



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“EVALUACIÓN DEL EFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA COMBINACIÓN DE  
ALBENDAZOL Y MELATONINA SOBRE GLIOBLASTOMA MULTIFORME”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD

PRESENTA

M. en C. Miguel Hernández Cerón

COMITÉ TUTORAL

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda (Codirector)

Dra. Helgi Helene Gisela Franziska Jung Cook (Codirectora)

Dr. Benjamín Pineda Olvera (Asesor)

Ciudad de México, 10 de enero 2024

El presente trabajo fue realizado en:

- El Laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", bajo la dirección de la Dra. Dra. Helgi Helene Gisela Franziska Jung Cook.
- El Laboratorio de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, bajo la dirección del Dr. Benjamín Pineda Olvera.
- El Laboratorio de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, bajo la dirección del Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.
- El Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Helgi Helene Gisela Franziska Jung Cook.
- El Laboratorio de Neurofarmacología Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

El autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 419514, que comprendió del periodo de 15 de enero de 2018 al 31 de enero de 2022. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCyT, con número de referencia 001480.

El autor también agradece por el financiamiento por parte del CONAHCyT para la realización de este proyecto con el número de registro A1-S-40569.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

M. en C. Miguel Hernández Cerón

El día 10 de enero de 2024

JURADO:



Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Presidente



Dra. Helgi Helene Gisela Franziska Jung Cook

Secretaria



Dr. Benjamín Pineda Olvera

Vocal 1



Dra. Francisca Pérez Severiano

Vocal 2



Dra. Tomasa Verónica Barón Flores

Vocal 3

## AGRADECIMIENTOS

### Agradecimientos a las instituciones

- A la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).
  - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Unidad Xochimilco.
  - Laboratorio de Neurofarmacología Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos, Unidad Xochimilco.
  
- Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) "Manuel Velasco Suárez".
  - Laboratorio de Neuropsicofarmacología.
  - Laboratorio de Neuroinmunología.
  - Laboratorio de Neuroquímica.
  - Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología.
  - Departamento de Bioterio.
  - Departamento de Neuropatología.
  
- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
  - Departamento de Farmacia de la Facultad de Química.
  - Unidad de Experimentación Animal.

Agradecimientos a los académicos y profesionales de la salud de las instituciones

Dra. Helgi Helene Gisela Franziska Jung Cook. Laboratorio de Neuropsicofarmacología, INNN. Departamento de Farmacia, UNAM.

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda. Laboratorio de Neuroquímica, INNN. Laboratorio de Neurofarmacología Molecular, UAM.

Dr. Benjamín Pineda Olvera. Laboratorio de Neuroinmunología, INNN.

Dra. Francisca Palomares Alonso. Laboratorio de Neuropsicofarmacología, INNN.

Dra. Roxana Magaña Maldonado. Laboratorio de Neuroinmunología, INNN.

Dr. Luis Tristán López. Laboratorio de Neuroquímica, INNN.

Dra. Edith González Guevara. Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología, INNN.

Dr. Daniel Rembao Bojorquez. Departamento de Neuropatología, INNN.

Química Noemí Gelista Herrera. Departamento de Neuropatología, INNN.

Químico Israel Torres Ramírez de Arellano. Departamento de Neuropatología, INNN.

## Agradecimientos personales

A Dios.

A mis Padres (Miguel Hernández Rodríguez y Catalina Cerón Hernández) y hermanos (Toño, Jesús, Lety, Carmen y Ana María).

A mi esposa Nancy Ixtlahuaca, mis hijos Miguel Roberto y Nancy Michelle, así como a mis suegros Roberto y Amada.

A colaboradores, compañeros, estudiantes y amigos: Carmen Rubio, Fabrizio Fernández, Francisca Pérez, Francisca Palomares, Héctor Lazcano, Susana Rojas, Javier Franco, Jetzabet Fragoso, Jonathan Pérez, Josefina Romero, Juan Carlos Martínez, Leonardo Florencio, Norma Alegría, Paola Camacho, Paulo Cesar Muñoz, Salvador Rangel.

A grupo Tlalpan y las experiencias compartidas con Arturo, Alejandro, Capulina, etc.

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

### Declaración de originalidad

El que suscribe el Maestro en Ciencias Miguel Hernández Cerón, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, y autor de la tesis o titulada: "Evaluación del efecto *in vitro* e *in vivo* de la combinación de albendazol y melatonina sobre glioblastoma multiforme".

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctor es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 10 de enero del 2024.

Atentamente

M en C Miguel Hernández Cerón

*Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.*



#### DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA  
Av. Vasco de Quiroga 4871  
Col. Santa Fe,  
Cuajimalpa de Morelos  
C.P. 05300, Cd. México  
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA  
Av. Ferrocarril San Rafael  
Atlixco 188, Col. Leyes de  
Reforma 1a Sección, Iztapalapa  
C.P. 09310, Cd. México  
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA  
Av. De las Garzas 10  
Col. El Panteón,  
Lerma de Villada  
C.P. 52005, Edo. de México  
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO  
Calz. del Hueso 1100,  
Col. Villa Quietud,  
Coyoacán  
C.P. 04960, Cd. México  
55 5483 7000 ext. 7504

[doctoradocbs@correo.uam.mx](mailto:doctoradocbs@correo.uam.mx)

<http://posgradocbs.uam.mx>

## CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

### Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 10 de enero del año 2024, quien suscribe el Maestro en Ciencias Miguel Hernández Cerón, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autor intelectual de la tesis titulada "Evaluación del efecto *in vitro* e *in vivo* de la combinación de albendazol y melatonina sobre glioblastoma multiforme", bajo la dirección del Comité Tutorial conformado por el cotutor, el Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda, la cotutora, la Dra. Helgi Helene Gisela Franziska Jung Cook, y el asesor el Dr. Benjamín Pineda Olvera, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor o del Comité Tutorial del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico [miguelqfbuamx@gmail.com](mailto:miguelqfbuamx@gmail.com); si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**M en C Miguel Hernández Cerón**

**2181800673**



#### DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA  
Av. Vasco de Quiroga 4871  
Col. Santa Fe,  
Cuajimalpa de Morelos  
C.P. 05300, Cd. México  
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA  
Av. Ferrocarril San Rafael  
Atlixco 186, Col. Leyes de  
Reforma 1a Sección, Iztapalapa  
C.P. 09310, Cd. México  
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA  
Av. De las Garzas 10  
Col. El Panteón,  
Lerma de Villada  
C.P. 52005, Edo. de México  
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO  
Catz. del Hueso 1100,  
Col. Villa Quietud,  
Coyoacán  
C.P. 04960, Cd. México  
55 5483 7000 ext. 7504

[doctoradocbs@correo.uam.mx](mailto:doctoradocbs@correo.uam.mx)

<http://posgradocbs.uam.mx>



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Cáncer.....	12
2.2 Tumores en sistema nervioso central.....	12
2.3 Glioblastoma (GB).....	17
2.3.1 Características del GB.....	17
2.3.2 Diagnóstico de GB.....	18
2.3.3 Tratamiento para GB.....	19
2.3.4 Pronóstico de GB.....	21
2.3.5 Terapias en combinación para GB.....	21
2.4 Albendazol (ALB).....	23
2.5 Melatonina (MLT).....	26
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVO GENERAL.....	29
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
7.1 Reactivos, anestésicos y alimento para roedor.....	30

7.2. Líneas celulares.....	30
7.2.1. Cultivo y conteo celular.....	30
7.3. Preparación de soluciones.....	31
7.3.1 Preparación de soluciones para las curvas concentración respuesta.....	32
7.3.1.1 Preparación de la curva de ALB para la evaluación de la relación concentración- respuesta.....	32
7.3.1.2 Preparación de la curva de SOALB para la evaluación de la relación concentración- respuesta.....	32
7.3.1.3 Preparación de la curva de MLT para la evaluación de la relación concentración- respuesta.....	33
7.4 Determinación de la Dosis del efecto medio (Dm).....	33
7.5 Determinación del Índice de Combinación (IC).....	35
7.6 Determinación de cambios morfológicos.....	37
7.7 Determinación del tipo de muerte celular.....	37
7.8 Estudio piloto de sobrevida empleando el modelo de GB en rata.....	38
7.8.1 Preparación de células.....	38
7.8.2 Inoculación de células.....	38
7.8.3 Tratamientos y evaluación de sobrevida.....	39
7.8.4 Evaluación histológica.....	40
7.9 Análisis estadístico.....	42
8. RESULTADOS.....	43
8.1. Valores de Dm de ALB, SOALB y MLT.....	43
8.2. Actividad antiproliferativa de la combinación de ALB con MLT.....	43
8.2.1. Efecto de la combinación de ALB con MLT sobre la morfología y tamaño celular.....	44
8.2.2. Interacción farmacológica de la combinación de ALB con MLT.....	45
8.2.3 Efecto de la combinación de ALB con MLT sobre el tipo de muerte celular.....	47
8.3. Actividad antiproliferativa de la combinación de SOALB con MLT.....	48
8.3.1. Efecto de la combinación de SOALB y MLT sobre la morfología y tamaño celular.....	49

8.3.2. Interacción farmacológica de la combinación de SOALB con MLT.....	49
8.3.3 Efecto de la combinación de SOALB con MLT sobre el tipo de muerte celular.....	51
8.4. Evaluación del estudio piloto en el modelo de GB.....	52
9. DISCUSIÓN.....	55
10. CONCLUSIONES.....	59
11. PERSPECTIVAS.....	60
12. REFERENCIAS.....	61
13 ANEXOS.....	72
13.1. Artículo.....	72
13.2. Difusión y Divulgación Científica.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la OMS de 2021 de tumores del SNC.....	14
Tabla 2. Concentraciones utilizadas para la evaluación de ALB + MLT y SOALB + MLT....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Teorías de origen de tumor cerebral.....	18
Figura 2. Efecto concentración dependiente y Dm.....	43
Figura 3. Actividad antiproliferativa de ALB + MLT.....	44
Figura 4. Efecto en la morfología celular con ALB + MLT.....	45
Figura 5. Interacción farmacológica de ALB + MLT en células C6.....	45
Figura 6. Interacción farmacológica de ALB + MLT en células RG2.....	46
Figura 7. Interacción farmacológica de ALB + MLT en células U87.....	46
Figura 8. Mecanismos de muerte celular con ALB + MLT.....	47
Figura 9. Actividad antiproliferativa de SOALB + MLT.....	48
Figura 10. Efecto en la morfología celular con SOALB + MLT.....	49
Figura 11. Interacción farmacológica de SOALB + MLT en células C6.....	50
Figura 12. Interacción farmacológica de SOALB + MLT en células RG2.....	50
Figura 13. Interacción farmacológica de SOALB + MLT en células U87.....	51
Figura 14. Mecanismos de muerte celular con SOALB + MLT.....	52
Figura 15. Evaluación macroscópica e histológica de tejido del modelo de GB.....	54
Figura 16. Evaluación del estudio piloto de sobrevida con la combinación ALB + MLT.....	54
Figura 17. Mecanismos de acción de ALB y MLT a través de los cuales podría presentarse el efecto sinérgico en células de GB.....	58

## **ABREVIATURAS**

7-aminoactinomicina D (7-AAD)  
Ácido desoxirribonucleico (ADN)  
Adenosín trifosfato (ATP)  
ADN mitocondrial (ADNmt)  
Albendazol (ALB)  
Anexina V (AV)  
Barrera hematoencefálica (BHE)  
Bevacizumab (BVZ)  
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol (MTT)  
Carmustina (BCNU)  
Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL)  
Concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>)  
Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT)  
Desviación estándar (DE)  
Dimetilsulfóxido (DMSO)  
Dosis del efecto medio (Dm)  
Especies reactivas de oxígeno (ERO)  
Estados unidos de América (EUA)  
Factor de transcripción nuclear kB (NF-kB)  
Factores de transcripción mitocondriales (TFAM, TFMB1M y TFB2M)  
Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN)  
Fracción afectada (fa)  
Glicoproteína P (PgP)  
Glioblastoma (GB)  
Hexoquinasa (HK)  
Índice de combinación (IC)  
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN)  
Isocitrato deshidrogenasa (IDH)  
Líquido cefalorraquídeo (LCR)  
Lomustina (CCNU)  
Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)  
Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium complementado (DMEMC)

Melatonina (MLT)  
Metil guanina metil transferasa (MGMT)  
Norma Oficial Mexicana (NOM)  
Organización Mundial de la Salud (OMS)  
Piruvato quinasa (PK)  
Proteína quinasa B (AKT)  
Proteína resistente al cáncer de mama (PRCM)  
Proteína tumoral 53 (TP53)  
Quimioterapia (QT)  
Radioterapia (RT)  
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)  
Receptor tirosina quinasa (RTQ)  
Sistema Nervioso Central (SNC)  
Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS)  
Subunidad 1 (complejo I) de NADH deshidrogenasa mitocondrial (MT-ND1)  
Sulfóxido de albendazol (SOALB)  
Temozolomida (TMZ)  
Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

## RESUMEN

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral más agresivo y letal en adultos, el cual presenta infiltración cerebral difusa, resistencia a los medicamentos y alta recurrencia. El tratamiento actual consiste en resección quirúrgica y radioterapia con quimioterapia siendo la temozolomida el fármaco de primera elección, no obstante, la supervivencia es de aproximadamente 15 meses. A pesar de que se han aprobado nuevos tratamientos (Bevacizumab) para pacientes con GB recurrente, la tasa de supervivencia media es de dos años, por lo que se requiere seguir explorando alternativas terapéuticas que ofrezcan mejores resultados. Evaluaciones previas han demostrado la actividad anticancerígena del albendazol (ALB), de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de melatonina (MLT), por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de la combinación MLT con ALB, así como de MLT con SOALB, considerando que este metabolito ha mostrado los niveles más altos en plasma y líquido cefalorraquídeo al administrar el ALB por vía oral; además, realizar un estudio piloto *in vivo* para evaluar el efecto de la combinación ALB con MLT. Para el estudio *in vitro*, se utilizaron células de glioma de rata C6 y RG2 y de glioma humano U87. Se determinó la relación concentración-respuesta en el rango de 0.16 a 1.25  $\mu\text{M}$  para ALB, de 2 a 64  $\mu\text{M}$  para SOALB y de 0.18 a 6 mM para MLT. A partir de los valores de dosis del efecto medio ( $D_m$ ) obtenidos, se seleccionaron las concentraciones para evaluar la eficacia de las combinaciones. La citotoxicidad se determinó por medio del ensayo MTT, y para establecer la interacción farmacológica se utilizó el método de Chou y colaboradores. Los mecanismos de muerte celular (apoptosis y necrosis), se evaluaron empleando anexina V y 7-aminoactinomicina D. El estudio piloto *in vivo* se llevó a cabo en ratas Fischer implantadas intra-cranealmente con células RG2, las cuales se dividieron en los siguientes grupos: control (vehículo), ALB, MLT y la combinación ALB con MLT, y se evaluó la sobrevida con respecto al control. Los resultados *in vitro* mostraron que, en todas las líneas celulares, los fármacos exhibieron actividad citotóxica de manera dependiente de la concentración. Para el ALB, los valores de  $D_m$  en las líneas C6, RG2 y U87, fueron 0.6  $\mu\text{M}$ , 0.6  $\mu\text{M}$  y 0.9  $\mu\text{M}$ ; para SOALB, 20  $\mu\text{M}$ , 26  $\mu\text{M}$  y 36  $\mu\text{M}$ ; y para MLT, 1 mM, 0.9 mM y 0.9 mM,

respectivamente. La mayoría de las combinaciones produjeron un efecto citotóxico sinérgico e indujeron la muerte celular por apoptosis. En el estudio piloto *in vivo* se encontró una tendencia en el incremento de la supervivencia después de la administración de la combinación. Los resultados indican que las combinaciones podrían ser una estrategia potencial para tratamiento del GB, considerando que estos compuestos son menos tóxicos y costosos. Es necesario continuar con las evaluaciones moleculares relacionadas con los mecanismos de acción involucrados y llevar a cabo el estudio final *in vivo*.

Palabras clave: Glioblastoma, albendazol, melatonina, combinación, sinergismo.



## ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is the most aggressive and lethal brain tumor in adults, which presents diffuse cerebral infiltration, drug resistance and high recurrence. The current treatment consists of surgical resection and radiotherapy with chemotherapy, with temozolomide being the drug of first choice; however, survival is approximately 15 months. Although new treatments (Bevacizumab) have been approved for patients with recurrent GB, the average survival rate is two years, therefore, it is necessary to continue exploring therapeutic alternatives that offer better results. Previous evaluations have shown the anticancer activity of albendazole (ALB), its active metabolite, albendazole sulfoxide (ALBSO) and melatonin (MLT), therefore, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* effect of the combination of MLT with ALB, as well as of MLT with SOALB, considering that this metabolite has shown the highest levels in plasma and cerebrospinal fluid when administering ALB orally, in addition to conduct a pilot study to evaluate the *in vivo* effect of the combination ALB with MLT. For the *in vitro* study, C6 and RG2 rat glioma cells and U87 human glioma cells were used. The concentration-response was determined in the range of 0.16 to 1.25  $\mu\text{M}$  for ALB, 2 to 64  $\mu\text{M}$  for ALBSO, and 0.18 to 6 mM for MLT. Based on the mean Dose ( $D_m$ ) values obtained, the concentrations for the combinations were selected. Cytotoxicity was evaluated by means of the MTT assay and drug interaction was determined by the Chou et al. method. Cell death mechanisms: apoptosis and necrosis, were evaluated using annexin V and 7-amino actinomycin D. The pilot study was carried out in Fischer rats implanted intracranially with RG2 cells, which were divided into the following groups: control, ALB, MLT, and the combination of ALB with MLT and survival was evaluated. The *in vitro* results showed that in all cell lines, the drugs exhibited cytotoxic activity in a concentration-dependent manner. For ALB, the  $D_m$  values in lines C6, RG2 and U87 were 0.6  $\mu\text{M}$ , 0.6  $\mu\text{M}$  and 0.9  $\mu\text{M}$ ; for ALBSO, 20  $\mu\text{M}$ , 26  $\mu\text{M}$  and 36  $\mu\text{M}$ ; and for MLT, 1 mM, 0.9 mM, and 0.9 mM, respectively. Most combinations produced a synergistic cytotoxic effect, and the cell death was induced by apoptosis. In the *in vivo* pilot study, a trend in the increase in survival rate after administration of the combination was found. The results indicate that the combinations could be a potential strategy for the treatment of GB, considering that these compounds are less toxic and expensive. It is necessary to continue with the molecular evaluations related to the action mechanisms involved and to perform the final *in vivo* study.

Key words: Glioblastoma, albendazole, melatonin, combination, synergism.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los tumores cerebrales son un grupo heterogéneo de enfermedades de diferentes estirpes celulares, los cuales pueden surgir en el cerebro e inmediaciones (Ostrom y cols., 2022; Fan y cols., 2022). Los tumores se clasifican en cuatro grados, siendo los tumores con clasificación I y II de bajo grado y con mayor sobrevida, mientras que los tumores con clasificación III y IV se consideran de alto grado y con menor sobrevida. El glioblastoma (GB), un tumor de grado IV, es la neoplasia más frecuente y maligna del Sistema Nervioso Central (SNC) (Louis y cols., 2016; Louis y cols., 2021; Tilak y cols., 2021). La incidencia a nivel mundial del GB se encuentra entre 0.59 y 5 por cada 100,000 personas, la cual se está incrementando en muchos países (Grech y cols., 2020). El tratamiento recomendado actualmente consiste en resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia a base de temozolomida, sin embargo, la tasa de supervivencia de los pacientes es reducida, con un promedio de 15 meses en el GB denominado primario y 31 meses en el nombrado GB secundario (Louis y cols., 2016). El mal pronóstico está asociado a alta invasividad infiltrativa de las células cancerígenas, la dificultad de la mayoría de los agentes antitumorales para acceder al SNC debido a la barrera hematoencefálica, la limitación para la acumulación intracelular de fármacos en células cancerígenas mediada por transportadores de eflujo y a los mecanismos de defensa de estas células, donde intervienen enzimas reparadoras del daño inducido al ácido desoxirribonucleico (ADN), como la mediada por la metil guanina metil transferasa, la vía de reparación de desajustes del ADN, el sistema de reparación por escisión de la bases del ADN, así como, la autofagia autoprotectora (Bae y cols., 2014; Birzu y cols., 2020; Cruz y cols., 2022; Jiapaer y cols., 2018; Lin y cols., 2014; Lozinski y cols., 2021). Por lo tanto, es necesario seguir explorando nuevas alternativas terapéuticas que ayuden a mejorar el pronóstico de los pacientes con GB, las cuales sean económicamente accesibles y seguras.

La búsqueda de nuevas estrategias para GB se ha enfocado al tratamiento con anticuerpos monoclonales, terapias virales, vacunas, reposicionamiento de fármacos y combinaciones de fármacos (Liu y cols., 2022b; Mudduluru y cols., 2016). En los últimos años, se le ha dado gran importancia a la evaluación de combinaciones de fármacos ya que permite utilizar el mecanismo de acción de cada uno para incrementar la eficacia mediante mecanismos sinérgicos o aditivos. Además, se pueden encontrar combinaciones que sean más seguras y mejor toleradas en comparación con los fármacos individuales (Byron y cols., 2018; Cruz Da Silva y cols., 2021; Gouda y Subbiah, 2023).

Considerando la importancia de esta enfermedad y la necesidad de contar con nuevas opciones terapéuticas, para el presente trabajo se seleccionaron las siguientes moléculas: el albendazol, su metabolito activo, el albendazol sulfóxido y la melatonina, las cuales han demostrado presentar efectos citotóxicos en diferentes tipos de cáncer, mediante mecanismos de acción diferentes (Aguayo-Ortiz y cols., 2013; Arieu-Bonnet y cols., 2020; Bai y cols., 2011; Castro y cols., 2016; Chen y cols., 2016; Cipolla-Neto y Amaral, 2018; Franco y cols., 2018; Guerra-Librero y cols., 2021; Kim y cols., 2021; Li y cols., 2017; Liang y cols., 2019; Lissoni y cols., 1996a; Lissoni y cols., 1996b; Macchi y cols., 2004; Marslin y cols., 2017; Martín y cols., 2006; Martín y cols., 2014; Moretti y cols., 2020; Morris y cols., 2001; Pandi-Perumal y cols., 2006; Pizzorno, 2014; Pourgholami y cols., 2005; Pourgholami y cols., 2009; Pourgholami y cols., 2010; Reiter y Benitez, 2009; Sarti y cols., 2013; Son y cols., 2020; Talib y cols., 2021; Tarocco y cols., 2019; Tordjman y cols., 2017; Wang y cols., 2022; Yang y cols., 2021), además de ser económicas, seguras y estar disponibles comercialmente.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer se describe como una enfermedad en la cual se altera la señalización y el metabolismo celular, provocando una división y supervivencia descontroladas de las células alteradas (Upadhyay, 2020). Entre los factores de riesgo para presentar cáncer se encuentran la exposición a productos químicos o a otras sustancias ambientales, la edad, los antecedentes familiares, el tabaco, el alcohol, el sobrepeso, infecciones, así como las mutaciones genéticas (GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016; Plummer y cols., 2016).

De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2019, en la mayor parte del mundo el cáncer representa una de las primeras causas de mortalidad en la población menor a 70 años. En Estados Unidos de América (EUA) esta enfermedad es la primera causa de muerte, mientras que en México se ha reportado como la segunda causa de mortalidad. En 2020 el Observatorio Global de Cáncer reportó más de 19,000,000 de nuevos casos de cáncer y aproximadamente 10,000,000 de muertes, siendo el cáncer de pulmón la principal causa de mortalidad con una estimación de 1,800,000 muertes (18 %), seguido del cáncer colorrectal con más de 900,000 (9,4 %), hígado con más de 830,000 (8,3 %), estómago con más de 768,000 (7,7 %), mama con más de 684,000 (6,9 %) y en el caso de tumores en cerebro se estimaron aproximadamente 251,000 muertes (2.5 %) (Sung y cols., 2021).

### **2.2 Tumores en sistema nervioso central**

Los tumores cerebrales y otros tumores del sistema nervioso central (SNC) son un conjunto heterogéneo y complejo de enfermedades (cánceres) que se derivan del cerebro y sus inmediaciones (Fan y cols., 2022). Con el tiempo su caracterización histopatológica se ha ido mejorando, sin embargo, debido a la extensa variedad de estos tumores y a los recursos necesarios para determinar las alteraciones genéticas y moleculares que presentan (relevantes para su clasificación y graduación), la interpretación de un informe de patología puede ser un desafío actual para la Neuro-oncología (van der Meulen y cols., 2022).

Se sugiere que las causas de este tipo de cánceres, pueden deberse a variaciones genéticas individuales, factores ambientales o exposición ocupacional (Fan y cols., 2022). A nivel mundial se diagnosticaron 308,102 nuevos casos en 2020 (Fan y cols., 2022) y en EUA se reportaron entre 2015 y 2019, 84,264 muertes atribuidas al cáncer en cerebro y

otros tumores del SNC (Ostrom y cols., 2022). En México, los datos epidemiológicos de tumores en SNC están incompletos debido a la falta de un registro nacional de cáncer. En la capital del país los pacientes con tumores del SNC son atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) y el Instituto Nacional de Cancerología (Moreno-Jiménez y cols., 2021). En 2016 se reportó que en los períodos de 1965 - 1978, 1979 - 1992 y 1993 - 2014, se registró un incremento en el número de tumores del SNC tratados en el INNN, con 876 casos, 2,915 casos y 9,005 casos, respectivamente (Aguirre-Cruz y cols., 2016).

A partir de 1979, la OMS desarrolló un sistema de clasificación de los tumores del SNC, basado en la célula de origen del proceso tumoral y las características morfológicas asociadas al pronóstico. Considerando estos fenómenos los tumores se clasifican como:

- Grado I: Tumores circunscritos de lento crecimiento y bajo potencial de conversión a un tumor de mayor malignidad. El tumor se considera benigno, presenta un buen pronóstico puesto que la resección quirúrgica completa se considera curativa. Estos tumores se diagnostican frecuentemente en la infancia.
- Grado II: Tumores de borde difuso, lento crecimiento, a menudo se designan como de “grado bajo” ya que tienen la tendencia a progresar a tumores de mayor malignidad. Los pacientes requieren un control consecutivo mediante resonancias magnéticas o tomografías computarizadas para vigilar que el tumor no vuelva a aparecer.
- Grado III: Tumores infiltrantes con células atípicas o anaplásicas, lesiones de grado intermedio a alto, con actividad mitótica relativamente mayor y evidencia de malignidad.
- Grado IV: Tumores de rápido crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo presentar vasos de neoformación y áreas de necrosis. Presentan un alto nivel de malignidad.

Los términos “glioma maligno” y “glioma de grado alto” comprenden tanto a los gliomas grado III y grado IV.

La clasificación de los tumores en el SNC de la OMS se actualiza continuamente con el objetivo de mejorar el diagnóstico y tratamiento, siendo la más reciente la quinta edición presentada en 2021, la cual se presenta en la tabla 1. Para la taxonomía de los tumores en el SNC en esta edición se destaca la importancia del uso de técnicas moleculares, histológicas y de inmunohistoquímica (Tilak y cols., 2021; Louis y cols., 2021).

Tabla 1. Clasificación de la OMS de 2021 de tumores del SNC. Tomado y modificado de Louis y cols., 2021.

<b>Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de Tumores del Sistema Nervioso Central, quinta edición</b>
<b>Gliomas, tumores glioneuronales y tumores neuronales</b>
<b>Gliomas difusos de tipo adulto</b>
Astrocitoma, IDH-mutante
Oligodendroglioma, IDH-mutante y 1p/19q-codeleciónado
Glioblastoma, tipo IDH-silvestre
<b>Gliomas difusos de bajo grado de tipo pediátrico</b>
Astrocitoma difuso, MYB - o MYBL1 - alterado
Glioma angiocéntrico
Tumor neuroepitelial polimorfo de bajo grado del joven
Glioma difuso de bajo grado, alterado en la vía MAPK
<b>Gliomas difusos de alto grado de tipo pediátrico</b>
Glioma difuso de línea media, H3 K27-alterado
Glioma hemisférico difuso, H3 G34-mutante
Glioma difuso de alto grado de tipo pediátrico, H3-silvestre e IDH-silvestre
Glioma hemisférico de tipo infantil
<b>Gliomas astrocíticos circunscritos</b>
Astrocitoma pilocítico
Astrocitoma de alto grado con características piloides
Xantastrocitoma pleomórfico
Astrocitoma subependimario de células gigantes
Glioma cordoideo
Astroblastoma, MN1 -alterado
<b>Tumores glioneuronales y neuronales</b>
Ganglioglioma
Ganglioglioma infantil desmoplásico / astrocitoma infantil desmoplásico
Tumor neuroepitelial disembrionárico
Tumor glioneuronal difuso con características similares a oligodendroglioma y grupos nucleares
Tumor glioneuronal papilar
Tumor glioneuronal formador de rosetas

<b>Tabla 1 ...continuación</b>
Tumor glioneuronal mixoide
Tumor glioneuronal leptomeníngeo difuso
Gangliocitoma
Tumor neuronal multinodular y vacuolizante
Gangliocitoma cerebeloso displásico (enfermedad de Lhermitte-Duclos)
neurocitoma central
neurocitoma extraventricular
<b>Tumores ependimarios</b>
Ependimoma supratentorial
Ependimoma supratentorial, fusión ZFTA positiva
Ependimoma supratentorial, fusión YAP1 positiva
Ependimoma de fosa posterior
Ependimoma de fosa posterior, grupo PFA
Ependimoma de fosa posterior, grupo PFB
Ependimoma espinal
Ependimoma espinal, MYCN -amplificado
Ependimoma mixopapilar
Subependimoma
<b>Tumores del plexo coroideo</b>
Papiloma del plexo coroideo
Papiloma de plexo coroideo atípico
Carcinoma de plexo coroideo
<b>Tumores embrionarios</b>
<b>Meduloblastoma</b>
Meduloblastomas, definidos molecularmente
Meduloblastoma, activado por WNT
Meduloblastoma, activado por SHH y TP53 de tipo silvestre
Meduloblastoma, activado por SHH y mutante en TP53
Meduloblastoma, no WNT/no SHH
Meduloblastomas, definidos histológicamente
<b>Otros tumores embrionarios del SNC</b>
Tumor teratoideo/rabdoideo atípico
Tumor neuroepitelial cribiforme
Tumor embrionario con rosetas multicapa
<b>Neuroblastoma del SNC, activado por FOXR2</b>
Tumor del SNC con duplicación interna en tándem de BCOR
Tumor embrionario del SNC
<b>Tumores pineales</b>
Pineocitoma
Tumor del parénquima pineal de diferenciación intermedia
Pineoblastoma

<b>Tabla 1 ... continuación</b>
Tumor papilar de la región pineal
Tumor mixoide desmoplásico de la región pineal, SMARCB1 - mutante
<b>Tumores de los nervios craneales y paraespinales</b>
Schwanoma
Neurofibroma
Perineurioma
Tumor híbrido de la vaina nerviosa
Tumor maligno de la vaina del nervio melanótico
Tumor maligno de la vaina del nervio periférico
Paraganglioma
<b>Meningiomas</b>
Meningioma
<b>Tumores mesenquimales, no meningoteliales</b>
<b>Tumores de tejidos blandos</b>
Tumor fibroso solitario
<b>Tumores vasculares</b>
Hemangiomas y malformaciones vasculares
Hemangioblastoma
<b>Tumores del músculo esquelético</b>
Rabdomiosarcoma
<b>Diferenciación incierta</b>
Tumor mesenquimatoso intracraneal, fusión FET-CREB positiva
CIC -sarcoma reordenado
Sarcoma intracraneal primario, mutante DICER1
Sarcoma de Ewing
<b>Tumores condroóseos</b>
<b>Tumores condrogénicos</b>
Condrosarcoma mesenquimatoso
Condrosarcoma
<b>Tumores notocordales</b>
Cordoma (incluyendo cordoma pobremente diferenciado)
<b>Tumores melanocíticos</b>
<b>Neoplasias melanocíticas meníngeas difusas</b>
Melanocitosis meníngea y melanomatosis meníngea
<b>Neoplasias melanocíticas meníngeas circunscritas</b>
Melanocitoma meníngeo y melanoma meníngeo
<b>Tumores hematolinfoides</b>
<b>Linfomas</b>
<b>Linfomas del SNC</b>
Linfoma primario difuso de células B grandes del SNC
Linfoma del SNC asociado a inmunodeficiencia
Granulomatosis linfomatoide



<b>Tabla 1 ... continuación</b>
Linfoma intravascular de células B grandes
<b>Varios linfomas raros en el SNC</b>
Linfoma MALT de la duramadre
Otros linfomas de células B de bajo grado del SNC
Linfoma anaplásico de células grandes ( ALK +/ ALK -)
Linfomas de células T y NK/células T
<b>Tumores histiocíticos</b>
Enfermedad de Erdheim-Chester
Enfermedad de Rosai-Dorfman
Xantogranuloma juvenil
Histiocitosis de células de Langerhans
Sarcoma histiocítico
<b>Tumores de células germinales</b>
Teratoma maduro
Teratoma inmaduro
Teratoma con malignidad de tipo somático
Germinoma
Carcinoma embrionario
Tumor del saco vitelino
Coriocarcinoma
Tumor mixto de células germinales
<b>Tumores de la región selar</b>
Craneofaringioma adamantinomatoso
Craneofaringioma papilar
Pituicitoma, tumor de células granulares de la región selar y oncocitoma de células fusiformes
Adenoma hipofisario/PitNET
Blastoma hipofisario
<b>Metástasis al SNC</b>
Metástasis en el cerebro y el parénquima de la médula espinal
Metástasis a las meninges

## **2.3 Glioblastoma (GB)**

### **2.3.1 Características del GB**

El GB, es el tumor cerebral más común y agresivo, el cual es clasificado como primario es referido molecularmente como isocitrato deshidrogenasa (IDH)-tipo silvestre, con una edad media de diagnóstico aproximada de 62 años, una proporción entre hombres y mujeres de 1.42:1 y una supervivencia general con tratamiento estándar de 15 meses; mientras que el clasificado como secundario, es referido como IDH-tipo mutante (Astrocitoma IDH-tipo mutante), con una edad media de diagnóstico es de 44 años, una proporción entre hombres y mujeres de 1.05:1 y una supervivencia general con tratamiento estándar de 31 meses

(Louis y cols., 2016; van der Meulen y cols., 2022). Así mismo, se ha encontrado que la mayoría de gliomas incluyendo al GB tiene una distribución de localización anatómica principalmente en los lóbulos frontal (28.6 %), temporal (25 %) y parietal (15.3) (Miller y cols., 2021). Por otra parte, se estima que en México los gliomas podrían representar el 33 % de todos los tumores intracraneales (Moreno-Jiménez y cols., 2021), mientras que, en EUA, se ha descrito que la incidencia anual promedio de GB es de 3.21 por cada 100,000 habitantes (Tan y cols., 2020).

