos la variabilidad que impondría este efecto en nuestros resultados utilizando una línea triple negativa. Un beneficio extra que aportó la utilización de esta línea fue que las células expresan GFP y Luciferasa, lo que nos permitió aplicar otros métodos de detección y cuantificación, además del histológico.

Actualmente, es muy difícil lograr un modelo apropiado para el estudio de las metástasis cerebrales, dado que las técnicas utilizadas para incrementar la probabilidad de que las células tumorales ingresen en cerebro, tales como la inyección intracarótida o intracardíaca, son difíciles de implementar exitosamente (Ushio Y, 1977); (Weil RJ, 2005); (Kim LS, 2004); (Samala R, 2016). Además, la evaluación de la existencia de metástasis en cerebro requiere por lo general la utilización de equipos de alta tecnología como resonadores magnéticos para ratones, PET CT o equipos de detección de bioluminiscencia, en especial si el objetivo del trabajo es evaluar si un tratamiento combinado es más efectivo al reducir el tamaño o número de las metástasis cerebrales que aquel tratamiento con un solo agente (Hamilton AM, 2012). Es por ésta razón que nuestro primer objetivo específico fue desarrollar un modelo adecuado para el estudio de este efecto sobre las metástasis cerebrales de cáncer de mama.

Dado que el método intracardíaco es ampliamente utilizado por diversos grupos para la generación de metástasis experimentales (Yoneda T, 2001); (Lorger M, 2010); (Lockman PR, 2010), y fue el elegido por el laboratorio del Dr. Massagué para la selección de la línea MDA-Br (Bos PD, 2009), decidimos iniciar utilizando este modelo, que aumentaría las probabilidades de que las células circulen por el torrente sanguíneo e ingresen al cerebro de los ratones. Sin embrago, ésta resultó ser una técnica complicada ya que sólo teníamos nuestro conocimiento de la anatomía murina para guiar el ingreso de la aguja al ventrículo izquierdo del corazón de los ratones. El porcentaje de ratones con tumores cerebrales fue menor al esperado y debido a los numerosos focos metastásicos en diversos órganos, el estado de salud de los ratones no nos permitió incrementar los tiempos del experimento para intentar obtener un mayor porcentaje de ratones con metástasis experimentales en cerebro. Además, los tumores observados en los cortes de cerebro resultaron ser muy pequeños y dispersos, para lo cual si necesitamos observar el efecto de un tratamiento combinado sobre el número o tamaño de las metástasis experimentales en cerebro en comparación con el tratamiento de un solo

agente, deberíamos cortar y analizar el cerebro completo de cada uno de los ratones.

Una posible mejora de este método sería inyectar las células junto con luciferina para poder observar instantáneamente por bioluminiscencia si la inyección fue en el ventrículo izquierdo y éstas ingresaron a la circulación sistémica o si, erróneamente, ingresaron a la circulación pulmonar, donde tienen menos probabilidad de llegar al cerebro (Samala R, 2016).

El método de bioluminiscencia, utilizado por diversos grupos de investigación (Lorger M, 2010); (Anders CK, 2013); (Bos PD, 2009); (Samala R, 2016); (Renier C, 2016); para la detección de tumores en cerebro de modelos murinos, no resultó efectivo, en este caso, para la observación de las metástasis experimentales en cerebro ni para la cuantificación del tamaño tumoral o densidad tumoral en éste. Esto podría deberse a que el equipo utilizado no fue lo suficientemente sensible para detectar los pequeños focos tumorales a través del cráneo de los ratones. Debido a estos resultados, este modelo no fue el más adecuado para la evaluación del efecto terapéutico de la combinación de MFP con doxo.

Dado que las células MDA-Br fueron seleccionadas para aumentar su capacidad de generar metástasis en cerebro, el segundo modelo desarrollado fue el subcutáneo. Esto permitiría lograr el establecimiento de un tumor primario y metástasis cerebrales espontáneas, de modo similar a la progresión de la enfermedad en pacientes humanos. De acuerdo a la bibliografía encontrada hasta la fecha (Weil RJ, 2005), (Price JE, 1990), este es el primer trabajo que reporta haber logrado obtener metástasis cerebrales a partir de un modelo subcutáneo con la línea celular MDA-Br. Este modelo, a diferencia del ic., requirió tiempos más prolongados para el desarrollo de metástasis en cerebro (60 días), pero presentó las mismas características histológicas que el ic. y tampoco fue posible detectar las metástasis en cerebro por bioluminiscencia. Sin embargo, la efectividad del modelo para generar metástasis en cerebro con la línea MDA-Br, superó a la del modelo ic. Esto indica que este podría ser un buen modelo para validar los resultados del tratamiento combinado con un método de detección más sensible como la citometría de flujo o por imágenes de resonancia magnética, ya que los cortes de todo el cerebro no fueron efectivos para cuantificar el efecto del tratamiento.

Si bien éste no fue el elegido, se utilizó el modelo sc. para evaluar el posible efecto de la MFP sobre la P-gp de las células tumorales MDA-Br. Se verificó que el tratamiento combinado con MFP no incrementa la eficiencia de la doxo en el tumor sc., esto indicaría que si en cerebro observamos un efecto del tratamiento combinado, éste no se debería a una inhibición de la P-gp de las células tumorales MDA-Br. Sin embargo, este experimento debe ser repetido con tumores sc. de menor tamaño para poder apreciar con certeza el efecto de los tratamientos en

el crecimiento tumoral mientras los mismos presentan un crecimiento exponencial, que es cuando quimioterápicos como la doxo son más efectivos.

