

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA ACRIFLAVINA EN  
LA PROGRESIÓN TUMORAL DEL CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE NASAL**

**TESIS DOCTORAL**

**GERMÁN MACÍA COLÓN**

**2011**

*A Beatriz.*

*Sólo una cosa vuelve un sueño imposible:*

*el miedo a fracasar*

**P. Coelho**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Madrid.

Al Departamento de Cirugía de la Universidad de Alcalá y al Servicio de Histología, Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

A los directores de la tesis, los profesores Fernando Noguerales Fraguas y Pedro Cuevas Sánchez por ser mis referentes como investigadores, por ser personas apasionadas con su trabajo que decidieron elegir el camino del saber como forma de vida.

A los biólogos del Departamento de Histología que me han guiado durante toda la investigación, Begoña Cuevas por tu entrega, tus consejos y tu gran participación en esta tesis y al doctor Javier Angulo que me ayudó en los momentos clave de este estudio explicándome aspectos fundamentales de la discusión.

Al doctor Jesús Marín Martínez por ayudarme con la investigación poniéndome en contacto con mis directores de tesis y por los consejos que siempre me ha dado en mi vida profesional. A mi familia y a mi estimado amigo Jaime Marcos porque siempre me han apoyado y sin vosotros jamás podría haber acometido esta empresa y por llegar hasta donde he llegado.

A todas las personas que han colaborado en el desarrollo del presente trabajo: Tina por tu ayuda incondicional y a Chantal por realizarme todas las gestiones pertinentes con los laboratorios para adquirir el material de la tesis, ambas del Departamento de Histología. Al Dr. Adrian Cuevas por su ayuda con los informes histológicos, a Javier Álvarez, informático quien en todo momento estuvo dispuesto a corregir la forma de presentación y los detalles del estudio para asegurarme el éxito del trabajo y a Concepción Peiró por su aportación con las fotos de los cultivos celulares. A los jefes de servicio de Cirugía Maxilofacial de los Hospitales Ramón y Cajal y Quirón de Madrid, doctores



Antonio Prieto y Julio Acero, respectivamente, por su consideración en la realización de esta tesis doctoral.

Gracias a Beatriz, por ser parte de mi y por tu apoyo en los momentos difíciles.

## **ABREVIATURAS**

**ACF:** Acriflavina

**AJCC:** American Joint Committee on Cancer

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CE:** Carcinoma epidermoide

**CECC:** Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

**CXC-quimiocina:** Quimiocina con 2 residuos de cisteína separados por un aminoácido

**CXCR:** Receptor de quimiocina k

**DHC-ME:** Ácido 2,5 dihidroxicinámico metil ester

**EDTA:** Ácido etilen-diamino-tetra-acético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico.

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

**EPO:** Eritropoyetina.

**FGF:** Factor de crecimiento para fibroblastos.

**FGFR:** Receptor del factor de crecimiento para fibroblastos.

**HIF:** Factor inducible por hipoxia

**HPV:** Virus del papiloma humano

**i.p:** intraperitoneal

**IGF:** Factor de crecimiento similar a la insulina

**IL:** Interleucina

**NO:** Óxido nítrico

**ODD:** Dominio de degradación dependiente de oxígeno

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PHDs:** Prolil-hidroxilasas

**PLGF:** Factor de crecimiento placentario

**pVHL:** Proteína Von Hippel-Lindau

**RM:** Resonancia magnética

**SDF-1:** Factor derivado del estroma extracelular

**TC:** Tomografía computerizada o escáner

**TGF:** Factor de crecimiento transformante

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TSP-1:** Trombospondina-1

**UICC:** Unión Internacional para el Control del Cáncer

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular

**VEGFR:** Receptor del factor del crecimiento de endotelio vascular

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>1 TUMORES DE LA REGIÓN NASAL</b>	<b>14</b>
1.1 VESTÍBULO NASAL	14
1.2 CAVIDAD NASAL	21
<b>2 ANGIOGÉNESIS Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS</b>	<b>29</b>
2.1 INTRODUCCIÓN	29
2.2 ANGIOGÉNESIS TUMORAL	30
2.3 APOPTOSIS Y ANGIOGÉNESIS	41
2.4 ANGIOGÉNESIS Y PROTEÍNA P53	42
2.5 EL PAPILOMA VIRUS Y PROTEÍNA P53 EN EL CECC	44
<b>3 EL PROCESO ANGIOGÉNICO</b>	<b>46</b>
3.1 SEÑALES DE INICIACIÓN DEL PROCESO ANGIOGÉNICO	48
3.2 SEÑALES DE ACTIVACIÓN DEL PROCESO ANGIOGÉNICO Y SUS RECEPTORES	57
<b>4 MODULACION FARMACOLÓGICA DE LA ANGIOGENESIS. TERAPIA ANTIANGIOGÉNICA</b>	<b>62</b>
4.1 ACRIFLAVINA	63
4.2 POLIFENOLES Y EFECTO ANTIPROLIFERATIVO: ÁCIDO CAFEICO Y ÁCIDO 2,5 DIHYDROXYCINÁMICO METIL ESTER (DHC-ME)	64
4.3 DOBESILATO Y EFECTO ANTIANGIOGÉNICO	65
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>68</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>70</b>
<b>1 MATERIAL</b>	<b>71</b>
1.1 LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES	71
1.2 INSTALACIONES PARA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES	72
1.3 CÉLULAS TUMORALES Y CULTIVO	72
<b>2 MÉTODO</b>	<b>73</b>
2.1 CULTIVO PRIMARIO	73
2.2 SUBCULTIVOS	75

