

Puesta al día acerca de NOMAC

El Acetato de Nomegestrol (NOMAC) suprime in vitro e in vivo la proliferación de las células del cáncer endometrial(RL95-2), relacionadas con la expresión de SUFU y Wnt7a

A-ying Ma,† Shu-wu Xie,† Jie-yun Zhou, y Yan Zhu (2017). Nomegestrol Acetate Suppresses Human Endometrial Cancer RL95-2 Cells Proliferation In Vitro and In Vivo Possibly Related to Upregulating Expression of SUFU and Wnt7a. *International Journal of Molecular Sciences*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535830/>

En este estudio se investigó los efectos del NOMAC (Acetato de Nomegestrol) in vitro e in vivo en las células provenientes del cáncer endometrial.

Introducción

El cáncer endometrial es una de las patologías ginecológicas malignas más frecuentes. Su incidencia ha aumentado de manera significativa a lo largo del mundo, especialmente en los países desarrollados.

El adenocarcinoma endometriode forma parte del 80% de los cánceres endometriales y un 5-14% de las mujeres afectadas son menores de 40 años. El pronóstico de este cáncer es más favorable en aquellas mujeres que se encuentran en edad fértil ya que suelen tener tumores bien diferenciados o una invasión endometrial ausente o mínima. Todas estas características pertenecen al cáncer endometrial tipo I (positivo para estrógeno y progesterona).

El tratamiento que se suele llevar a cabo es la cirugía con terapia adyuvante (ej. progestin, radioterapia y quimioterapia). A pesar de que la anexohisterectomía total suele llevar a la remisión completa y tener buen pronóstico a futuro, esta intervención lleva a la infertilidad, por lo que es necesaria la utilización de otros tratamientos, especialmente en aquellas pacientes que todavía desean preservar su fertilidad.

Este tipo de cáncer ha sido tratado con varios derivados de la progesterona como el MA (acetato de megestrol) y el MPA (acetato de medroxiprogesterona). Este último predispone a la formación de trombos, motivo por el cual debe ser suspendido inmediatamente al momento de producir patologías como infarto cerebral, infarto agudo de miocardio o trombo embolismo pulmonar. Además se han reportado casos de recurrencias y otros en los que el tratamiento no fue totalmente efectivo.

El NOMAC o Acetato de Nomegestrol es un progestágeno derivado de la 19 norprogesterona, que se caracteriza por ser muy potente. Se une de manera altamente selectiva al receptor de la progesterona. Presenta efectos antiestrogénicos a nivel del endometrio, y actividad antigonadotrópica sin propiedades androgénicas o glucocorticoideas como el acné, el hirsutismo y la retención de líquidos.

Ha sido utilizado satisfactoriamente para el tratamiento de ciertos trastornos ginecológicos hormonodependientes como alteraciones menstruales, dismenorrea, y síndromes premenstruales. También fue usado como terapia de reemplazo hormonal en combinación con estradiol para el alivio de síntomas propios de la menopausia. Combinado con estradiol también pudo lograr la anticoncepción con un control adecuado del ciclo menstrual y un buen nivel de seguridad. NOMAC no aumenta el riesgo de cáncer de mama y se sospecha que podría evitar su aparición.

Para estudiar in vitro el efecto del NOMAC en el crecimiento del cáncer endometrial se utilizaron dos grupos de células: las RL95-2, provenientes del cáncer endometrial tipo

I(positivo para estrógeno y progesterona) y las KLE propias del cáncer endometrial tipo II(negativo para estrógeno y progesterona). Dichas células fueron incubadas con un gradiente de concentración determinado de NOMAC y MPA (0, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 micromoles\L) por 24, 48 y 72 horas.

También se investigó los efectos del NOMAC in vivo. Se inocularon 40 ratones con RL95-2 y aproximadamente 20 días después el xenoinjerto fue observado en todos los ratones inoculados. Los xenoinjertos que llegaron a un volumen tumoral de 100 mm³ fueron divididos en 5 grupos y tratados con un solvente, MPA o NOMAC por 28 días consecutivos. El MPA fue administrado por vía oral(100 mg\kg equivalentes con la dosis clínica de 500mg) y el NOMAC fue administrado en dosis de 50, 100 y 200 mg\kg en los otros 3 grupos.

Además, para identificar los efectos del NOMAC en la expresión genética de las RL95-2, se realizó un análisis completo del genoma con las micromatrices o chips de DNA(microarray).¹ Luego, se identificó los niveles de expresión de dichos genes a través de RT-PCR y para confirmar la expresión de los genes, se detectaron los niveles de expresión de proteínas codificadas a través de Western Blott.