El tercer modelo se desarrolló a partir de la inyección intracraneal de las células tumorales. Este método de inyección, ampliamente utilizado para el estudio de tumores cerebrales y MC en modelos murinos (Renier C, 2016), (Anders CK, 2013), (Morshed RA, 2016), (Fellner S, 2002), permitió controlar la localización de los tumores en el cerebro y que la cantidad de células inicial, que da lugar al tumor, sea aproximadamente la misma en todos los ratones, facilitando la observación y cuantificación del efecto de un tratamiento combinado en el tamaño tumoral.

Teniendo en cuenta que la línea celular MDA-Br expresa GFP y luciferasa, se decidió utilizar los métodos de citometría de flujo y luminometría para cuantificar el número de células tumorales en cerebro. Para lograr esto, primero se tuvo que poner a punto un método de disgregación manual y homogeneización del cerebro que nos permitiera obtener suficientes células enteras aisladas para analizar por citometría de flujo la proporción de células tumorales GFP positivas en la muestra y a su vez adaptar un protocolo de lisis celular para cuantificar la actividad de luciferasa de las células tumorales. Ambos métodos resultaron eficientes para la detección de las células tumorales en cerebro con una alta sensibilidad, sin embargo la citometría de flujo fue más precisa que la luminometría, e introdujo menos variabilidad inter-ratón.

La inyección intracraneal, además, permite utilizar líneas celulares que no han sido descriptas con la capacidad de metastatizar a cerebro, como por ejemplo el tumor murino de cáncer de mama C4-2-HI desarrollado en el laboratorio de la Dra. Lanari. Se seleccionó este tumor como modelo dado que no se inhibe con MFP, por ende se puede descartar que cualquier efecto del antiprogestágeno sobre el crecimiento tumoral en el cerebro, sea a través del PR. Asimismo, el efecto del tratamiento combinado MFP+doxo sobre carcinomas mamarios murinos desarrollados en dicho laboratorio, e inyectados subcutáneamente en ratones, ya ha sido estudiado por Sequeira y col. (Sequeira G, 2014), quienes concluyeron que el tratamiento con MFP no mejoró el efecto de la doxo en tumores sc. no respondedores a antiprogestágenos, como el C4-2-HI. Por ende, se puede descartar que el efecto del tratamiento combinado MFP+doxo sobre este tumor inyectado en cerebro se deba una acción directa de la MFP sobre la P-gp de las células tumorales.

El análisis del tamaño de los tumores C4-2-HI inyectados en cerebro de ratones BALB/c-GFP se pudo realizar exitosamente por medio de la observación por microscopía de fluorescencia de cortes seriados de cerebro, en donde el tumor era fácilmente diferenciable del tejido cerebral

adyacente que expresa GFP. Se observó que la velocidad de crecimiento del tumor C4-2-HI en cerebro es mayor a la de la línea MDA-Br, por lo que se propone disminuir el número inicial de células que se inyectan en el cerebro, de modo que al momento de iniciar los tratamientos, los tumores sean de menor tamaño, logrando un modelo más similar a la patología humana.

Los experimentos con el tumor C4-2-HI permitieron visualizar y cuantificar el volumen tumoral luego de la administración de los tratamientos. Se observó que el tratamiento combinado inhibe el crecimiento tumoral en cerebro, resultados que confirman lo obtenido con el tumor MDA-Br.

En ambas líneas tumorales se verificó que el tratamiento combinado reduce significativamente el crecimiento tumoral respecto del grupo de ratones no tratados. Esto no ocurre con el tratamiento sólo con doxo. A pesar de este alentador resultado, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento combinado y el tratamiento sólo con doxo. Es necesario repetir estos experimentos aumentando el número de animales y disminuyendo la dosis de doxo con el objetivo de evidenciar las diferencias entre el tratamiento sólo con doxo y MFP+doxo.

Dado que el tratamiento simple con MFP no tuvo ningún efecto en el crecimiento tumoral ya sea en el cerebro o en los tumores sc. y que, además, como el tratamiento MFP+doxo no disminuyó el crecimiento de los tumores sc. pero si el de tumores en cerebro, se puede concluir que este antiprogestágeno no ejerce un efecto inhibitorio directo sobre el tumor. Esto sugiere que la MFP podría estar permitiendo un mayor ingreso de la doxo al cerebro.

En este trabajo, proponemos que inhibir temporalmente la actividad de P-gp de las células endoteliales de la BHE permitiría una mayor acumulación de doxorrubicina en estas células, y por ende un mayor ingreso de doxorrubicina al cerebro, en especial a la zona peri- e intratumoral altamente irrigadas por capilares del cerebro (Bauer, 2005); (Chamberlain, 2012); (Miller DS B. B., 2008).

Con el objetivo de evaluar si efectivamente la MFP aumenta la acumulación de doxo intracerebral, se trataron ratones sin tumor con doxo o MFP+doxo de modo de cuantificar la acumulación de doxo en el cerebro haciendo uso de su autofluorescencia. Sin embargo los resultados obtenidos no fueron concluyentes. Uno de los inconvenientes principales en este análisis fue la imposibilidad de usar el microscopio confocal, debido a un mal funcionamiento del aparato, lo que nos llevó a utilizar un microscopio de fluorescencia. Como esta técnica ya había sido utilizada con buenos resultados por Sequeira y col. (Sequeira G, 2014) en tumores de mama del modelo murino, en este caso creemos que el tejido cerebral, debido a sus

características morfológicas, dificultó la observación de la acumulación intracelular de la doxo. Aun así, en las fotografías obtenidas se distingue la presencia de núcleos rojos (doxo), pero no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los tiempos evaluados, por lo que se propone utilizar un microscopio confocal de fluorescencia para aumentar la sensibilidad de detección e incrementar el número de fotos por cerebro con el objetivo de relevar un área mayor del mismo. Consideramos que la técnica utilizada para observar acumulación de doxo en líneas celulares por fluorometría, podría ser más adecuada para evaluar los tratamientos en cerebro. Proponemos hacer macerados de estos cerebros y luego un lisado de las células según el protocolo ya utilizado.