2.3	ESTUDIO <i>IN VITRO</i>	79
2.4	ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	80
2.5	ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS: CUANTIFICACIÓN	83
2.6	ENSAYO DE LA APOPTOSIS: MÉTODO DE LA TRANSFERASA TERMINAL O TUNEL	83
2.7	METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	85
<b>RESULTADOS</b>		<b>86</b>
<b>1</b>	<b>ESTUDIO <i>IN VITRO</i></b>	<b>87</b>
1.1	MORFOLOGÍA CELULAR	87
1.2	RESULTADOS <i>IN VITRO</i> DE ACF, DOBESILATO, ÁCIDO CAFEICO Y DHC-ME SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES FAT-7	90
<b>2</b>	<b>ESTUDIO <i>IN VIVO</i></b>	<b>95</b>
2.1	MORFOLOGÍA CELULAR	95
2.2	EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN TUMORAL Y DEL PESO DE LA RATA	99
2.3	ANGIOGÉNESIS TUMORAL	112
2.4	ESTUDIO DE APOPTOSIS MEDIANTE TÉCNICA TUNEL	116
2.5	ESTUDIO BIOQUÍMICO	119
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>120</b>
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>136</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>138</b>

## **RESUMEN**

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados. Los tumores malignos de cabeza y cuello son relativamente frecuentes, representando en España la cuarta o quinta neoplasia en orden de frecuencia para los varones y la décima o undécima para las mujeres. La mayoría son carcinomas epidermoides y representan el 5-10 por ciento de todos los procesos malignos. En España, origina aproximadamente el 5 por ciento de las muertes por cáncer lo que supone unas 4000 muertes anuales y se calcula que para el 2015 habrá unos 12.000 nuevos casos por año.

Los tumores de la región nasal están englobados dentro de los tumores de cabeza y cuello. Su comportamiento biológico y su estudio clínico y diagnóstico son similares en las diferentes localizaciones y por tanto su tratamiento se aplica con conceptos y principios similares.

El crecimiento de un tumor, tanto primario como secundario, a partir de un cierto diámetro (de tan sólo 2-3 mm<sup>3</sup>) requiere su vascularización. Sin ella, las células tumorales mueren por deficiencia de nutrientes y oxígeno, y por falta de eliminación de sustancias de desecho. La angiogénesis es, por tanto, esencial para la progresión tumoral.

En este trabajo, hemos estudiado la actividad antiangiogénica y proapoptótica de una sustancia llamada Acriflavina frente a células tumorales de carcinoma epidermoide nasal de rata o FAT-7. La Acriflavina, en estudios *in vitro*, presenta efectos antiproliferativos frente a esta línea celular directamente proporcional a la dosis del compuesto. En el ensayo *in vivo*, hemos implantado un cultivo de células tumorales a nivel subcutáneo en la región abdominal de 19 ratas Fisher, 13 machos y 6 hembras. Las ratas desarrollaron tumor macroscópico al cabo de 4 días y un crecimiento progresivo del tumor en días posteriores. La Acriflavina, inyectada a diario intraperitonealmente y al cabo de una semana de la implantación de células FAT-7 carece de efectos secundarios relevantes para los animales de experimentación y es capaz de inhibir la progresión tumoral provocando la remisión completa del tumor al cabo de dos semanas de tratamiento. En nuestro estudio concluimos que la Acriflavina inhibe la

angiogénesis de esta línea celular implantada en ratas Fisher ya que en los cortes histológicos de estos tumores se evidencia una disminución en el número de vasos sanguíneos de manera estadísticamente significativa y promueve la apoptosis de células FAT-7 según la técnica de TUNEL.

## **ABSTRACT**

Cancer is the second leading cause of death in developed countries. The head and neck tumors are common in Spain, and represent the fourth or fifth neoplasia among men and the tenth or eleventh among women. Most are squamous cell carcinomas and account for 5-10 per cent of all malignant tumors. In Spain, those tumors cause about 5 per cent of cancer deaths, representing about 4000 deaths annually, and it is estimated that by 2015 there will be about 12,000 new cases per year.