En el GB no se ha identificado una lesión precursora que lo genere, por lo que su inicio, su desarrollo y progresión no están plenamente descritos. Se ha propuesto que, en el origen de tumores cerebrales, las células madre y células progenitoras, pueden presentar cambios genéticos, transformándose a células madre de tumores cerebrales, de igual forma, las células diferenciadas como oligodendrocitos y astrocitos pueden desdiferenciarse y convertirse en células progenitoras las cuales posteriormente también se transforman a células madre malignas (Figura 1) (Matos-Rojas y cols., 2012; Beiriger y cols., 2022).

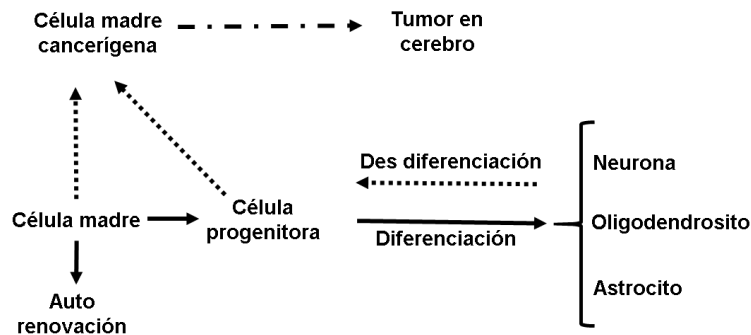


Figura 1. Teorías de origen de tumor cerebral. Modificada de Matos-Rojas y cols., 2012.

### 2.3.2 Diagnóstico de GB

En la mayoría de los casos, el diagnóstico se realiza después de que se presentan síntomas como crisis epilépticas, alteraciones del estado mental o aumento de presión intracraneal. Este diagnóstico tardío podría deberse al lento proceso de diseminación de este tipo de tumores. Las pruebas diagnósticas consisten en un examen neurológico y pruebas diagnósticas por imagen como son: 1. La tomografía axial computarizada; 2. La exploración por tomografía por emisión de positrones; 3. La técnica de resonancia magnética nuclear; 4. Las técnicas de resonancia magnética avanzada que incluyen: a) La técnica de imagen por resonancia magnética funcional, b) La técnica de imágenes de tensor de difusión, c) La

técnica de espectroscopía de resonancia magnética, d) La técnica de resonancia magnética de perfusión para reconocer el grado y el volumen de sangre del tumor cerebral, e) La técnica de imágenes de hemosiderina para identificar la presencia de sangre acumulada en el cerebro y f) La técnica de angiografía de diagnóstico, empleada para crear un mapa de los vasos sanguíneos y el flujo de sanguíneo en el cerebro con un marcaje de contraste (Wen y cols., 2020)

Así mismo, a partir de tejido de áreas de masa tumoral sólida se evalúan marcadores moleculares como, la enzima IDH; la metilación del promotor de la enzima metil guanina metil transferasa (MGMT) (relacionado con la fármacorresistencia); la mutación del gen de la proteína tumoral 53 (TP53) que codifica la proteína p53 (denominada guardián del genoma - supresora de tumores); la mutación de la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) (aumenta el riesgo de contraer cáncer) y la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (mayor tasa de proliferación celular), etc., para clasificar su nivel de agresividad (Silantyev y cols., 2019; Wen y cols., 2020).

### **2.3.3 Tratamiento para GB**

El tratamiento estándar actual para el GB de recién diagnóstico consta de resección quirúrgica, seguida de radioterapia (RT) en combinación con quimioterapia (QT) concomitante y adyuvante. En el caso de la cirugía, a pesar de que el GB no es una enfermedad curable quirúrgicamente, se ha descrito que la resección puede mejorar la supervivencia, potenciar la eficacia de las terapias adyuvantes, ayudar a disminuir la presión intracraneal, reducir del edema peritumoral y disminuir la incidencia de crisis epilépticas, por lo que sigue siendo uno de los procedimientos más importantes para el tratamiento (Erazo-Valle-Solís y cols., 2017; Fisher y Adamson, 2021; Tan y cols., 2020).

La RT fue aprobada entre 1975 y 1980 para su uso después de la cirugía, con la finalidad de mejorar la supervivencia, abarcando el campo del tumor, sus inmediaciones y el edema, con una dosis total de 60 Gray; correspondiente a 30 tratamientos (1 tratamiento = 2 gray por día) en 5 tratamientos por semana durante 6 semanas. Respecto a la QT, ésta inició en los años 70 con los agentes alquilantes, nitrosureas (lomustina (CCNU) y carmustina (BCNU)), así como, un derivado del triazenos (procarbazida). A finales de los 90 se aprobó la temozolomida (TMZ), un alquilante triazeno, la cual se ha convertido en el fármaco de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad conjuntamente con la RT (Altwairgi y

cols., 2017; Erazo-Valle-Solís y cols., 2017; Fisher y Adamson, 2021; Rodríguez y cols., 2012).

Para la terapia concomitante de TMZ y RT, se propone un programa de tratamiento con dosis diarias de TMZ de 75 mg/m<sup>2</sup> vía oral, 1 hora previa a cada sesión de RT sin interrumpir la toma durante los días que no hay sesión de RT. Este tratamiento ha mostrado una mejora en la supervivencia general en comparación con RT sola. Cuatro semanas después de completar la fase concomitante, se administran hasta 6 ciclos de TMZ en monoterapia. En el primer ciclo se administran 150 mg/m<sup>2</sup>/día (nivel de dosis 0) por vía oral durante cinco días consecutivos seguido de 23 días sin tratamiento. En los ciclos subsiguientes, la dosis se puede escalar a 200 mg/m<sup>2</sup>/día (nivel de dosis +1) siempre y cuando no se observe toxicidad significativa en el primer ciclo, y en caso contrario la dosis puede reducirse un nivel de 100 mg/m<sup>2</sup>/día (nivel de dosis -1). Los efectos hematológicos adversos de TMZ incluyen: trombocitopenia, linfopenia y neutropenia; y los no hematológicos incluyen náuseas, anorexia, fatiga y hepatotoxicidad (Altwaigi y cols., 2017).

Cabe mencionar que después de la administración oral, la TMZ se absorbe en el intestino delgado, y se hidroliza a pH fisiológico convirtiéndose en el metabolito 3-metil-(-1-il)imidazol-4-carboxamida, el cual posteriormente forma el 5-aminoimidazol 4-carboxamida y el catión metildiazonio. Este catión es el responsable de agregar grupos metilo a bases de guanina del ADN, lo cual induce la ruptura de los nucleótidos e incluso llega a separar la cadena de doble hélice provocando muerte por apoptosis (Altwaigi y cols., 2017; Hotchkiss y Sampson, 2021; Liu y cols., 2022a).

Los costos aproximados de un tratamiento estándar para GB de acuerdo al tabulador de cuotas de recuperación 2018 publicado en la página de internet del INNN y a los precios obtenidos de la página de internet de la farmacia San Pablo (consultada en 16-10-2023) fueron: Cirugía de GB con un costo máximo de 55,051 pesos, radioterapia estereotáctica fraccionada con un costo máximo de 331,483 pesos y en el caso de la TMZ el tratamiento completo (concomitante y adyuvante), fue de 233,000 pesos, dando un total de 619,534 pesos, sin considerar gastos por hospitalización, estudios histológicos, de imagen y de gabinete, etc. (INNN, 2018; Farmacia San Pablo, 2023).

Las terapias recomendadas para el tratamiento de gliomas de alto grado cuando se presenta la recurrencia son: TMZ, BCNU por vía intravenosa, CCNU por vía oral, Bevacizumab (BVZ) por vía intravenosa y el dispositivo de campos de tratamiento de tumores “Optune®”, entre otros (Erazo-Valle-Solís y cols., 2017; Kim y cols., 2018; Fisher y Adamson, 2021). En México, la guía del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) titulada “Tratamiento del Glioma Cerebral de Alto Grado (Astrocitoma - Oligodendroglioma III-IV) en el adulto” recomienda, previa valoración del paciente, la cirugía recesiva y RT, así como el uso de los siguientes fármacos: TMZ, procarbazona, vincristina, BVZ, BCNU/CCNU, irinotecan, ciclofosfamida y esquemas basados en platino (IMSS, 2013).

#### **2.3.4 Pronóstico de GB**

Para el pronóstico de GB se consideran factores como la edad, grado del tumor, escala de estado funcional de Karnofsky (índice numérico del 0 al 100 para expresar el estado general de salud y la calidad de vida de un paciente), extensión de la resección quirúrgica y los resultados del análisis molecular entre los que se encuentran, la determinación de la mutación del receptor del EGFR y la enzima PTEN más evidentes en GB primario, así como, la mutación de la enzima IDH y la TP53 más evidentes en GB secundario. Además de la valoración del porcentaje de metilación del promotor del gen de la enzima MGMT, el cual en GB primario es bajo y le confiere mayor fármacorresistencia a agentes alquilantes, mientras en el GB secundario es alto y le confiere menor fármacorresistencia (Altwaigi y cols., 2017; De Vleeschouwer, 2017; Ghosh y cols., 2018).

Así mismo, se ha demostrado que la presencia de los transportadores de cassettes de unión a adenosina trifosfato (ATP), como la proteína resistente al cáncer de mama (PRCM) o la Glicoproteína P (Pgp), también contribuyen a la fármacorresistencia debido a sus características de transportadores de eflujo (Bhatia y cols., 2012).

#### **2.3.5 Terapias en combinación para GB**

La combinación de fármacos para el tratamiento del cáncer incluyendo el GB, representa una opción para potenciar la eficacia de esta estrategia; disminuir las dosis de fármacos; contrarrestar mecanismos de resistencia; disminuir efectos adversos, prevenir la recurrencia y eliminar células tumorales residuales.

En 2021, Cruz Da Silva y colaboradores, publicaron una revisión con información de los últimos 20 años donde describieron terapias contra GB en las Fases II-IV de 257 ensayos clínicos (Cruz Da Silva y cols., 2021), de los cuales más de 220 correspondían a estudios de fármacos en combinación. Al hacer una revisión propia el 31 de agosto de 2023, en la página de *Clinicaltrials.org*, empleando las palabras “glioblastoma” y “drug combination”, se encontraron 117 registros de estudios clínicos, lo cual refleja el gran interés de esta estrategia para el tratamiento de esta enfermedad (Clinical trials, 2023).

Algunos de los estudios que han reportado resultados prometedores son los siguientes:

- La combinación de disulfiram con gemcitabina un antimetabolito de células de GB y células madre de GB, generó un efecto sinérgico (Liu y cols., 2012).
- La combinación de melatonina (MLT) con TMZ, doxorubicina y mitoxantrona presentó un efecto sinérgico sobre las células madre tumorales cerebrales y de glioma, lo cual se correlacionó con la regulación a la baja, de la expresión y función del transportador PRCM (Martín y cols., 2013).
- La combinación de sildenafil (inhibidores de la fosfodiesterasa 5) con celecoxib un antiinflamatorio no esteroideo, mostró efectos citotóxicos en células tumorales de glioma humano (Booth y cols., 2015).
- La combinación de sulforafano (inhibidor transcripcional de NF-kB) con TMZ, en líneas celulares resistentes a TMZ dio lugar a la reversión de la quimiorresistencia y aumento de la muerte celular (Ghosh y cols., 2018).
- La combinación de morfina (inhibidor de la Pgp1) con TMZ, mostró reducción del crecimiento tumoral, disminuyendo la quimiorresistencia (Ghosh y cols., 2018).
- La combinación de albendazol (ALB) y nanopartículas de plata y albúmina, mostró un incremento en la citotoxicidad, inhibición de la proliferación y supresión del crecimiento tumoral (Liang y cols., 2018; Liang y cols., 2019).

- La combinación de CCNU con el anticuerpo monoclonal BVZ mostró beneficios clínicos positivos, debido a que la tasa de supervivencia general fue más prometedora en el grupo de combinación (Johanssen y cols., 2023).

En un estudio piloto con 7 pacientes, se encontró que después del tratamiento de la triple combinación compuesta por carboplatino (alquilante) más un inhibidor de la enzima poli ADP ribosa polimerasa (Olaparib) y un inhibidor enzimático de la cinasa MEK (Trametinib), uno de los pacientes alcanzó una supervivencia libre de progresión de 12 meses y en otro paciente la supervivencia libre de progresión fue de 21 meses (Byron y cols., 2018). En 2022 se aprobó la combinación de dabrafenib con trametinib para cáncer, incluyendo pacientes con GB y que presentan mutación en el gen BRAF V600E (Gouda y Subbiah, 2023).

A pesar de la eficacia reportada hasta la fecha con los tratamientos aprobados para GB, así como los resultados obtenidos con las distintas propuestas recientes para contrarrestarlo, aún la esperanza de vida sigue siendo baja y los costos elevados, por lo que es necesario seguir con la búsqueda de nuevas estrategias con las cuales se alcancen altos porcentajes de eficacia, además de que sean accesibles económicamente y seguras. Para la presente investigación, se seleccionó la combinación de ALB con MLT, así como de sulfóxido de albendazol (SOALB) (metabolito activo cuando se administra ALB vía oral, el cual llega a cerebro) con MLT, los cuales por separado y combinados con otros fármacos han mostrado su eficacia contra células cancerígenas. A continuación, se describen las características por las cuales se consideró que las combinaciones podrían tener mayor efecto que el que presentan de manera individual.

#### **2.4 Albendazol (ALB)**

Desde hace algunas décadas, se ha señalado que los fármacos que pueden inhibir la polimerización de la tubulina, pueden producir efectos anti cancerígenos, lo cual se demostró con la vinblastina que actúa uniéndose a los microtúbulos que forman los haces mitóticos durante la metafase, interrumpiendo el ciclo celular (Rendine y cols., 2010). En el año de 1985, se demostró que el nocodazol, un benzimidazol carbamato, utilizado para el tratamiento de cáncer, se une a la beta tubulina interfiriendo en el ensamblaje/desensamblaje de los microtúbulos, lo que impide la mitosis e induce la apoptosis. Ello generó la interrogante acerca de cuáles otros derivados de benzimidazol

carbamato pudieran presentar propiedades anticancerígenas (Lacey y Watson, 1985). A la fecha se ha encontrado que el mebendazol, ALB y flubendazol presentan esta actividad.

El ALB (metil 5-propiltio-1H-benzimidazol-2-il) con peso molecular de 265.3 g/mol es un benzimidazol que inició sus estudios para uso en humanos en el año de 1979 y ha sido utilizado desde 1983 como antihelmíntico de amplio espectro en el tratamiento de diversas parasitosis como la hidatidosis y teniasis (Marriner y cols., 1986; Merino y cols., 2002). En el año de 1987, el ALB mostró ser efectivo en el tratamiento de neurocisticercosis (Escobedo y cols., 1987), siendo a la fecha el fármaco de elección para ese padecimiento con un esquema de dosificación de 15 mg/kg /día por vía oral dividido en 2 dosis cada 12 horas durante 8 días (Sotelo y Jung, 1998). Una vez absorbido, el ALB se metaboliza por 2 sistemas enzimáticos microsomales: sistema flavínmonooxigenasas y el sistema citocromo P450, específicamente el CYP3A4, para formar su metabolito activo, el SOALB, con peso molecular de 281.3 g/mol. Posteriormente se lleva a cabo una segunda oxidación por el CYP3A4 transformando el SOALB a albendazol sulfona, que es un metabolito inactivo (Sotelo y Jung, 1998; Takayanagui y cols., 2002).

Se ha demostrado que el SOALB cruza la barrera hematoencefálica (BHE), por difusión pasiva, alcanzando altas concentraciones en líquido cefalorraquídeo (LCR) (de hasta 50 % de la concentración que hay en plasma), lo cual ayuda a explicar su alta eficacia en el tratamiento de neurocisticercosis parenquimatosa. En 2012, González-Hernández y colaboradores reportaron los niveles en plasma y LCR de SOALB de pacientes con neurocisticercosis tratados con tratamiento de ALB 30 mg kg<sup>-1</sup> durante 7 días, con valores promedio de 1911.4 ± 925.9 ng/ml en plasma y 842.7 ± 517.6 ng/ml en LCR (González-Hernández y cols., 2012).

Los benzimidazoles entre los que se encuentra el ALB, han sido considerados como fármacos potenciales para su uso en cáncer debido a que presenta citotoxicidad mínima en células normales y alta citotoxicidad en células tumorales (Son y cols., 2020). Sus efectos anticancerígenos *in vitro*, se han demostrado en diferentes modelos celulares, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gastrointestinal, leucemia, cáncer de cabeza y cuello y en glioma (Son y cols., 2020). En un estudio piloto en pacientes con cáncer colorrectal y metástasis hepática o carcinoma hepatocelular refractarios a otras terapias, se les administró ALB en dosis de 10 mg/kg diariamente durante 28 días,



encontrando que el fármaco fue bien tolerado y no hubo cambios significativos en la función, renal o hepática. Además, en 2 de los 9 pacientes se presentó una disminución del antígeno carcinoembrionario y en 3 de ellos se estabilizó el antígeno. Sin embargo, en 2 de los pacientes se presentó neutropenia, por lo que fueron retirados del estudio. De este estudio los autores concluyen que sus datos respaldan los resultados *in vitro* previamente obtenidos y avalan el efecto antitumoral del ALB (Morris y cols., 2001).

En un estudio *in vivo* en un modelo de xenoinjeto en ratones desnudos implantados con células HT-29 (adenocarcinoma; colorrectal humano), se encontró que el ALB (150 mg/kg i. p.) provocó la inhibición del crecimiento tumoral peritoneal. Estos resultados concuerdan con los hallazgos *in vitro* en donde se encontró una concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de 0.12  $\mu$ M para ABZ, además de una CI<sub>50</sub> de 2.35  $\mu$ M para SOALB (Pourgholami y cols., 2005). Posteriormente este grupo de investigadores llevó a cabo un estudio clínico fase I para evaluar la dosis máxima tolerada, en el cual se administró ALB por vía oral en dosis de 400 a 1,200 mg, dos veces al día, a pacientes con 15 tipos diferentes de tumores avanzados y refractarios a tratamientos convencionales, encontrando que fue bien tolerado (Pourgholami y cols., 2010). Otro estudio mostró que el tratamiento con ALB disminuyó la viabilidad de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, y prolongó el tiempo de supervivencia en cerca de un 50 % en un modelo murino de carcinoma de ascitis de Ehrlich (adenocarcinoma mamario murino espontáneo) (Castro y cols., 2016).

En el caso de líneas celulares cerebrales, Bai y colaboradores evaluaron la eficacia de diferentes benzimidazoles para el tratamiento de GB. En la línea celular de glioma GL261, el valor de CI<sub>50</sub> para ALB fue de 0.30 $\mu$ M, valor similar al de mebendazol que fue de 0.24  $\mu$ M. En el caso de la línea celular de GB 060919 el valor de CI<sub>50</sub> fue de 0.1  $\mu$ M para ambos fármacos. *In vivo*, empleando el modelo de glioma inducido por inyección intracraneal de células GL261 en ratones C57BL/6, a una dosis de 100 mg/kg, el ALB prolongó el tiempo de vida de los ratones de 30 a 39 días (Bai y cols., 2011). Liang y colaboradores en el 2019, mostraron el efecto citotóxico de ALB en la línea celular C6 reportando un valor de CI<sub>50</sub> de 2.3  $\mu$ g/ml a las 48 horas (Liang y cols., 2019). Así mismo, Marslin G y colaboradores en 2017 informaron un valor de CI<sub>50</sub> de 50.1  $\mu$ M en la línea celular U87 a las 24 horas (Marslin y cols., 2017), mientras que, en 2020, Arie-Bonnet y colaboradores demostraron un efecto dependiente de la dosis de ALB en la viabilidad celular de las células U87, U87vIII, T98G y U251 (Arie-Bonnet y cols., 2020).

A la fecha existe poca información acerca del mecanismo de acción del ALB en GB. Se ha propuesto que el efecto podría estar relacionado a la inhibición de la producción de ATP mediante la inhibición de las enzimas glucolíticas hexoquinasa (HK) y piruvato (PK) quinasa, dando lugar a la inhibición de la proliferación, arresto del ciclo celular y apoptosis de las células tumorales (Liang y cols., 2019).

Es importante mencionar que en modelos *in vitro*, se ha demostrado que el SOALB es sustrato de la proteína de eflujo PRCM, por lo que se ha propuesto el uso de inhibidores de esta proteína para incrementar el tiempo de duración de SOALB en enfermedades sistémicas (Huls y cols., 2009; Martín y cols., 2013; Merino y cols., 2005; Muenster y cols., 2008; Russel, 2010).

## **2.5 Melatonina (MLT)**

La MLT (N-acetil-5-metoxitriptamina), con peso molecular de 232.278 g/mol, es una hormona endógena sintetizada nocturnamente (22:00 a 06:00 horas aproximadamente) por la glándula pineal (pinealocitos), (Macchi y cols., 2004; Pandi-Perumal y cols., 2006). Está descrito que la MLT también se sintetiza en otras zonas como por ejemplo en retina, médula ósea, cerebelo, piel, ovarios y tracto gastrointestinal, encontrándose en esta última zona concentraciones entre 10 y 100 veces mayores que las que se encuentran en sangre y al menos 400 veces más que la concentración en la glándula pineal, lo cual está asociado con la ingesta de alimentos, particularmente aquellos con alto contenido de triptófano. Se propone que el tracto gastrointestinal contribuye a las concentraciones circulantes de MLT (Chen y cols., 2016; Tordjman y cols., 2017). La síntesis de MLT en la glándula pineal, comienza por estímulos de conexiones neuronales entre los ojos y la glándula, para que posteriormente los pinealocitos tomen triptófano de la sangre y, a través de un proceso de hidroxilación y descarboxilación, lo convierten en serotonina. Esta, posteriormente, se convierte en N-acetilserotonina por acción de la N-acetiltransferasa, que después es metilada, en una reacción catalizada por la enzima hidroxilindol-O-metiltransferasa, para dar lugar a la MLT. Una vez en circulación, la MLT se metaboliza principalmente en el hígado por el citocromo P450 a 6-hidroximelatonina que después se transforma a conjugados de glucurónidos (5 %) y sulfatos (70-80 %) los cuales son eliminados en orina. La MLT puede cruzar fácilmente a la mayoría de los tejidos y fluidos incluyendo la BHE debido a su alto grado de lipofilia y una vez en cerebro, una gran parte de ésta se metaboliza a derivados de kinurenina, como la N1-acetil-N2-formil-5-metoxicinuramina y la

N1-acetil-5-metoxicinuramina, las cuales también presentan propiedades antioxidantes. En promedio, la glándula pineal produce entre 0.1 y 0.9 mg de MLT por día y la concentración plasmática máxima oscila entre 60 a 200 pg/ml. El patrón de secreción de MLT, alcanza sus valores más altos entre los 1 - 3 años de vida, posteriormente presenta una disminución del 80 % entre los 15 y 20 años y durante las décadas siguientes, sus niveles disminuyen moderadamente hasta los 70-90 años con valores aproximados de 30 pg/ml (Minich y cols., 2022; Pandi-Perumal y cols., 2006; Reiter y Kormaz, 2008).

Se reportó que aquellos pacientes con GB, tratados con RT y una dosis de 20 mg/día de MLT, presentaron mejor calidad y tiempo de vida en comparación con aquellos pacientes que solo recibieron la RT (Lissoni y cols., 1996a). Lissoni y colaboradores reportaron también que la administración de MLT (20 mg/ día por la noche) con tamoxifen (20 mg día al mediodía) aumentó la eficacia del tratamiento, sugiriendo que la combinación podría beneficiar a pacientes con tumores metastásicos (cáncer de mama y próstata, melanomas, carcinomas de cuello uterino, páncreas, hepatocarcinomas, ovario y pulmón), que presentaron falta de respuesta a QT previa (Lissoni y cols., 1996b).

En el caso de la actividad antitumoral intrínseca, se ha reportado que en células C6 de GB, la MLT a concentración de 1mM, redujo el crecimiento de celular en un 50 % a las 48 horas y en un 70 % a las 72 horas, a través de la alteración de la fase del ciclo celular G1 a S. En los experimentos *in vivo*, en los cuales se implantaron células C6 en ratas Wistar y después de 5 días, se administró MLT durante 12 días por vía intraperitoneal a dosis de 15 mg/kg, se encontró una disminución del 50 % del tumor en el día 14 después del tratamiento en comparación con el control (Martín y cols., 2006). Chen y colaboradores en 2016, realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* empleando células madre de pacientes con GB. Los estudios *in vitro* mostraron que la que MLT podría inhibir las vías de señalización específicas en la auto renovación y supervivencia de las células de GB. El estudio *in vivo* se llevó a cabo empleando ratones desnudos, a los cuales se les implantaron las células madre y se administró MLT 1 mol/l durante 5 días, demostrando un aumento en el tiempo de vida de los animales (Chen y cols., 2016).

Así mismo se ha descrito que la MLT redujo la proliferación de células iniciadoras de GB, (que representan una subpoblación similar a las células madre dentro del GB), responsables del desarrollo, la progresión, la resistencia terapéutica y la recaída del tumor,

induciendo muerte celular por autofagia (Martín y cols., 2014). En otro estudio se encontró que la administración de MLT (100, 500 y 1500  $\mu$ M, durante 1, 3 y 5 días) en células de carcinoma de cabeza y cuello, generó la disminución de la proliferación celular, así como apoptosis, por lo que los autores sugieren que podría ser un posible agente adyuvante en la terapia para pacientes con cáncer (Guerra-Librero y cols., 2021).

Uno de los mecanismos de acción de MLT en células de GB, está relacionado con sus propiedades antioxidantes, reduciendo los niveles basales de radicales libres intracelulares, e inhibiendo el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Esta inhibición está asociada al bloqueo de la vía de señalización de receptor tirosina quinasa(RTQ)/proteína quinasa B (AKT)/NF- $\kappa$ B, dando lugar a la actividad antiproliferativa (Martín y cols., 2006). Otro mecanismo propuesto, es mediante la disminución de la expresión de factores de transcripción mitocondriales (TFAM, TFMB1M y TFB2M) que son esenciales para mantener la integridad del ADN mitocondrial (ADNmt); lo cual está asociado a la reducción de la expresión del gen de la subunidad 1 (complejo I) de NADH deshidrogenasa mitocondrial (MT-ND1). Así mismo se demostró que la MLT disminuye la transición G0/G1 de la fase del ciclo celular, lo cual produjo un aumento en la apoptosis (Franco y cols., 2018).

Se ha planteado que la MLT puede ser un candidato prometedor contra la resistencia farmacológica ya que disminuye la expresión del transportador PRCM presente en las líneas de células madre de tumor cerebral, mejorando el paso y la eficacia de fármacos quimioterapéuticos como TMZ, doxorubicina y mitoxantrona. El mecanismo propuesto por el cual MLT causó la reducción de la expresión del PRCM, fue mediante el aumento de los niveles de metilación del promotor de ese transportador (Martín y cols., 2013). Así mismo se describió la capacidad de esta molécula de proteger células sanas de la toxicidad inducida por fármacos quimioterapéuticos, antiestrógenos y por radiación (González-González y cols., 2018; Vijayalaxmi y cols., 2002).

En el presente trabajo de evaluación del efecto de la combinación de MLT con ALB o con su metabolito activo el SOALB contra GB, los ensayos se realizaron en tres de las líneas celulares más utilizadas, la C6 y RG2 de glioma de rata, así como U87 derivada de humanos, las cuales pueden simular en general la alta tasa de crecimiento, vascularización, infiltración y fármacorresistencia del GB (Giakoumettis y cols., 2018).

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Podría la combinación de albendazol con melatonina, así como de sulfóxido de albendazol con melatonina presentar un efecto citotóxico sinérgico *in vitro* sobre células de glioma?

### **4. HIPÓTESIS**

La combinación de albendazol con melatonina, así como de sulfóxido de albendazol con melatonina presentará al menos un efecto aditivo *in vitro* sobre células de glioma.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto *in vitro* de la combinación de albendazol con melatonina o sulfóxido de albendazol con melatonina en células de glioma y realizar un estudio piloto *in vivo* para evaluar el efecto de la combinación albendazol con melatonina en un modelo de murino de glioblastoma.

### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el índice de combinación de albendazol con melatonina y sulfóxido de albendazol con melatonina en células C6 y RG2 de glioma de rata, así como en células U87 de glioma de humano.
- Determinar los cambios morfológicos de la combinación de albendazol con melatonina y sulfóxido de albendazol con melatonina en células C6 y RG2 de glioma de rata, así como en células U87 de glioma de humano.
- Determinar el tipo de muerte celular que presenta la combinación de albendazol con melatonina y sulfóxido de albendazol con melatonina en células C6 y RG2 de glioma de rata, así como en células U87 de glioma de humano.
- Realizar un estudio piloto para evaluar el efecto de la combinación de albendazol con melatonina empleando el modelo de glioblastoma en ratas Fisher.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Reactivos, anestésicos y alimento para roedor.**

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (D1152); la solución de antibiótico antifúngico (10,000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomina y 25 µg de anfotericina B, por ml), (A5955); la solución de tripsina 10X (059427C); los reactivos ALB (A4673), SOALB (19953), MLT (M5250), azul de tripano (T8154), cloruro de sodio (S5886), cloruro de potasio (P5405), fosfato de sodio dibásico (S0751), fosfato de potasio monobásico (P5655), paraformaldehído (158127), resina de montaje Entellan (HX71792560) y el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol (MTT) (M2128) fueron de la marca Sigma-Aldrich. TMZ fue de Supelco (PHR1437). El suero fetal bovino fue de Biowest (S1650). El kit de detección de apoptosis APC con anexina V (AV) y 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (640930) fue de BioLegend. El dimetilsulfóxido (DMSO) (102952) y el etanol (107017) fueron de Merck. El Cremophor EL (27963) fue de Fluka. El alimento para roedores fue de Labdiet (500I). La ketamina (Reg. Q-7833-028) y la xilacina (Reg. Q-7833-099) fueron de Pisa. El antiséptico (Dermodine) de Protec. El formaldehído fue de tecsiquim (FT1860-8). La parafina fue de Thermo (8330). El Xilol fue de Baker (9490-07). La Hematoxilina de Harris fue de Hycen (738). La Eosina (EC1010) y el agua purificada (A1673) fueron de High purity.