Resultados

1. NOMAC inhibe de manera concentración dependiente la viabilidad de las RL95-2, en comparación con el MPA, que no logró la inhibición de la proliferación de las mismas(Figura 1).

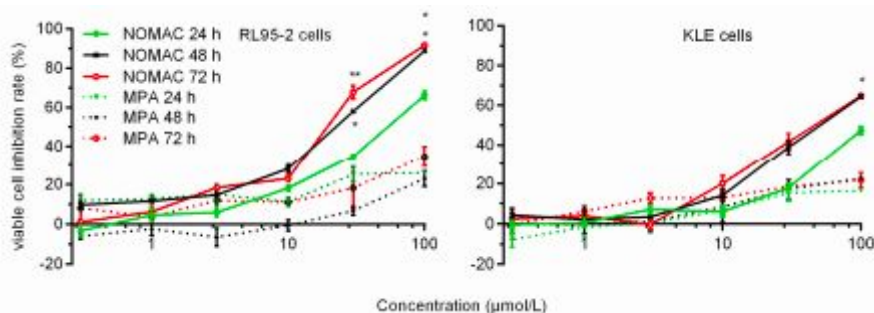


Figura 1. Efectos del NOMAC y del MPA en la viabilidad de las células del cáncer endometrial(RL95-2 y KLE). En esta figura se puede observar cómo al aumentar la concentración del NOMAC, aumenta la inhibición de la proliferación celular, efecto que no se ve en el MPA.

¹ Las micromatrices se utilizan para el análisis del patrón de expresión de genes de cada tumor o muestra de cualquier tejido y pueden determinar la expresión de miles de genes simultáneamente.

2. Efectos del NOMAC en la proliferación de RL95-2 y KLE(Figura 2)

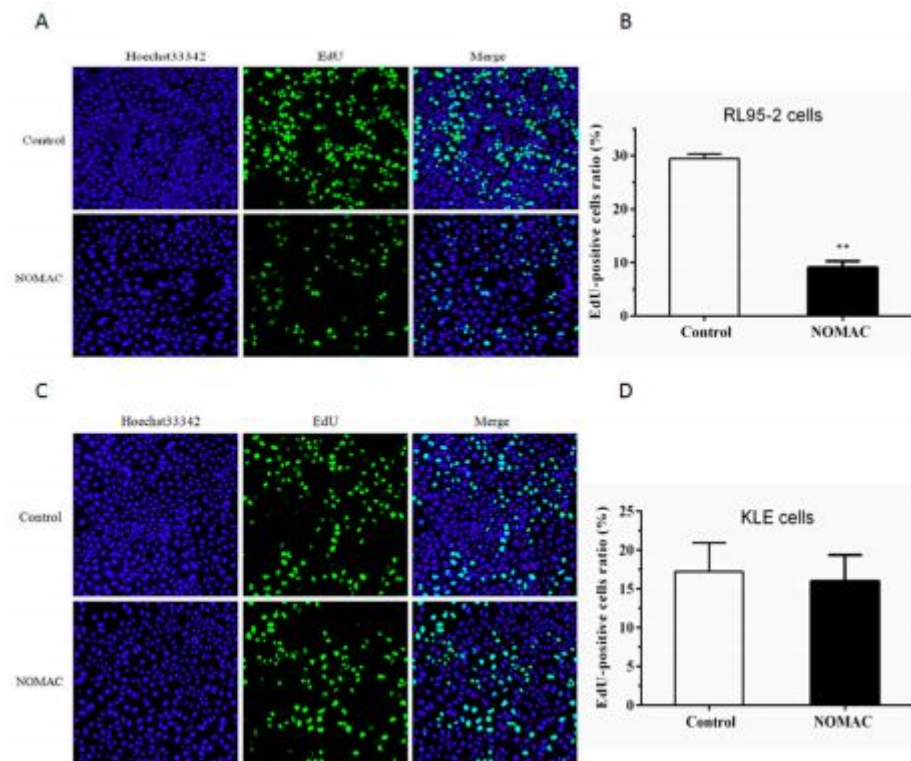


Figura 2. Efectos del NOMAC en la proliferación de RL95-2 y KLE. Todos los núcleos celulares que se ven representados en azul están teñidos con la solución de Hoechst33342. La tinción con EdU se ve en verde e indica nuevo ADN sintetizado. Se puede observar cómo se produjo un importante efecto inhibitorio en la síntesis de ADN en el grupo de RL95-2 que fue tratado con NOMAC, comparado con el grupo control que no recibió tratamiento(AB). A su vez, se evidencia la ausencia de respuesta en las KLE tanto en las que recibieron NOMAC como en las que no(CD).