Tumors of the nasal region are encompassed within the head and neck tumors. Its biological behavior and clinical study and diagnosis are similar in different locations and, therefore, the treatment is applicable to similar concepts and principles.

The tumor growth, both primary and secondary, from a certain diameter (of only 2-3 mm<sup>3</sup>), requires vascularization. Without it, the tumor cells die from lack of nutrients and oxygen, and lack of disposal of waste substances. Angiogenesis is therefore essential for tumor progression.

In this work, we study the anti-angiogenic effect and apoptogenic properties of a compound called Acriflavine against tumor cells of rat nasal squamous-cell carcinoma or FAT-7. The Acriflavine, tested *in vitro* studies, has antiproliferative effects against this cell line that are directly proportional to the administered dose. In the *in vivo* test, we subcutaneously implanted tumor cells in the abdominal region of 19 Fisher rats, 13 males and 6 females. The rats developed macroscopic tumor after four days and progressive tumor growth on subsequent days. The Acriflavine, daily injected intraperitoneally and after one week of the implantation of FAT-7 cells, was safe for the experimental animals and is capable of inhibiting tumor progression, reaching complete tumor remission after two weeks treatment. In addition, the Acriflavine inhibits angiogenesis of this cell line implanted in Fisher rats, as the histological sections of these tumors shows a decrease in the number of blood vessels and apoptogenic properties by TUNEL tecnic.



## **INTRODUCCIÓN**

## **1 TUMORES DE LA REGIÓN NASAL**

Los tumores de la región nasal se encuentran comprendidos entre los tumores de cabeza y cuello. La variedad histológica más frecuente es el carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide (CE) que se origina en el epitelio de la vía aérea y digestiva superior (cavidad oral, senos paranasales, región nasal, naso-oro e hipofaringe, laringe y esófago cervical). Su comportamiento biológico y su estudio clínico y diagnóstico guardan los mismos principios en las diferentes localizaciones. Por tanto, el tratamiento es aplicable con conceptos y principios similares.

Representan al 4-5 por ciento de todos los cánceres. Es más frecuente en hombres que en mujeres en relación 4 a 1 y ocurre con más frecuencia a partir de los 40 años de edad. Su diseminación es sobre todo linfática a través de ganglios regionales cervicales.

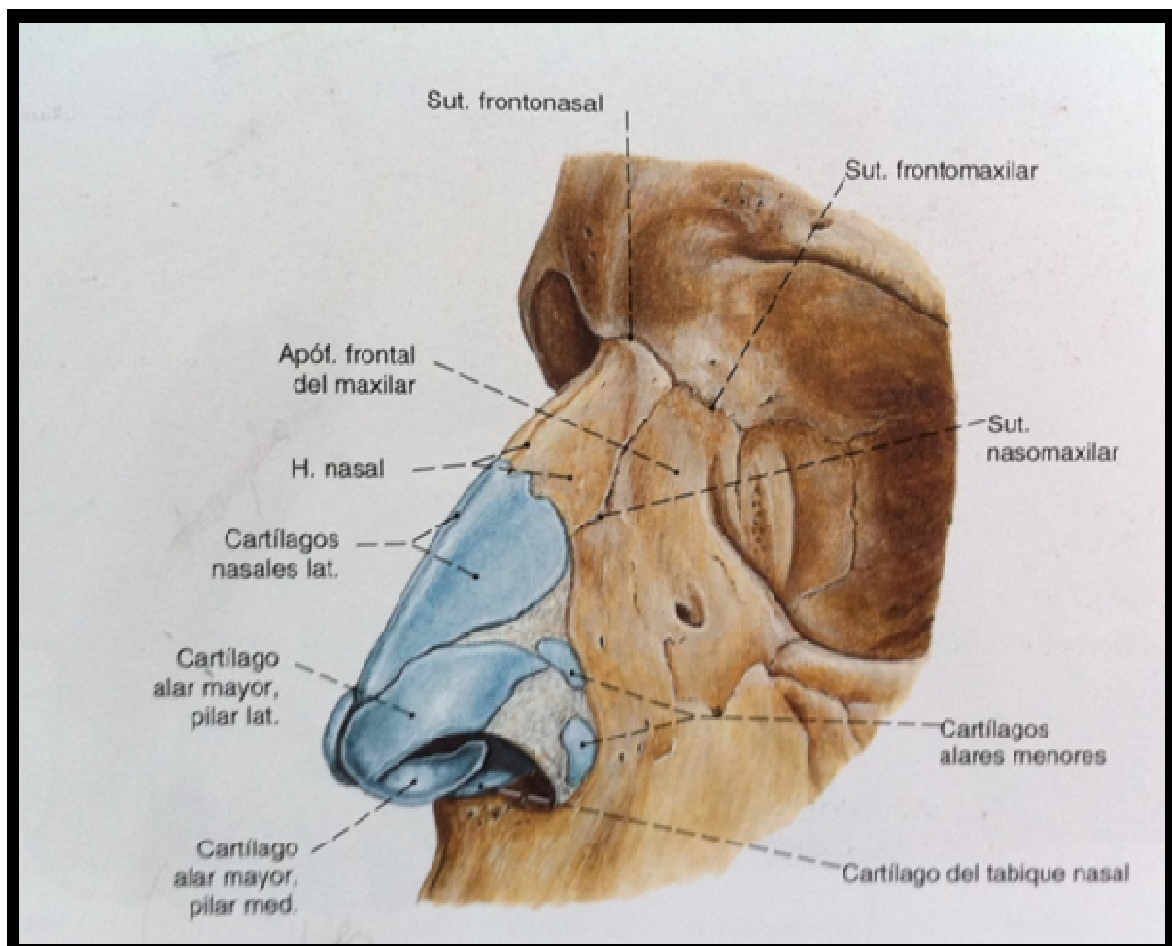
Los tumores de la región nasal se clasifican anatómicamente en aquéllos que se originan en el vestíbulo nasal y los que su origen es la cavidad nasal. Son poco frecuentes y representan menos del 1 por ciento de todos los tumores de cabeza y cuello <sup>(122)</sup>.