### **7.2. Líneas celulares**

Las líneas celulares de glioma de rata C6 (CCL-107) y RG2 (CRL-2433), así como la línea de glioma humano U87 (HTB-14), de American Type Culture Collection, fueron proporcionadas en el Laboratorio de Neuroinmunología del INNN.

#### **7.2.1. Cultivo y conteo celular**

Las células se cultivaron empleando botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo DMEM al que se le complementó con suero fetal bovino al 10 %, antibiótico y antifúngico al 1 % (DMEM complementado: DMEMC) y se mantuvieron en una incubadora (Panasonic KM-CC17RU1A) a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y 98 % de humedad relativa, hasta que alcanzaron una confluencia entre el 80 y 90 %.

En campana de flujo laminar (Biosafety cabinet BSC-1100IIA2-X), las células confluentes se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS: 27 g de cloruro de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio, 1.15 g de fosfato de sodio dibásico y 0.2 g de fosfato de potasio

monobásico. pH 7.4), posteriormente se añadieron 200 µl de solución de tripsina 1X y se mantuvieron a 37 °C en incubadora durante 5 minutos para despegarlas. Inmediatamente después se agregó 1 ml de DMEMC para neutralizar la tripsina (1.2 ml = volumen total aproximado) e iniciar el conteo de las células. En una cámara de Neubauer (Optik Labor) se depositaron 10 µl de la solución de las células despegadas, más 90 µl del colorante azul de tripano (dilución 1:10) y se colocaron en un microscopio óptico (ZEISS-ICM 400). Se contaron las células viables (refringentes) de los 4 cuadrantes descartando aquellas que estaban teñidas con el colorante. Para el cálculo del número de células en el volumen total se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Concentración células} = (\text{Promedio de número de células en los 4 cuadrantes}) * (\text{factor de la cámara (10,000)}) * (\text{factor de dilución (10)}) * (\text{volumen total aproximado})$$

El tipo de placas y número de células empleado para los diferentes estudios fue el siguiente:

- Estudio de viabilidad celular con MTT, para evaluar la eficacia de los tratamientos. Se utilizaron placas de 96 pozos, conteniendo 3,000 células por pozo en 100 µl de DMEMC.
- Evaluación del tipo de muerte celular (apoptosis y necrosis), por citometría de flujo y marcadores de AV, 7-AAD. Se utilizaron placas de 24 pozos conteniendo 20,000 células por pozo en 1,000 µl de DMEMC.

### **7.3. Preparación de soluciones**

Soluciones madre de ALB, SOALB, MLT y TMZ.

ALB 2,000 µM: se pesaron 1.06 mg del fármaco y se disolvió en 2 ml de DMSO al 100 % utilizando un vortex.

SOALB 20,000 µM: se pesaron 5.6 mg del compuesto y se disolvió en 1 ml de DMSO al 100 % utilizando un vortex.

MLT 200 mM: se pesaron 9.3 mg del compuesto y se disolvió en 200 µl de etanol absoluto utilizando un vortex.

TMZ 100 mM: se pesaron 19.4 mg del fármaco y se disolvió en 1 ml de DMSO al 100 % utilizando un vortex.

### **7.3.1 Preparación de soluciones para las curvas concentración respuesta**

A partir de cada una de las soluciones madre, se prepararon las soluciones para las curvas concentración respuesta, con las concentraciones que se describen a continuación. Todas las diluciones se llevaron a cabo empleando DMEMC en el cual las concentraciones de DMSO y etanol no superaron el 0.5 % y el 3 %, respectivamente.

#### **7.3.1.1 Preparación de la curva de ALB para la evaluación de la relación concentración- respuesta**

De la solución madre de ALB 2,000  $\mu\text{M}$  se tomaron 40  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 8 ml de DMEMC, obteniendo una solución de trabajo con una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . De esta solución de trabajo:

- a) Se tomaron 500  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 1.25  $\mu\text{M}$ .
- b) Se tomaron 332  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.83  $\mu\text{M}$ .
- c) Se tomaron 200  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.55  $\mu\text{M}$ .
- d) Se tomaron 144  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.36  $\mu\text{M}$ .
- e) Se tomaron 96  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.24  $\mu\text{M}$ .
- f) Se tomaron 64  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.16  $\mu\text{M}$ .

#### **7.3.1.2 Preparación de la curva de SOALB para la evaluación de la relación concentración-respuesta**

De la solución madre de 20,000  $\mu\text{M}$  se tomaron 40  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 8 ml de DMEMC, para obtener una solución de trabajo de concentración de 100  $\mu\text{M}$ . De esta solución de trabajo:

- a) Se tomaron 2,560  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 64  $\mu\text{M}$ .
- b) Se tomaron 1,280  $\mu\text{l}$  y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 32  $\mu\text{M}$ .



- c) Se tomaron 640  $\mu$ l y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 16  $\mu$ M.
- d) Se tomaron 320  $\mu$ l y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 8  $\mu$ M.
- e) Se tomaron 160  $\mu$ l y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 4  $\mu$ M.
- f) Se tomaron 80  $\mu$ l y se llevaron a 4 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 2  $\mu$ M.

### **7.3.1.3 Preparación de la curva de MLT para la evaluación de la relación concentración-respuesta**

Para la curva de MLT, esta se preparó a partir de diluciones sucesivas, como se presenta a continuación:

- a) De la solución madre (200 mM), se tomaron 60  $\mu$ l y se llevaron a 2 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 6 mM.
- b) De la solución 6 mM, se tomó 1 ml y llevó a 2 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 3 mM.
- c) De la solución 3 mM se tomó 1 ml y llevo a 2 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 1.5 mM.
- d) De la solución 1.5 mM se tomó 1 ml y llevó a 2 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.75 mM.
- e) De la solución 0.75 mM se tomó 1 ml y llevo a 2 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.375 mM.
- f) De la solución 0.375 mM se tomó 1 ml y llevo a 2 ml de DMEMC para obtener una solución de concentración de 0.1875 mM.

### **7.4 Determinación de la Dosis del efecto medio (Dm)**

La determinación de la Dm equivalente a  $CI_{50}$  de cada uno de los fármacos (ALB, ALBSO y MLT) en las tres líneas celulares (C6, U87 y RG2), se llevó a cabo empleando la metodología de Chou y colaboradores y el software CompuSyn (Chou 2006; Chou y Martin 2005; Chou y Talalay 1984). La ecuación del modelo, empleada para esta metodología, se sustenta en la teoría unificada de las ecuaciones de Scatchard, Hill, Michaelis Menten y Henderson Hasselbalch, la cual que permite describir de la forma más simple posible la relación entre las dosis y efecto y cuya ecuación es la siguiente.

$$\frac{fa}{fu} = \left( \frac{D}{Dm} \right)^m = \text{Ecuación del efecto medio}$$

(ecuación 1)

Donde D es la dosis o concentración utilizada del fármaco, *fa* es la fracción afectada por D (porcentaje de inhibición/100), *fu* es la fracción no afectada ( $fu = 1-fa$ ), *Dm* es la dosis de efecto medio ( $CI_{50}$ ,  $ED_{50}$  o  $LD_{50}$ ) que inhibe el sistema en estudio en un 50 %, y *m* es el coeficiente que significa la forma de la relación dosis-efecto, donde  $m = 1$ ,  $>1$  y  $< 1$  indican curvas dosis-efecto hiperbólica, sigmoidea y sigmoidea plana, respectivamente.

El procedimiento a seguir fue el siguiente: En placas de cultivo de 96 pozos, se sembraron  $3 \times 10^3$  células por pozo de cada una de las tres líneas celulares. Veinticuatro horas después se añadieron 100  $\mu$ l de las soluciones que conformaron cada una de las concentraciones correspondientes a las curvas de los fármacos y se incubaron durante 72 horas. Una vez transcurrido el periodo, las soluciones se reemplazaron con DMEMC y se agregaron 10  $\mu$ l de MTT a una concentración de 5 mg en 1 ml de PBS. Después de 3 horas de incubación, la solución de MTT se sustituyó con DMSO 100 % para disolver los cristales de formazán. Las placas se agitaron durante 5 minutos y se leyó la absorbancia de cada pozo utilizando un lector de microplacas (BiotekSynergy LX) a 570 nm. Se realizaron al menos cuatro experimentos independientes por cada una de las curvas, con seis repeticiones de cada punto de concentración. A partir de las lecturas de absorbancia, se calculó el porcentaje de viabilidad celular mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia grupo tratado}}{\text{Absorbancia grupo vehículo}} \times 100 = \% \text{ viabilidad celular}$$

(ecuación 2)

Posteriormente se calculó el porcentaje de disminución de la viabilidad celular expresado como fracción afectada o inhibición fraccionada (*fa*) de la siguiente manera:

$$fa = 100 - \% \text{ de viabilidad celular} / 100$$

(ecuación 3)

Los valores de concentración y de “*fa*” se ingresaron al software CompuSyn (Chou y Martin 2005) y se determinó el valor de *Dm* de cada fármaco.

## 7.5 Determinación del Índice de Combinación (IC).

Los valores de Dm obtenidos se utilizaron para seleccionar las concentraciones a utilizar en los estudios de combinación y determinar el grado de interacción farmacológica. La metodología recomienda que, en una etapa inicial, se evalúe la combinación empleando una relación de equipotencia, es decir, seleccionar las proporciones de acuerdo a el valor de Dm obtenido para cada fármaco (Dm primer fármaco + Dm del segundo fármaco), con el objetivo de evaluar la contribución de los efectos de cada uno de ellos. Con base en esta recomendación, para el presente trabajo, para la combinación ALB con MLT se seleccionó la relación 1:1 en las tres líneas celulares, mientras que para la combinación ALBSO con MLT se seleccionó la relación 20:1 para la línea C6, 29:1 para la línea RG2 y 40:1 para la U87. Las concentraciones de las combinaciones evaluadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones utilizadas para la evaluación de ALB + MLT y SOALB + MLT.

Línea celular	Soluciones preparadas para combinar		Concentración de la combinación	Soluciones preparadas para combinar		Concentración de la combinación
C6	Relación 1:1			Relación 20:1		
	ALB (µM)	MLT (mM)	ALB (µM) + MLT (mM)	SOALB (µM)	MLT (mM)	SOALB (µM)+MLT (mM)
	1.2	1.2	0.6 + 0.6	40	2	20 + 1
	0.6	0.6	0.3 + 0.3	20	1	10 + 0.5
	0.3	0.3	0.15 + 15	10	0.5	5 + 0.25
	0.15	0.15	0.075 + 0.075	5	0.25	2.5 + 0.12
0.075	0.075	0.0375 + 0.0375	2.5	0.12	1.2 + 0.06	
RG2	Relación 1:1			Relación 29:1		
	ALB (µM)	MLT (mM)	ALB (µM) + MLT (mM)	SOALB (µM)	MLT (mM)	SOALB (µM)+MLT (mM)
	1.2	1.2	0.6 + 0.6	52	1.8	26 + 0.9
	0.6	0.6	0.3 + 0.3	26	0.9	13 + 0.45
	0.3	0.3	0.15 + 15	13	0.45	6.5 + 0.225
	0.15	0.15	0.075 + 0.075	6.5	0.225	3.25 + 0.1125
0.075	0.075	0.0375 + 0.0375	3.25	0.1125	1.625 + 0.05625	
U87	Relación 1:1			Relación 40:1		
	ALB (µM)	MLT (mM)	ALB (µM) + MLT (mM)	SOALB (µM)	MLT (mM)	SOALB (µM)+MLT (mM)
	1.8	1.8	0.9 + 0.9	72	1.8	36 + 0.9
	0.9	0.9	0.45 + 0.45	36	0.9	18 + 0.45
	0.45	0.45	0.225 + 0.225	18	0.45	9 + 0.225
	0.225	0.225	0.1125 + 0.1125	9	0.225	4.5 + 0.1125
0.1125	0.1125	0.05625 + 0.05625	4.5	0.1125	2.25 + 0.05625	

La metodología utilizada para el estudio de combinación fue: En placas de cultivo de 96 pozos, se sembraron en cada pozo,  $3 \times 10^3$  células de cada una de las tres líneas celulares (C6, RG2 y U87). Veinticuatro horas después, se añadieron 100 µl de las soluciones que

se presentan en la tabla 2. Como control de vehículo se utilizó solución de DMSO más etanol a concentraciones que no superaron el 0.5 % y el 3 %, respectivamente. Como control positivo se utilizó la TMZ a una concentración 100 µM. Las células se incubaron durante 72 horas, y una vez transcurrido este periodo, las soluciones se reemplazaron con DMEM y se agregaron 10 µl de una solución de MTT a una concentración de 5 mg/ml. Después de 3 horas de incubación, la solución de MTT se sustituyó por DMSO 100 % para disolver los cristales de formazán. Las placas se agitaron durante 5 minutos y se leyó la absorbancia de cada pozo, utilizando un lector de microplacas (BiotekSynergy LX) a 570 nm. En cada línea celular se realizaron cuatro experimentos independientes. Cada uno de ellos incluyó las cinco concentraciones de la combinación con seis repeticiones de cada punto, tanto para ALB con MLT, así como, para el SOALB con MLT.

Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia, el porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la ecuación 2 y posteriormente, se calculó el porcentaje de disminución de la viabilidad celular expresado como “fa” empleando la ecuación 3.

La ecuación para el cálculo del índice de combinación (IC) que emplea el modelo es la siguiente.

$$IC = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2} = \text{Ecuación general del índice de combinación}$$

(ecuación 4)

Donde (D)1 y (D)2 fueron las dosis de los fármacos en combinación para provocar el mismo efecto. (Dx)1 y (Dx)2 fueron las dosis de cada fármaco de manera individual para ejercer x % de efecto.

Se empleó el programa CompuSyn introduciendo los valores de concentración de cada punto de la combinación y el valor de “fa” obtenido. El cálculo se llevó a cabo empleando el software CompuSyn desarrollado por Chou y colaboradores. El grado de interacción farmacológica representado cuantitativamente indica que un valor de IC = 1 corresponde a un efecto aditivo; un valor de IC <1 corresponde a un efecto sinérgico, mientras que un valor de IC >1 corresponde a un efecto antagónico (Chou 2006; Chou y Martin 2005; Chou y Talalay 1984).

## **7.6 Determinación de cambios morfológicos**

El procedimiento para la evaluación de los cambios morfológicos con microscopía de campo claro fue el siguiente: antes de agregar la solución de MTT, después de las 72 horas de tratamiento, se tomaron microfotografías en un microscopio invertido campo claro (Motic AE31) y un objetivo 20X, de los pozos correspondientes al grupo control (vehículo) y a los tratamientos con el control de TMZ 100  $\mu$ M, las combinaciones, así como con ALB, SOALB y MLT solos.

## **7.7 Determinación del tipo de muerte celular**

Para determinar el tipo de muerte celular por apoptosis y necrosis, se utilizó la metodología de citometría de flujo. Se seleccionaron las combinaciones que presentaron los mayores porcentajes de mortalidad, además de que presentaran interacciones farmacológicas de aditividad o sinergismo. En el caso de la línea celular C6, las combinaciones seleccionadas fueron ALB 0.6  $\mu$ M + MLT 0.6 mM (relación 1:1) y SOALB 20  $\mu$ M + MLT 1 mM (relación 20:1). Para la línea celular RG2 las combinaciones seleccionadas fueron ALB 0.6  $\mu$ M + MLT 0.6 mM (relación 1:1) y SOALB 26  $\mu$ M + MLT 0.9 mM (relación 29:1). Para la línea celular U87 las combinaciones seleccionadas fueron ALB 0.45  $\mu$ M + MLT 0.45 mM (relación 1:1) y SOALB 18  $\mu$ M + MLT 0.45 mM (relación 40:1).

Para el ensayo, se sembraron  $2 \times 10^4$  células por pozo de cada una de las tres líneas celulares (C6, RG2 y U87), en placas de cultivo de 24 pozos. Veinticuatro horas después se añadió 1 ml de la solución con el tratamiento correspondiente (ALB, SOALB, MLT, ALB + MLT o SOALB + MLT); así como, controles de vehículo y TMZ 100  $\mu$ M. Después de 48 horas de incubación, el medio de cultivo se transfirió a tubos de centrifuga y las células se lavaron con PBS. Luego, las células se despegaron agregando 70  $\mu$ l de solución de tripsina 1X, se colocaron en los mismos tubos de centrifuga y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes se desecharon teniendo cuidado de no tirar el botón de las células sedimentadas, y a los tubos se les añadieron 100  $\mu$ l del buffer de unión incluido en el kit, más 0.5  $\mu$ l de cada una de las soluciones marcadoras de AV y 7-AAD.

Las muestras se agitaron suavemente y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente (25 °C) en la oscuridad. A las células teñidas se les añadieron 300  $\mu$ l de solución buffer de unión y se analizaron empleando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton-Dickinson, EUA) y la versión del software Flow Jo v10. Se recopilaron datos de 10,000

eventos en cada archivo de datos. Se distinguieron cuatro poblaciones celulares diferentes: las no marcadas (células viables), las unidas solo AV (apoptóticas tempranas), las teñidas con 7ADD (necróticas) y las unidas a la AV y 7ADD (apoptóticas tardías). La distribución de fluorescencia se mostró como un análisis de diagrama de puntos coloreados. Cada experimento se realizó por triplicado.

## **7.8 Estudio piloto de sobrevida empleando el modelo de GB en rata**

### **7.8.1 Preparación de células**

El cultivo y conteo celular en la línea celular RG2, se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 7.2.1. Se preparó cada día de inoculación una solución conteniendo 100,000 células en 5 µl en DMEMC, las cuales se mantuvieron en hielo durante todo el tiempo que se usaron. La solución con las células se homogenizó cada vez que se utilizaron para la implantación.

### **7.8.2 Inoculación de células**

Se utilizaron 26 ratas macho de la cepa Fischer 344, de 180 a 250 g de peso adquiridas de Bioinvert, México. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, "especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Se alojaron 4 ratas por caja (tamaño 940 cm<sup>2</sup>), las cuales eran de pisos y paredes continuas sólidas y con tapa removible de reja. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura en el rango de 18 a 26 °C, humedad relativa en un rango de 40 a 70 %, aire ambiental un rango mínimo de 15 a 18 recambios por hora y ciclos de luz-obscuridad de 12:12 horas, con libre acceso a alimento para roedores (pellets Labdiet 500I) y agua potable purificada, además de condiciones adecuadas de higiene y la cantidad de cama conveniente con recambios tres veces por semana.

El protocolo (Efecto *in vitro* e *in vivo* de la combinación de albendazol y melatonina en glioblastoma multiforme. Número 150/16) fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del INNN con oficio número CICUAL/SO/VI/22617/020/2017. Los experimentos se realizaron tanto en el bioterio del INNN, así como, en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Las ratas se pesaron al momento de su recepción y se mantuvieron 7 días en observación visual general (alimentación, estado del pelaje, piel y ojos, evacuación de heces y movilidad). Después de ese periodo los animales se pesaron y se llevó a cabo la inoculación de las células. Los animales se anestesiaron vía intraperitoneal con ketamina y xilacina a una concentración de 70 mg/kg y 8 mg/kg respectivamente. Inmediatamente después se colocaron en el aparato estereotáxico, la base del cráneo se rasuró y desinfectó con antiséptico, para realizar un trepano empleando las coordenadas de 2 mm lateral y 2 mm anterior al bregma (cuerpo calloso) del lado derecho del cráneo. Se inyectaron  $1 \times 10^5$  células RG2 suspendidas en 5  $\mu$ l de DMEMC a 3 mm de profundidad de la duramadre a una velocidad de 0.5  $\mu$ l/min, en un lapso de 10 minutos, empleando una bomba de infusión y una micro jeringa de vidrio de 10  $\mu$ l. Se dejó un espacio de tiempo de 5 minutos para la difusión de las células.

Se inocularon de 3 a 5 ratas en un día. Antes de cada inoculación se corroboró la viabilidad de la solución conteniendo las células, en una cámara de Neubauer empleando un microscopio óptico campo claro. Se verificó con cronómetro que el volumen de la solución (5  $\mu$ l) pasara a través de la jeringa en los 10 minutos establecidos y de esta manera tener una alta probabilidad de que las células llegaran a la coordenada de implante. Cada rata se operó entre 20 a 30 minutos y ninguna murió en cirugía. Una vez realizada la cirugía, los animales estuvieron en observación durante los siguientes 7 días, para identificar alteraciones neurológicas evidentes y tempranas (deterioro del agarre de las patas traseras o paresia (grado de debilidad muscular leve a moderado), cambios tróficos (la piel se hace más delgada y el pelo crecen más lentos), alteraciones en la alimentación, movimiento y evacuación de heces, así como presencia de hemorragia y disminución de peso drástico) y en caso de presentarse descartarlos.

### **7.8.3 Tratamientos y evaluación de sobrevida**

Siete días después de la implantación de las células, se formaron aleatoriamente 4 grupos de estudio, los cuales fueron un grupo control (vehículo), ALB, MLT y la combinación ALB con MLT, las cuales se administraron durante 20 días vía oral de acuerdo a cada grupo de tratamiento. La solución para el grupo control (vehículo) se preparó mezclando en vortex el Cremophor EL con agua hasta obtener una concentración al 40 %. La dosis de ALB fue de 25 mg/kg, la de MLT fue de 15 mg/kg y en el caso de la combinación, las dosis de los fármacos fueron a las mismas concentraciones que se emplearon de manera individual. El

vehículo fue utilizado para disolver los fármacos. Las soluciones de tratamiento se prepararon diariamente.

La administración se llevó a cabo en un horario de entre las 7:00 y 9:00 a.m. por vía oral, utilizando una cánula de administración de acero inoxidable, inmovilizando a la rata e introduciendo la cánula en el hocico para administrar los 0.5 ml de la solución de MLT o los 0.7 ml de la solución de ALB. En el caso de la combinación se administró primero los 0.5 ml de la solución de MLT y 15 minutos después los 0.7 ml de la solución de ALB. Las ratas se pesaron cada tercer día, se mantuvieron en observación, se registraron los decesos diariamente para la evaluación de supervivencia *Kaplan Meier*. El tiempo de corte del estudio fue a los 90 días. Los animales que presentaron alteraciones en la piel, en la alimentación o en la movilidad, o baja de peso considerable, fueron dispuestas para eutanasia con pentobarbital sódico vía intravenosa (induce inconciencia con dolor mínimo o transitorio de la aguja) a una concentración de 120-210 mg/kg de peso e inmediatamente después se perfundieron con PBS y después con paraformaldehído (4 %) vía intraventricular para la fijación del cerebro.

#### **7.8.4 Evaluación histológica**

Procesamiento del tejido: Los cerebros de las ratas que murieron a lo largo del estudio, así como el de las que se sometieron a eutanasia, se removieron del cráneo y se almacenaron para fijación en paraformaldehído (4 %) por 24 horas y posteriormente se pasaron a solución de formaldehído (4 %) amortiguado, hasta el siguiente paso.

Inclusión del tejido: Se realizó el corte de los cerebros en 4 segmentos, los cuales fueron colocados en cassettes de histoquímica (Leica TP 1020), sumergiéndolos en dos soluciones de formaldehído (4 %) consecutivas, para después gradualmente deshidratarlos en una serie de soluciones de alcoholes a concentraciones ascendentes de 70 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %, 100 %, xilol y xilol. Enseguida pasaron por dos soluciones de parafina fundida durante 6 horas a 60°C, para después colocar el tejido en moldes de metal a los cuales se les puso parafina fundida y se les dejó solidificar en frío en un centro de inclusión de tejidos (Leica EG 1160).

Cortes de tejido: Hasta el momento, se trabajó un cerebro de cada grupo de tratamiento. Los bloques con los tejidos incluidos en parafina solidificada se colocan en un micrótopo



(Leica RM2125T) y se realizaron cortes coronales seriados de 7  $\mu$ m los cuales se montaron en portaobjetos recubiertos de silano al 2 %.

Tinción del tejido y montaje: Los portaobjetos fueron colocados en una canastilla y sumergidos en soluciones de xilol para desparafinar y enseguida se sumergieron en una serie de soluciones de alcoholes a concentraciones descendentes para hidratar el tejido y teñirlo primero con hematoxilina y enseguida con eosina, para finalmente llevar a cabo el proceso de montaje colocando resina en los tejidos adheridos a los portaobjetos y poniendo el cubreobjetos encima. A continuación, se describen los detalles del proceso.

1. Xilol (3-5 baños).
2. Xilol (3-5 baños).
3. Xilol (3-5 baños).
4. Alcohol 100 % (3-5 baños).
5. Alcohol 96 % (3-5 baños).
6. Agua (1 lavado).
7. Hematoxilina de Harris (5 minutos).
8. Agua (1 lavado).
9. Alcohol acido 1 % (1 baño rápido).
10. Agua (1 lavado).
11. Agua amoniacal (3 segundos, se viran de color los núcleos).
12. Agua (1 lavado).
13. Eosina (30 segundos).
14. Agua (1 lavado).
15. Alcohol 96 % (3-5 baños).
16. Alcohol 96 % (3-5 baños).
17. Alcohol 100 % (3-5 baños).
18. Alcohol 100 % (3-5 baños).
19. Xilol (3-5 baños).
20. Xilol (3-5 baños).
21. Xilol (3-5 baños).
22. Montaje en resina.

Finalmente se tomaron fotografías en microscopio estereoscópico modular (Leica MZ6) con acercamiento de 2.5.

### **7.9 Análisis estadístico**

Los datos de viabilidad celular y tipo de muerte celular se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). La normalidad de los datos se evaluó con la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. La homogeneidad de varianza se evaluó con una prueba de *Levene*. Los resultados que presentaron homogeneidad de varianza  $> 0.05$  fueron considerados con distribución normal, mientras los que presentaron homogeneidad de varianza  $< 0.05$  fueron considerados con distribución no normal. Para determinar si había diferencias significativas entre los grupos, se realizó el análisis estadístico con la prueba de *Kruskal-Wallis* y una prueba de *Dunn* para comparaciones múltiples. El análisis se llevó a cabo utilizando el software SPSS (V. 15.0) y las diferencias se consideraron significativas a un valor de  $p < 0.05$ .

El análisis de la curva de supervivencia *Kaplan Meier* se realizó con la prueba de rango logarítmico (*Mantel-Cox*), utilizando el software SPSS (V. 15.0).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Valores de Dm de ALB, SOALB y MLT

Los resultados mostraron que, en las diferentes líneas celulares (C6, RG2 y U87), los 3 fármacos presentaron un efecto dependiente de la concentración. El valor de Dm de ALB fue 0.6  $\mu$ M tanto en la línea celular C6 como en la RG2, mientras que en la línea celular humana U87 el valor fue de 0.9  $\mu$ M. En cuanto al SOALB, el valor de Dm en las líneas C6, RG2 y U87 fue de 22  $\mu$ M, 26  $\mu$ M, 36  $\mu$ M respectivamente. En el caso de MLT, el valor de Dm en las tres líneas fue similar con valores de 1, 0.9 y 0.9 mM respectivamente (figura 2).

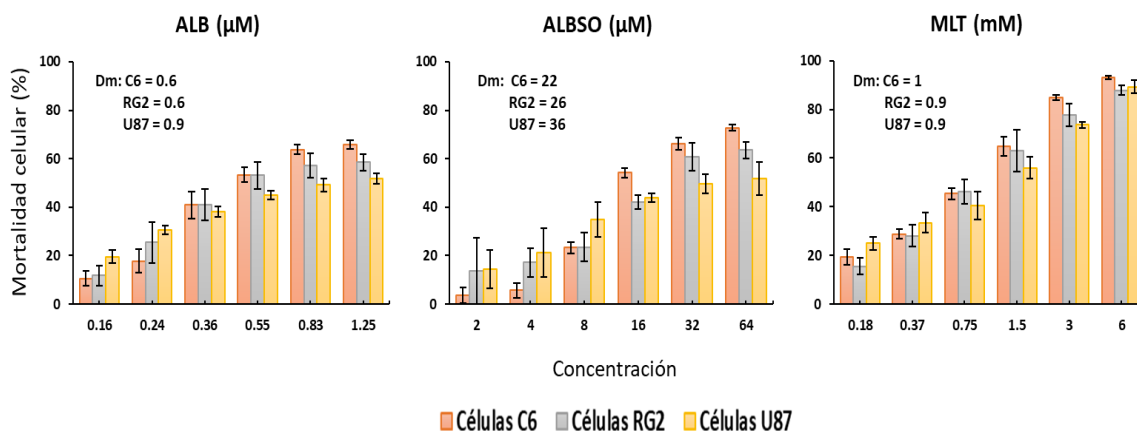


Figura 2. Efecto concentración dependiente y Dm. Efecto de los fármacos individuales sobre la mortalidad celular a las 72 horas, en las tres líneas celulares por ensayo MTT. Cada barra representa la media  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes, cada uno con seis repeticiones.

### 8.2. Actividad antiproliferativa de la combinación de ALB con MLT

Los resultados mostraron que, en todas las líneas celulares (C6, RG2 y U87), los tratamientos en combinación presentaron mortalidad dependiente de la concentración. Además, la mayoría de las combinaciones presentó mayor citotoxicidad que los fármacos solos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ). De igual forma se encontró que la mortalidad de la mayoría de las combinaciones fue mayor que la obtenida con TMZ ( $p < 0.05$ ). Así, en las células C6 las combinaciones de ALB 0.15  $\mu$ M + MLT 0.15 mM, ALB 0.3  $\mu$ M + MLT 0.3 mM y ALB 0.6  $\mu$ M + MLT 0.6 mM, presentaron 38.3 %, 54 % y 65 % de mortalidad respectivamente, mientras la mortalidad de TMZ 100  $\mu$ M fue 31.9 %. En las células RG2 las combinaciones de ALB 0.03  $\mu$ M + MLT 0.03 mM, ALB 0.07  $\mu$ M + MLT 0.07 mM, ALB 0.15  $\mu$ M + MLT 0.15 mM, ALB 0.3  $\mu$ M + MLT 0.3 mM y ALB 0.6  $\mu$ M + MLT 0.6 mM, presentaron 8.4 %, 14.9 %, 23.5 %, 44.2 % y 65 % de mortalidad

respectivamente, mientras que con TMZ 100  $\mu$ M no presentó efecto. En el caso de las células U87, las combinaciones de ALB 0.05  $\mu$ M + MLT 0.05 mM, ALB 0.11  $\mu$ M + MLT 0.11 mM, ALB 0.22  $\mu$ M + MLT 0.22 mM, ALB 0.45  $\mu$ M + MLT 0.45 mM y ALB 0.9  $\mu$ M + MLT 0.9 mM, presentaron 21 %, 34.3 %, 46 %, 60 % y 66 % de mortalidad respectivamente, mientras que TMZ 100  $\mu$ M presentó un valor de 9.9 % (figura 3).