Sería interesante corroborar la efectividad de éstos métodos y comparar los resultados obtenidos con MFP+doxo realizando tratamientos con inhibidores de P-gp conocidos, como verapamilo (Ford, 1990); (Lecureur V, 1994).

Un método comúnmente elegido para evaluar la actividad de la P-gp, en diversos tipos celulares *in vitro*, es la cuantificación de la acumulación intracelular de algún colorante o compuesto fluorescente sustrato de la P-gp (Narang VS., 2008); (Gruol DJ, 1994); (Li YC, 2004) (Lecureur V, 1994). En base a esto, se decidió evaluar si el tratamiento con MFP inhibe la actividad de la P-gp y de esta manera permite un incremento en la acumulación de doxo intracelular, que es fluorescente.

En primera instancia se eligió utilizar como control la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma humano, dado que ésta línea expresa altos niveles de P-gp (Li YC, 2004). Los resultados indican que el tratamiento con MFP incrementa la acumulación de doxo intracelular respecto del tratamiento simple con doxo, y esto se hace aún más evidente con el transcurso del tiempo.

Estos resultados están en línea con los obtenidos por Lecureur y col. (Lecureur V, 1994) quienes demostraron que, en células MDR de hepatoma de rata RHC1 (que sobreexpresa P-gp), la MFP incrementó la retención intracelular de doxorrubicina a partir de una concentración de 5 µM. La retención a 10 µM con MFP fue similar a la del verapamilo a 10 µM pero mayor a la obtenida con la misma concentración de PRG.

Sin embargo, dado que nos interesa estudiar el efecto de la MFP sobre la P-gp de BHE, decidimos realizar el mismo experimento, de forma preliminar, con la línea celular HUVEC de células endoteliales de la barrera hemato-placentaria, que presenta características similares a las células endoteliales de la BHE y expresa niveles fisiológicos de P-gp (Eugenin EA, 2003); (Bos PD, 2009). Observamos que la MFP es capaz de inhibir la actividad de la P-gp lo suficiente como para permitir una mayor acumulación de doxorrubicina intracelular. Sin embargo éstos

resultados aún deben ser corroborados. El modelo ideal de BHE para determinar el efecto de la MFP sobre la P-gp sería el cultivo primario de células de capilares de cerebro de ratón o, en segunda instancia y dado que el método de aislamiento de los mismos es dificultoso (Miller DS N. S., 2000), la utilización de la línea celular hCMEC/D3 (*human Cerebral Microvascular Endotelial Cells*, Merck & Co.) (Dauchy S, 2009). Se propone realizar el experimento de acumulación de doxorrubicina con ésta línea, realizando, además, tratamientos con inhibidores conocidos de la P-gp, como verapamilo, y como control desarrollar líneas celulares a las cuáles se les ha silenciado la expresión de P-gp por siARN.

Para confirmar el mecanismo de acción de la MFP sobre la P-gp de la BHE proponemos utilizar cultivos de la línea celular hCMEC/D3 para evaluar si la inhibición es por unión directa a la P-gp, llevando a cabo un ensayo de competencia por fotoafinidad con [3H]azidopina, tal como lo realiza Lecureur y col. en su línea tumoral (Lecureur V, 1994).

Por otro lado, sería interesante estudiar si la MFP ejerce algún efecto a nivel transcripcional sobre la P-gp, dado que se sabe que la P-gp tiene elementos promotores GC-box y PXR (Miller DS, 2008).

PXR (o SXR en humanos) es miembro de la superfamilia de los factores de transcripción activados por ligando, es activado tanto por esteroides naturales, como pregnenolona, PRG y glucocorticoides; como por antiglucocorticoides sintéticos (Bauer, 2004), (Miller DS, 2008), por ende es factible suponer que la MFP podría afectar la actividad de este factor de transcripción.

Teng y col. (Teng S, 2003) demuestran que la MFP (25 µM) es un activador de PXR y éste, por autorregulación, produce un aumento de la transcripción de ARNm de PXR en hepatocitos humanos *in vitro* y en hepatocitos de ratones tratados *in vivo* con una dosis de 50 mg/kg/día por 3 días.

Sin embargo en los ensayos del trabajo de Narang y col. (Narang VS., 2008) con cultivos primarios de capilares extraídos de cerebro de ratón, no se observó incremento en la expresión de P-gp, BCRP ni PXR (WB) al tratarlos sólo con MFP (250 nM). Tampoco reportan un incremento en la transcripción de PXR o del transportador BCRP. Estos resultados contradictorios tal vez se deban a que PXR presenta diferencias en especificidad tipo-celular dependiente (Narang VS., 2008) y/o a la gran diferencia en las concentraciones de MFP utilizadas.