### **1.1 VESTÍBULO NASAL**

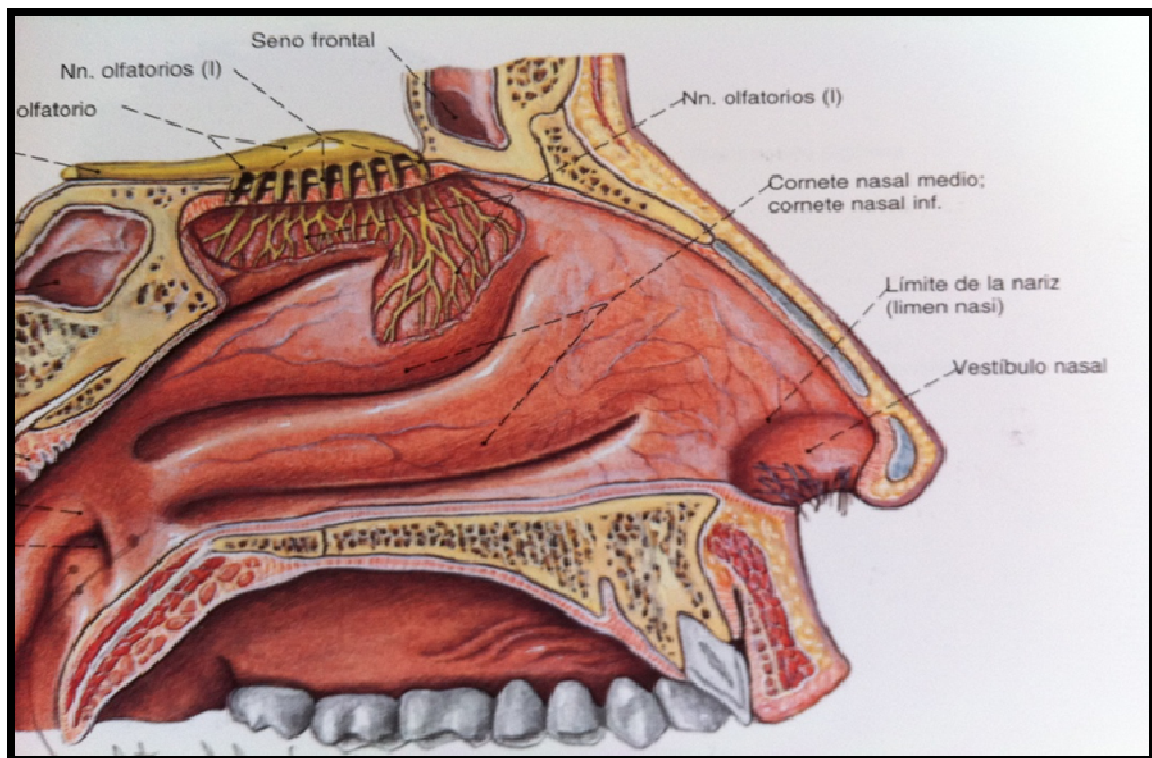
Los tumores originados en esta localización tienen una historia natural similar a la del carcinoma cutáneo de células escamosas o CE cutáneo. Los tumores primarios del vestíbulo nasal suelen presentar un pronóstico más favorable que los tumores de la cavidad nasal.

### 1.1.1 Anatomía

El vestíbulo nasal es una cavidad en forma de pera que constituye la entrada a la cavidad nasal. Sus límites son: medialmente el tabique nasal y columela; lateralmente los cartílagos alares y sesamoideos; caudalmente se encuentra la base o suelo de la nariz formado por la premaxila; posteriormente se halla la unión de los cartílagos alares y triangulares que equivale a la transición de la piel a la mucosa (Figuras 1 y 2). El vestíbulo está revestido por folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas.