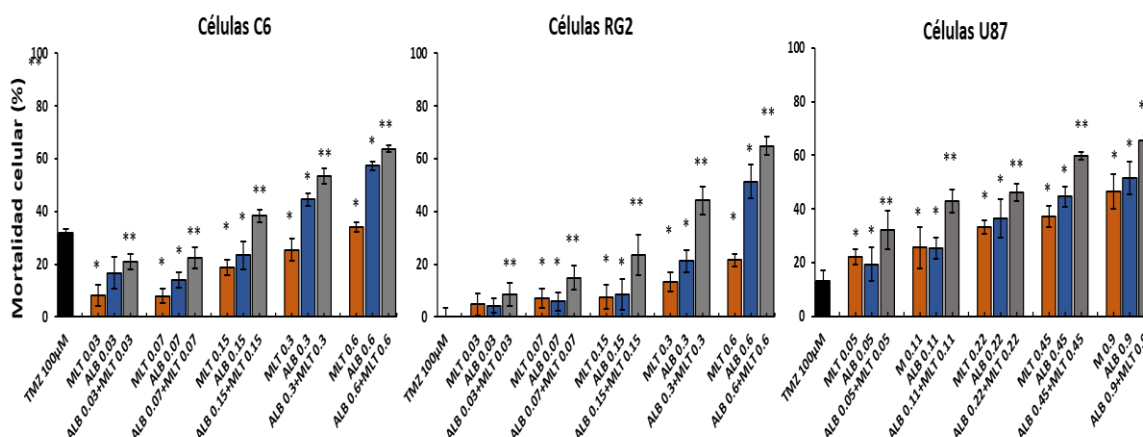


Figura 3. Actividad antiproliferativa de ALB + MLT. Mortalidad celular obtenida con los fármacos individuales, con ALB ( $\mu$ M) + MLT (mM), en proporción 1:1, y TMZ (100  $\mu$ M) en las tres líneas celulares. Prueba *Kruskal-Wallis* y prueba de *Dunn* para comparaciones múltiples. Significación estadística \*  $p < 0.05$  al comparar el grupo de combinación con los fármacos solos, y \*\*  $p < 0.05$  al comparar el grupo de combinación con TMZ.

### 8.2.1. Efecto de la combinación de ALB con MLT sobre la morfología y tamaño celular

Las imágenes de microscopía óptica (figura 4) mostraron cambios en la morfología, como forma alterada, tamaño celular reducido y confluencia reducida, los cuales fueron más evidentes con los tratamientos combinados que con los obtenidos con cada fármaco individual o TMZ, lo cual se correlacionó con resultados de mortalidad.

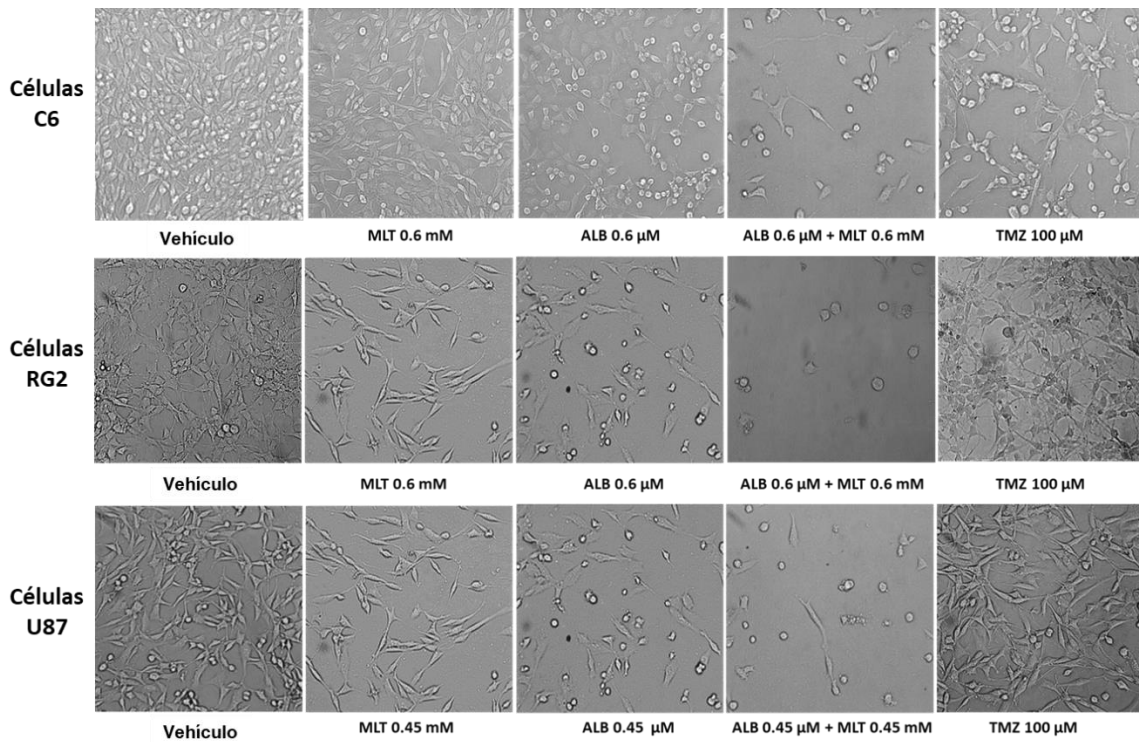


Figura 4. Efecto en la morfología celular con ALB + MLT. Imágenes de microscopía óptica (20X) resultantes de los tratamientos con los fármacos individuales, la combinación ALB ( $\mu\text{M}$ ) + MLT (mM), en proporción 1:1, y TMZ ( $100\ \mu\text{M}$ ) en las tres líneas celulares.

### 8.2.2. Interacción farmacológica de la combinación de ALB con MLT

En células C6, se encontró que la combinación ALB con MLT a la concentración más alta presentó un efecto aditivo, mientras las otras combinaciones presentaron efecto sinérgico con valores de IC cercanos y menores a 1 respectivamente (figura 5).

Células C6 proporción 1:1			
Concentración ALB ( $\mu\text{M}$ )	Concentración MLT (mM)	Fa	IC
0.6	0.6	0.65	0.99
0.3	0.3	0.54	0.70
0.15	0.15	0.38	0.57
0.075	0.075	0.22	0.51
0.0375	0.0375	0.21	0.27

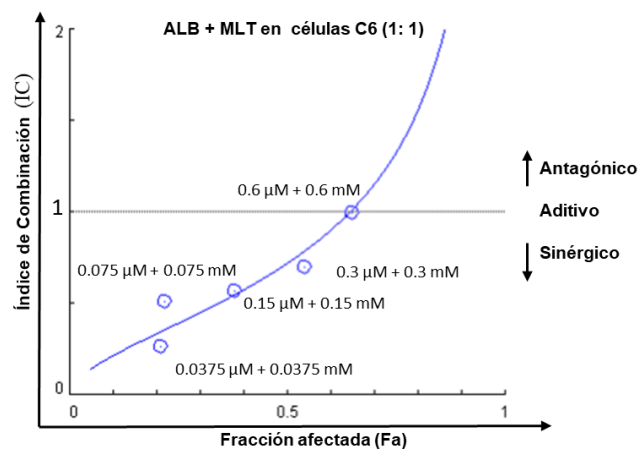


Figura 5. Interacción farmacológica de ALB + MLT en células C6. Valores y representación gráfica de IC obtenidos con el software CompuSyn y la metodología de Chou–Talalay.

Respecto a las células RG2, los resultados de IC para las combinaciones ALB con MLT mostraron un efecto sinérgico con la combinación más alta y baja, mientras que las otras combinaciones presentaron efecto aditivo (figura 6).

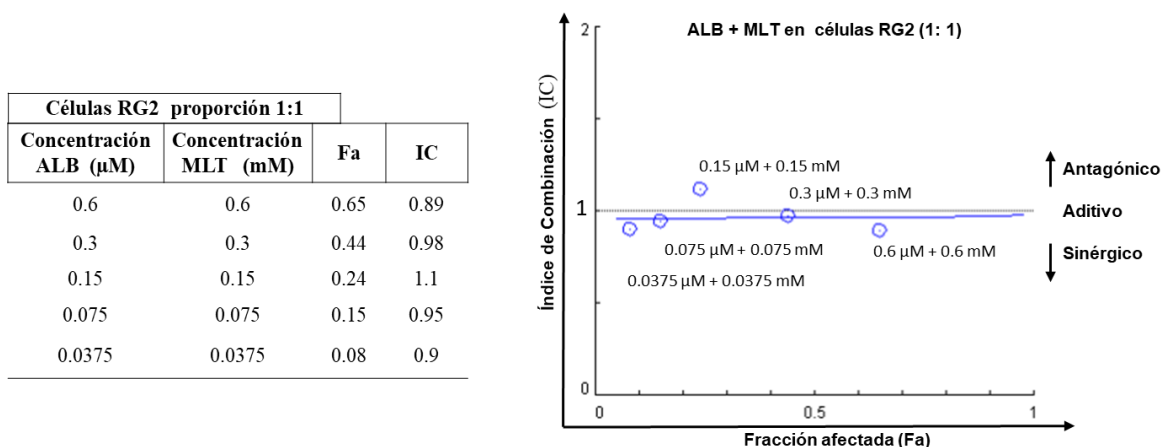


Figura 6. Interacción farmacológica de ALB + MLT en células RG2. Valores y representación gráfica de IC obtenidos con el software CompuSyn y la metodología de Chou–Talalay.

En relación con las células U87 los resultados de IC mostraron que todas las combinaciones presentaron efecto sinérgico, con valores menores a 1 (figura 7).

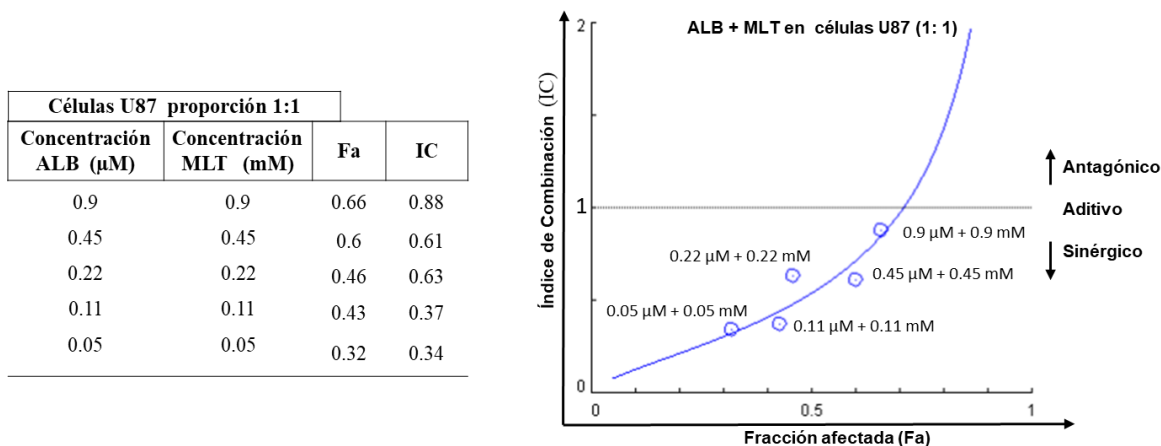


Figura 7. Interacción farmacológica de ALB + MLT en células U87. Valores y representación gráfica de IC obtenidos con el software CompuSyn y la metodología de Chou–Talalay.

### 8.2.3 Efecto de la combinación de ALB con MLT sobre el tipo de muerte celular

La Figura 8 muestra los diagramas de puntos representativos y la descripción gráfica del tipo de muerte celular en las diferentes líneas celulares tratadas con ALB, MLT, ALB con MLT y TMZ 100  $\mu$ M. Se encontró que en las tres líneas celulares (C6, RG2 y U87) el tratamiento combinado de ALB con MLT, indujo un porcentaje de apoptosis estadísticamente mayor en comparación con el del vehículo ( $p < 0.05$ ).

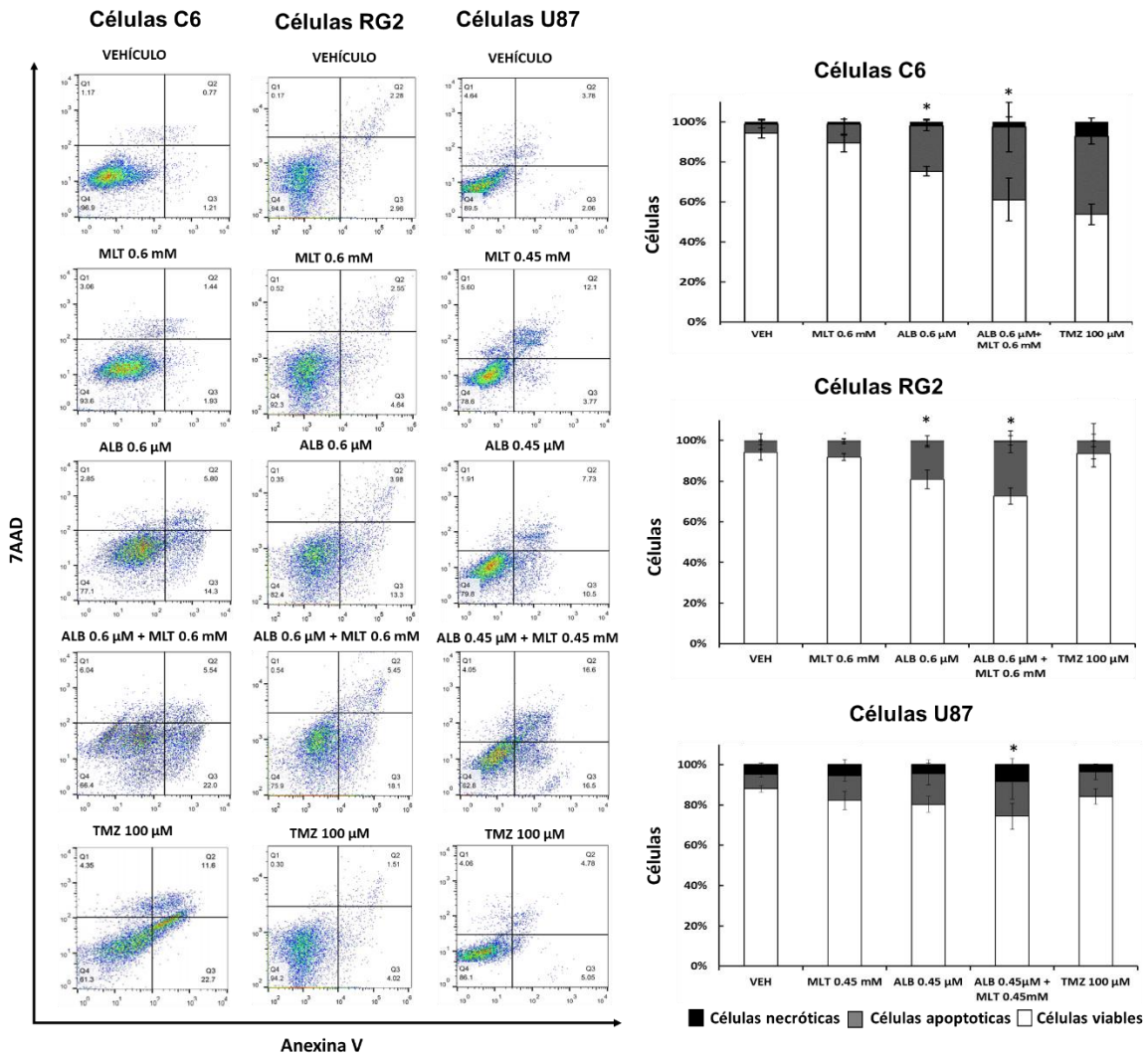


Figura 8. Mecanismos de muerte celular con ALB + MLT. Gráficos de puntos representativos que muestran el efecto citotóxico de ALB y MLT solos o en combinación (proporción 1:1), en las tres líneas celulares. Inferior izquierda (Q4) = células vivas normales (AV- / 7-AAD-), Inferior derecha (Q3) = células apoptóticas tempranas (AV + / 7-AAD-). Superior derecha (Q2) = Células apoptóticas tardías (AV+/7-AAD+), Superior izquierda (Q1) = Células necróticas (7-AAD+). Representación gráfica de los porcentajes de células viables, apoptóticas y necróticas en tres líneas celulares. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos

independientes, cada uno con seis repeticiones. *Kruskal-Wallis* y prueba de *Dunn* para comparaciones múltiples. Significancia estadística \*  $p < 0.05$  al comparar los tratamientos con el vehículo.

### 8.3. Actividad antiproliferativa de la combinación de SOALB con MLT

En el caso de la administración conjunta de SOALB y MLT, se encontró que, en todas las líneas celulares, el efecto fue dependiente de la concentración. Además, la mayoría de las combinaciones presentó una mayor citotoxicidad que SOALB o MLT, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ). En las células C6, las combinaciones de SOALB 5  $\mu\text{M}$  + MLT 0.25 mM, SOALB 10  $\mu\text{M}$  + MLT 0.5 mM y SOALB 20  $\mu\text{M}$  + MLT 1 mM, mostraron una mortalidad de 44.2 %, 54.9 % y 68.9 % respectivamente, mientras la mortalidad de TMZ 100  $\mu\text{M}$  fue de 39.2 % ( $p < 0.05$ ).

En células RG2 las combinaciones SOALB 1.6  $\mu\text{M}$  + MLT 0.05 mM, SOALB 3.2  $\mu\text{M}$  + MLT 0.11 mM, SOALB 6.5  $\mu\text{M}$  + MLT 0.22 mM, SOALB 13  $\mu\text{M}$  + MLT 0.45 mM y SOALB 26  $\mu\text{M}$  + MLT 0.9 mM, presentaron valores de mortalidad de 9.4 %, 17.4 %, 27.3 %, 51.1 % y 77.2 % respectivamente, mientras que TMZ 100  $\mu\text{M}$  no presentó efecto. En el caso de las células U87, los valores de mortalidad de las combinaciones de SOALB 2.25  $\mu\text{M}$  + MLT 0.05 mM, SOALB 4.5  $\mu\text{M}$  + MLT 0.11 mM, SOALB 9  $\mu\text{M}$  + MLT 0.22 mM, SOALB 18  $\mu\text{M}$  + MLT 0.45 mM y SOALB 36  $\mu\text{M}$  + MLT 0.9 mM, fueron 32.5 %, 38.1 %, 44.8 %, 61.1 % y 67.4 % respectivamente, mientras que la mortalidad de TMZ fue de 16.7 % ( $p < 0.05$ ) (figura 9).

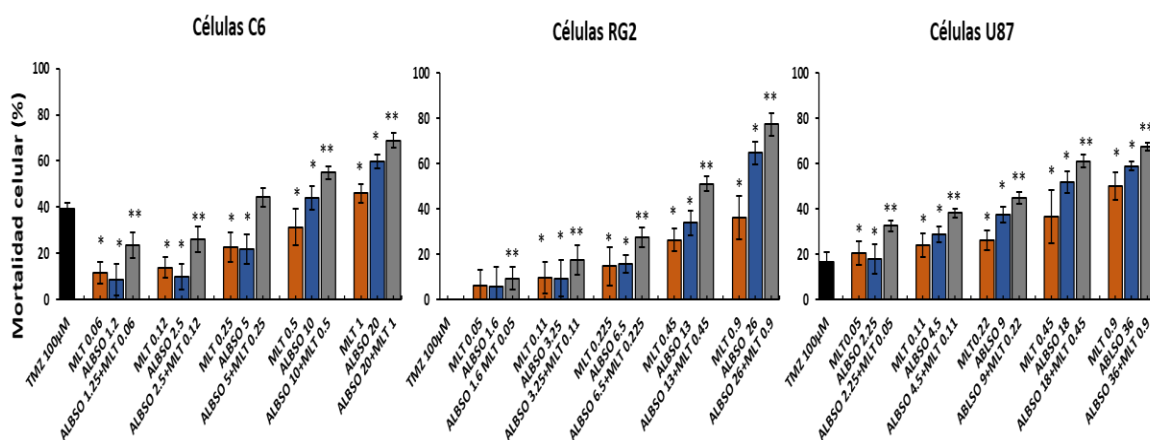


Figura 9. Actividad antiproliferativa de SOALB + MLT. Mortalidad celular obtenida con TMZ (100  $\mu\text{M}$ ), los fármacos individuales y con SOALB ( $\mu\text{M}$ ) + MLT (mM) en proporción 20:1 en células C6; 29:1 en células RG2 y 40:1 en células U87. Prueba *Kruskal-Wallis* y prueba de *Dunn* para comparaciones múltiples. Significación estadística \*  $p < 0.05$  al comparar el grupo de combinación con los fármacos solos, y \*\*  $p < 0.05$  al comparar el grupo de combinación con TMZ.



### 8.3.1. Efecto de la combinación de SOALB y MLT sobre la morfología y tamaño celular

Los resultados de microscopía óptica (figura 10), mostraron cambios morfológicos en las tres líneas celulares, como forma alterada, tamaño celular reducido y confluencia reducida, siendo más evidentes con el tratamiento combinado, lo cual se correlacionó con resultados de mortalidad.

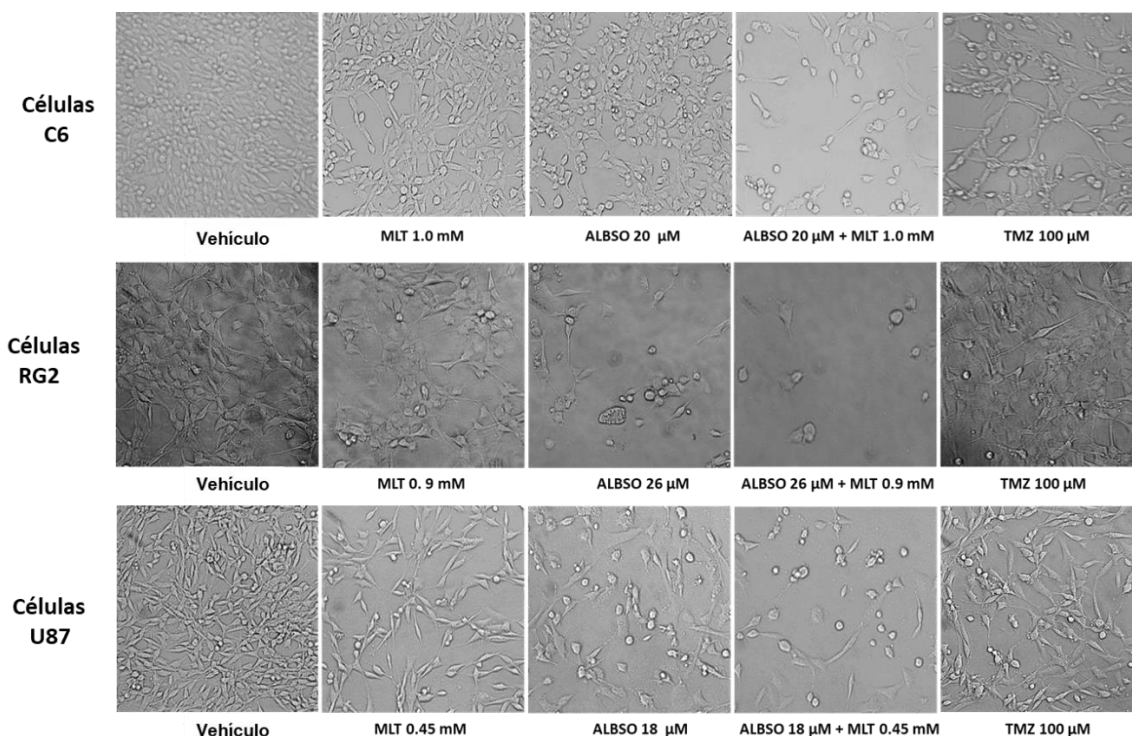


Figura 10. Efecto en la morfología celular con SOALB + MLT. Imágenes representativas de microscopía óptica (20X), del efecto obtenido tras el tratamiento con los fármacos individuales, con la combinación SOALB ( $\mu$ M) + MLT (mM) y TMZ (100  $\mu$ M) en las tres líneas celulares.

### 8.3.2. Interacción farmacológica de la combinación de SOALB con MLT

Al evaluar la interacción farmacológica de los tratamientos en combinación, se encontró que en las células C6, la combinación con la concentración más alta presentó un efecto aditivo, mientras las otras combinaciones presentaron efecto sinérgico (figura 11).

Células C6 proporción 20:1			
Concentración ALBSO ( $\mu\text{M}$ )	Concentración MLT (mM)	Fa	IC
20	1	0.69	1
10	0.5	0.55	0.81
5	0.25	0.44	0.58
2.5	0.12	0.26	0.55
1.25	0.06	0.23	0.31

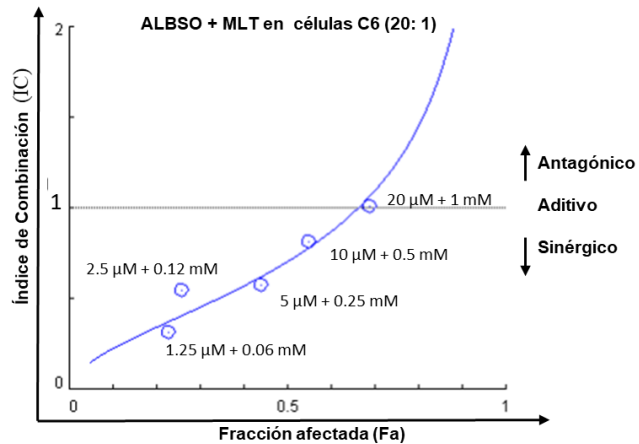


Figura 11. Interacción farmacológica de SOALB + MLT en células C6. Valores y representación gráfica de IC obtenidos con el software CompuSyn y la metodología de Chou–Talalay.

En el caso de las células RG2, los resultados de IC indicaron que la combinación SOALB 26  $\mu\text{M}$  + MLT 0.9 mM presentó sinergismo, la combinación SOALB 13  $\mu\text{M}$  + MLT 0.45 mM aditividad, mientras las otras presentaron efecto antagónico (figura 12).

Células RG2 proporción 29:1			
Concentración ALBSO ( $\mu\text{M}$ )	Concentración MLT (mM)	Fa	IC
26	0.9	0.77	0.55
13	0.45	0.51	0.98
6.5	0.22	0.27	1.56
3.25	0.11	0.17	1.53
1.62	0.05	0.09	1.78

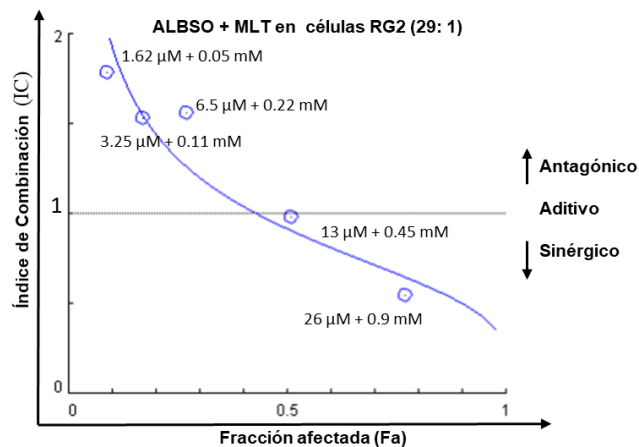


Figura 12. Interacción farmacológica de SOALB + MLT en células RG2. Valores y representación gráfica de IC obtenidos con el software CompuSyn y la metodología de Chou–Talalay.

En las células U87, se encontró que al igual que con el tratamiento ALB + MLT, todas las combinaciones con SOALB + MLT presentaron efecto sinérgico debido a que el IC fue menor a 1 (figura 13).

Células U87 proporción 40:1			
Concentración ALBSO ( $\mu\text{M}$ )	Concentración MLT (mM)	Fa	IC
36	0.9	0.67	0.75
18	0.45	0.61	0.54
9	0.22	0.45	0.68
4.5	0.11	0.38	0.52
2.2	0.05	0.33	0.36

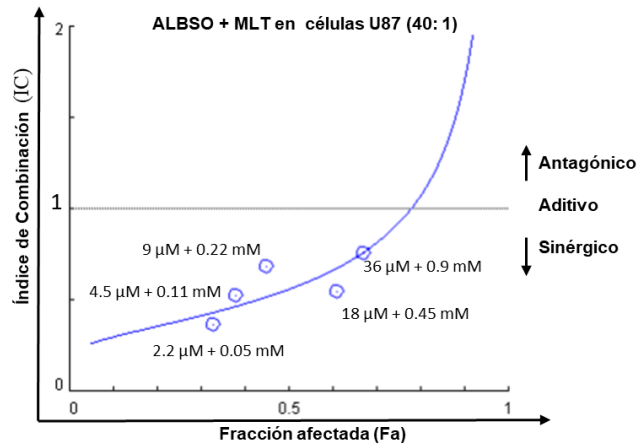


Figura 13. Interacción farmacológica de SOALB + MLT en células U87. Valores y representación gráfica de IC obtenidos con el software CompuSyn y la metodología de Chou–Talalay.

### 8.3.3 Efecto de la combinación de SOALB con MLT sobre el tipo de muerte celular

En la figura 14 se presentan, los diagramas de puntos representativos y la descripción gráfica del tipo de muerte en las diferentes líneas celulares. Al igual que con las combinaciones de ALB con MLT, se encontró que en todas las líneas (C6, RG2 y U87), la combinación de SOALB con MLT presento un porcentaje de apoptosis significativamente mayor que el control ( $p < 0.05$ ).

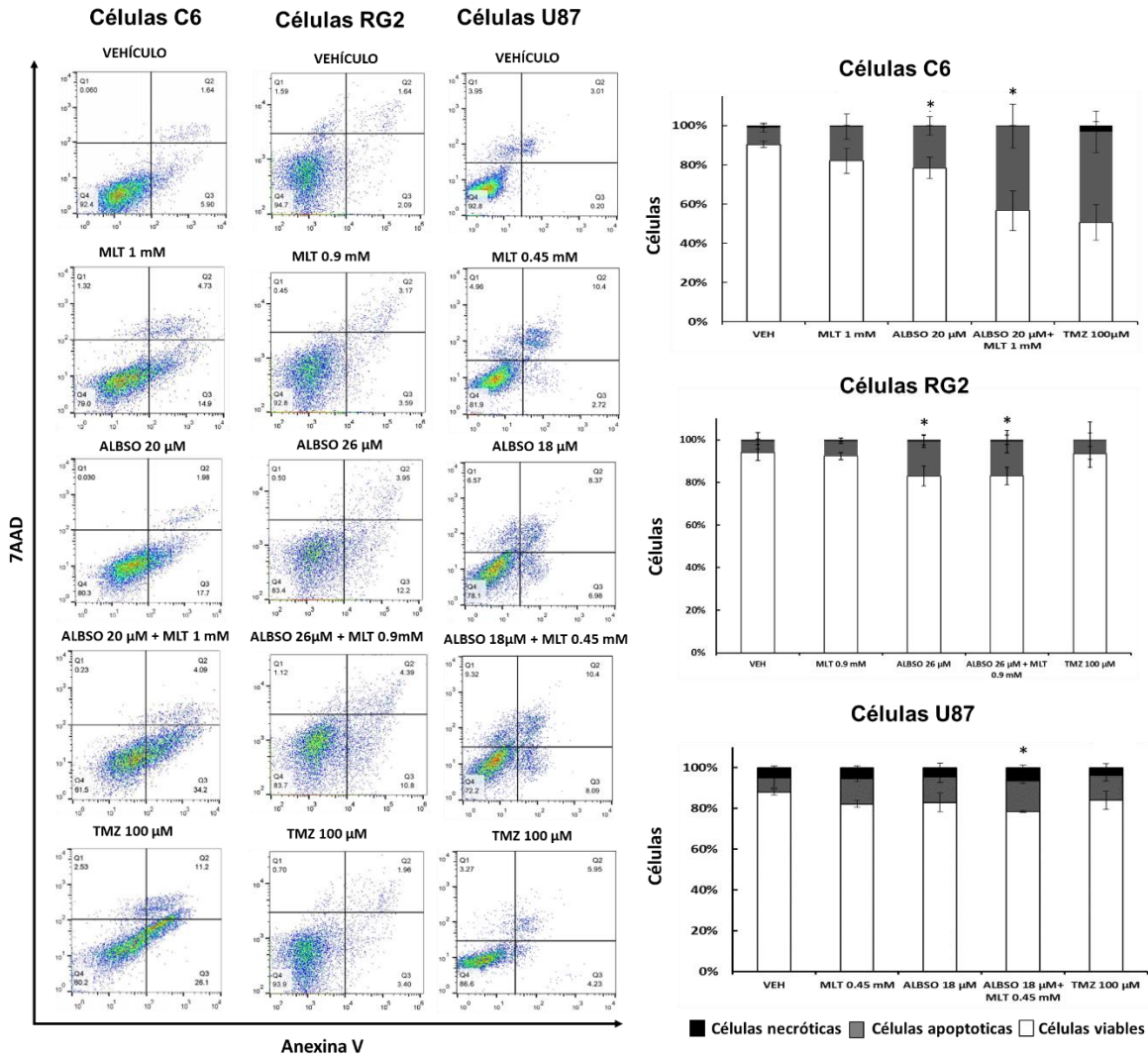


Figura 14. Mecanismos de muerte celular con SOALB + MLT. Gráficos de puntos representativos que muestran el efecto citotóxico de SOALB y MLT solos o combinados en la línea C6 (relación 20:1), en la línea RG2 (relación 29:1) y en la línea U87 (relación 40:1). Inferior izquierda (Q4) = células vivas normales (AV- / 7-AAD-), Inferior derecha (Q3) = células apoptóticas tempranas (AV+ / 7-AAD-). Superior derecha (Q2) = Células apoptóticas tardías (AV+/7-AAD+), Superior izquierda (Q1) = Células necróticas (7-AAD+). Representación gráfica de los porcentajes de células viables, apoptóticas y necróticas en tres líneas celulares. Los gráficos de barras representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes, cada uno con seis repeticiones. *Kruskal-Wallis* y prueba de *Dunn* para comparaciones múltiples. Significancia estadística \*  $p < 0.05$  al comparar los tratamientos con el vehículo.