3. Efectos del NOMAC en el cDNA Microarray

El microarray fue realizado únicamente en las RL95-2 ya que, como fue mencionado anteriormente, no hubo una respuesta significativa en las KLE ante el NOMAC.

En el estudio se identificaron 329 genes que fueron regulados positivamente (upregulated) y 400 que fueron regulados negativamente (downregulated) en comparación con los controles. Se encontró que los genes relacionados con la proliferación del tumor, tal como Wnt7a, SUFU, PTCH2 y Gli2 aumentaron de forma significativa. Posteriormente fueron seleccionados para realizar una RT-PCR para ver si realmente había expresión de dichos genes.

4. Efectos del NOMAC en los niveles de expresión del gen SUFU y el Wnt7a en las RL95-2 y KLE.

Para identificar la vía que media los efectos del NOMAC en la proliferación celular se investigó por RT-PCR los efectos del NOMAC en los niveles de expresión de ARNm de SUFU y Wnt7a, B catenina, PTCH2 y Gli 2. Como resultado se vio que el NOMAC aumenta los niveles de expresión de SUFU y Wnt7a. En cambio, en las KLE, no se vio un aumento significativo de la expresión de ARNm ni de SUFU ni de Wnt7a.

5. Efectos del NOMAC en los niveles proteicos de SUFU y Wnt7a en las RL95-2 y KLE. Luego de confirmar el aumento de los niveles de expresión de ARNm de SUFU y Wnt7a en las RL95-2 y no en las KLE se llevó a cabo un Western Blott para determinar el efecto del NOMAC en los niveles proteicos de SUFU y Wnt7a. Se demostró un aumento de los mismos de manera concentración dependiente (en las RL95-2). El Western Blott también fue realizado en las KLE pero, al igual que en la RT-PCR, el NOMAC no alteró los niveles proteicos de SUFU ni de Wnt7a.

6. NOMAC inhibe in vivo el crecimiento tumoral

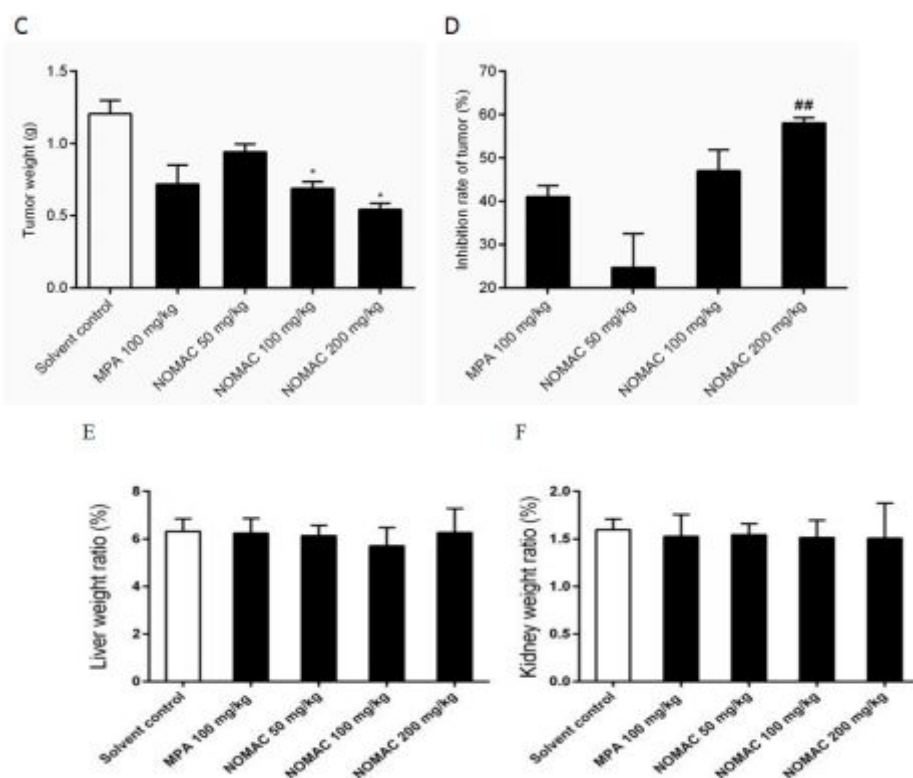


Figura 3. NOMAC y MPA redujeron el crecimiento de los tumores xenoinjertos con las RL95-2. (C) Se observa cómo se redujo o no el peso del tumor al final del tratamiento con los distintos compuestos. (D) Tasa de inhibición del crecimiento tumoral. En el gráfico se ve representada la gran diferencia que hay en la inhibición tumoral cuando se utilizan 200 mg/kg de NOMAC comparado con 100 mg/kg de MPA. (E) y (F) Peso relativo hígado y riñón al final del tratamiento. La similitud en los distintos pesos luego de cada tratamiento puede ser sugestivo que ni el NOMAC y ni el MPA generan importantes efectos adversos en estos órganos.