**Figura 1.** Visión lateral del esqueleto nasal. (Atlas de anatomía humana Sobotta<sup>(141)</sup>).



**Figura 2.** Pared lateral de la fosa nasal. Límite entre vestíbulo nasal y cavidad nasal, limen nasi. (Atlas de anatomía humana Sobotta<sup>(142)</sup>).

### 1.1.2 Epidemiología

Los tumores del vestíbulo nasal son 2 veces más frecuentes en hombres que en mujeres y con una edad promedio de 60 a 65 años <sup>(96, 99, 124)</sup>. El desarrollo de tumores del vestíbulo nasal se ha asociado con el tabaco <sup>(72)</sup>. El tipo histológico más frecuente de los tumores del vestíbulo nasal es el CE seguido del carcinoma de células basales <sup>(12, 61)</sup>.

### 1.1.3 Clínica

Ulceraciones superficiales o masas del tabique membranoso o columela con formación de costras y sangrado ocasional son las manifestaciones más frecuentes. Las lesiones más avanzadas pueden perforar el tabique o invadir el

cartílago alar o crecer a través de la superficie de la piel. También puede haber extensión caudal en dirección al surco gingivolabial y premaxila. La extensión hacia la cavidad nasal posterior ocurre en estadios avanzados o en recidivas tumorales.

El drenaje linfático del vestíbulo nasal se efectúa principalmente a los ganglios linfáticos submandibulares y secundariamente al resto de ganglios faciales. Sólo alrededor del 5 al 10 por ciento de los pacientes presentan metástasis en los ganglios linfáticos <sup>(82, 96)</sup>.

#### **1.1.4 Diagnóstico y estadificación**

Una historia clínica detallada, la tomografía computarizada (TC) o la resonancia magnética (RM) para valorar extensión tumoral y la biopsia para la confirmación patológica suelen ser suficientes para el diagnóstico <sup>(38)</sup>.

No hay sistema de clasificación específico para tumores del vestíbulo nasal. Se estadifican según el sistema de clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tablas 1 y 2).

<b>Tumor Primario</b>	
TX	Tumor primario no puede evaluarse
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión con menos de dos características de alto riesgo (véase abajo la lista de características de alto riesgo)
T2	Tumor mayor de 2 cm en su mayor dimensión o  Tumor de cualquier tamaño con dos o más características de alto riesgo
T3	Tumor con invasión del maxilar superior, la órbita, la mandíbula, o hueso temporal
T4	Tumor con invasión del esqueleto (axial o apendicular) o invasión perineural en la base del cráneo

<b>Características de alto riesgo en el tumor primario</b>
>2 mm de espesor
Estadio de Clark $\geq$ IV
Invasión perineural
Localización primaria en el pabellón auricular
Pobrementemente diferenciado o indiferenciado

**Tabla 1.** Sistema de estadificación TNM para el carcinoma cutáneo de células escamosas: T indica el tamaño tumoral<sup>(4)</sup>.

<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
NX	Ganglios linfáticos no se pueden evaluar
N0	No evidencia de metástasis ganglionar
N1	Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral, 3 cm o menos de su diámetro mayor
NX	Ganglios linfáticos no se pueden evaluar
N2a	Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral, más de 3 cm y menos de 6 cm en su diámetro mayor
N2b	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales múltiples, ninguno más de 6 cm en su diámetro mayor
N2c	Metástasis en los ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno más 6 cm en su diámetro mayor
N3	Metástasis en un ganglio linfático, más de 6 cm en su diámetro mayor
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
Mx	No es posible establecer la presencia de metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

**Tabla 2.** Sistema de estadificación TNM para el carcinoma cutáneo de células escamosas: N indica la afectación ganglionar cervical y M las metástasis a distancia<sup>(4)</sup>.

### 1.1.5 Tratamiento

El objetivo es lograr el mejor resultado desde el punto de vista oncológico con la menor morbilidad conservando la estética y la función nasal. Tanto la escisión quirúrgica como la radioterapia están indicados en el tratamiento de los tumores iniciales T1 y T2. Sin embargo la radioterapia ofrece mejores resultados estéticos que la deformidad originada por la cirugía.

Los tumores T1 y T2 tratados con radioterapia presentan una tasa de control local a cinco años del 95 por ciento y una supervivencia global del 76 al 90 por ciento<sup>(98, 149)</sup>. La dosis inicial de radioterapia externa es generalmente de 50

gray (Gy) y las complicaciones graves son poco comunes <sup>(44)</sup>. La cirugía es una alternativa razonable si la lesión se puede extirpar con un buen resultado funcional y estético. Las tasas de control local de tumores T1 y T2 tratados mediante extirpación quirúrgica son del 90 al 100 por cien. Los tumores T3 y T4 pequeños sin invasión ósea son generalmente tratados con cirugía valorando radioterapia postoperatoria.