#### 8.4. Evaluación del estudio piloto en el modelo de GB

Los resultados mostraron que después de la cirugía, la mayoría de las ratas se encontraban en condiciones de salud relativamente estables, no presentaban alteraciones neurológicas

tempranas, como debilidad muscular, alteraciones en el pelaje, la alimentación, la movilidad o la evacuación de heces, Tampoco se observó presencia de hemorragia.

En la evaluación macroscópica de ratas sin tratamiento (control), en se encontró evidencia de presencia de masa tumoral, un incremento en el tamaño del hemisferio implantado y la línea media del cerebro desplazada, lo cual es característico de la presencia del tumor. En la figura 15 se muestra la evaluación histológica de una rata, la cual murió a los 35 días poscirugía, con un tamaño lineal de la masa tumoral aproximada de 6 mm (Figura 15).

En el caso de las ratas con tratamiento de MLT también se encontró un incremento en el tamaño del hemisferio implantado, la línea media del cerebro desplazada, y presencia de masa tumoral con lesiones que fueron de desde 1 mm aproximadamente en ratas vivas hasta los 90 días, a 6 mm aproximadamente en ratas muertas durante el estudio, como el del ejemplo que se muestra, el cual es de una rata que murió a los 10 días poscirugía la cual presento un tamaño lineal aproximado de 6 mm (Figura 15).

Respecto a las ratas con tratamiento de ALB y la combinación ALB + MLT se encontraron características similares de presencia de tumor con lesiones de hasta 5 mm en ratas que murieron durante es estudio, mientras que en ratas que estuvieron vivas hasta los 90 días, se encontraron lesiones menores de 1 mm aproximadamente, como fue el caso de los ejemplos de una rata de cada uno de estos grupos mostrados en la Figura 15.

En el caso de la evaluación histológica, la cual se realizó a una rata de cada grupo, se encontró evidencia de invasión celular focal en el área de inoculación de las células RG2, en la rata control y en la del grupo de administración de MLT. En las ratas del grupo con tratamiento de ALB y con la combinación, la presencia de una invasión celular se observó mínimamente (Figura 15).

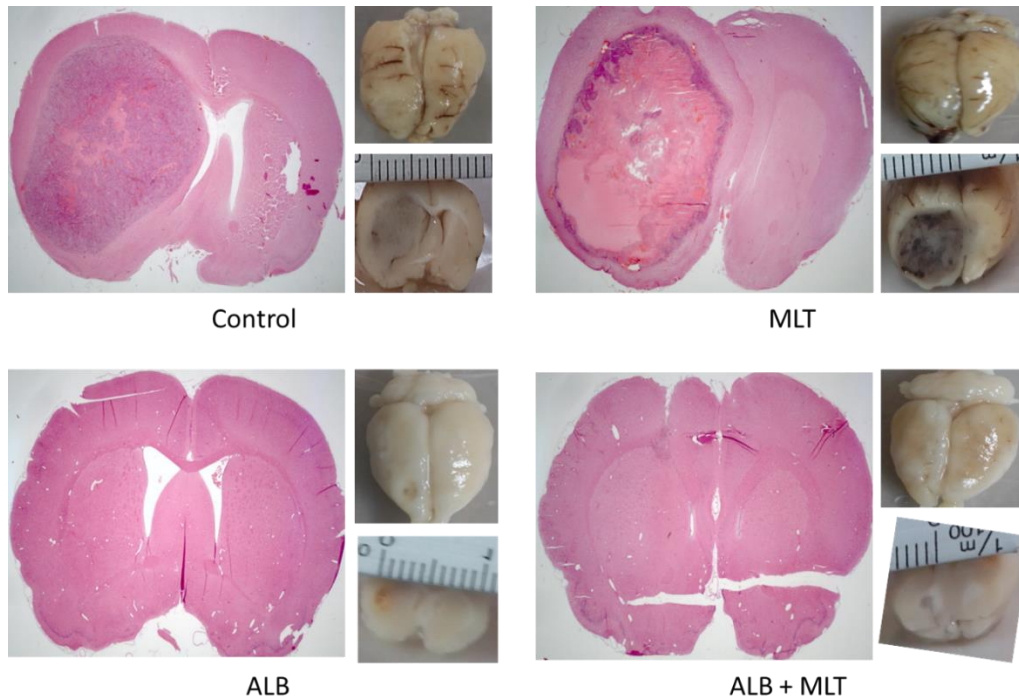


Figura 15. Evaluación macroscópica e histológica de tejido del modelo de GB. Fotografías representativas de un cerebro de rata Fischer implantada con células RG2, de cada grupo de tratamiento y el grupo control (vehículo).

Los resultados de la evaluación de sobrevida con la prueba de *Kaplan Meier*, mostraron que el grupo control presentó una estimación de sobrevida acumulada de 47 días, el de MLT de 52 días, mientras en el grupo de ALB fue de 67 días, y en el de la combinación de 72 días, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos (Figura 16).

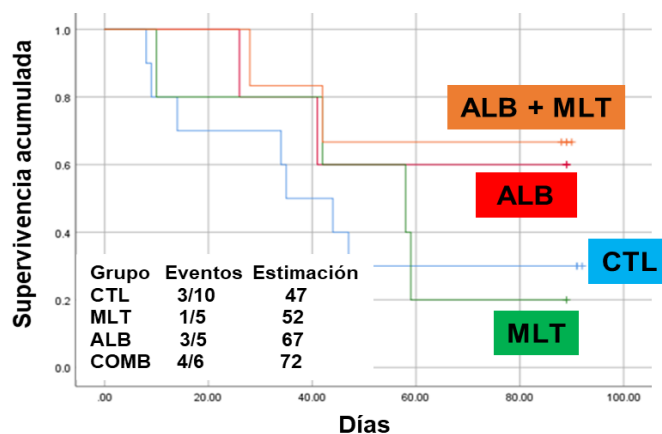


Figura 16. Evaluación del estudio piloto de sobrevida con la combinación ALB + MLT. Gráfico de curva de sobrevida *Kaplan Meier* con la prueba de rango logarítmico (*Mantel-Cox*), en ratas Fisher implantadas con células RG2. Azul = control; verde = MLT; rojo = ALB; anaranjado = ALB+MLT.

## 9. DISCUSIÓN

El GB sigue siendo el tumor cerebral más agresivo, invasivo y letal, que se infiltra ampliamente en el cerebro, crece rápidamente y presenta una alta frecuencia de recurrencia (Birzu y cols., 2020). En México aun cuando existen diferentes medicamentos aprobados para esta enfermedad como la TMZ, CCNU, BCNU y BVZ, la supervivencia promedio no supera los 15 meses (Erazo-Valle-Solís y cols., 2017). El mal pronóstico se atribuye a la infiltración de las células malignas al tejido sano; el acceso restringido de los fármacos a través de la BHE (Wang y cols., 2019; Dymova y cols., 2021); la limitación para la acumulación intracelular de fármacos debido a transportadores de eflujo como la Pgp y el PRCM (Lin y cols., 2014) y los mecanismos de defensa de las células tumorales como la reparación del ADN frente al daño inducido por el tratamiento con TMZ (Bae y cols., 2014; Lozinski y cols., 2021), entre otros.

En 2009 la FDA aprobó el anticuerpo monoclonal BVZ para su uso en pacientes con GB recurrente, sin embargo, con este tratamiento el tiempo de supervivencia no ha superado los 2 años (Wick y cols., 2018; Lyne y Yamini, 2021). En la búsqueda de nuevas estrategias se encuentran nuevos anticuerpos monoclonales, terapias virales, vacunas, reposicionamiento de fármacos y combinaciones de fármacos. La investigación de terapia combinada ha ganado mucha atención, debido al potencial que presenta para aumentar la eficacia, disminuir las dosis y efectos adversos, así como contrarrestar mecanismos de resistencia, entre otros (Rattray y cols., 2021; Yool y Ramesh, 2020; Lyne y Yamini, 2021; Debela y cols., 2021).

En la búsqueda de una nueva opción para el tratamiento de GB, para el presente trabajo se seleccionaron dos moléculas: el ALB y la MLT, tomando como base sus efectos citotóxicos y sus distintos mecanismos de acción. Se evaluó también la combinación de MLT con SOALB considerando que este metabolito ha presentado las concentraciones más altas en plasma y LCR al administrar el ALB por vía oral (González-Hernández y cols., 2012).

Los resultados mostraron que, en todas las líneas celulares, el ALB y la MLT presentaron efectos citotóxicos, siendo MLT la más efectiva con porcentajes de mortalidad en promedio del 90 % y el ALB el más potente. Al analizar los datos de SOALB, se encontró que fue igualmente efectivo que el ALB, pero menos potente. Se ha reportado que las líneas

celulares C6, RG2 y U87 expresan el transportador de eflujo PRCM (Gilg y cols., 2008; Bhatia y cols., 2012; de Gooijer y cols., 2021). El hecho de que el SOALB fuera menos potente podría deberse a que esta molécula es sustrato del transportador PRCM y por lo tanto se requiere mayor concentración para obtener el efecto (Merino y cols., 2005).

Los resultados de citotoxicidad de ALB y MLT encontrados en el presente estudio, concuerdan con lo reportado previamente en las líneas celulares C6 y U87 (Bai y cols., 2011; Liang y cols., 2019; Ariey-Bonnet y cols., 2020; Marslin y cols., 2017; Martín y cols., 2006; Gu y cols., 2017). Con respecto a SOALB, este es el primer estudio que muestra su efecto sobre células de glioma. Los resultados son importantes considerando que este metabolito cruza la BHE y podría contribuir al efecto en las células del tumor cerebral.

Respecto al efecto de las combinaciones se encontró que, en las tres líneas celulares se produjeron efectos citotóxicos, así mismo, al realizar la comparación de las combinaciones de ALB con MLT con las de SOALB con MLT empleando las concentraciones en las cuales las contribuciones de los efectos de cada fármaco fueron aproximadamente iguales, se observó en la combinación con SOALB presentó una tendencia de mayor mortalidad, que la combinación ALB-MLT. Por ejemplo, en la línea celular RG2, la mortalidad de SOALB 26  $\mu$ M + MLT 0.9 mM fue de 77 % RG2, mientras que el valor de mortalidad de ALB 0.6  $\mu$ M + MLT 0.6 mM fue de 65 %. Estas diferencias podrían estar relacionadas con una inhibición de la expresión del transportador PRCM por MLT, lo cual evitaría que SOALB sea expulsado de la célula aumentando su citotoxicidad.

En el caso de la interacción farmacológica, se encontró que, en las líneas celulares, C6 y U87 las combinaciones de ALB con MLT y de ALBSO con MLT presentaron efectos aditivos o sinérgicos, mientras que en la línea RG2 algunas de las combinaciones presentaron efectos antagónicos. Sin embargo, en esta línea RG2, la combinación SOALB 26  $\mu$ M con MLT 0.9 mM fue la que presentó el mayor porcentaje de mortalidad con 77 % y un alto sinergismo con un valor de IC de 0.5. Aun cuando las tres líneas celulares presentan un alto índice mitótico, mutación de la proteína p16 (proteína supresora de tumores) y pleomorfismo nuclear (variabilidad de la forma y el tamaño de los núcleos, característico en tumores), las diferencias encontradas entre las células RG2 y las otras 2 líneas celulares, podrían estar relacionadas a que esta línea celular presenta mayores niveles de invasividad y de focos de necrosis tumoral, presencia de vimentina (marcador metastásico) y mutación



de la proteína KRAS (participa en vías de transducción de señales de crecimiento y diferenciación celular (Giakoumettis y cols., 2018).

El principal mecanismo de muerte celular de los fármacos individuales fue por apoptosis, lo cual concuerda con lo reportado previamente para ALB (Liang y cols., 2019) y MLT (Talib y cols., 2021; Martín y cols., 2010). En el caso de las combinaciones, se encontró que en las líneas celulares C6 y RG2, el porcentaje de apoptosis fue mayor que el obtenido con los fármacos individuales, sin embargo, en la línea U87 no se encontraron diferencias entre los tratamientos, lo cual podría deberse a que las concentraciones evaluadas en las líneas C6 y RG2 fueron mayores o bien a otros mecanismos de muerte celular, como la autofagia (Martín y cols., 2014, Zhou y cols., 2019).

Los resultados *in vitro* de la combinación ALB con MLT, así como de SOALB con MLT demostraron que el efecto fue mayor que el obtenido con los fármacos por separado, lo cual podría estar relacionado a sus diferentes mecanismos de acción.

En relación al estudio piloto *in vivo*, se observó una pérdida de peso promedio de 46 g en las ratas que murieron durante el período de experimentación, lo cual hace suponer que la pérdida de peso y la posterior muerte está relacionada a la presencia de tumor cerebral.

En estudios previos realizados en modelos de glioma intracraneal empleando ratas Fisher, se reportó un porcentaje de positividad a tumor de 88 %, comprobado con evaluaciones de resonancia magnética e histología (Biasibetti y cols., 2017). En el presente estudio el porcentaje de animales del grupo control que fallecieron entre los 14 a los 47 días post cirugía fue de 70 %, lo cual hace pensar que en el 30 % restante, el tumor no se implantó. Para corroborar este supuesto, hubiera sido necesario llevar a cabo el estudio histopatológico de todos los animales empleados en el estudio.

Al construir la curva *Kaplan Meier*, se encontró una tendencia mayor en la supervivencia de las ratas del grupo de combinación (estimación de 72 días de supervivencia), con un aumento del 7 % en comparación con el grupo de ALB, del 28 % con el de MLT y del 35 % con el control.

El incremento de la citotoxicidad encontrado con la combinación de ALB o ALBSO con MLT, podría estar relacionado a una complementariedad de los mecanismos de acción de los fármacos bajo estudio. En la figura 17 se resumen los mecanismos actualmente reportados a través de los cuales podría llevarse a cabo el efecto sinérgico.

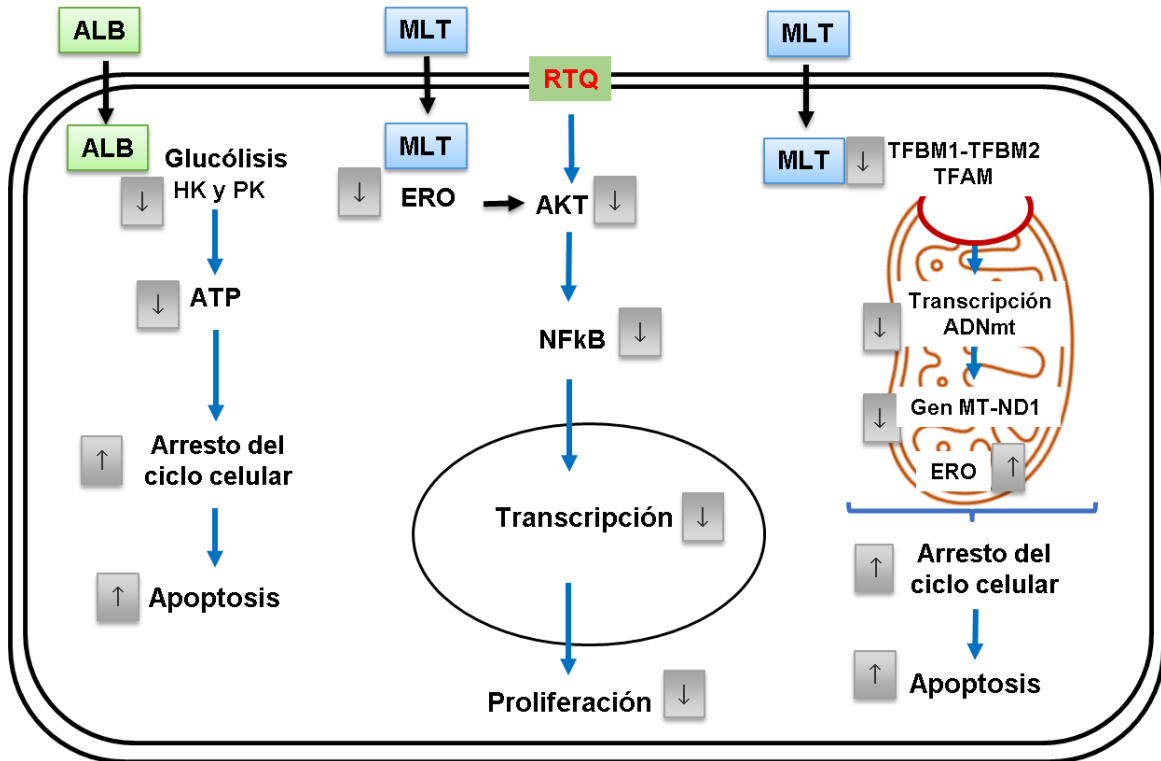


Figura 17. Mecanismos de acción de ALB y MLT a través de los cuales podría presentarse el efecto sinérgico en células de GB. ALB: Albendazol. MLT: Melatonina. HK: Hexoquinasa, PK: piruvato quinasa. AKT: Proteína quinasa B. NF-kB: Factor nuclear kB. TFAM, TFB1M y TFB2M: Factores de transcripción mitocondriales. RTQ: Receptor tirosina quinasa. MT-ND1: subunidad 1 (complejo I) de NADH deshidrogenasa. ADNmt: ADN mitocondrial. ERO: Especies reactivas de oxígeno. ↑: Incremento. ↓: disminución.

## 10. CONCLUSIONES

Las combinaciones de ALB con MLT y SOALB con MLT *in vitro* presentaron efectos aditivos y sinérgicos en las diferentes líneas bajo estudio, lo cual podría deberse a mecanismos de acción complementarios.

En el estudio *in vitro*, las alteraciones morfológicas y la disminución de la confluencia fue más evidentes con las combinaciones que con los fármacos individuales, siendo el principal tipo de muerte celular, la apoptosis.

En el estudio piloto *in vivo*, aun cuando no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, la combinación presento una mayor tendencia de sobrevida.

Los resultados del presente estudio muestran que la combinación ALB con MLT podría ser una estrategia potencial para ayudar en el tratamiento del GB, considerando que se conoce su perfil de seguridad de ambos fármacos, estos están disponibles comercialmente y son económicos. Sería necesario llevar a cabo las evaluaciones moleculares relacionadas con los mecanismos de acción involucrados, así como, realizar el estudio final *in vivo*.

## 11. PERSPECTIVAS

- Realizar evaluaciones *in vitro* para evidenciar los mecanismos que se presentan con los tratamientos individuales (ALB, SOALB y MLT) y las combinaciones (ALB + MLT y SOALB + MLT), que coadyuven a la interpretación del efecto de interacción sinérgica encontrado. Los estudios serían los siguientes:

- \*Determinación de la expresión y actividad de enzimas (HK, PK, AKT) y factores de transcripción (NF-kB y TFAM).
- \* Determinación de la concentración de ATP intracelular.
- \* Determinación de la actividad de la polimerización de tubulina.
- \* Determinación de ERO intracelulares.
- \*Evaluación de la expresión del transportador PRCM.
- \*Análisis del ciclo celular.

- Llevar a cabo el estudio final *in vivo* en el modelo de glioma, realizando las siguientes modificaciones:

- \*Para la evaluación de la eficacia se prepararán suspensiones de ALB y MLT, en carboximetilcelulosa al 0.5 %. Para la evaluación del efecto de la combinación se administrarán las suspensiones de manera conjunta.
- \*Para la evaluación del implante del tumor, al final del estudio se llevará a cabo un seguimiento por resonancia magnética y un análisis histopatológico de todos los animales.
- \*Para la evaluación de hepatotoxicidad, al final del estudio se realizará la medición en plasma de las enzimas alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y gamma-glutamil transferasa.
- \*Para la evaluación de balance, coordinación, desplazamiento, exploración y actividad locomotora se realizarán pruebas con equipos de rotarod (cilindro rotatorio) y optovarimex (unidad de registro óptico) al final del estudio.

## 12. REFERENCIAS

- Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Medina-Franco, J. L., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Hernández-Luis, F., and Hernández-Campos, A. (2013). Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to  $\beta$ -tubulin of *Trichinella spiralis*: insights from computational and experimental data. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 41, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmgs.2013.01.007>.
- Aguirre-Cruz L., Rangel-López, E., Cruz-Aguilera, D., Rodríguez-Pérez, C., Ruano, L., Velásquez-Pérez, L., Martínez-Moreno, M., Garduño-Espinosa, J., & Sotelo, J. (2016). Historical distribution of central nervous system tumors in the Mexican National Institute of Neurology and Neurosurgery. *Salud Pública de México*, 58(2), 171-178.
- Altwaigi, A. K., Raja, S., Manzoor, M., Aldandan, S., Alsaeed, E., Balbaid, A., Alhussain, H., Orz, Y., Lary, A., and Alsharm, A. A. (2017). Management and treatment recommendations for World Health Organization Grade III and IV gliomas. *International Journal of Health Sciences*, 11(3), 54–62.
- Ariey-Bonnet, J., Carrasco, K., Le Grand, M., Hoffer, L., Betzi, S., Feracci, M., Tsvetkov, P., Devred, F., Collette, Y., Morelli, X., Ballester, P., and Pasquier, E. (2020). In silico molecular target prediction unveils mebendazole as a potent MAPK14 inhibitor. *Molecular Oncology*, 14(12), 3083–3099. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12810>.
- Bae, S. H., Park, M. J., Lee, M. M., Kim, T. M., Lee, S. H., Cho, S. Y., Kim, Y. H., Kim, Y. J., Park, C. K., and Kim, C. Y. (2014). Toxicity profile of temozolomide in the treatment of 300 malignant glioma patients in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 29(7), 980–984. <https://doi.org/10.3346/jkms.2014.29.7.980>.
- Bai, R. Y., Staedtke, V., Aprhys, C. M., Gallia, G. L., and Riggins, G. J. (2011). Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, 13(9), 974–982. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor077>.
- Beiriger, J., Habib, A., Jovanovich, N., Kodavali, C. V., Edwards, L., Amankulor, N., and Zinn, P. O. (2022). The Subventricular Zone in Glioblastoma: Genesis, Maintenance, and Modeling. *Frontiers in Oncology*, 12, 790976. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.790976>.
- Bhatia, P., Bernier, M., Sanghvi, M., Moaddel, R., Schwarting, R., Ramamoorthy, A., and Wainer, I. W. (2012). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) localises to the nucleus in glioblastoma multiforme cells. *Xenobiotica; The Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 42(8), 748–755. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.662726>.
- Biasibetti, E., Valazza, A., Capucchio, M. T., Annovazzi, L., Battaglia, L., Chirio, D., Gallarate, M., Mellai, M., Muntoni, E., Peira, E., Riganti, C., Schiffer, D., Panciani, P., & Lanotte, M. (2017). Comparison of Allogeneic and Syngeneic Rat Glioma Models by Using MRI and Histopathologic Evaluation. *Comparative medicine*, 67(2), 147–156.
- Birzu, C., French, P., Caccese, M., Cerretti, G., Idbaih, A., Zaganel, V., and Lombardi, G. (2020). Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.3390/cancers13010047>.

Booth, L., Roberts, J. L., Cruickshanks, N., Tavallai, S., Webb, T., Samuel, P., Conley, A., Binion, B., Young, H. F., Poklepovic, A., Spiegel, S., and Dent, P. (2015). PDE5 inhibitors enhance celecoxib killing in multiple tumor types. *Journal of Cellular Physiology*, 230(5), 1115–1127. <https://doi.org/10.1002/jcp.24843>.

Byron, S. A., Tran, N. L., Halperin, R. F., Phillips, J. J., Kuhn, J. G., de Groot, J. F., Colman, H., Ligon, K. L., Wen, P. Y., Cloughesy, T. F., Mellinghoff, I. K., Butowski, N. A., Taylor, J. W., Clarke, J. L., Chang, S. M., Berger, M. S., Molinaro, A. M., Maggiora, G. M., Peng, S., Nasser, S., Liang W.S., Trent J.M., Berens M.E., Carpten J.D., Craig D.W., and Prados, M. D. (2018). Prospective Feasibility Trial for Genomics-Informed Treatment in Recurrent and Progressive Glioblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(2), 295–305. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0963>.

Castro, L. S., Kwiecinski, M. R., Ourique, F., Parisotto, E. B., Grinevicius, V. M., Correia, J. F., Wilhelm Filho, D., and Pedrosa, R. C. (2016). Albendazole as a promising molecule for tumor control. *Redox Biology*, 10, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.013>.

Chen, X., Hao, A., Li, X., Du, Z., Li, H., Wang, H., Yang, H., and Fang, Z. (2016). Melatonin inhibits tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells via the AKT-EZH2-STAT3 signaling axis. *Journal of Pineal Research*, 61(2), 208–217. <https://doi.org/10.1111/jpi.12341>.

Chou, T. C., and Talalay P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22:27–55.

Chou and Martin (2005), CompuSyn for PC Windows interface, CD-ROM, Web browser, graphic improvements, statistic updates, and polygonograms.

Chou, T. C., (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>.

Cipolla-Neto, J., and Amaral, F. G. D. (2018). Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine Reviews*, 39(6), 990–1028. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00084>.

Clinical trials. (2023). <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=abandcond=Glioblastomaandterm=Drug+combinationandcntry=andstate=andcity=anddist=> . Revisada 31 de agosto de 2023.

Cruz Da Silva, E., Mercier, M. C., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., and Choulier, L. (2021). A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials. *Cancers*, 13(8), 1795. <https://doi.org/10.3390/cancers13081795>.

Cruz, J. V. R., Batista, C., Afonso, B. H., Alexandre-Moreira, M. S., Dubois, L. G., Pontes, B., Moura Neto, V., & Mendes, F. A. (2022). Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers*, 14(13), 3203. <https://doi.org/10.3390/cancers14133203>.

de Gooijer, M. C., Kemper, E. M., Buil, L. C. M., Çitirikkaya, C. H., Buckle, T., Beijnen, J. H., and van Tellingen, O. (2021). ATP-binding cassette transporters restrict drug delivery and efficacy against brain tumors even when blood-brain barrier integrity is lost. *Cell reports. Medicine*, 2(1), 100184. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100184>.

De Vleeschouwer S, editor. (2017). *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469998/> doi: 10.15586/codon.glioblastoma.

Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., and Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 20503121211034366. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>.

Dymova, M. A., Kuligina, E. V., and Richter, V. A. (2021). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6385. <https://doi.org/10.3390/ijms22126385>.

Erazo-Valle-Solís, A., Juárez-Ramiro, A., Mora-Pérez, J., Cervantes-Sánchez, M.G., Fernández-Orozco, A., Gil-Ortiz-Mejía, C., Plácido-Méndez, A. M., Plascencia-Álvarez, N., Valdez-Orduño, R., Núñez-Guardado, G., Ceja-García, J. P., Cruz-López, J. C., Enríquez-Aceves, M. I., Figueroa-Martínez, P., Flores-Anaya, N., González-Vela, J. L., Guerrero-Maldonado, A., Hernández-Hernández, C. A., Hernández-Luis, G. N., Landa-Fernández, A. M., Murillo-Medina, K., Padilla-Ponce, I. and Serna-Camacho, M. E. (2017). Recomendaciones Institucionales ISSSTE en el tratamiento multidisciplinario de los gliomas de alto grado *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 22:110-130.

Escobedo, F., Penagos, P., Rodriguez, J., and Sotelo, J. (1987). Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Archives of Internal Medicine*, 147(4), 738–741.

Fan, Y., Zhang, X., Gao, C., Jiang, S., Wu, H., Liu, Z., and Dou, T. (2022). Burden and trends of brain and central nervous system cancer from 1990 to 2019 at the global, regional, and country levels. *Archives of Public Health = Archives Belges de Sante Publique*, 80(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s13690-022-00965-5>.

Farmacia San Pablo (2023). <https://www.farmaciasanpablo.com.mx/medicamentos/especialidades-medicas/s---t/temodal-sachet-5-capsulas-caja/p/000000000030220005>.

Fisher, J. P., and Adamson, D. C. (2021). Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines*, 9(3), 324. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030324>.

Franco, D., Moretti, I., and Marie, S. (2018). Mitochondria Transcription Factor A: A Putative Target for the Effect of Melatonin on U87MG Malignant Glioma Cell Line. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(5), 1129. <https://doi.org/10.3390/molecules23051129>.

GBD 2015 Risk Factors Collaborators (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388(10053), 1659–1724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).

Ghosh, D., Nandi, S., and Bhattacharjee, S. (2018). Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. *Clinical and Translational Medicine*, 7(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0211-8>.

Giakoumettis, D., Kritis, A., and Foroglou, N. (2018). C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 22(3), 105–112.

Gilg, A. G., Tye, S. L., Tolliver, L. B., Wheeler, W. G., Visconti, R. P., Duncan, J. D., Kostova, F. V., Bolds, L. N., Toole, B. P., and Maria, B. L. (2008). Targeting hyaluronan interactions in malignant gliomas and their drug-resistant multipotent progenitors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(6), 1804–1813. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1228>.

González-González, A., Mediavilla, M. D., and Sánchez-Barceló, E. J. (2018). Melatonin: A Molecule for Reducing Breast Cancer Risk. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(2), 336. <https://doi.org/10.3390/molecules23020336>.

González-Hernández, I., Ruiz-Olmedo, M. I., Cárdenas, G., and Jung-Cook, H. (2012). A simple LC-MS/MS method to determine plasma and cerebrospinal fluid levels of albendazole metabolites (albendazole sulfoxide and albendazole sulfone) in patients with neurocysticercosis. *Biomedical Chromatography: BMC*, 26(2), 267–272. <https://doi.org/10.1002/bmc.1659>.

Gouda, M. A., and Subbiah, V. (2023). Expanding the Benefit: Dabrafenib/Trametinib as Tissue-Agnostic Therapy for BRAF V600E-Positive Adult and Pediatric Solid Tumors. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 43, e404770. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_404770](https://doi.org/10.1200/EDBK_404770).

Grech, N., Dalli, T., Mizzi, S., Meilak, L., Calleja, N., and Zrinzo, A. (2020). Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population. *Cureus*, 12(5), e8195. <https://doi.org/10.7759/cureus.8195>.

Gu, J., Lu, Z., Ji, C., Chen, Y., Liu, Y., Lei, Z., Wang, L., Zhang, H. T., and Li, X. (2017). Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells. *Biomedicine and pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 93, 969–975. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.010>.

Guerra-Librero, A., Fernandez-Gil, B. I., Florido, J., Martinez-Ruiz, L., Rodríguez-Santana, C., Shen, Y. Q., García-Verdugo, J. M., López-Rodríguez, A., Rusanova, I., Quiñones-Hinojosa, A., Acuña-Castroviejo, D., Marruecos, J., De Haro, T., and Escames, G. (2021). Melatonin Targets Metabolism in Head and Neck Cancer Cells by Regulating Mitochondrial Structure and Function. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(4), 603. <https://doi.org/10.3390/antiox10040603>.

Hotchkiss, K. M., & Sampson, J. H. (2021). Temozolomide treatment outcomes and immunotherapy efficacy in brain tumor. *Journal of neuro-oncology*, 151(1), 55–62. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03598-2>.

Huls, M., Russel, F. G., and Masereeuw, R. (2009). The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(1), 3–9. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.132225>.