El GR es capaz de unirse al GC-box, alterando la expresión de muchos genes, entre ellos P-gp. En los trabajos de Miller y col. (Miller, 2010) y Narang y col. (Narang VS., 2008) se comprobó

que la dexametasona, aumenta la expresión de las proteínas P-gp y BCRP en la BHE (WB) y el tratamiento combinado con dexametasona y MFP disminuye esta inducción. Dado que la MFP es un fuerte inhibidor de GR, es lógico suponer que al unirse a GR evitaría que éste active al GC-box y de esta manera podría disminuir parcialmente la transcripción de P-gp. Sin embargo, en el trabajo de Narang y col. reportan que el tratamiento sólo con MFP 250 nM no tuvo ningún efecto en la expresión de P-gp.

Sería interesante evaluar el efecto del tratamiento con MFP utilizando la dosis de 10 µM en células hCMEC/D3, analizando por real time PCR los niveles de ARNm y por WB la expresión de la proteína P-gp, y a su vez, estudiar estos efectos en líneas celulares hCMEC/D3 a las que se les haya silenciado la expresión de PXR o GR.

Por otro lado, la activación de GR induce la transcripción de genes que codifican para proteínas de vías de señalización anti-apoptóticas en células epiteliales de mama (Wu W, 2004). Skor y col. (Skor MN, 2013) demuestran que la MFP antagoniza la inducción de estos genes en líneas celulares triple negativas, con alta expresión de GR, tratadas *in vitro* con glucocorticoides (1 µM). Además, realizan experimentos *in vivo* en un modelo murino de inyección ortotópica de la línea tumoral MDA-MB-231. A diferencia de nuestros resultados con doxo en el tumor sc. MDA-Br, ellos demuestran que el pre-tratamiento con MFP (15 mg/kg/día) una hora antes de la administración de Paclitaxel, por 5 días consecutivos, inhibe significativamente el crecimiento tumoral respecto del tratamiento sólo con Paclitaxel.

En base a todo esto, nos proponemos seguir estudiando las interacciones entre la MFP y las diversas moléculas que intervienen en el transporte de sustancias xenobióticas en la BHE vía P-gp, con el objetivo de comprender el funcionamiento de una droga que podría ser utilizada como adyuvante de la quimioterapia en el tratamiento de metástasis cerebrales.

CONCLUSIONES

El modelo icrl., junto con los métodos de citometría de flujo y medición de volumen tumoral en cortes histológicos, nos permitieron observar que en el tumor no respondedor a MFP C4-2-HI y triple negativo MDA-Br creciendo en cerebro, el tratamiento combinado con MFP y el quimioterápico doxo, induce una disminución en el crecimiento tumoral que no se logra con cada agente en forma individual. Comprobamos también que, *in vitro*, la MFP incrementa la acumulación intracelular de doxorrubicina en la línea celular HepG2 y, preliminarmente en la línea HUVEC. Estos resultados sugieren que la MFP podría inhibir la actividad de la P-gp de BHE permitiendo el ingreso de una mayor cantidad de quimioterápico al cerebro. Más aún, el incremento en la acumulación intracerebral de la doxo podría habilitar la disminución de las dosis de este quimioterápico que, se sabe, provoca graves efectos secundarios. En base a esto proponemos que la MFP no sólo debería ser considerada como tratamiento para carcinomas mamarios con mayor proporción de isoforma PRA>PRB y sus metástasis, sino también como adyuvante de la quimioterapia contra metástasis cerebrales de tumores no respondedores a antiprogestágenos y triple negativos, ejerciendo su efecto sobre la P-gp de BHE.

ANEXO

Cultivo celular, medios y soluciones

- Medio de cultivo

Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium:

Ham's F12, 1:1) (Sigma-Aldrich)…….…… 15,6 g/l

Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich)…..……..... 1,2 g/l

Sulfato de gentamicina (Calbiochem) .....…….…… 50 mg/l

- SFB bovino

SFB (PAA Lab. BIOSER, Argentina) calentado en baño térmico a 56 °C durante treinta minutos para activar el sistema de complemento (decomplementar).

Para el mantenimiento de las líneas celulares se utilizó DMEM/F12, 10 % SFB decomplementado.

- Tripsina-EDTA

Tripsina (Gibco BRL; USA) 0,25 % p/v + EDTA (Cicarelli) 0,2 % p/v, disuelto en PBS 1X y posteriormente filtrado.

Drogas utilizadas en ensayos *in cultivo*

- MFP/RU486 (Sigma-Aldrich), 10 µM. Se disuelve en EtOH puro.
- Doxorrubicina 20 µM (Sigma). Se disuelve en solución fisiológica.

Fijación de Tejidos:

- Formalina 10 %. La solución se preparó en el momento disolviendo Formaldehido (Merck) al 10 % en PBS 1X.
- Paraformaldehído 4 % (Sigma-Aldrich). Se disuelve en PBS 1X.
- Sacarosa 20 % (Anedra). Se disuelve en PBS 1X.

Otras soluciones:

- Solución enzimática para disgregación de tejido tumoral: tripsina (Gibco) 0,25 % mg/ml, colagenasa Tipo II (Gibco) 0,25 % p/v o 850 U/ml, albúmina sérica bovina (Sigma) 0,5 %. Se disolvió en PBS 1X.

- Buffer lisis de cultivos celulares: 10 mM Tris–HCl (pH 7,0) (Sigma), 100 mM NaCl (Cicarelli), 10 mM E.D.T.A. Disódico (Cicarelli), 0,01 % Tritón X-100 (Anedra).
- PBS 10X: 10,9 g Na_2HPO_4 Anhidro (Anedra), 3,68 g Sodio Fosfato Monobásico (Cicarelli), 90 g NaCl (Cicarelli) se disuelven en 1 L de agua Roux. Se lleva a pH 7,2-7,4.
- Solución Fisiológica para perfusión: 0,9 % NaCl (Cicarelli) en agua destilada.