Los tumores avanzados T4 con invasión ósea requieren un enfoque de modalidad combinada que consiste en la cirugía y radioterapia postoperatoria. En este caso, la radioterapia se puede administrar antes o después de la intervención quirúrgica. La radioterapia preoperatoria ofrece la posibilidad de la reducción del tumor para permitir una resección menos amplia. Sin embargo, la radioterapia postoperatoria presenta menos complicaciones de la herida quirúrgica.

En cuanto al tratamiento de las metástasis cervicales, dado que el riesgo es bajo, el tratamiento regional ya sea con radioterapia o cirugía mediante disección cervical debe ser considerado solamente para los pacientes con tumores avanzados T4, en particular los que están mal diferenciados y / o recidivas tumorales. Los pacientes que presentan metástasis en ganglios linfáticos cervicales deben ser tratados con disección cervical y radioterapia postoperatoria. Existe escasa evidencia científica en la eficacia de la quimioterapia para este tipo de tumor <sup>(33)</sup>.

#### **1.1.6 Pronóstico**

El control local del tumor a cinco años se consigue del 80 a 95 por ciento para los tumores en fase inicial y en el 70 por ciento para las lesiones avanzadas <sup>(82, 149)</sup>. La supervivencia global a cinco años es del 58 al 76 por ciento. Las metástasis regionales cervicales y a distancia son muy raras. Los factores asociados a un peor pronóstico son un mayor estadio T, la afectación ganglionar, y la participación de los labios, cartílago o hueso <sup>(96, 99)</sup>.



## **1.2 CAVIDAD NASAL**

Los tumores que se originan en la cavidad nasal tienen una historia natural, histología, patogenia y opciones terapéuticas similares a los tumores de los senos paranasales.

### **1.2.1 Anatomía**

Comienza en la nariz por detrás del limen nasi y termina posteriormente en las coanas, que se comunican directamente con la nasofaringe (Figuras 1 y 2). Está limitada caudalmente por el paladar duro y cranealmente por la base del cráneo. Se divide en mitades derecha e izquierda por el tabique nasal. La pared lateral de cada cavidad nasal está compuesta de huesos finos a modo de pliegues que se proyectan hacia la cavidad nasal, llamados cornetes nasales inferiores, medios y superiores. La cavidad nasal se comunica con los senos paranasales a través de los meatos nasales.

### **1.2.2 Epidemiología**

Los tumores de la cavidad nasal son dos veces más frecuentes en hombres que en mujeres y generalmente se presentan entre las edades de 55 y 65 años.

El humo del tabaco se ha asociado con el desarrollo de tumores de la cavidad nasal. Las exposiciones ocupacionales tales como el polvo de madera, el formaldehído, el polvo de cuero, textiles y polvo ambiental se asocian al desarrollo de adenocarcinomas de la cavidad nasal <sup>(76,104)</sup>.

### **1.2.3 Histología**

El CE es la variedad histológica más frecuente, representando del 38 al 66 por ciento de todos los casos <sup>(6, 24, 36)</sup>.

Los tumores de glándulas salivales menores representan el 30 por ciento de las neoplasias en la cavidad nasal <sup>(72)</sup>. El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente, seguido por el carcinoma adenoide quístico, mixto benigno, y mucoepidermoide <sup>(132)</sup>. El carcinoma de células acinares es poco frecuente en la cavidad nasal y senos paranasales.

Los carcinomas neuroendocrinos constituyen un espectro de histologías poco comunes que incluyen estesioneuroblastoma (neuroblastoma olfatorio), el carcinoma nasosinusal indiferenciado, carcinoma de células pequeñas y carcinoma neuroendocrino <sup>(132)</sup>.

El papiloma invertido es un tumor raro, benigno que se presenta en el epitelio de Schneider que recubre la cavidad nasal. Se asocia con el CE en aproximadamente 5 a 10 por ciento de los pacientes y es localmente agresivo, incluso en ausencia de CE.

Otras neoplasias que se originan en la cavidad nasal incluyen los linfomas, sarcomas y melanomas malignos <sup>(1)</sup>.

#### **1.2.4 Clínica**

Los pacientes con tumores de la cavidad nasal, por lo general, se presentan con una historia crónica de congestión nasal, obstrucción nasal recurrente y epistaxis intermitente. Estos síntomas pueden parecerse a los de la sinusitis crónica o pólipos nasales y pueden retrasar el diagnóstico de cáncer. Sin embargo, como la sinusitis crónica se asocia más con síntomas bilaterales, los síntomas unilaterales nos deben hacer sospechar de origen tumoral y se debe realizar pruebas complementarias como la endoscopia nasal y / o pruebas de imagen.