Instituto Mexicano del Seguro Social. (2013). Guía de Práctica Clínica Tratamiento del Glioma del Glioma Cerebral de alto grado (Astrocitoma-oligodendroglioma III-IV) en el Adulto. México. <http://www.imss.gob.mx/profesionales/guiasclinicas/Pages/guias.aspx>.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). (2018). Tabulador de cuotas de recuperación. <https://www.gob.mx/salud/innn/documentos/tabulador-de-cuotas-de-recuperacion>.

Jiapaer, S., Furuta, T., Tanaka, S., Kitabayashi, T., & Nakada, M. (2018). Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. *Neurologia medico-chirurgica*, 58(10), 405–421. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>.

Johanssen, T., McVeigh, L., Erridge, S., Higgins, G., Straehla, J., Frame, M., Aittokallio, T., Carragher, N. O., and Ebner, D. (2023). Glioblastoma and the search for non-hypothesis driven combination therapeutics in academia. *Frontiers in Oncology*, 12, 1075559. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1075559>.

Kim, U., Shin, C., Kim, C. Y., Ryu, B., Kim, J., Bang, J., and Park, J. H. (2021). Albendazole exerts antiproliferative effects on prostate cancer cells by inducing reactive oxygen species generation. *Oncology Letters*, 21(5), 395. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12656>.

Kim, S. H., Yoo, H., Chang, J. H., Kim, C. Y., Chung, D. S., Kim, S. H., Park, S. H., Lee, Y. S., and Yang, S. H. (2018). Procarbazine and CCNU Chemotherapy for Recurrent Glioblastoma with MGMT Promoter Methylation. *Journal of Korean Medical Science*, 33(24), e167. <https://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e167>.

Lacey, E., and Watson, T. R. (1985). Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 34(7), 1073–1077. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90611-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90611-2).

Li, Y., Li, S., Zhou, Y., Meng, X., Zhang, J. J., Xu, D. P., and Li, H. B. (2017). Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*, 8(24), 39896–39921. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16379>.

Liang, J., Zhu, Y., Gao, C., Ling, C., Qin, J., Wang, Q., Huang, Y., Lu, W. and Wang, J. (2019). Menthol-modified BSA nanoparticles for glioma targeting therapy using an energy restriction strategy. *NPG Asia Mater.* 11,38. <https://doi.org/10.1038/s41427-019-0138-6>.

Liang, J., Li, R., He, Y., Ling, Wang, Q., Huang, Y., Qin, J., Lu, W., Wang, J. (2018). A novel tumor-targeting treatment strategy uses energy restriction via co-delivery of albendazole and nanosilver. *Nano Research*, 11(9): 4507-4523. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2032-x>.

Lin, F., de Gooijer, M. C., Roig, E. M., Buil, L. C., Christner, S. M., Beumer, J. H., Würdinger, T., Beijnen, J. H., and van Tellingen, O. (2014). ABCB1, ABCG2, and PTEN determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(10), 2703–2713. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0084>.

Lissoni, P., Meregalli, S., Nosetto, L., Barni, S., Tancini, G., Fossati, V., and Maestroni, G. (1996). Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology*, 53(1), 43–46. <https://doi.org/10.1159/000227533> (a).

Lissoni, P., Paolorossi, F., Tancini, G., Ardizzioia, A., Barni, S., Brivio, F., Maestroni, G. J., and Chillelli, M. (1996). A phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic solid tumour patients. *British Journal of Cancer*, 74(9), 1466–1468. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.566> (b).

Liu, D., Yang, T., Ma, W., and Wang, Y. (2022). Clinical strategies to manage adult glioblastoma patients without MGMT hypermethylation. *Journal of Cancer*, 13(1), 354–363. <https://doi.org/10.7150/jca.63595> (a).

Liu, H., Qiu, W., Sun, T., Wang, L., Du, C., Hu, Y., Liu, W., Feng, F., Chen, Y., & Sun, H. (2022). Therapeutic strategies of glioblastoma (GBM): The current advances in the molecular targets and bioactive small molecule compounds. *Acta pharmaceutica Sinica B*, 12(4), 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.12.019> (b).

Liu, P., Brown, S., Goktug, T., Channathodiyil, P., Kannappan, V., Hugnot, J. P., Guichet, P. O., Bian, X., Armesilla, A. L., Darling, J. L., and Wang, W. (2012). Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *British Journal of Cancer*, 107(9), 1488–1497. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.442>.

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., and Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiotti, R., von Deimling, A., and Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.

Lozinski, M., Bowden, N. A., Graves, M. C., Fay, M., and Tooney, P. A. (2021). DNA damage repair in glioblastoma: current perspectives on its role in tumour progression, treatment resistance and PIKKing potential therapeutic targets. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 44(5), 961–981. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00613-0>.

Lyne, S. B., and Yamini, B. (2021). An Alternative Pipeline for Glioblastoma Therapeutics: A Systematic Review of Drug Repurposing in Glioblastoma. *Cancers*, 13(8), 1953. <https://doi.org/10.3390/cancers13081953>.

Macchi, M. M., and Bruce, J. N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25(3-4), 177–195. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2004.08.001>.

Marriner, S. E., Morris, D. L., Dickson, B., and Bogan, J. A. (1986). Pharmacokinetics of albendazole in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 30(6), 705–708. <https://doi.org/10.1007/BF00608219>.

Marslin, G., Siram, K., Liu, X., Khandelwal, V. K. M., Xiaolei, S., Xiang, W., and Franklin, G. (2017). Solid Lipid Nanoparticles of Albendazole for Enhancing Cellular Uptake and Cytotoxicity against U-87 MG Glioma Cell Lines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(11), 2040. <https://doi.org/10.3390/molecules22112040>.

Martín, V., Herrera, F., Carrera-Gonzalez, P., García-Santos, G., Antolín, I., Rodríguez-Blanco, J., and Rodríguez, C. (2006). Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Research*, 66(2), 1081–1088. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2354>.

Martín, V., García-Santos, G., Rodríguez-Blanco, J., Casado-Zapico, S., Sanchez-Sanchez, A., Antolín, I., Medina, M., and Rodríguez, C. (2010). Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. *Cancer Letters*, 287(2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.06.016>.

Martín, V., Sanchez-Sanchez, A. M., Herrera, F., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Alvarez-Vega, M. A., Antolín, I., and Rodríguez, C. (2013). Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. *British Journal of Cancer*, 108(10), 2005–2012. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.188>.

Martín, V., Sanchez-Sanchez, A. M., Puente-Moncada, N., Gomez-Lobo, M., Alvarez-Vega, M. A., Antolín, I., and Rodríguez, C. (2014). Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. *Journal of Pineal Research*, 57(3), 308–316. <https://doi.org/10.1111/jpi.12170>.

Matos-Rojas, I. A., Bertholdo, D., and Castillo, M. (2012). Células madre: implicaciones en el desarrollo de tumores cerebrales [Stem cells: implications in the development of brain tumors]. *Radiología*, 54(3), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2011.05.014>.

Merino, G., Alvarez, A. I., Prieto, J. G., and Kim, R. B. (2002). The anthelmintic agent albendazole does not interact with p-glycoprotein. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 30(4), 365–369. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.4.365>.

Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Pulido, M. M., Molina, A. J., Alvarez, A. I., and Schinkel, A. H. (2005). Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 33(5), 614–618. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003319>.

Miller K. D., Ostrom Q. T., Kruchko C, Patil N., Tihan T., Cioffi G., Fuchs H. E., Waite K. A., Jemal A., Siegel R. L. and Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). Brain and other central nervous system tumor statistics. *Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71:381–406. <https://doi.org/10.3322/caac.21693>.

Minich, D. M., Henning, M., Darley, C., Fahoum, M., Schuler, C. B., and Frame, J. (2022). Is Melatonin the "Next Vitamin D"? A Review of Emerging Science, Clinical Uses, Safety, and Dietary Supplements. *Nutrients*, 14(19), 3934. <https://doi.org/10.3390/nu14193934>.

Moreno-Jiménez, S., Alegría-Loyola, M. A., Sonabend, A. M., Romano, S. K., and Romo, C. G. (2021). Management of glioblastoma: a perspective from Mexico. *Chinese clinical Oncology*, 10(4), 44. <https://doi.org/10.21037/cco-20-129>.

Moretti, E., Favero, G., Rodella, L. F., and Rezzani, R. (2020). Melatonin's Antineoplastic Potential Against Glioblastoma. *Cells*, 9(3), 599. <https://doi.org/10.3390/cells9030599>.

Morris, D. L., Jourdan, J. L., and Pourgholami, M. H. (2001). Pilot study of albendazole in patients with advanced malignancy. Effect on serum tumor markers/high incidence of neutropenia. *Oncology*, 61(1), 42–46. <https://doi.org/10.1159/000055351>.

Mudduluru, G., Walther, W., Kobelt, D., Dahlmann, M., Treese, C., Assaraf, Y. G., and Stein, U. (2016). Repositioning of drugs for intervention in tumor progression and metastasis: Old drugs for new targets. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 26, 10–27. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.03.002>.

Muenster, U., Grieshop, B., Ickenroth, K., and Gnoth, M. J. (2008). Characterization of substrates and inhibitors for the in vitro assessment of Bcrp mediated drug-drug interactions. *Pharmaceutical Research*, 25(10), 2320–2326. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9632-1>.

NORMA Oficial Mexicana. (1999). NOM-062-ZOO-1999, “especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf). Revisado el 28 de junio de 2023.

Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro-Oncology*, 24(Suppl 5), v1–v95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>.

Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., and Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal?. *The FEBS Journal*, 273(13), 2813–2838. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x>.

Pizzorno J. (2014). Glutathione!. *Integrative Medicine (Encinitas, Calif.)*, 13(1), 8–12.

Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., and Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet. Global Health*, 4(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7).

Pourgholami, M. H., Akhter, J., Wang, L., Lu, Y., and Morris, D. L. (2005). Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55(5), 425–432. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0927-6>.

Pourgholami, M. H., Cai, Z. Y., Wang, L., Badar, S., Links, M., and Morris, D. L. (2009). Inhibition of cell proliferation, vascular endothelial growth factor and tumor growth by albendazole. *Cancer investigation*, 27(2), 171–177. <https://doi.org/10.1080/07357900802210752>.

Pourgholami, M. H., Szwajcer, M., Chin, M., Liauw, W., Seef, J., Galettis, P., Morris, D. L., and Links, M. (2010). Phase I clinical trial to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(3), 597–605. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1157-8>.

Rattray, Z., Deng, G., Zhang, S., Shirali, A., May, C. K., Chen, X., Cuffari, B. J., Liu, J., Zou, P., Rattray, N. J., Johnson, C. H., Dubljevic, V., Campbell, J. A., Huttner, A., Baehring, J. M., Zhou, J., and Hansen, J. E. (2021). ENT2 facilitates brain endothelial cell penetration

and blood-brain barrier transport by a tumor-targeting anti-DNA autoantibody. *JCI Insight*, 6(14), e145875. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145875>.

Reiter, R. J., and Benitez, K. G. (2009). Melatonin reduces neuronal loss and cytoskeletal deterioration: implications for psychiatry. *Salud Mental*. 32:3-11.

Reiter, R. J., and Korkmaz, A. (2008). Clinical aspects of melatonin. *Saudi Medical Journal*, 29(11), 1537–1547.

Rendine, S.; Pieraccini, S; and Sironi, M. (2010) Vinblastine perturbation of tubulin protofilament structure: a computational insight. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 12/2010, Volumen 12, 15530–15536 doi: 10.1039/c0cp00594k.

Rodríguez, R., Lombardo, K., Roldán G., Silvera J. and Lagomarsino, R. (2012). Glioblastoma multiforme cerebral hemisférico: análisis de sobrevida de 65 casos tratados en el Departamento de Oncología del Hospital de Clínicas, desde 1980 a 2000. *Revista Médica del Uruguay*, 28(4), 250-261.

Russel, F.G. (2010). Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. In: Pang, K., Rodrigues, A., Peter, R. (eds) *Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions*. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0840-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0840-7_2).

Sarti, P., Magnifico, M. C., Altieri, F., Mastronicola, D., and Arese, M. (2013). New evidence for cross talk between melatonin and mitochondria mediated by a circadian-compatible interaction with nitric oxide. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11259–11276. <https://doi.org/10.3390/ijms140611259>.

Silantsev, A. S., Falzone, L., Libra, M., Gurina, O. I., Kardashova, K. S., Nikolouzakis, T. K., Nosyrev, A. E., Sutton, C. W., Mitsias, P. D., and Tsatsakis, A. (2019). Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 8(8), 863. <https://doi.org/10.3390/cells8080863>.

Son, D. S., Lee, E. S., and Adunyah, S. E. (2020). The Antitumor Potentials of Benzimidazole Anthelmintics as Repurposing Drugs. *Immune Network*, 20(4), e29. <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e29>.

Sotelo, J., and Jung, H. (1998). Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clinical Pharmacokinetics*, 34(6), 503–515. <https://doi.org/10.2165/00003088-199834060-00006>.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Takayanagui, O. M., Bonato, P. S., Dreossi, S. A., and Lanchote, V. L. (2002). Enantioselective distribution of albendazole metabolites in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54(2), 125–130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2002.01634.x>.

Talib, W. H., Alsayed, A. R., Abuawad, A., Daoud, S., and Mahmud, A. I. (2021). Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(9), 2506. <https://doi.org/10.3390/molecules26092506>.

Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., and Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(4), 299–312. <https://doi.org/10.3322/caac.21613>.

Tarocco, A., Caroccia, N., Morciano, G., Wieckowski, M. R., Ancora, G., Garani, G., and Pinton, P. (2019). Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death & Disease*, 10(4), 317. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>.

Tilak, M., Holborn, J., New, L. A., Lalonde, J., and Jones, N. (2021). Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Targeting in Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1831. <https://doi.org/10.3390/ijms22041831>.

Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., and Fougerou, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, 15(3), 434–443. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666161228122115>.

Upadhyay A. (2020). Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. *Genes & diseases*, 8(5), 655–661. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.002>.

van der Meulen, M., Ramos, R. C., Mason, W. P., Von Deimling, A., and Maas, S. L. N. (2022). Opinion and Special Article: Glioma Classification: How to Interpret Molecular Markers in a Diffuse Glioma Pathology Report. *Neurology*, 10.1212/WNL.0000000000201262. Advance Online Publication. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201262>.

Vijayalaxmi, Thomas, C. R., Jr, Reiter, R. J., and Herman, T. S. (2002). Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(10), 2575–2601. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.11.004>.

Wang D., Wang, C., Wang, L., and Chen, Y. (2019). A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Delivery*, 26(1), 551–565. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1616235>.

Wang, L., Wang, C., and Choi, W. S. (2022). Use of Melatonin in Cancer Treatment: Where Are We?. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3779. <https://doi.org/10.3390/ijms23073779>.

Wen, P. Y., Weller, M., Lee, E. Q., Alexander, B. M., Barnholtz-Sloan, J. S., Barthel, F. P., Batchelor, T. T., Bindra, R. S., Chang, S. M., Chiocca, E. A., Cloughesy, T. F., DeGroot, J. F., Galanis, E., Gilbert, M. R., Hegi, M. E., Horbinski, C., Huang, R. Y., Lassman, A. B., Le, Rhun, E., Lim, M., Mehta, M. P., Mellinghoff, I. K., Minniti, G., Nathanson, D., Platten, M., Preusser, M., Roth, P., Sanson, M., Schiff, D., Short, S. C., Taphoorn, M. J. B., Tonn, J. C., Tsang, J., Verhaak, R. G. W., von Deimling, A., Wick, W., Zadeh, G., Reardon, D. A., Aldape,

K. D., and van den Bent, M. J. (2020). Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology*, 22(8), 1073–1113. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa106>.

Wick, W., Osswald, M., Wick, A., and Winkler, F. (2018). Treatment of glioblastoma in adults. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, 1756286418790452. <https://doi.org/10.1177/1756286418790452>.

Yang, M. H., Ha, I. J., Um, J. Y., and Ahn, K. S. (2021). Albendazole Exhibits Anti-Neoplastic Actions against Gastric Cancer Cells by Affecting STAT3 and STAT5 Activation by Pleiotropic Mechanism(s). *Biomedicines*, 9(4), 362. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040362>.

Yool, A. J., and Ramesh, S. (2020). Molecular Targets for Combined Therapeutic Strategies to Limit Glioblastoma Cell Migration and Invasion. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 358. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00358>.

Zhou, N., Wei, Z. X., and Qi, Z. X. (2019). Inhibition of autophagy triggers melatonin-induced apoptosis in glioblastoma cells. *BMC Neuroscience*, 20(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0545-1>.

Article

## Melatonin in Combination with Albendazole or Albendazole Sulfoxide Produces a Synergistic Cytotoxicity against Malignant Glioma Cells through Autophagy and Apoptosis

Miguel Hernández-Cerón <sup>1,†</sup>, Víctor Chavarría <sup>2,†</sup>, Camilo Ríos <sup>1,3</sup>, Benjamin Pineda <sup>2</sup>,  
Francisca Palomares-Alonso <sup>4</sup>, Irma Susana Rojas-Tomé <sup>4</sup> and Helgi Jung-Cook <sup>5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Doctorate in Biological and Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City 04960, Mexico; miguelqbuamx@gmail.com (M.H.-C.); crios@correo.xoc.uam.mx (C.R.)  
<sup>2</sup> Neuroimmunology and Neuro-Oncology Unit, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Mexico City 14269, Mexico; vchavarría@innn.edu.mx (V.C.); benjamin.pineda@innn.edu.mx (B.P.)  
<sup>3</sup> Laboratorio de Neurofarmacología Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Mexico City 04960, Mexico  
<sup>4</sup> Neuropsychopharmacology Lab, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City 14269, Mexico; francisca.palomares@innn.edu.mx (F.P.-A.); isrtome@hotmail.com (I.S.-T.)  
<sup>5</sup> Pharmacy Department, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico  
 \* Correspondence: helgi@unam.mx  
 † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Hernández-Cerón, M.; Chavarría, V.; Ríos, C.; Pineda, B.; Palomares-Alonso, F.; Rojas-Tomé, I.S.; Jung-Cook, H. Melatonin in Combination with Albendazole or Albendazole Sulfoxide Produces a Synergistic Cytotoxicity against Malignant Glioma Cells through Autophagy and Apoptosis. *Brain Sci.* **2023**, *13*, 869. <https://doi.org/10.3390/brainsci13060869>

Academic Editors: Luis Esquivel Ibarra, Laura Natalia Milla Sanabria and Nuria Arias-Ramos

Received: 10 May 2023  
 Revised: 23 May 2023  
 Accepted: 25 May 2023  
 Published: 27 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Glioblastoma is the most aggressive and lethal brain tumor in adults, presenting diffuse brain infiltration, necrosis, and drug resistance. Although new drugs have been approved for recurrent patients, the median survival rate is two years; therefore, new alternatives to treat these patients are required. Previous studies have reported the anticancer activity of albendazole, its active metabolite albendazole sulfoxide, and melatonin; therefore, the present study was performed to evaluate if the combination of melatonin with albendazole or with albendazole sulfoxide induces an additive or synergistic cytotoxic effect on C6 and RG2 rat glioma cells, as well as on U87 human glioblastoma cells. Drug interaction was determined by the Chou–Talalay method. We evaluated the mechanism of cell death by flow cytometry, immunofluorescence, and crystal violet staining. The cytotoxicity of the combinations was mainly synergistic. The combined treatments induced significantly more apoptotic and autophagic cell death on the glioma cell lines. Additionally, albendazole and albendazole sulfoxide inhibited proliferation independently of melatonin. Our data justify continuing with the evaluation of this proposal since the combinations could be a potential strategy to aid in the treatment of glioblastoma.

**Keywords:** glioblastoma; melatonin; albendazole; albendazole sulfoxide; synergism

### 1. Introduction

Glioblastoma (GB) is the most frequent malignant tumor of the central nervous system (CNS) in adults, and it has a poor prognosis. Currently, the standard treatment involves maximal surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy; however, the median overall survival is between 12 and 15 months [1]. In 2017, bevacizumab, an angiogenesis inhibitor, received Food and Drug Administration approval for the treatment of adults with recurrent GB that has progressed following prior therapy; however, the median overall survival did not exceed 24 months [2]. The poor prognosis of GB treatment is related to the low specificity of chemotherapeutic agents, the difficulty of most antitumor agents to access the CNS due to the blood–brain barrier (BBB), as well as the limitation to intracellular accumulation of drugs in tumor cells mediated by efflux transporters [3–5]. Therefore, these challenges point to the need to develop new therapies for this disease.



Drug repositioning has been a successful strategy to investigate existing drugs for additional clinical indications, with evidence supporting the anticancer effects of benzimidazole carbamates [6,7]. In this category, albendazole (ALB) has been addressed in different cancer models, including GB [8–10], with a well-tolerated high dose as anticancer treatment in clinical trials [11].

After oral administration, ALB is rapidly transformed into the chiral active metabolite albendazole sulfoxide [(+)-ALBSO; (–)-ALBSO], which possesses anthelmintic activity, and into the non-chiral metabolite albendazole sulfone, which lacks pharmacologic activity. Studies from microsomal investigations in several species suggests that CYP3A4 and flavin-containing monooxygenase (FMO) are major enzymes responsible for the formation of sulfoxide metabolites from ALB [12]. Lee et al. reported that the ALBSO formation from ALB is also mediated by the CYP2J2 isoform, and significantly higher than those by the CYP3A4 isoform [13]. ALBSO readily crosses the BBB due to its high lipid solubility, presenting high availability in CNS, with almost half the concentration in cerebrospinal fluid than in plasma [14,15]. ALB and ALBSO are classically known for their affinity for tubulin and alteration of the microtubule assembly [16]. In addition, ALB has been reported as pleiotropic drugs with multiple effects on cells, including the inhibition of phosphorylation signaling pathways [17] and induction of oxidative stress promoting DNA fragmentation [18].

Melatonin (MLT), an endogenous indolamine synthesized primarily by the pineal gland, regulates numerous processes in humans, such as the sleep–wake cycle, immunomodulation, and endocrine function. MLT is primarily metabolized to 6-hydroxymelatonin, but MLT can also be deacetylated to 5-methoxytryptamine and  $N^1$ -acetyl-5-methoxykynuramine in the CNS, with antioxidant properties to capture reactive oxygen species and reactive nitrogen species [19–21]. MLT is a highly lipophilic molecule that can diffuse through the cell membrane to interact with intracellular targets [22]. Several studies have shown the potential use of MLT in the treatment of cancer [23], including GB, with synergistic activity when combined with other drugs, attributed to the inhibition of multiple pro-survival pathways, the inhibition of efflux pumps, and the regulation of autophagy [24–27].

The present study was performed to evaluate if the combination of MLT with ALB or with ALBSO induces an additive or synergistic cytotoxic effect in glioma cells. Likewise, the cell death mechanisms involved were investigated. The assays were conducted on three of the most widely used cell lines (C6, RG2, and U87).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents, Drugs, and Antibodies

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), antibiotic-antimycotic solution (10,000 units of penicillin, 10 mg of streptomycin, and 25  $\mu$ g of amphotericin B per mL), 10 $\times$  trypsin solution, albendazole (ALB), albendazole sulfoxide (ALBSO), melatonin (MLT), propidium iodide (PI), crystal violet, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Biowest (Nuaillé, Pays de la Loire, France). MACS bovine serum albumin was obtained from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). APC-Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD was obtained from BioLegend (San Diego, CA, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethanol (Merck, Readington Township, NJ, Germany) were of analytical reagent grade. Acridine orange (AO) was obtained from Polysciences (Warrington, PA, USA). The goat polyclonal antibody anti-MAP LC3 was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), and the anti-goat IgG-FITC antibody was obtained from Abcam (Cambridge, UK).

### 2.2. Glioma Cells and Cell Culture

C6 and RG2 rat malignant glioma cell lines and U87 human glioblastoma cell line were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were maintained in DMEM with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic solution in a 37 °C

incubator with 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and 98% relative humidity. Cells were maintained in culture flasks until they reached 80–90% confluence. Confluent cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and detached by incubation in 1 × trypsin solution, for collection and seeding.

### 2.3. Concentration-Effect and Combination Study

For concentration-effect study, the stock solutions of ALB 2000 µM and ALBSO 20,000 µM were prepared in DMSO. Additionally, a stock solution of MLT 200 mM was prepared in ethanol. The stock solutions were serially diluted in DMEM to prepare working solutions of each drug to obtain final concentrations 0.16, 0.24, 0.36, 0.55, 0.83, and 1.25 µM for ALB; 2, 4, 8, 16, 32, and 64 µM for ALBSO; and 0.18, 0.37, 0.75, 1.5, 3, and 6 mM for MLT. DMSO and ethanol concentrations in DMEM did not exceed 0.5% and 3%, respectively. Solutions of DMSO and ethanol were used as vehicle control. To evaluate the cytotoxic effect of the treatments,  $3 \times 10^3$  cells were seeded into 96-well tissue culture plates. Then, 24 h later, the cells were incubated with 100 µL of working solutions of ALB, ALBSO, MLT, and vehicle. After 72 h of treatment, the medium was removed, and cells were washed with PBS, and then 100 µL of MTT solution at a concentration of 5 mg/mL in DMEM was added to each well and incubated for 3 h at 37 °C. Afterward, the medium was aspirated, and blue formazan crystals were solubilized with 100 µL of DMSO. Absorbance was determined using a microplate reader (Synergy LX, BioTek, Winooski, VT, USA) at 570 nm. Six replicates were evaluated for each treatment, and the experiments were repeated at least four times. The cell viability percentage was calculated by the formula:

$$(\text{Absorbance of treated group} / \text{Absorbance of vehicle}) \times 100$$

The median dose effect (Dm) equivalent to mean inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the concentration–response curves was calculated using the Chou–Talalay method [28,29] and CompuSyn.exe® software (Version 1.0), developed from the physical–chemical principle of the mass-action law analysis via mathematical induction and deduction.

Once the Dm values of each drug were calculated, they were used to design the combination study. The experimental procedures for preparing the solutions and assessing the cell viability were the same as described in the concentration-effect study. DMEM with maximum 0.5% of DMSO and 3% of ethanol was prepared as vehicle control. Each experiment was performed in triplicate over six repetitions. The combination index (CI) was calculated from the Chou–Talalay method using CompuSyn.exe® software (Version 1.0), which represents a quantitative measure of the extent of drug interaction with the following ranges: CI = 0.1–0.90 (synergism), 0.90–1.10 (nearly additive), and 1.10 to >10 (antagonism) [28,29].

### 2.4. Determination of Cell Death Mechanisms

The combinations selected for the study were those that presented the greatest cytotoxic effect. In the C6 cell line, the concentrations were ALB 0.6 µM–MLT 0.6 mM and ALBSO 20 µM–MLT 1 mM, while for the RG2 cell line, the concentrations were ALB 0.6 µM–MLT 0.6 mM and ALBSO 26 µM–MLT 0.9 mM. For the U87 cell line, the concentrations used were ALB 0.45 µM–MLT 0.45 mM and ALBSO 18 µM–MLT 0.45 mM. In addition, the effect of individual drugs at the same concentrations was evaluated. For the experiments,  $2 \times 10^4$  cells were seeded into 24-well tissue culture plates. Then, 24 h later, the cells were incubated with 1 mL of working solutions of the combinations and vehicle. After 48 h of treatment, the culture medium was transferred to flow cytometry tubes, and the cells were washed with PBS. Then, cells were detached by adding 1X trypsin solution and were harvested into the same centrifuge tubes. The samples were centrifuged at 2000 rpm for 5 min, and the supernatants were discarded, taking care not to throw the button of sedimented cells.

#### 2.4.1. Apoptosis Detection with Annexin V and 7-AAD Double Stain

To detect annexin V bound to phosphatidylserine (PS) in the extracellular plasma membrane and 7-AAD bound to DNA, the Apoptosis detection with Annexin V and 7-AAD double stain assay was used [30]. To carry out these determinations, the treatments were prepared and processed as indicated in Section 2.4. After centrifuging and removing the supernatant, the pellet was resuspended with APC-labeled Annexin V and 7AAD in 100  $\mu$ L of binding buffer. After 15 min of incubation at room temperature in the dark, 400  $\mu$ L of binding buffer was added to analyze the cells by flow cytometry within 1 h after treatment. A total of 10,000 events were acquired in a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Analysis was performed using CellQuest Pro and FlowJo v10 software. The dot plots were divided in quadrants to quantify the viable cells (Q4: Annexin V<sup>-</sup>/7AAD<sup>-</sup>), total apoptotic cells (Q3: early apoptosis, Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup> plus Q2: late apoptosis, Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup>) and necrotic cells (Q1: Annexin V<sup>-</sup>/7AAD<sup>+</sup>). The fluorescence distribution was shown as a colored dot plot analysis. Data were obtained from three independent experiments performed in triplicate.

#### 2.4.2. Evaluation of Autophagy

##### Detection of Acidic Vesicular Organelles

Autophagy is characterized by the formation and promotion of acidic vesicular organelles (AVOs) [31]. We used the lysosomotropic agent acridine orange (AO), which moves freely across biological membranes when it is uncharged; its protonated form accumulates in acidic cell compartments, where it forms aggregates that fluoresce bright red, as we have previously reported [32]. Flow cytometry with AO staining was employed to detect and quantify the cells with AVOs. In AO-stained cells, the cytoplasm and nucleus fluoresce bright green and dim red, respectively, whereas acidic compartments fluoresce bright red. Therefore, we measured the change in the intensity of the red fluorescence to obtain the percentage of cells with AVOs. To carry out these determinations, the treatments were prepared and processed as indicated in Section 2.4. Briefly, after centrifuging and removing the supernatant, cells were resuspended and stained with 300  $\mu$ L of a solution of 1  $\mu$ g/mL AO in DMEM for 15 min at room temperature and analyzed on a CytoFlex SRT cell sorter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), measuring the green (FL-1, *x*-axis) vs. the red (FL-3, *y*-axis) fluorescence of AO in a linear scale. Dot plots are divided in quadrants, where the use of the upper-left and the upper-right quadrants of the dot plot (red fluorescent events) was used to represent the percentage of autophagic cells. These assays were performed in triplicate.

##### LC3 immunofluorescence Staining

The microtubule-associated protein 1 light-chain 3 (LC3) is essential for amino-acid starvation-induced autophagy and is associated with the autophagosome membrane [33]. In this case,  $1.5 \times 10^4$  glioma cells were seeded on chamber slide dishes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), and treated with the drug concentrations and vehicle indicated in Section 2.4. After 48 h of treatment, cells were fixed with cold methanol for 30 min, washed twice with PBS and blocked with 2% bovine serum albumin for 10 min three times. After that, cells were incubated with the goat polyclonal antibody anti-MAP LC3 (1:400) for 30 min at room temperature. Then, cells were washed twice with PBS, blocked with 2% bovine serum albumin three times for 10 min, and incubated by additional 30 min in darkness with an anti-goat IgG-FITC antibody (1:400), washed again with PBS, and finally mounted with DAPI-mounting fluid. Images were obtained on a Leica DMLS microscope, with a 100 $\times$  objective using the Leica Application Suite software (v. 4.0).

#### 2.5. Proliferation Assay

For this test, the crystal violet dye was used, which binds to proteins and DNA molecules of attached cells, where cell proliferation can be calculated in relation to the amount of biomass present after treatment, since dead cells are shed, reducing the staining

with crystal violet [34]. Briefly,  $2 \times 10^3$  cells were seeded into 96-well plates and treated with the drug concentrations indicated in Section 2.4. Media were removed, and cells were fixed with a solution of cold ethanol (70%) for 30 min at room temperature after 1, 3, 5, and 7 days of treatment. Finally, cells were stained with a crystal violet solution (0.1%) for 30 min, and the supernatants were discarded. Crystals were dissolved with 100  $\mu$ L of 10% glacial acetic acid solution, and absorbance was measured in a spectrophotometer Eon at 570 nm. The relative cell proliferation of each treatment group was calculated by the formula:

$$\text{Absorbance of "X" group on each day (day 1, 3, 5, 7)} / \text{Absorbance of "X" group on day 1}$$

where the "X" group represents a specific treatment group, dividing the absorbances obtained on days 1, 3, 5, and 7 by the absorbances of the same treatment group on day 1, individually, obtaining the relative cell proliferation. Analysis of the proliferation assay was performed by comparing the relative cell proliferation between the treatment groups on each day.