Anestesias:

- Ketamina (Holliday - Scott S.A) 0,05-0,06 ml
- Xilacina (Richmond Vet Pharma) 0,01 ml

Western Blot

Obtención de extractos proteicos

Buffer RIPA (1X) (Cell Signaling Tec. #9806): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 1 % NP-40, 1 % deoxycholato de sodio, 2,5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM b-glicerofosfato, 1 mM Na_3 VO_4, 1 µg/ml leupeptina.

Inhibidores de proteasas:

Los inhibidores de proteasas utilizados en la preparación de los extractos proteicos totales tumorales fueron:

PMSF (Sigma Aldrich). ……. 0,5 mM

ZPCK (Sigma Aldrich)…….. 0,025 mM

TLC (Sigma Aldrich)…….. 0,025 mM

TPCK (Sigma Adrich) …….. 0,025 mM

TAME (Sigma Aldrich)…….. 0,025 mM

Se diluyen 1:100 en el buffer de extracción.

Corrida, transferencia y revelado

- TBS 10X

Para la técnica de western blot se prepara disolviendo las sales en 1 L de agua destilada (Llevar a pH 7,2 con HCl).

NaCl……. 87,66 g

Tris…….. 24,22 g

- TBS-Tween 0,1 %

Para preparar TBST 0,1 % se disuelve 1 ml de Tween 20, en 1 L de TBS 1X.

- Acrilamida 30 %

Se filtra y se conserva a 4 ºC protegida de la luz.

Acrilamida (Gibco)…….. 29 g

Bisacrilamida (Gibco)……. 1 g

Agua destilada c.s.p…… 100 ml

- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. (Llevar a pH con HCl)

Tris…….. 90,85 g

Agua destilada c.s.p…….. 500 ml

- Tris-HCl 1,0 M pH 6,8. (Llevar a pH con HCl)

Tris…… 60,57 g

Agua destilada c.s.p…….. 500 ml

- SDS 10 %

SDS (Gibco)…….. 10 g

Agua destilada c.s.p…….. 100 ml

- Persulfato 10 % (APS)

APS (Gibco)…….. 1 g

Agua destilada c.s.p…….. 10 ml

- Buffer de siembra (loading buffer) 4X

El buffer utilizado para craquear y sembrar las muestras en el gel se preparó de la siguiente manera:

SDS…….. 6 %

β-mercaptoetanol…….. 15 % V/V

Glicerol…….. 60 %

Tris 0,18 M pH 6,8 …….. 0,18 M

Azul de Bromofenol …….. 0,006 % p/v

- Marcadores de peso molecular

Page ruler prestained protein ladder, marcador de peso molecular (Amersham).

- Buffer de corrida 10X

Para transferir la corrida electroforética se utilizó una dilución 1:10 en agua destilada de la siguiente preparación:

Tris…….. 30 g/l

Glicina…….. 144 g/l

SDS…….. 10 g/l

- Buffer de transferencia

Para transferir las proteínas a las membranas de nitrocelulosa se utilizó la siguiente preparación, en 1 L de agua destilada:

Buffer de corrida 10X ……..... 100 ml

Metanol……..... 200 ml

- Membrana de Nitrocelulosa

Hybond C (0,45 µm; Amersham).

- Solución de bolqueo

Para bloquear las membranas de nitrocelulosa se utilizó, según lo indicaran los distintos anticuerpos utilizados leche descremada en polvo al 5 % en TBS-Tween.

- Solución de revelado

Se mezclan las soluciones A y B y se coloca la resultante sobre la/s membrana/s de nitrocelulosa durante 2 min aproximadamente antes de exponer las películas fotográficas.

A) 4,6 ml agua destilada + 333 µl Tris pH 8,8 + 50 µl luminol (Sigma) + 22 µl ácido cumárico (Sigma Aldrich).

B) 4,6 ml agua destilada + 333 µl Tris pH 8,8 + 3.2 µl H2O2 (Merck).

Luminol: 22 mg de luminol en 500 µl de DMSO.

Cumárico: 7,5 mg de ácido cumárico en 500 µl de DMSO.

BIBLIOGRAFIA

Adkins CE, M. R. (2012). Vascular Permeability Within Brain Metastases. In D. Palmieri, *Central Nervous System Metastasis, the Biological Basis and Clinical Considerations* (pp. 55-68). New York - London: Springer Dordrecht Heidelberg.

Albiges L, A. F.-A. (2005). Spectrum of breast cancer metastasis in BRCA1 mutation carriers: highly increased incidence of brain metastases. *Ann Oncol.*, 16(11):1846-7.

Anders CK, A. B. (2013). Pharmacokinetics and efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin in an intracranial. *PLoS ONE*, 8(5): e61359. doi:10.1371/journal.pone.0061359.

Antonadou D, P. M. (2002). Phase II randomized trial of temozolomide and concurrent radiotherapy in patients with brain metastases. *J Clin Oncol.*, 1;20(17):3644-50.

Aoyama H, T. M.-1.-1. (2015). Stereotactic Radiosurgery With or Without Whole-Brain Radiotherapy for Brain Metastases: Secondary Analysis of the JROSG 99-1 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.*, 1(4):457-64. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1145.

Barni S, C. M. (2010). Benefit of adjuvant chemotherapy in elderly ER-negative breast cancer patients: benefits and pitfalls. *2*(10).