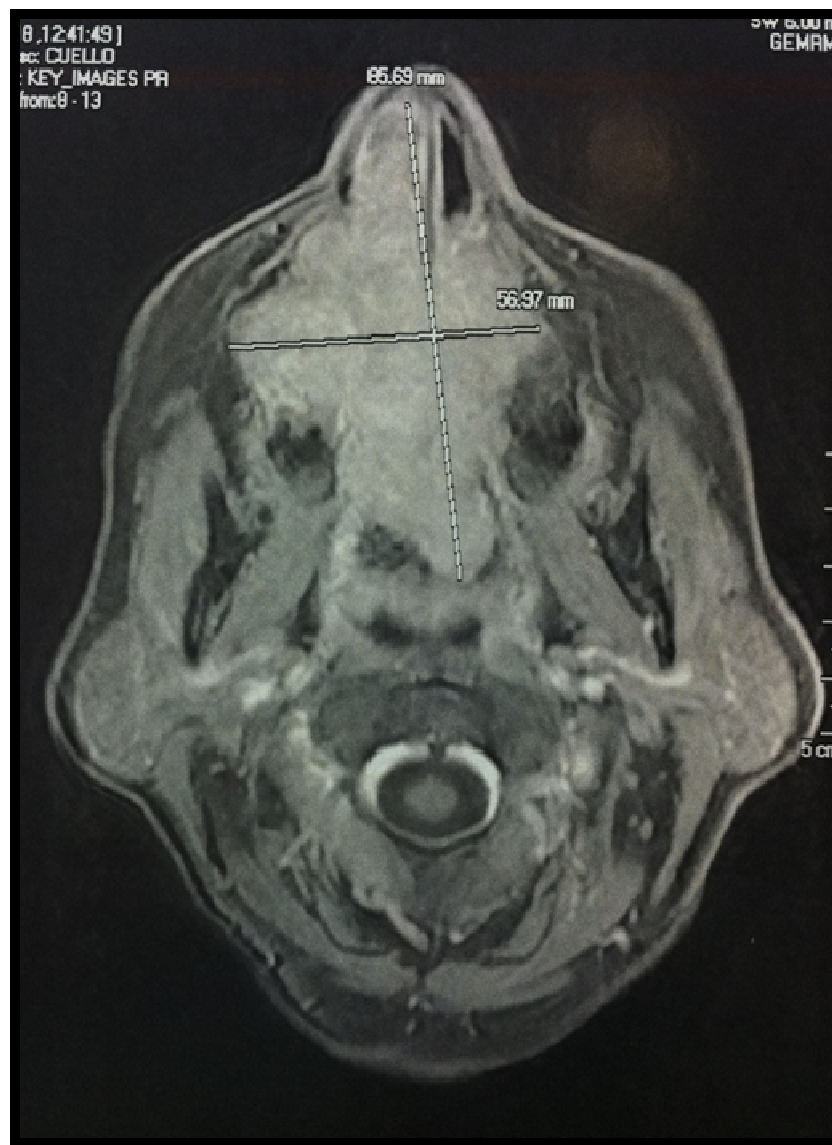
Los síntomas de las lesiones más avanzadas dependen de la localización tumoral y extensión del tumor: anosmia cuando el tumor invade la región olfativa; cefalea frontal cuando existe extensión a través de la placa cribiforme

o invade el seno etmoidal; proptosis, diplopía o una masa palpable orbitaria al invadir la pared medial de la órbita.

El drenaje linfático de la cavidad nasal se efectúa a través de los ganglios retrofaríngeos, submandibulares y subdigástricos. Menos del 10 por ciento de los pacientes presentan metástasis en los ganglios linfáticos <sup>(24)</sup>.

### **1.2.5 Diagnóstico**

Una historia clínica detallada y un examen físico deben realizarse con especial atención a los signos y síntomas de afectación de la órbita o los pares craneales. Tanto el TC con contraste como la RM se realizan habitualmente: el TC para la determinación de la invasión en los huesos, la nasofaringe y los ganglios linfáticos y la RM para evaluar la extensión intracraneal, orbitaria y perineural. La RM también ayuda a determinar si los senos están opacificados debido a un tumor, a líquido o a cambios inflamatorios de la mucosa (figura 3). El diagnóstico definitivo es la biopsia que generalmente puede llevarse a cabo a través de la endoscopia nasal <sup>(38)</sup>.



**Figura 3.** RM corte axial de extensa tumoración que invade fosas nasales, sobrepasa línea media y llega posteriormente hasta seno esfenoidal. (Con permiso del Servicio de Radiología, Hospital Quirón, Madrid)

### 1.2.6 Estadificación

Los tumores de la cavidad nasal se estadifican junto con los tumores del seno etmoidal en el manual de estadificación de la AJCC 2002 (Tabla 3). El T se basa en la extensión de la enfermedad, no el tamaño del tumor. N y M son iguales que para el CE cutáneo de la tabla 2.