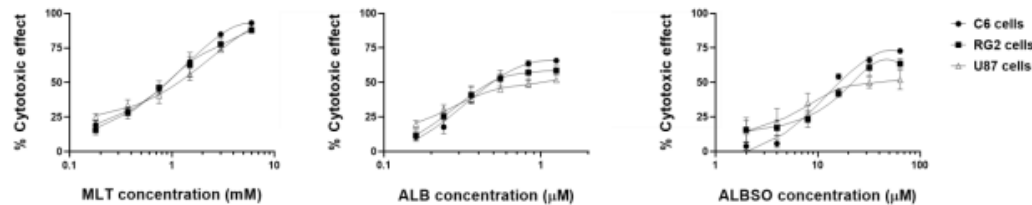
### 2.6. Statistical Analysis

Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). GraphPad Prism 6 software (v. 6.07) was used for statistical analysis, normality of the data was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test, and statistical analysis was performed with the Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test.

## 3. Results

### 3.1. ALB, ALBSO, and MLT Induced a Cytotoxic Effect on C6, RG2, and U87 Cell Lines

We found that all three drugs induced a cytotoxic effect in a concentration-dependent manner (Figure 1). In addition, the Dm values for ALB were 0.6  $\mu$ M, 0.6  $\mu$ M, and 0.9  $\mu$ M in the C6, RG2, and U87 cell lines, respectively. For the ALBSO, the Dm values were 20  $\mu$ M, 26  $\mu$ M and 36  $\mu$ M in the C6, RG2, and U87 cells, respectively. In the case of MLT, the obtained Dm values were 1 mM, 0.9 mM, and 0.9 mM, for C6, RG2, and U87 cells, respectively.

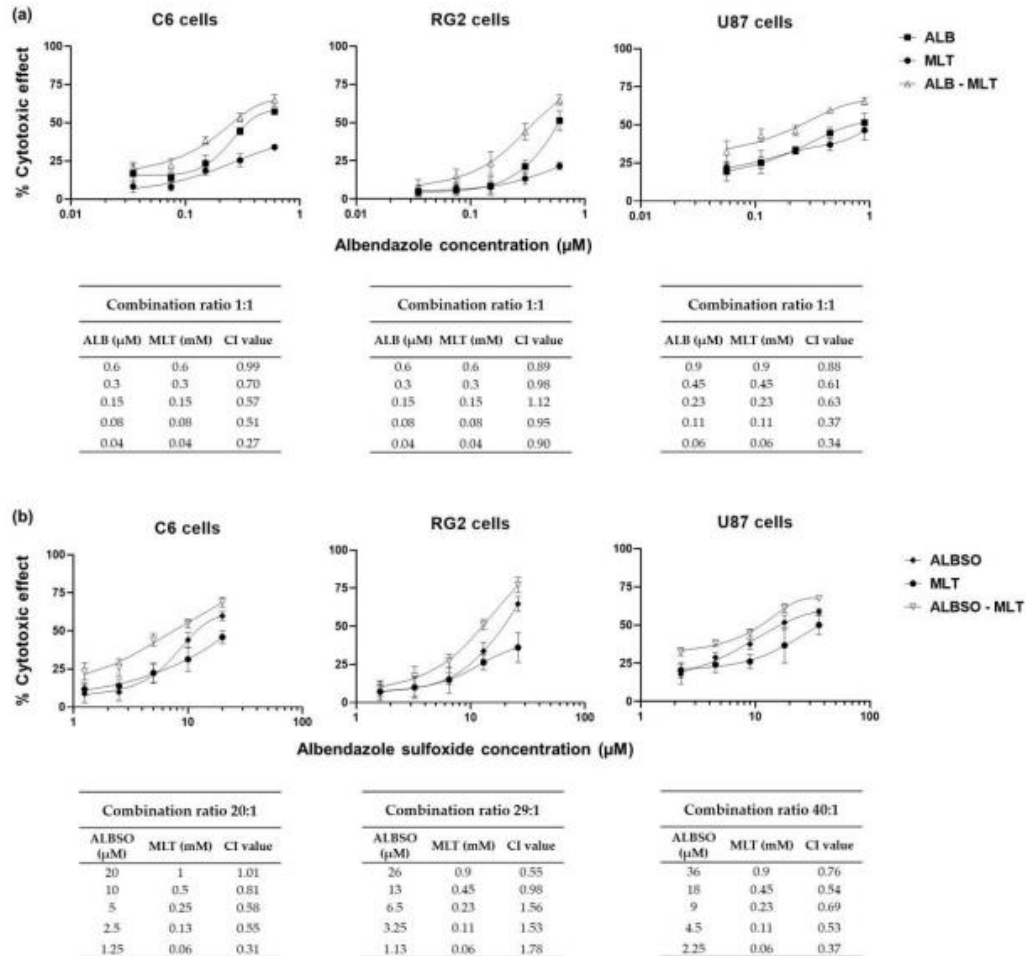


**Figure 1.** Concentration-effect curves of individual drugs. Cytotoxic effect after 72 h, in the three cell lines evaluated by the MTT reduction assay. Data obtained from four independent experiments, each with six replicates. Each dot represents mean  $\pm$  SD.

### 3.2. The Combination of MLT with ALB or ALBSO Induced a Synergistic Cytotoxicity

Due to the ability of ALB, ALBSO, as well as MLT to induce cytotoxicity in the C6, RG2, and U87 cells, we tested whether the combination of ALB with MLT and ALBSO with MLT could induce an additive or synergistic cytotoxic effect. Based on the Dm of each drug, we combined ALB with MLT in a 1:1 ratio concentration for all cell lines. In the case of the combination of ALBSO with MLT, the ratio concentrations were 20:1 for C6 cells, 29:1 for RG2 cells and 40:1 for U87 cells. The results showed that most of the combinations caused a higher percentage of cytotoxicity than the single drugs. According to the Chou–Talalay method, most of the combinations of ALB-MLT caused a synergistic cytotoxic effect (CI < 1.00). In the case of ALBSO-MLT, most of the combinations caused a

synergistic cytotoxic effect in the C6 and U87 lines, while in the RG2 line, this synergy was found only in the combinations with the highest concentrations (Figure 2).



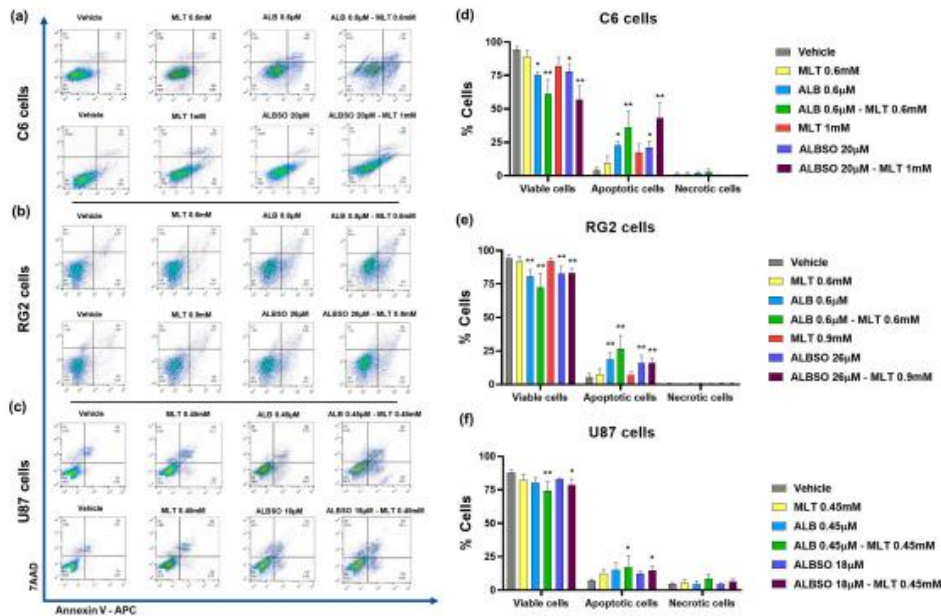
**Figure 2.** The combinations of MLT with ALB or ALBSO showed synergistic and/or additive effects. Graphic representation of the cytotoxic effect of the individual drugs and their combination, after 72 h of treatment, and the CI results in the three cell lines, for the combination of ALB with MLT (a) and ALBSO with MLT (b). Data obtained from three independent experiments in triplicate. Each dot represents mean  $\pm$  SD.

### 3.3. Effect of the Combinations of MLT with ALB or ALBSO on the Cell Death Mechanisms

#### 3.3.1. The Combinations of MLT with ALB or ALBSO Induced Apoptosis

Regarding the evaluation of the mechanisms involved in the decrease of tumor cell viability, our results showed that the combination of ALB 0.6  $\mu$ M-MLT 0.6 mM induced apoptosis in 36% of C6 cells, statistically higher compared to 4.3% produced by the vehicle ( $p < 0.01$ ), while MLT and ALB induced apoptosis only in 9.4 and 22.8% of cells, respectively

(Figure 3a,d). Similarly, the combination of ALBSO 20  $\mu\text{M}$ -MLT 1 mM induced a statistical increase in apoptotic C6 cells, with a mean of 43.4% ( $p < 0.01$ ).



**Figure 3.** The combinations of MLT with ALB or ALBSO induced apoptosis. Representative dot plots and percentage of cells stained with Annexin V-APC/7AAD, quantified by flow cytometry after 48 h of treatment on C6 cells (a,d), RG2 cells (b,e), and U87 cells (c,f). The dot plots were divided in quadrants to quantify the viable cells (Q4: Annexin V-/7AAD-), total apoptotic cells (Q3: early apoptosis, Annexin V+/7AAD- plus Q2: late apoptosis, Annexin V+/7AAD+) and necrotic cells (Q1: Annexin V-/7AAD+). Data obtained from three independent experiments in triplicate (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to vehicle). Each bar represents mean  $\pm$  SD.

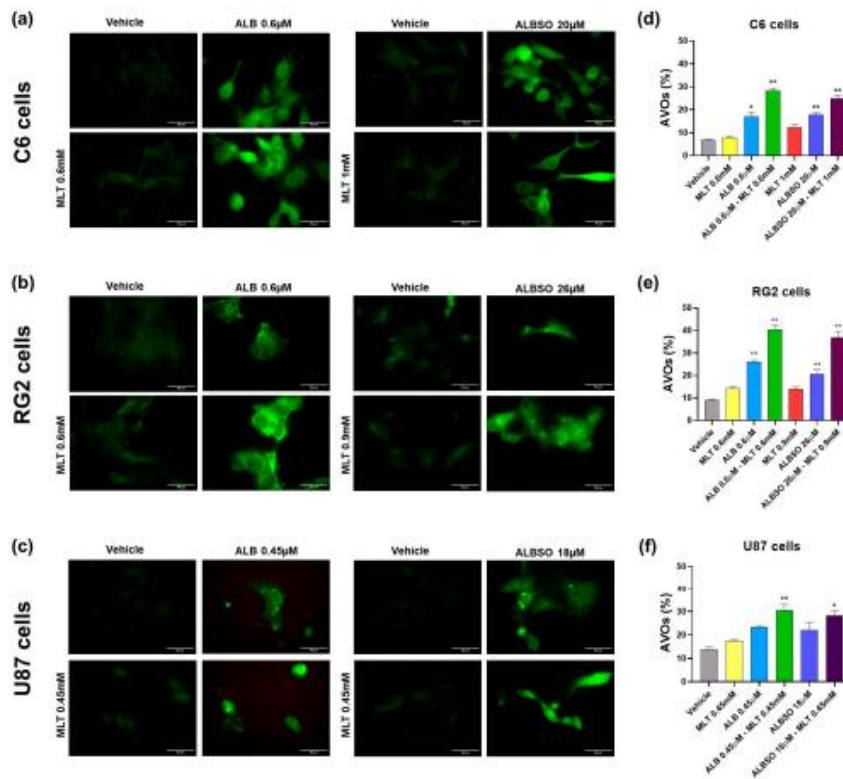
In the RG2 cell line, the combination of ALB 0.6  $\mu\text{M}$ -MLT 0.6 mM induced apoptosis in 26.7% of cells, statistically higher than the vehicle with 5.4% ( $p < 0.01$ ), while MLT and ALB induced apoptosis in 7.8 and 18.7% of cells, respectively. While the treatment with ALBSO 26  $\mu\text{M}$ -MLT 0.9 mM and ALBSO 26  $\mu\text{M}$  alone induced similar percentages of apoptotic cells, with 16.2 and 16.1% ( $p < 0.01$ ), respectively (Figure 3b,e).

In the U87 cells, the combination of ALB 0.45  $\mu\text{M}$ -MLT 0.45 mM increased the apoptotic cells, with 17.1% ( $p < 0.01$ ), while the vehicle produced 7.1%, MLT alone produced 12.4%, and ALB alone produced 15.1% of apoptotic cells. Likewise, the combination ALBSO 18  $\mu\text{M}$ -MLT 0.45 mM showed similar percentages of apoptosis, with 15% of apoptotic cells ( $p < 0.01$ ) (Figure 3e,f). Regarding the percentage of necrotic cells, there were no statistical differences between groups.

### 3.3.2. The Combinations of MLT with ALB or ALBSO Induced Autophagy

ALB has been reported to induce autophagy in human colon adenocarcinoma cells [35]; thus, we evaluated the contribution of autophagy to the cytotoxicity induced by the drug combinations. First, we verified the formation of LC3 puncta by immuno-fluorescence microscopy of glioblastoma cells. As seen in Figure 4a, the C6 cells show a higher expression of LC3 and the formation of the LC3 punctate pattern after the treatment with ALB 0.6  $\mu\text{M}$ , and in combination with MLT 0.6 mM, as well as when treated with ALBSO 20  $\mu\text{M}$ , and

in combination with MLT 1 mM. Similarly, the RG2 cells had a higher expression of LC3 and showed LC3 aggregation after the treatment with ALB 0.6  $\mu$ M and in combination with MLT 0.6 mM, as well as when treated with ALBSO 26  $\mu$ M and in combination with MLT 0.9 mM, as seen in Figure 4b. In addition, results in the U87 cells showed LC3 puncta formation after the treatment with ALB 0.45  $\mu$ M and in combination with MLT 0.45 mM, as well as with ALBSO 18  $\mu$ M treatment and in combination with MLT 0.45 mM, as seen in Figure 4c.



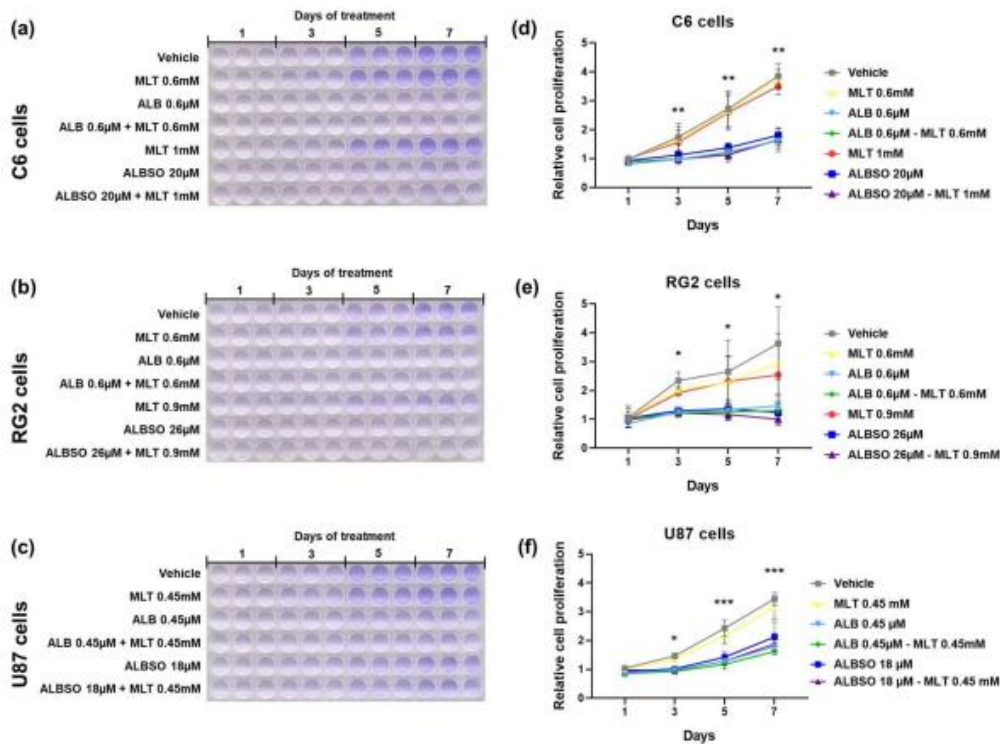
**Figure 4.** The combinations of MLT with ALB or ALBSO induced autophagy. Representative images of LC3-staining pattern by immunofluorescence and percentage of cells with AVOs quantified by flow cytometry after 48 h of treatment on C6 cells (a,d), RG2 cells (b,e), and U87 cells (c,f). Data obtained from three independent experiments in triplicate (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to vehicle). Scale bar equals 50  $\mu$ m in microphotographs. Each bar represents mean  $\pm$  SD in graphs.

Next, we quantified the generation of AVOs in the tumor cells with AO staining by flow cytometry, indicating the percentage of cells with AVOs. In the C6 cells, the combination of ALB 0.6  $\mu$ M-MLT 0.6 mM induced AVOs in 28.3% cells, statistically higher than the vehicle with 6.9%, MLT alone (7.8%), and ALB alone (17.1%) ( $p < 0.01$ ), as seen in Figure 4d. Similarly, the combination ALBSO 20  $\mu$ M-MLT 1 mM increased the C6 cells with AVOs, with a mean of 24.8%, statistically higher than MLT alone (12.4%) and ALBSO alone (17.9%) ( $p < 0.01$ ). In the RG2 cells, the combination of ALB 0.6  $\mu$ M-MLT 0.6 mM induced the highest percent of cells with AVOs (40.4%), statistically higher than the vehicle (9%), the MLT alone (14.1%), and the ALB alone (26%) ( $p < 0.01$ ). Similarly, the combination of ALBSO 26  $\mu$ M-MLT 0.9 mM induced a higher percent of RG2 cells with AVOs (37%), when

compared to MLT alone (14%) and ALBSO alone (20.6%) ( $p < 0.01$ ), as seen in Figure 4e. In the case of U87 cells, the combinations ALB 0.45  $\mu$ M-MLT 0.45 mM and ALBSO 18  $\mu$ M-MLT 0.45 mM induced a significant increase in cells with AVOs, showing values of 30.5% ( $p < 0.01$ ) and 28.3% ( $p < 0.05$ ), respectively, when compared to vehicle (13.7%), as seen in Figure 4f.

### 3.4. The Treatment with ALB and ALBSO Inhibited Proliferation, Independently of MLT

Then, we evaluated the proliferation rate of tumor cells by crystal violet staining during 7 days of treatment on C6 cells (Figure 5a), RG2 cells (Figure 5b), and U87 cells (Figure 5c). In addition, for the C6 cells, we found a significant suppression of proliferation from day 3 until day 7 of treatment with ALB 0.6  $\mu$ M or ALBSO 20  $\mu$ M, independently of the combination with MLT ( $p < 0.01$ ), as seen in Figure 5d. A similar result was obtained in the RG2 cells, where the treatment with ALB 0.6  $\mu$ M or ALBSO 26  $\mu$ M suppressed the cell proliferation, finding a significant difference after day 3 when comparing both combinations of ALB-MLT and ALBSO-MLT to the vehicle ( $p < 0.05$ ), as seen in Figure 5e. Figure 5f shows the proliferation rate of U87 cells, finding a significant suppression of cell proliferation after 3 days of treatment ( $p < 0.05$ ) with ALB 0.45  $\mu$ M or ALBSO 18  $\mu$ M, despite the presence of MLT, showing a higher difference on days 5 and 7 ( $p < 0.001$ ).



**Figure 5.** The treatment with ALB and ALBSO inhibited proliferation, independently of MLT. Representative images of crystal violet-stained cells in 96-well plates and graph with relative cell proliferation obtained after 1, 3, 5, and 7 days of treatment on C6 cells (a,d), RG2 cells (b,e), and U87 cells (c,f). Data obtained from three independent experiments in triplicate (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to vehicle). Each dot represents mean  $\pm$  SD.



#### 4. Discussion

Glioblastoma remains to be the most aggressive brain tumor in adults. Although in recent decades advances in the treatment of GB have been achieved, recurrence is often inevitable, and the survival of patients remains low; therefore, new treatment strategies are under evaluation, such as monoclonal antibodies, viral therapies, vaccines, drug repositioning, and drug combinations [36,37]. In recent years, the combination of drugs with different mechanisms of action is gaining more relevance in the treatment of GB, with the aim to increase the efficacy, lower drug doses, and counteract mechanisms of drug-resistance, among others [38].

In the present study, we evaluated the combination of ALB with MLT, since both drugs have demonstrated antitumor activity through different mechanisms of action [25,39]; therefore, we investigated if the combination could potentially synergize their antitumor effect. Likewise, we evaluated the combination of MLT with ALBSO, considering that ALBSO, the main metabolite of ALB, has shown the highest levels in plasma and cerebrospinal fluid after the oral administration of ALB [40]. The assays were conducted on three of the most widely used cell lines in the GB research, namely, the U87 human glioblastoma cell line and the C6 and RG2 rat malignant glioma cell lines, that have proven to be highly homologous to the GB [41].

Our results corroborate the cytotoxic effect that the ALB and MLT have on the C6 and U87 glioma cell lines [42–45]. In addition, the cytotoxic effect of these drugs on the RG2 line is reported for the first time. In all cell lines, MLT was the most effective and ALB the most potent. To date, there are few studies that have determined the IC<sub>50</sub> values for ALB or MLT in glioma cells. Marslin et al. evaluated the cytotoxic effect of ALB in the U87 cell line and reported a value of 50.1  $\mu\text{M}$  for ALB [10], which is higher than those found in the present study (0.9  $\mu\text{M}$ ). The difference could be related to the exposure time, since in our study the incubation time was 72 h, and in the previous study, it was performed at 24 h.

This is the first study demonstrating the antitumor activity of ALBSO against glioma cells. The only prior report of the antitumor activity of ALBSO shows the induction of apoptosis of breast cancer cells *in vitro* [46]. The antitumor activity of ALBSO is relevant given that it is highly available in the brain, so it could reach therapeutic concentrations in brain tumors such as GB. The results showed that this metabolite was as effective as ALB in inducing cytotoxicity against the glioma cells.

When the combination study was performed, we found that both ALB-MLT and ALBSO-MLT combinations produced an additive or synergistic cytotoxic effect on most combination ratios in all three glioma cell lines. It is worth noting that apoptosis was the main cell death mechanism associated with the treatments using the drugs alone and in combination, finding necrosis in a minimal percentage on the three glioma cell lines. Ehteda et al. found that the combination of ALB with 2-methoxyestradiol synergizes the induction of apoptosis of colon cancer cells and improves the survival of HCT-116 tumor-bearing nude mice [47]. The synergy was based on the sum effect of microtubule-binding activity of both drugs, which differs from our approach, which is based on the possible sum of the different mechanisms of action attributed to ALB and MLT, as mentioned above [17,18,24,27]. On the other hand, MLT also has shown a chemosensitizing effect, since MLT downregulates the expression of ABC transporter ABCG2, inducing the synergistic cytotoxicity when combined with TMZ against GB cells and GB-stem cells [26].

The formation of a punctuate pattern of LC3 is associated with the initiation of autophagy, via the aggregation of LC3 and the formation of the autophagosome, and directly correlated to the increase in AVOs in glioma cells, as an indication of the fusion of the autophagosome and lysosome [48]. Previous reports indicate that benzimidazoles, as mebendazole and ALB, can induce autophagy on GB cells [49] and colon adenocarcinoma cells [35], respectively, while the blockade of autophagy in cholangiocarcinoma cells, after its induction with ALB, has been associated with increased apoptosis of tumor cells [50]. Meanwhile, MLT has shown the ability to suppress autophagy in ovarian granulosa cells [51], as well as in rat brain neurons, through the reduction of reactive oxygen species [52]; however,

the oxidative capacity of MLT metabolites has also been reported [53]. The autophagy in GB cells has been associated with the induction of cell death as a response to sustained cell damage, related to the accumulation of AVOs and the loss of the protective effect of autophagy [54]. In this regard, the interplay between the induction of apoptosis and autophagy is proposed to potentiate cell death in cancer cells and promote the effectiveness of anti-tumor molecules [55].

Previous reports show that the anti-proliferative effect of MLT is attributed to the suppression of miR-155 on U87 cells; however, these effects were found with very low concentrations of MLT (1  $\mu\text{M}$ ), compared to the concentrations used in this study [44]. MLT has shown a synergistic anti-proliferative effect when combined with sorafenib, by dual suppression of the STAT3 pathway in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo [56]. In the case of ALB, its antiproliferative activity on C6 cells has been previously attributed to the inhibition of enzymes involved in the glycolytic pathway and lower ATP concentration in vitro and in vivo, showing an enhanced effect when ALB is loaded on silver nanoparticles [45]. In a similar way, thiabendazole, another antiparasitic benzimidazole, has proven to be effective at inhibiting proliferation of several GB cell lines by the downregulation of mini-chromosome maintenance protein 2 (MCM2) [57]. Shu et al. demonstrated that ALB plus Palbociclib, a cyclin kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitor, synergistically suppresses melanoma cell proliferation in vitro and in vivo, by the dual arrest of cell cycle progression [58].

The gold-standard drug in the treatment of GB is temozolomide (TMZ); however, in vitro evaluations indicate the need for high concentrations, ranging from 100  $\mu\text{M}$  to more than 1000  $\mu\text{M}$ , to induce the desired effect on glioma cells [59]. There is evidence of the potentiation of the cytotoxic effect of TMZ in combination with other treatments against glioma cells, where apoptosis and autophagy can be synergized [60,61]; therefore, the evaluation of the combined effect of MLT-ALB/ALBSO to potentiate the antitumor effect of TMZ is proposed as a follow-up to this work.

New directions are needed for the combinations of ALB, ALBSO, and MLT. Recently, ALB has also been reported to promote immunotherapy response by facilitating ubiquitin-mediated PD-L1 degradation in melanoma models [62]; likewise, MLT has shown antitumor potential by impairing many of the characteristics that sustain cancer progression [63], highlighting the importance of discovering other potential mechanisms of action that could benefit the current treatment of patients with cancer.

Future perspectives include the evaluation in an in vivo model of orthotopic malignant glioma, which will allow us to evaluate the impact of the combined administration of these drugs on molecular markers, tumor eradication, and survival time, given that survival is a parameter of great importance to determine the therapeutic efficacy of a drug in the management of GB [64]. Potential in vivo studies could be based on the use of classical immunocompetent orthotopic malignant glioma models, as we have previously reported with C6 cells implanted in the brain parenchyma of Wistar rats [65], or as the model performed with GL621 mouse glioma cells in C57BL/6 mice [66].

## 5. Conclusions

The combined mechanisms of the pleiotropic drugs, ALB, ALBSO, and MLT, are relevant for the additivity and synergism found against the glioma cells. Considering the safety and inexpensive profiles of these drugs, and their high availability to the CNS, their combination could be a potential therapeutic strategy against GB. Other studies would be necessary to evaluate the antitumoral activity of these combinations in in vivo models.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.H.-C. and H.J.-C.; methodology, M.H.-C., V.C., B.P., F.P.-A., I.S.R.-T. and H.J.-C.; formal analysis, M.H.-C. and V.C.; investigation, M.H.-C., V.C., B.P., F.P.-A. and H.J.-C.; resources, M.H.-C., C.R., B.P., F.P.-A., I.S.R.-T. and H.J.-C.; data curation, M.H.-C., V.C., C.R., B.P., F.P.-A., I.S.R.-T. and H.J.-C.; writing—original draft preparation, M.H.-C., F.P.-A. and H.J.-C.; writing—review and editing, M.H.-C., V.C., C.R., B.P., F.P.-A., I.S.R.-T. and H.J.-C.; visualization, M.H.-C., C.R., B.P., F.P.-A. and H.J.-C.; supervision, C.R., B.P. and H.J.-C.; project administration,

M.H.-C., B.P., F.P.-A. and H.J.-C.; funding acquisition, M.H.-C., F.P.-A. and H.J.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT Mexico), grant number A1-S-40569.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request to the corresponding author.