Bauer, B., H. A., Fr. G., M. D. (2004). Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Molecular Pharmacology*(66), 66:413–419.

Bauer, B., H. A., F. G., M. D. (2005). Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood-brain barrier. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 1535-3702/05/2302-0118.

Bindal RK, S. R. (1993). Surgical treatment of multiple brain metastases. . *J Neurosurg*, 79(2):210–216.

Boogerd W, d. G. (2007). Temozolomide in advanced malignant melanoma with small brain metastases: can we withhold cranial irradiation? . *Cancer*, 109:306–312.

Bos PD, X. H. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, 459(7249): 1005–1009. doi:10.1038/nature08021.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (72).

Broxterman HJ, G. K. (2009). Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. *Elsevier, Drug Resistance Updates*, 12, 114–126.

Carbonell W, A. O. (2009). The vascular basement membrane as “soil” in brain metastasis. . *PLoS One*, 4:e5857.

Chamberlain, M. (2012). Is There a Role for Systemic Chemotherapy in the Treatment of Brain Metastases? In D. Palmieri, *Central Nervous System Metastasis, the Biological Basis*

and Clinical Considerations (pp. 133-152). New York - London: Springer Science+Business Media Dordrecht.

Chambers TC, M. E. (1990). Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *J Biol Chem.*, 5;265(13):7679-86.

Chaudhary PM, R. l. (1991). Expression and activity of P-Glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoyetic stem cells. *Cell, 66*, Vol. 66, 85-94.

Chen J, W. J. (2014). The unique pharmacological characteristics of mifepristone (RU486), from terminating pregnancy to preventing cancer metastasis. *Medicinal Research Reviews, 0*(00), 00, No. 00, 1–22,.

Clarke CA, K. T. (2012). Age-specific incidence of breast cancer subtypes, understanding the black-white crossover. *JNCI*, 104, 14: 1094-1101.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). Breast and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50.302 women with breast cancer and 96.973 women without the disease. *Lancet*, 360(9328):187-195.

Costa R, G. N. (2017). Systematic analysis of early phase clinical studies for patients with breast cancer: Inclusion of patients with brain metastasis. *Cancer Treat Rev.*, 55:10-15. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.02.006.

Cunningham T L, C. C.-C. (2014). Correlations between Blood–Brain Barrier Disruption and Neuroinflammation in an Experimental Model of Penetrating Ballistic-Like Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*(31), 31:505–514.

Danaei G, H. S. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366, 1784–93.

Dauchy S, M. F. (2009). Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol.*, 1;77(5):897-909. doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.001.

DeAngelis LM, S. W. (2002). Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. *J Clin Oncol.*, 15;20(24):4643-8.

Delattre JY, K. G. (1988). Distribution of brain metastases. *Arch Neurol*, 45(7):741–744.

DeSantis CE, B. F.-T. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24:1495-1506.

Eugenin EA, B. J. (2003). Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier. *Methods, Elsevier*, 29:351–361.

Eugenin EA, B. J. (2003). Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier. *Methods.*, 29(4):351-61.

Evans A, J. J. (2004). Brain metastases from breast cancer: identification of a high-risk group. *Clin Oncol*, 16:345–349.

Fellner S, B. B. (2002). Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest.*, 110(9):1309-18.

Ferlay J, S. I. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: soures, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136:E359–86.

Fidler, I. (2011). The role of the organ microenvironment in brain metastasis. *Semin Cancer Biol.*, 21(2):107-12. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.12.009.

Ford JM, Y. J. (1996). P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: experimental and clinical strategies for its reversal. *Cancer Treat Res.*, 87:3-38.

Ford, J., H, W. (1990). Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacological Reviews, 42*(3), 3(42)155-199.

Franciosi V, C. G. (1999). Front-line chemotherapy with cisplatin and etoposide for patients with brain metastases from breast carcinoma, nonsmall cell lung carcinoma, or malignant melanoma: a prospective study. *Cancer*, 1;85(7):1599-605.

Gavirlovic, I. T., & Posner, J. B. (2005). Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *Journal of Neuro-Oncology*, 75: 5–14.

Gruol DJ, Z. M. (1994). Reversal of multidrog resistance by RU486. *Cancer Research*(54), 3088-3091.

Hamilton AM, F. P. (2012). Imaging experimental brain metastases. In P. D., *Central nervous system metastatis, the biological basis and clinical considerations.* (pp. 69-86). London - New York: Springer Science+Business Media Dordrecht.

Heikinheimo O, R. K. (1993). Dose-response relationships of RU 486. *Annals of Medicine*(25), 25: 71 -76.

Heikinheimo, O., Kekkonen, R., & Lähteenmäki, P. (2003). The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogestin action. *Contraception.*, 68(6):421-6.

Helguero LA, V. M. (2003). Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res.Treat., 3*(79), 79 379-390.

Huang SK, L. K.-D. (1992). Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma bearing mice. *Cancer Research*, 5135-5143.

Hue CD, C. F. (2015). Dexamethasone potentiates in vitro blood-brain barrier recovery after primary blast injury by glucocorticoid receptor-mediated upregulation of ZO-1 tight junction protein. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 35(7):1191-8. doi: 10.1038/jcbfm.2015.38.

Jain RK, d. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* , 8(8):610–622.

Jarden JO, D. V. (1989). Positron emission tomographic measurement of blood-to-brain and blood-to-tumor transport of 82Rb: the effect of dexamethasone and wholebrain radiation therapy. *Ann Neurol.*, 18:636–646.