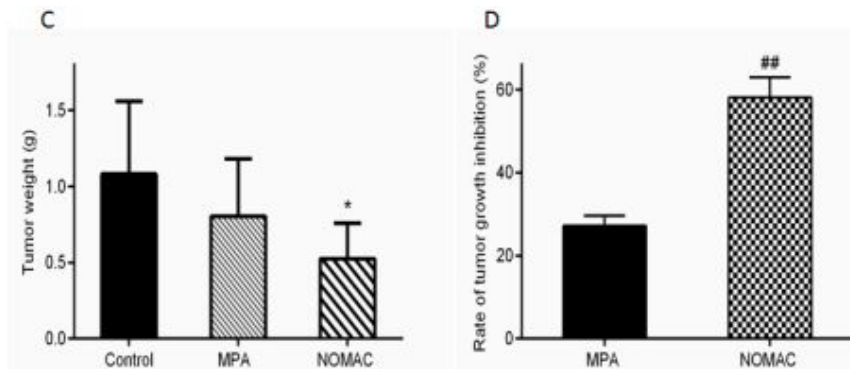


Figura 4. Efectos del uso de la misma dosis (200 mg/kg) de MPA y de NOMAC. (C) Crecimiento tumoral al final del tratamiento. (D) Tasa de inhibición tumoral. Los resultados son mucho mejores cuando se utilizan 200 mg/kg de NOMAC que con MPA.

7. NOMAC suprime la expresión de SUFU y Wnt7a en los tejidos tumorales al igual que lo hace in vitro.

Discusión

En este estudio se encontró que, in vitro, el NOMAC suprime de forma significativa el crecimiento de las RL95-2 (provenientes del cáncer endometrial hormono dependiente o tipo I) y no lo hace en las KLE, (pertenecientes al no hormonodependiente o tipo II). Esto se produce porque las KLE, al no expresar receptores para estrógenos y progesterona, no son sensibles al tratamiento con progestágenos, a diferencia de las RL95-2, que si lo son ya que expresan dichos receptores². Estos resultados, que fueron hallados analizando las tasas de inhibición y los valores de IC50, indicarían que el NOMAC es una opción de tratamiento muy prometedora para aquellos pacientes que presentan cáncer endometrial tipo I, especialmente en aquellas pacientes que presentan adenocarcinomas endometrioides bien diferenciados y que desean preservar su útero o ser madres.

Posteriormente, se utilizaron xenoinjertos para validar la actividad antitumoral del NOMAC. Se pudo comprobar que el NOMAC tiene efectos concentración dependientes más potentes que el MPA en la inhibición de la progresión y el desarrollo de dichos xenoinjertos tumorales, aunque ambos lograron reducir el tumor en mayor medida que los casos control. Además, no se pudo evidenciar ninguna anomalía tanto en el riñón como en el hígado, lo que indicaría que ni el NOMAC y ni el MPA generan importantes efectos adversos en estos órganos.

Realizando un análisis completo del genoma de las RL95-2, se pudo ver que hubo un aumento de la expresión de ciertos genes como el SUFU y el Wnt7a en respuesta al NOMAC (comparado con los casos control que no los expresan). La expresión celular de estos genes, observada en el Microarray, se produjo tanto en las células cultivadas in vivo como en las in vitro. Luego de realizar los microarrays se llevó a cabo la RT-PCR para detectar la expresión del ARNm de estos genes. Tal como fueron los resultados del primer estudio, los niveles de SUFU y Wnt7a se vieron aumentados significativamente en aquellas células tratadas con NOMAC. Por último, se llevó a cabo un Western Blott para detectar los niveles de sus respectivas proteínas y así poder confirmar la expresión de estos dos genes

² Al principio del estudio se detectaron por Western Blott los niveles de ER y PR en la RL95-2 y en las KLE.

en las RL95-2. Efectivamente, dichos niveles aumentaron. Estos resultados sugieren que la inhibición del NOMAC sobre la proliferación celular de las RL95-2 podría estar relacionado con el aumento de la expresión de SUFU (un inhibidor muy importante de la vía de señalización Hh) y Wnt7a.

Conclusión

En las concentraciones testeadas, el mecanismo de acción del NOMAC podría estar relacionado con la regulación de la actividad de los genes SUFU y Wnt7a, encargados de controlar el crecimiento del cáncer endometrial tipo I, conformado por las RL95-2. Estos resultados innovadores podrían facilitar el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de este tipo de cáncer.

Resumen realizado por Guadalupe Romero
IAR Hospital Italiano de Buenos Aires