**Acknowledgments:** A student grant (419514) was provided to Miguel Hernández by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT Mexico). We thank Luis Tristán (Laboratory of Neurochemistry, INNN, Mexico), Edith Gonzales (Laboratory of Molecular Neuropharmacology and Nanotechnology, INNN, Mexico), and Nancy Ixtlahuaca-Barrientos for the technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. [\[CrossRef\]](#)
- Wick, W.; Osswald, M.; Wick, A.; Winkler, F. Treatment of glioblastoma in adults. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2018**, *11*, 1756286418790452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cruz, J.V.R.; Batista, C.; Afonso, B.H.; Alexandre-Moreira, M.S.; Dubois, L.G.; Pontes, B.; Moura Neto, V.; Mendes, F.A. Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers* **2022**, *14*, 3203. [\[CrossRef\]](#)
- Bhatia, P.; Bernier, M.; Sanghvi, M.; Moaddel, R.; Schwarting, R.; Ramamoorthy, A.; Wainer, I.W. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) localises to the nucleus in glioblastoma multiforme cells. *Xenobiotica* **2012**, *42*, 748–755. [\[CrossRef\]](#)
- Lin, F.; de Gooijer, M.C.; Roig, E.M.; Buil, L.C.; Christner, S.M.; Beumer, J.H.; Wündering, T.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. ABCB1, ABCG2, and PTEN determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2703–2713. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Panic, G.; Duthaler, U.; Speich, B.; Keiser, J. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, *4*, 185–200. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Son, D.S.; Lee, E.S.; Adunyah, S.E. The Antitumor Potentials of Benzimidazole Anthelmintics as Repurposing Drugs. *Immune Netw.* **2020**, *20*, e29. [\[CrossRef\]](#)
- Castro, L.S.; Kwiecinski, M.R.; Ourique, F.; Parisotto, E.B.; Grinevicius, V.M.; Correia, J.F.; Wilhelm Filho, D.; Pedrosa, R.C. Albendazole as a promising molecule for tumor control. *Redox Biol.* **2016**, *10*, 90–99. [\[CrossRef\]](#)
- Pourgholami, M.H.; Akhter, J.; Wang, L.; Lu, Y.; Morris, D.L. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: In vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother. Pharm.* **2005**, *55*, 425–432. [\[CrossRef\]](#)
- Marslin, G.; Siram, K.; Liu, X.; Khandelwal, V.K.M.; Xiaolei, S.; Xiang, W.; Franklin, G. Solid Lipid Nanoparticles of Albendazole for Enhancing Cellular Uptake and Cytotoxicity against U-87 MG Glioma Cell Lines. *Molecules* **2017**, *22*, 2040. [\[CrossRef\]](#)
- Pourgholami, M.H.; Szwajcer, M.; Chin, M.; Liauw, W.; Seef, J.; Galettis, P.; Morris, D.L.; Links, M. Phase I clinical trial to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharm.* **2010**, *65*, 597–605. [\[CrossRef\]](#)
- Rawden, H.C.; Kokwaro, G.O.; Ward, S.A.; Edwards, G. Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharm.* **2000**, *49*, 313–322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lee, C.A.; Neul, D.; Clouser-Roche, A.; Dalvie, D.; Wester, M.R.; Jiang, Y.; Jones, J.P.; Freiwald, S.; Zientek, M.; Totah, R.A. Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2. *Drug. Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 347–356. [\[CrossRef\]](#)
- Jung, H.; Cárdenas, G.; Sciotto, E.; Fleury, A. Medical treatment for neurocysticercosis: Drugs, indications and perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 424–433. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sotelo, J.; Jung, H. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin. Pharm.* **1998**, *34*, 503–515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Aguayo-Ortiz, R.; Méndez-Lucio, O.; Medina-Franco, J.L.; Castillo, R.; Yépez-Mulia, L.; Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A. Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to  $\beta$ -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, *41*, 12–19. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, M.H.; Ha, I.J.; Um, J.Y.; Ahn, K.S. Albendazole Exhibits Anti-Neoplastic Actions against Gastric Cancer Cells by Affecting STAT3 and STAT5 Activation by Pleiotropic Mechanism(s). *Biomedicines* **2021**, *9*, 362. [\[CrossRef\]](#)

18. Kim, U.; Shin, C.; Kim, C.Y.; Ryu, B.; Kim, J.; Bang, J.; Park, J.H. Albendazole exerts antiproliferative effects on prostate cancer cells by inducing reactive oxygen species generation. *Oncol. Lett.* **2021**, *21*, 395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Macchi, M.M.; Bruce, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocr.* **2004**, *25*, 177–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Reiter, R.J.; Korkmaz, A. Clinical aspects of melatonin. *Saudi Med. J.* **2008**, *29*, 1537–1547.
21. Hardeland, R. Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* **2010**, *8*, 168–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yu, H.; Dickson, E.J.; Jung, S.R.; Koh, D.S.; Hille, B. High membrane permeability for melatonin. *J. Gen. Physiol.* **2016**, *147*, 63–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liu, J.; Clough, S.J.; Hutchinson, A.J.; Adamah-Biassi, E.B.; Popovska-Gorevski, M.; Dubocovich, M.L. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* **2016**, *56*, 361–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Moretti, E.; Favero, G.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Melatonin's Antineoplastic Potential Against Glioblastoma. *Cells* **2020**, *9*, 599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Li, Y.; Li, S.; Zhou, Y.; Meng, X.; Zhang, J.J.; Xu, D.P.; Li, H.B. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 39896–39921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Martín, V.; Sanchez-Sanchez, A.M.; Herrera, F.; Gomez-Manzano, C.; Fueyo, J.; Alvarez-Vega, M.A.; Antolin, I.; Rodriguez, C. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 2005–2012. [[CrossRef](#)]
27. Hsiao, S.Y.; Tang, C.H.; Chen, P.C.; Lin, T.H.; Chao, C.C. Melatonin Inhibits EMT in Bladder Cancer by Targeting Autophagy. *Molecules* **2022**, *27*, 8649. [[CrossRef](#)]
28. Chou, T.C.; Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzym. Regul.* **1984**, *22*, 27–55. [[CrossRef](#)]
29. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharm. Rev.* **2006**, *58*, 621–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zembruski, N.C.; Stache, V.; Haefeli, W.E.; Weiss, J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal. Biochem.* **2012**, *429*, 79–81. [[CrossRef](#)]
31. Kanzawa, T.; Kondo, Y.; Ito, H.; Kondo, S.; Germano, I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2103–2108. [[PubMed](#)]
32. Romano-Feinholz, S.; Salazar-Ramiro, A.; Munoz-Sandoval, E.; Magana-Maldonado, R.; Hernandez Pedro, N.; Rangel Lopez, E.; Gonzalez Aguilar, A.; Sanchez Garcia, A.; Sotelo, J.; Perez de la Cruz, V.; et al. Cytotoxicity induced by carbon nanotubes in experimental malignant glioma. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 6005–6026. [[CrossRef](#)]
33. Runwal, G.; Stamatakou, E.; Siddiqi, F.H.; Puri, C.; Zhu, Y.; Rubinsztein, D.C. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*, 087379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jung, Y.Y.; Baek, S.H.; Ha, I.J.; Ahn, K.S. Regulation of apoptosis and autophagy by albendazole in human colon adenocarcinoma cells. *Biochimie* **2022**, *198*, 155–166. [[CrossRef](#)]
36. Liu, H.; Qiu, W.; Sun, T.; Wang, L.; Du, C.; Hu, Y.; Liu, W.; Feng, F.; Chen, Y.; Sun, H. Therapeutic strategies of glioblastoma (GBM): The current advances in the molecular targets and bioactive small molecule compounds. *Acta Pharm. Sin. B* **2022**, *12*, 1781–1804. [[CrossRef](#)]
37. Mudduluru, G.; Walther, W.; Kobelt, D.; Dahlmann, M.; Treese, C.; Assaraf, Y.G.; Stein, U. Repositioning of drugs for intervention in tumor progression and metastasis: Old drugs for new targets. *Drug. Resist. Updat.* **2016**, *26*, 10–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Yool, A.J.; Ramesh, S. Molecular Targets for Combined Therapeutic Strategies to Limit Glioblastoma Cell Migration and Invasion. *Front. Pharm.* **2020**, *11*, 358. [[CrossRef](#)]
39. Li, Y.Q.; Zheng, Z.; Liu, Q.X.; Lu, X.; Zhou, D.; Zhang, J.; Zheng, H.; Dai, J.G. Repositioning of Antiparasitic Drugs for Tumor Treatment. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 670804. [[CrossRef](#)]
40. González-Hernández, I.; Ruiz-Olmedo, M.I.; Cárdenas, G.; Jung-Cook, H. A simple LC-MS/MS method to determine plasma and cerebrospinal fluid levels of albendazole metabolites (albendazole sulfoxide and albendazole sulfone) in patients with neurocysticercosis. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 267–272. [[CrossRef](#)]
41. Giakoumettis, D.; Kritsis, A.; Foroglou, N. C6 cell line: The gold standard in glioma research. *Hippokratia* **2018**, *22*, 105–112. [[PubMed](#)]
42. Martín, V.; Herrera, F.; Carrera-Gonzalez, P.; García-Santos, G.; Antolin, I.; Rodriguez-Blanco, J.; Rodriguez, C. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1081–1088. [[CrossRef](#)]
43. Ariey-Bonnet, J.; Carrasco, K.; Le Grand, M.; Hoffer, L.; Betzi, S.; Feracci, M.; Tsvetkov, P.; Devred, F.; Collette, Y.; Morelli, X.; et al. In silico molecular target prediction unveils mebendazole as a potent MAPK14 inhibitor. *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 3083–3099. [[CrossRef](#)]
44. Gu, J.; Lu, Z.; Ji, C.; Chen, Y.; Liu, Y.; Lei, Z.; Wang, L.; Zhang, H.T.; Li, X. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells. *Biomed. Pharm.* **2017**, *93*, 969–975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Liang, J.; Zhu, Y.; Gao, C.; Ling, C.; Qin, J.; Wang, Q.; Huang, Y.; Lu, W.; Wang, J. Menthol-modified BSA nanoparticles for glioma targeting therapy using an energy restriction strategy. *NPG Asia Mater.* **2019**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)]

46. Belaz, K.R.A.; Denadai, M.; Almeida, A.P.; Lima, R.T.; Vasconcelos, M.H.; Pinto, M.M.; Cass, Q.B.; Oliveira, R.V. Enantiomeric resolution of albendazole sulfoxide by semipreparative HPLC and in vitro study of growth inhibitory effects on human cancer cell lines. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *66*, 100–108. [\[CrossRef\]](#)
47. Ehteda, A.; Galettis, P.; Pillai, K.; Morris, D.L. Combination of albendazole and 2-methoxyestradiol significantly improves the survival of HCT-116 tumor-bearing nude mice. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 86. [\[CrossRef\]](#)
48. Thomé, M.P.; Filippi-Chiela, E.C.; Villodre, E.S.; Migliavaca, C.B.; Onzi, G.R.; Felipe, K.B.; Lenz, G. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J. Cell. Sci.* **2016**, *129*, 4622–4632. [\[CrossRef\]](#)
49. Jo, S.B.; Sung, S.J.; Choi, H.S.; Park, J.S.; Hong, Y.K.; Joe, Y.A. Modulation of Autophagy is a Potential Strategy for Enhancing the Anti-Tumor Effect of Mebendazole in Glioblastoma Cells. *Biomol. Ther.* **2022**, *30*, 616–624. [\[CrossRef\]](#)
50. He, Q.; Yin, Y.; Pan, X.; Wu, Y.; Li, X. Albendazole-induced autophagy blockade contributes to elevated apoptosis in cholangiocarcinoma cells through AMPK/mTOR activation. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2022**, *454*, 116214. [\[CrossRef\]](#)
51. Wu, D.; Zhao, W.; Xu, C.; Zhou, X.; Leng, X.; Li, Y. Melatonin suppresses serum starvation-induced autophagy of ovarian granulosa cells in premature ovarian insufficiency. *BMC Womens Health* **2022**, *22*, 474. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Shi, L.; Liang, F.; Zheng, J.; Zhou, K.; Chen, S.; Yu, J.; Zhang, J. Melatonin Regulates Apoptosis and Autophagy Via ROS-MST1 Pathway in Subarachnoid Hemorrhage. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 93. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Ximenes, V.E.; Pessoa, A.S.; Padovan, C.Z.; Abrantes, D.C.; Gomes, F.H.; Maticoli, M.A.; de Menezes, M.L. Oxidation of melatonin by AAPH-derived peroxy radicals: Evidence of a pro-oxidant effect of melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 787–792. [\[CrossRef\]](#)
54. Yao, K.C.; Komata, T.; Kondo, Y.; Kanzawa, T.; Kondo, S.; Germano, I.M. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: Cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J. Neurosurg.* **2003**, *98*, 378–384. [\[CrossRef\]](#)
55. Bata, N.; Cosford, N.D.P. Cell Survival and Cell Death at the Intersection of Autophagy and Apoptosis: Implications for Current and Future Cancer Therapeutics. *ACS Pharm. Transl. Sci.* **2021**, *4*, 1728–1746. [\[CrossRef\]](#)
56. Fang, Z.; Jung, K.H.; Yan, H.H.; Kim, S.J.; Rumman, M.; Park, J.H.; Han, B.; Lee, J.E.; Kang, Y.W.; Lim, J.H.; et al. Melatonin Synergizes with Sorafenib to Suppress Pancreatic Cancer via Melatonin Receptor and PDGFR- $\beta$ /STAT3 Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *47*, 1751–1768. [\[CrossRef\]](#)
57. Hu, Y.; Zhou, W.; Xue, Z.; Liu, X.; Feng, Z.; Zhang, Y.; Li, W.; Zhang, Q.; Chen, A.; Huang, B.; et al. Thiabendazole Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation and Invasion Targeting Mini-chromosome Maintenance Protein 2. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2022**, *380*, 63–75. [\[CrossRef\]](#)
58. Zhu, L.; Yang, Q.; Hu, R.; Li, Y.; Peng, Y.; Liu, H.; Ye, M.; Zhang, B.; Zhang, P.; Liu-Smith, F.; et al. Novel therapeutic strategy for melanoma based on albendazole and the CDK4/6 inhibitor palbociclib. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 5706. [\[CrossRef\]](#)
59. Lee, S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes. Dis.* **2016**, *3*, 198–210. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Golden, E.B.; Cho, H.Y.; Jahanian, A.; Hofman, F.M.; Louie, S.G.; Schönthal, A.H.; Chen, T.C. Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. *Neurosurg. Focus.* **2014**, *37*, E12. [\[CrossRef\]](#)
61. Magaña-Maldonado, R.; Manoutcharian, K.; Hernández-Pedro, N.Y.; Rangel-López, E.; Pérez-De la Cruz, V.; Rodríguez-Balderas, C.; Sotelo, J.; Pineda, B. Concomitant treatment with pertussis toxin plus temozolomide increases the survival of rats bearing intracerebral RG2 glioma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2014**, *140*, 291–301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Zhu, L.; Kuang, X.; Zhang, G.; Liang, L.; Liu, D.; Hu, B.; Xie, Z.; Li, H.; Liu, H.; Ye, M.; et al. Albendazole induces immunotherapy response by facilitating ubiquitin-mediated PD-L1 degradation. *J. Immunother. Cancer* **2022**, *10*, e003819. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Talib, W.H.; Alsayed, A.R.; Abuawad, A.; Daoud, S.; Mahmood, A.I. Melatonin in Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Opportunities. *Molecules* **2021**, *26*, 2506. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. deSouza, R.M.; Shaweis, H.; Han, C.; Sivasubramaniam, V.; Brazil, L.; Beaney, R.; Sadler, G.; Al-Sarraj, S.; Hampton, T.; Logan, J.; et al. Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years? *Br. J. Cancer* **2016**, *114*, 146–150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Chavarria, V.; Ortiz-Islas, E.; Salazar, A.; Pérez-de la Cruz, V.; Espinosa-Bonilla, A.; Figueroa, R.; Ortiz-Plata, A.; Sotelo, J.; Sánchez-García, F.J.; Pineda, B. Lactate-Loaded Nanoparticles Induce Glioma Cytotoxicity and Increase the Survival of Rats Bearing Malignant Glioma Brain Tumor. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 327. [\[CrossRef\]](#)
66. Wu, S.; Calero-Pérez, P.; Arús, C.; Candiota, A.P. Anti-PD-1 Immunotherapy in Preclinical GL261 Glioblastoma: Influence of Therapeutic Parameters and Non-Invasive Response Biomarker Assessment with MRSI-Based Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 13.2. Difusión y divulgación científica



**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía**  
**Manuel Velasco Suárez**



Otorga la presente  
**Constancia**

A:

**Miguel Hernández Cerón<sup>1</sup>, Francisca Palomares Alonso<sup>1</sup>, Benjamín Pineda Olvera<sup>2</sup>, Roxana Magaña Maldonado<sup>2</sup>, Irma Susana Rojas Tomé<sup>1</sup>, Iliana Elvira González Hernández<sup>1</sup>, Nelly Castro Torres<sup>1</sup>, Luis Camilo Ríos Castañeda<sup>3</sup>, Francisca Pérez Severiano<sup>3</sup>, César Augusto Rodríguez Balderas<sup>4</sup>, Helgi Jung Cook<sup>1</sup>.**

Por su participación en la **XXXII Reunión Anual de Investigación**, llevada a cabo en la Ciudad de México durante los días 18 y 19 de mayo de 2017, con el cartel:

**BÚSQUEDA DE UNA NUEVA ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME: EVALUACIÓN IN VITRO DE LA COMBINACIÓN DE ALBENDAZOL Y MELATONINA.**


Ciudad de México, a 19 de mayo de 2017.




**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN



**ING. MARÍA ANGÉLICA GARCÍA GUZMÁN**  
COORDINADORA GENERAL



**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía**  
**Manuel Velasco Suárez**



Otorga la presente  
**Constancia**


A:

**Miguel Hernández Cerón<sup>1,4</sup>, Luis Camilo Ríos Castañeda<sup>3,4</sup>, Benjamín Pineda Olvera<sup>2</sup>, Jonathan Alexis Pérez de los Santos<sup>1,5</sup>, Antonio Tarek Valerio Velázquez<sup>1,5</sup>, Francisca Palomares Alonso<sup>1</sup>, Irma Susana Rojas Tomé<sup>1</sup>, Iliana Elvira González Hernández<sup>1</sup>, Helgi Jung Cook<sup>1</sup>.**


Por su participación en la **XXXIII Reunión Anual de Investigación**, llevada a cabo en la Ciudad de México durante los días 17 y 18 de mayo de 2018, con el cartel:

**“BÚSQUEDA DE UNA POSIBLE ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME: EVALUACIÓN DE ALBENDAZOL, MELATONINA Y SU COMBINACIÓN IN VITRO”**



Ciudad de México, a 18 de mayo de 2018.



**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN



**ING. MARÍA ANGÉLICA GARCÍA GUZMÁN**  
COORDINADORA GENERAL





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
Manuel Velasco Suárez



Otorga la presente

## Constancia

A:

Miguel Hernández Cerón, Luis Camilo Ríos Castañeda, Benjamín Pineda Olvera, Francisca Palomares Alonso, Irma Susana Rojas Tomé, Iliana Elvira González Hernández y Helgi Jung Cook.

Por su participación en la **XXXIV Reunión Anual de Investigación**, llevada a cabo en la Ciudad de México durante los días 16 y 17 de mayo de 2019, con cartel:

"Evaluación in vitro de la combinación de albendazol y melatonina sobre glioblastoma multiforme".

Ciudad de México, a 17 de mayo de 2019.

**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

**LIC. T.S. GUSTAVO A. LÓPEZ VEGA**  
COORDINADOR GENERAL



[Print this Page for Your Records](#)

[Close Window](#)

**Control/Tracking Number:** 2021-S-868-SfN  
**Activity:** Scientific Abstract  
**Current Date/Time:** 11/12/2020 6:34:35 PM

#### Combination of Albendazole and Melatonin against glioblastoma: in vitro evaluation

**AUTHOR BLOCK:** \*M. H. CERÓN, Sr.<sup>1</sup>, C. RIOS<sup>2</sup>, B. P. OLVERA<sup>3</sup>, F. P. ALONSO<sup>4</sup>, I. S. ROJAS<sup>5</sup>, H. J. COOK<sup>4</sup>;

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas y de la salud, Univ. Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, Mexico; <sup>2</sup>Natl. Inst. Neurology, Neurosurg, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>Neuroinmunología, <sup>4</sup>Neuropsicofarmacología, <sup>5</sup>Neuropsicofarmacología, Inst. de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, Mexico

#### Abstract:

**Purpose:** Glioblastoma (GB) is one of the most aggressive tumors affecting the central nervous system (CNS) due to its rapid progress and resistance to drugs associated with the presence of ATP-binding cassette (ABC) transporters, such as breast cancer resistant protein (BCRP), a drug efflux transporter. The first-line treatment of the disease is surgery, followed by radiotherapy combined with chemotherapy (temozolomide-TMZ), but the prognosis is poor. Recent studies have shown that albendazole (ALB), and their active metabolite albendazole sulfoxide (ALBSO), have anticancer activity attributed to their tubulin binding capacity, resulting in de-polymerization and cell-cycle arrest; whereas melatonin (MLT) with antioxidant properties, has been associated with the inactivation of signaling pathways for the proliferation and survival of tumor cells. In the search of new treatments, we considered that this drug combination could be an alternative approach. **Objective:** Evaluate the in vitro effect of the ALB-MLT and ALBSO-MLT combinations against glioblastoma cells. **Methods:** C6 cells were treated with ALB in the range of 0.16 to 1.25  $\mu$ M; ALBSO in a range of 2.0 to 64.0  $\mu$ M; MLT in the range of 0.25 to 8.0 mM and TMZ (positive control) at 100  $\mu$ M, for 72 hours. Cell viability was evaluated with the MTT technique. The mean effect (Dm) was calculated and then the ALB-MLT combination was evaluated in a 1:1 and 1:4 ratios, and also the ALBSO-MLT combination in a 1:1 ratio. The combination index (CI) and dose reduction index (DRI) were determined using CompuSyn software. To determine the type of the cell death (apoptosis or necrosis) the annexin V / 7AAD test was performed using by flow cytometry. Data were expressed as the mean of the standard error (MSE). All experiments were performed in triplicate. The determination of significant differences in the experiments of cell viability and induction of necrosis and apoptosis was performed with a one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post hoc test. In all cases, significance was considered when \*  $p < 0.05$ . **Results:** The Dm for ALB, ALBSO and MLT were 0.6  $\mu$ M, 20.0  $\mu$ M and 1.0 mM, respectively. Most combinations of ALB-MLT and ALBSO-MLT exhibited synergism (CI between 0.1 and 0.85) and favorable dose reduction (DRI between 2.0 and 19.0). Cytometric analysis showed a greater effect of cell death with the combination than with the drugs alone, mainly due to apoptosis. **Conclusion:** The results are promising, mainly for the favorable dose reduction. Other studies in animal models are needed to determine the advantages of the combination.

:

**Presentation Preference (Complete):** Wednesday, Jan 13, 3:00 PM  
**Theme and Topic (Complete):** B.11.b. Astrocytes – Disease mechanisms  
**Hashtags (Complete):**

**Please enter your hashtags:** : #glioblastome, #combination #albendazole, #melatonin, #synergism

#### Support (Complete):

**Support:** Yes

**Grant/Other Support:** : Conacyt No. A1-S-40569





## SESIONES DE CARTELES

### MIÉRCOLES 25 11:00 – 12:30

- 1 Evaluación del efecto citotóxico de la combinación de albendazol-melatonina y sulfóxido de albendazol-melatonina en las células de glioma C6  
Miguel Hernández Cerón  
Luis Camilo Ríos Castañeda, Benjamín Pineda Olvera, Francisca Palomares Alonso, Irma Susana Rojas Tomé, Helgi Jung Cook
  
- 2 Evaluación de la actividad quimioatrayente de sonic hedgehog en el direccionamiento de axones de neuronas dopaminérgicas  
Brenda García Lara  
Adolfo López Ornelas, Eva Ramón Gallegos, Alfredo Martínez Morales, Iván Velasco Velázquez, Jesús Enrique Estudillo Hernández
  
- 3 Generación de células troncales pluripotenciales inducidas de pacientes con enfermedad de Parkinson  
Xóchitl Natalia Flores Ponce  
Adolfo López Ornelas, Mayela Rodríguez Violante, David Dávila, Amín Cervantes, Nancy Monroy, Iván Velasco Velázquez
  
- 4 Expresión de proteínas pro-apoptóticas y BCL-2 posterior a la exposición a ozono en hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo y corteza en ratas  
María del Carmen Rubio Osornio  
Paola M Rodríguez Quintero, Wilhelm Moreno Roman, Leonardo Hernández López, Javier Brito Brito, Verónica Custodio Ramírez, Moisés Rubio Osornio
  
- 5 Cambios en la expresión de CFOS, gaba y glutamato de las células granulares del cerebelo en ratones kindled  
Verónica Custodio Ramírez  
Marco Aurelio Agüero Medina, Carmen Rubio Osornio, Leonardo Hernández López, Javier Brito Brito
  
- 6 Papel de GDNF en el crecimiento axonal y en el establecimiento de la unión neuromuscular  
Fernando Becerra Vélez  
Daniel Cortés, Karla Méndez Maldonado, Enrique Estudillo, Iván Velasco



## Evaluación del efecto citotóxico de la combinación de albendazol-melatonina y sulfóxido de albendazol-melatonina en las células de glioma humano U87

Hernández-Cerón Miguel <sup>1,2</sup>, Ríos-Castañeda Luis Camilo <sup>1,2,3</sup>, Pineda-Olvera Benjamín <sup>4</sup>, Palomares-Alonso Francisca<sup>5</sup>, Rojas-Tomé Irma Susana<sup>6</sup>, Camacho-Galindo Paola Viridiana<sup>7</sup>, Jung-Cook Helgi<sup>8</sup>

<sup>1</sup>. Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana; <sup>2</sup> Laboratorio de Neurofarmacología Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco; <sup>3</sup> Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; <sup>4</sup> Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; <sup>5</sup> Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; <sup>6</sup> Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>7</sup> Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

**Antecedentes:** el glioblastoma (GB) es uno de los tumores más agresivos que afectan al cerebro. Es tratado mediante resección y radioterapia combinada con quimioterapia (temozolomida); no obstante, la supervivencia es de aproximadamente 15 meses, por lo que se requieren nuevas alternativas terapéuticas. Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que la combinación de albendazol (ALB) con melatonina (MLT) así como, sulfóxido de albendazol (ALBSO) con MLT, presentan actividad citotóxica sinérgica en células de glioma de rata C6, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de combinaciones de ALB-MLT y ALBSO-MLT sobre la línea celular de glioma de humano U87.

**Métodos:** células U87 se trataron con las combinaciones siguientes: ALB 0.9µM-MLT 0.9 mM y cuatro diluciones en proporción 1:1, así como, ALBSO 36 µM-MLT 0.9 mM y cuatro diluciones en proporción 40:1. La viabilidad celular se evaluó con la técnica MTT. El índice de combinación se determinó empleando la metodología de Chou-Talalay y el software CompuSyn. El efecto de las combinaciones sobre la apoptosis se determinó mediante citometría de flujo. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

**Núm. de registro del protocolo:** 150/16

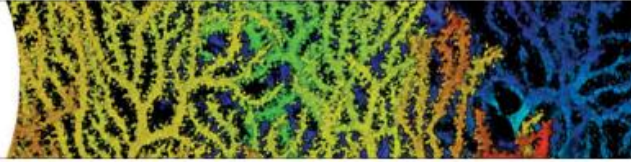
**Resultados:** al igual que en la línea celular de glioma de rata C6, la mayoría de las combinaciones ALB-MLT y ALBSO-MLT presentaron sinergismo sobre la línea U87 de humano, siendo las más relevantes ALB 0.45µM-MLT 0.45 mM y ALBSO 18µM-MLT 0.45 mM. La apoptosis se incrementó significativamente con las combinaciones, en comparación con el control.

**Conclusiones:** con las evidencias del efecto citotóxico sinérgico en ambas líneas celulares, la combinación ALB-MLT podría ser una estrategia útil para el tratamiento de GB, considerando que estos fármacos son menos tóxicos y costosos que los utilizados actualmente. Se requieren más estudios para conocer los mecanismos de la actividad citotóxica de las combinaciones.

**Palabras clave:** albendazol, melatonina, glioblastoma



Neuroscience  
2022



[Print this Page for Your Records](#)

[Close Window](#)

**Control/Tracking Number:** 2022-J-13633-SFN

**Activity:** Theme J Abstract

**Current Date/Time:** 6/17/2022 12:50:56 PM

**Synergistic cytotoxic effect of the combination of albendazole with melatonin on human glioma cells**

**AUTHOR BLOCK:** \*M. CERÓN<sup>1</sup>, C. RIOS<sup>2</sup>, B. PINEDA OLVERA<sup>3</sup>, F. PALOMARES<sup>4</sup>, H. JUNG<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Univ. Autónoma Metropolitana, Inst. Nacional De Neurología Y Neurocirugía, Mexico, Mexico; <sup>2</sup>Neurochemistry, Natl. Inst. Neurology, Neurosurg, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>NEUROINMUNOLOGIA, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIROLOGIA, MEXICO CIY, Mexico; <sup>4</sup>Inst. Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, Mexico; <sup>5</sup>Facultad de química, Univ. Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

**Abstract**

Synergistic cytotoxic effect of the combination of albendazole with melatonin on human glioma cells. Miguel Hernández-Cerón, Camilo Ríos, Benjamin Pineda, Francisca Palomares-Alonso, Helgi Jung-Cook Glioblastoma (GB) is the most aggressive tumor of the central nervous system (CNS) in adults, with a poor prognosis. Currently, standard treatment involves maximal surgical resection, followed by radiation therapy and concurrent chemotherapy with temozolomide (TMZ); however, the median overall survival is 12-15 months. Previous studies have reported the anticancer activity of albendazole (ALB) and melatonin (MLT), in various types of cancer cells, therefore, main objective of the present study was to evaluate the effect of the combination ALB + MLT on U87 and RG2 cells of the human glioma. Cell viability was evaluated with the MTT technique. Drug interaction was determined by the Chou-Talalay method. The morphological changes were determined by light microscopy. Results showed that in the both cell lines, ALB, ALBSO and MLT displayed cytotoxic activity in a concentration-dependent manner. In RG2 cell lines, the combinations of ALB + MLT, which presented a mortality approximately 80%, showed synergistic and additive cytotoxic effects, while in the U87 line, all the combinations presented synergism. Our results showed that ALB treatment in combination with MLT was better than with the individual drugs and TMZ control and further studies in vivo glioma models are warranted.

Author Disclosure Information:

**M. Cerón:** None. **C. Ríos:** None. **B. Pineda olvera:** None. **F. Palomares:** None. **H. Jung:** None.

**Theme and Topic (Complete):** J.01.a. History of neuroscience

**Keyword (Complete):** CELL CULTURE

**Support (Complete):**

**Support:** Yes

**Grant/Other Support:** : Conacyt No. A1-S-40569

**Grant/Other Support:** : Conacyt No. 419514

**Special Requests (Complete):**

**How do you plan to participate in Neuroscience 2022?:** Virtually Only

**Religious Conflict?:** No Religious Conflict

**Additional Conflict?:** No

**Is the submitting author of this abstract also a senior author?:** Yes

**Status:** Finalized



SOCIETY for  
NEUROSCIENCE

1121 14th Street NW, Suite 1010  
Washington, DC 20005  
(202) 962-4000

[Access the Member Center](#) | [Accessibility Policy](#) | [Disclaimer](#) | [Contact Us](#)

Copyright © 2022 Society for Neuroscience

**Stay Connected**



cOASIS Technical Support | Monday - Friday, 9 am - 5 pm CT | Phone: 1-217-398-1792 | Email: [cOASIS.Helpdesk](mailto:cOASIS.Helpdesk)

[Feedback](#)

Powered by [cOASIS](#) The Online Abstract Submission and Invitation System <sup>SM</sup>  
© 1996 - 2022 [CTI Meeting Technology](#). All rights reserved. [Privacy Policy](#)



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

OTORGA EL PRESENTE


# RECONOCIMIENTO


a: Miguel Hernández-Cerón, Camilo Ríos, Francisca Palomares-Alonso, Irma Susana Rojas-Tomé, Helgi Jung-Cook

Por la PRESENTACIÓN ORAL del trabajo titulado:

Efecto citotóxico sinérgico de la combinación de melatonina con albendazol o sulfóxido de albendazol contra células de glioma in vitro

En el marco de la XXXVII Reunión Anual de Investigación celebrada del 5 al 7 de junio de 2023.

  
Dr. Ángel Antonio Arauz Góngora  
Director General

  
Dr. Benjamín Pineda Olvera  
Director de Investigación



EL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD

Otorga la presente

## CONSTANCIA

**MIGUEL HERNÁNDEZ CERÓN**

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL CARTEL "LA COMBINACIÓN DE FÁRMACOS: UNA ALTERNATIVA CONTRA LAS CÉLULAS DE CÁNCER CEREBRAL" EN EL MARCO DE LA SEMANA DEL CEREBRO, EVENTO CELEBRADO DEL 13 AL 17 DE MARZO DE 2023



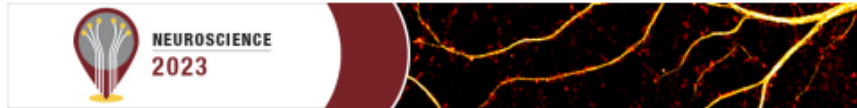
  
DRA. FABIOLA EUNICE SERRANO ARIAS  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

  
DRA. EMMA ELISA ORTIZ ISLAS  
SECRETARÍA DEL COMITÉ ORGANIZADOR

  
DRA. PENELOPE AGUILERA HERNÁNDEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR



2023  
AÑO DE  
**Francisco VILA**  
EL RENOVACIONISMO DEL PUEBLO



[Print this Page for Your Records](#)

Thank you for your responses. The first page of this notification is copied below for your reference. If you wish to edit your responses, select the button below. After **Thursday, August 24, 2023**, you will no longer have the option to edit your author block.

[Reset Status / Edit Author Blocks](#)

August 8, 2023

Dear Miguel Cerón,

Thank you for submitting a Scientific Abstract for Neuroscience 2023 taking place November 11-15 in Washington, D.C. Your abstract has been accepted for poster presentation and is scheduled in the session listed below.

You have received this communication because you are listed as the presenting author of this abstract. **Please share this information with your co-authors, as they will not receive an acceptance notification.** Times provided are in Eastern Standard Time.

**Abstract Control Number:** 11123

**Abstract Title:** Synergistic cytotoxic effect of the combination of melatonin with albendazole or albendazole sulfoxide on glioma cells through autophagy and apoptosis

**\*M. CERÓN**<sup>1,2</sup>, V. CHAVARRIA<sup>4</sup>, C. RIOS<sup>3</sup>, B. PINEDA<sup>5</sup>, F. PALOMARES<sup>6</sup>, I. ROJAS-TOMÉ<sup>6</sup>, H. JUNG<sup>7</sup>;

<sup>1</sup>Neuroquímica, Inst. Nacional De Neurología Y Neurocirugía, Mexico, Mexico; <sup>2</sup>Ciencias Biológicas y de la Salud, <sup>3</sup>Sistemas Biológicos, Univ. Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico; <sup>4</sup>Unidad de Neuroinmunología y Neurooncología, Inst. Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico; <sup>5</sup>Unidad de Neuroinmunología y Neurooncología, Inst. Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico, D.F., Mexico; <sup>6</sup>Lab. de Neuropsicofarmacología, Inst. Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico; <sup>7</sup>Dept. de Farmacia, Univ. Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

**Session Number:** PSTR255

**Session Title:** Glioblastoma and Other Nervous System Cancers: Mechanisms and Techniques

**Session Day and Time:** 11/13/2023 1:00:00 PM-11/13/2023 5:00:00 PM

Mark your calendars for Monday, September 18 at 3:00 pm EDT for our webinar **How to Make & Present a Poster**. This one-hour webinar, moderated by Dr. Ekaterina Likhnik and featuring Dr. Marina Picciotto and Dr. Stephen Maren, will discuss key points of poster preparation and presentation, including where to start, how to visualize your ideas using text and figures, how to present to different audiences, how to handle questions and discussions at your poster, and how to follow up with your audience. More information and registration information coming soon to [neuronline.sfn.org](https://neuronline.sfn.org).