Kemper EM, V. M. (2004). Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *Eur J Cancer.*, 40(8):1269-74.

Kim LS, H. S. (2004). Vascular endothelial growth factor expression promotes the growth of breast cancer brain metastases in nude mice. *Clin Exp Metastasis*, 21:107–118.

Kocher M, S. R.-S. (2011). Adjuvant whole-brain radiotherapy versus observation after radiosurgery or surgical resection of one to three cerebral metastases: results of the EORTC 22952-26001 study. *J Clin Oncol.*, 10;29(2):134-41. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1655.

Kordon E, L. C. (1991). Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int J Cancer.*(49), 2;49(6):900-5.

Lacey JV Jr, K. A. (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer*, 9, 84.

Lanari C, W. V. (2012). Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocrine-Related Cancer*, 19:35-50.

Lanari, C., M. A., P. C. (1986). Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.*(33), 33(2):215-23.

Lawrence YR, L. X. (2010). Radiation dose-volume effects in the brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 1;76(3 Suppl):S20-7. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.02.091.

Lecureur V, F. O. (1994). The antiprogestin drug RU486 potentiates doxorubicin cytotoxicity in multidrug resistant cells through inhibition of P-glycoprotein function. *FEBS Letters*(355), 355:187-191.

Li YC, F. K. (2004). Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells. *Chemotherapy.*, Jun;50(2):55-62.

Lockman PR, M. R. (2010). Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res.*, 1;16(23):5664-78. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1564.

Lorger M, F.-H. B. (2010). Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *The American Journal of Pathology*, Vol. 176, No. 6.

Meattini I, B. G. (2017). Impact of molecular subtypes classification concordance between preoperative core needle biopsy and surgical specimen on early breast cancer managementt: Single-institution experience and review of published literature. *Eur J Surg Oncol*, 43(4):642-648. doi: 10.1016/j.ejso.2016.10.025.

Michna H, S. M. (1989). Antitumor activity of the antiprogestins ZK 98.299 and and RU 38.486 in hormone dependent rat and mouse mammary tumors: mechanistic studies. *Breast Cancer Res Treat.*, 14(3):275-88.

Miller DS, B. B. (2008). Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 60:196–209, 2008.

Miller DS, N. S. (2000). Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol.*, 58(6):1357-67.

Miller KD, W. T. (2003). Occult central nervous system involvement in patients with metastatic breast cancer: prevalence, predictive factors and impact on overall survival. *Annals of Oncology*, 14: 1072–1077.

Miller, D. S. (2010). Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood–brain barrier. *Elsevier, Trends in Pharmacological Sciences*, 31, 246–254, doi:10.1016/j.tips.2010.03.003 .

Molinolo AA, L. C. (1987). Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst.*(79), 79(6):1341-50.

Morshed RA, M. M. (2016). Cell-Penetrating Peptide-Modified Gold Nanoparticles for the Delivery of Doxorubicin to Brain Metastatic Breast Cancer. *Mol Pharm.*, 13(6):1843-54. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00004.

Mruk DD, C. C. (2011). Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis*, 1:121-122.

Narang VS., F. C. (2008). Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *Am J Physiol, Cell Physiol*, 295: C440–C450, 2008, doi:10.1152/ajpcell.00491.2007.

Nayak L, L. E. (2012). Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep*, 14(1):48–54.

Oberhoff C, K. D. (2001). Topotecan chemotherapy in patients with breast cancer and brain metastases: results of a pilot study. *Onkologie*, 24(3):256-60.

Palmieri, D. (2012). *Central Nervous System Metastasis, the Biological Basis and Clinical Considerations.* National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA,: Editorial Springer Science+Business Media Dordrecht.

Park J, A. M.-Z. (2016). Evaluation of permeability, doxorubicin delivery, and drug retention in a rat brain tumor model after ultrasound-induced blood-tumor barrier disruption. *Journal of Controlled Release*, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.10.011.

Park, J. (2002). Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Research*, 4:95-99.

Patchell RA, T. P. (1990). A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med.*, 22;322(8):494-500.

Paxinos G, F. K. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* San Diego, California, USA: Academic Press.

Peerboom, D. (2005). Chemotherapy in brain metastases. *Neurosurgery*, 57(5 Suppl):S54–S65.

Polli JW, O. K.-W. (2009). An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}meth. *Drug Metab Dispos.*, 37(2):439-42. doi: 10.1124/dmd.108.024646.

Poorolajal J, A. M. (2010). Breast cancer screening (BCS) chart: a basic and preliminary model for making screening mammography more productive and efficient. *Journal of Public Health*, 1-8, doi:10.1093/pubmed/fdx052.

Price JE, P. A. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Research*, 50, 717-721.

Renier C, D. J.-N. (2016). Regression of experimental NIS-expressing breast cancer brain metastases in response to radioiodide/gemcitabine dual therapy. *Oncotarget.*, 7(34):54811-54824.

Rojas P, d. l. (2009). Antiprogestin-induced regression of experimental breast carcinomas transplanted in mouse brains. *AACR Advances in Breast Cancer Research: Genetics, Biology, and Clinical Applications.* , October 13-16, San Diego, California. US. .

Rojas PA, M. M. (2017). Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogestin Responsiveness. *J Natl Cancer Inst.*, 1;109(7). doi: 10.1093/jnci/djw317.

Safa, A. (1992). Photoaffinity labeling of P- glicoprotein in multidrug-resistant cells. *Cancer Investigation, 4*(10), 10(4), 295-305.

Sahores A, L. G.-V. (2013). Novel, Low Cost, Highly Effective, Handmade Steroid Pellets for Experimental Studies. *PLoS One., 5*(8), 15;8(5):e64049. doi: 10.1371/journal.pone.0064049.

Samala R, T. H. (2016). Vinorelbine delivery and efficacy in the MDA-MB-231BR preclinical model of brain metastases of breast cancer. *Pharm Res.*, 33(12):2904-2919.

Sequeira G, V. S. (2014). The effectiveness of nano chemotherapeutic particles combined with mifepristone depends on the PR isoform ratio in preclinical models of breast cancer. *Oncotarget., 5*(10), 30;5(10):3246-60.

Server A, O. T. (2011). Diagnostic examination performance by using microvascular leakage and blood flow derived from 3-T dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging in the differentiation of glioblastoma multiforme and brain metastasis. *Neuroradiology*, 53(5):319-30. doi: 10.1007/s00234-010-0740-3.

Shah PD, N. K. (2017). Application of Panel-Based Tests for Inherited Risk of Cancer. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, 18:16.1–16.27.

SIVER/INC. (2016). *Instituto Nacional del Cáncer*. Retrieved Mayo 16, 2017, from Ministerio de Salud de la Nación: http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer

Skor MN, W. E. (2013). Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.*, 19(22):6163-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3826.

Smart, D. (2012). Radiation Therapy of CNS metastases. In P. D, *Central Nervous System Metastasis, the Biological Basis and Clinical Considerations* (pp. 153-186). New York - London: Springer Dordrecht Heidelberg.

Sperduto PW, K. N. (2012). Effect of tumor subtype on survival and the graded prognostic assessment for patients with breast cancer and brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 1;82(5):2111-7. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.02.027.

Steeg PS, C. K. (2011). Brain metastases as preventive and therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.*, 11(5):352-63. doi: 10.1038/nrc3053.

Stofko DL, W. R. (2012). Surgery for Brain Metastasis. In D. Palmieri, *Central Nervous System Metastasis, the Biological Basis and Clinical Considerations* (pp. 109-132). New York - London: Springer Science+Business Media Dordrecht.

Teng S, J. V.-M. (2003). Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug metabolism and disposition*(31), 11(31)1296–1299.

Tome ME, H. J. (2016). P-glycoprotein traffics from the nucleus to the plasma membrane in rat brain endothelium during inflammatory pain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 0(00) 1–16, DOI: 10.1177/0271678X16661728.

Tonyali O, C. U. (2016). Risk factors for brain metastasis as a first site of disease recurrence in patients with HER2 positive early stage breast cancer treated with adjuvant trastuzumab. *Breast*, 25:22-6. doi: 10.1016/j.breast.2015.11.006.

Ushio Y, C. N. (1977). Metastic tumor of the brain: development of an experimental model. *Ann Neurol.*, 2(1):20-9.

Uster PS, W. P. (1998). Pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL®, CAELYX®) distribution in tumour models observed with confocal laser scanning microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 162: 77–86.

Walker JV, N. J. (2004). DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Investigation*, 20(4), 570–589.

Wargon V, R. M. (2015). Progestin and antiprogestin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *Int J Cancer.*, 136(11):2680-92. doi: 10.1002/ijc.29304.

Weil RJ, P. D. (2005). Breast cancer metastasis to the central nervous system. *American Journal of Pathology*, Vol. 167, No. 4.

Weinberg JS, L. F. (2001). Surgical management of brain metastases. . *Curr Oncol Rep.*, 3(6):476–483.

WHO. (2017). *World Health Organization*. Retrieved Mayo 17, 2017, from Breast Cancer: Prevention and Control.: http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index2.html

Winkler, F. (2012). Possibilities of targeted therapies for brain metastases. In D. Palmieri, *Central Nervous System Metastasis, the Biological Basis and Clinical Considerations* (pp. 87-108). New York - London: Springer Science+Business Media Dordrecht.

Wong ET, B. A. (2004). The role of topotecan in the treatment of brain metastases. *Oncologist.*, 9(1):68-79.

Wu SG, S. J. (2016). Clinical features of brain metastases in breast cancer: an implication for hippocampal-sparing whole-brain radiation therapy. *Ther Clin Risk Manag.*, 13;12:1849-1853. doi: 10.2147/TCRM.S124212.

Wu W, C. S. (2004). Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res.*, 1;64(5):1757-64.

Yoneda T, W. P. (2001). A bone seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res*, 16:1486–1495.

Yu S, Y. X. (2015). Systems pharmacology of mifepristone (RU486) reveals its 47 hub targets and network, comprehensive analysis and pharmacological focus on FAK-Src-Paxillin complex. *Scientific Reports*, 5:7830. DOI: 10.1038/srep07830.

Zhang H, W. F. (2016). Chitosan-based nanoparticles for improved anticancer efficacy and bioavailability of mifepristone. *Beilstein J. Nanotechnol.*(7), 7, 1861–1870.

Zhang L, H. M.-L. (2016). Mifepristone increases mRNA translation rate, triggers the unfolded protein response, increases autophagic flux, and kills ovarian cancer cells in combination with proteasome or lysosome inhibitors. *Mol Oncol.*, 10(7):1099-117. doi: 10.1016/j.molonc.2016.05.001.

Zhang RD, P. J. (1992). Differential permeability of the blood-brain barrier in experimental brain metastases produced by human neoplasms implanted into nude mice. *Am J Pathol.*, 141(5):1115-24.

Zhang S, L. X.-K.-S. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine.*, volume 18, number 11, 1639-1645.