<b>Tumor Primario (T). Cavidad nasal y seno etmoidal.</b>	
TX	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado a una sola pared con o sin invasión ósea
T2	Tumor que invade 2 paredes en una misma región o se extiende a una región adyacente dentro del complejo nasoetmoidal con o sin invasión ósea.
T3	Tumor que invade la pared medial o el suelo de la órbita, seno maxilar, paladar o área cribiforme.
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor invade cualquiera de las siguientes estructuras: región anterior orbitario, piel de nariz o mejilla, fosa craneal anterior, apófisis pterigoides, esfenoides o seno frontal.
T4b	Enfermedad local muy avanzada. Tumor invade cualquiera de las siguientes estructuras: apex orbitario, duramadre, invasión intracraneal, encéfalo, pares craneales, nasofaringe o clivus.

<b>Estadaje anatómico</b>			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Estadio IVB	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla 3.** Sistema de estadificación TNM para el tumor de cavidad y senos paranasales <sup>(4)</sup>.

### 1.2.7 Tratamiento

Las recomendaciones de tratamiento se aplican a todas las histologías, pero son más relevantes para la CE y el adenocarcinoma, ya que éstas son las histologías más comunes en la cavidad nasal. El tratamiento de ciertos tumores en particular se examina por separado.

- Fase inicial. Para los tumores T1N0, la cirugía sólo es una opción de tratamiento razonable, dando lugar a una supervivencia global del 50 al 70 por ciento en pacientes seleccionados <sup>(36)</sup>. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con tumores en estadios precoces se tratan con cirugía y radioterapia postoperatoria, cuyos detalles se discuten a continuación.

- Fase avanzada. El tratamiento estándar para tumores en estadio avanzado es quirúrgico seguido de radioterapia. Aunque la radioterapia preoperatoria ha sido utilizada para reducir al mínimo el volumen del tumor y limitar la extensión de la resección, la radioterapia postoperatoria reduce el riesgo de complicaciones de la herida quirúrgica <sup>(6)</sup>.

- Fase muy avanzada. Los tumores no resecables son tratados con radioterapia definitiva. A veces se administra quimioterapia en la inducción o concurrente con la radioterapia.

El control local después de cirugía como tratamiento único es del 50 a 60 por ciento a los cinco años <sup>(77)</sup>. La adición de radioterapia postoperatoria mejora el control local a los 5 años al 55 – 80 por ciento.

El objetivo de las técnicas quirúrgicas es proporcionar una resección en bloque del tumor con márgenes libres de enfermedad preservando en lo posible la función y la estética.

La resección endoscópica está ganando aceptación como alternativa a las cirugías craneofaciales o transfaciales <sup>(77)</sup>.

No hay consenso sobre los criterios utilizados para definir tumores no resecables. La mayoría coinciden en que los tumores que invaden el seno cavernoso, el quiasma óptico o presentan invasión intracraneal no son resecables.

La radioterapia se debe administrar cuatro a seis semanas después de la cirugía para permitir la cicatrización. Una dosis de 60 Gy aplicados en fracciones de 2 Gy al día es suficiente cuando los márgenes están libres de enfermedad. Si el tumor extirpado presenta márgenes afectados o la resección no ha sido curativa existiendo enfermedad residual macroscópica (R1-R2), o si el tumor fue reducido y extirpado parcialmente (es decir, a través de endoscopia), la dosis utilizada es de 66 a 70 Gy en fracciones de 2 Gy diariamente.

La radioterapia para los tumores de la cavidad nasal es casi siempre de intensidad modulada en lugar de radioterapia externa convencional con el objetivo de preservar regiones como la órbita y globo ocular disminuyendo la probabilidad de ceguera <sup>(24)</sup>.

Los tumores irresecables son tratados con altas dosis de radioterapia, por lo general 70 Gy en fracciones de 2 Gy al día, o 74,4 Gy en fracciones de 1,2 Gy aplicados dos veces al día. La supervivencia global a cinco años es del 15 por ciento. Existe escasa evidencia en la eficacia de la quimioterapia en el cáncer de la cavidad nasal <sup>(41)</sup>.

En relación al tratamiento de las metástasis cervicales, el tratamiento electivo del cuello N<sub>0</sub> es controvertido. Las tasas de recidiva ganglionar en el cuello N<sub>0</sub> varían de 0 a 19 por ciento <sup>(6,24)</sup>. Algunos creen que no hay beneficio para el tratamiento electivo del cuello N<sub>0</sub>. El plan de tratamiento más aceptado es la disección cervical funcional o la irradiación de los cuellos N<sub>0</sub> en pacientes con enfermedad T3 y T4 o extensión del tumor a zonas ricas en vasos linfáticos (por ejemplo, la nasofaringe), en el estesioblastoma cuando aparece en todos los senos paranasales y en los carcinomas indiferenciados.

Los pacientes que presentan enfermedad en los ganglios linfáticos positivos deben ser tratados con cirugía mediante disección funcional cervical y radioterapia postoperatoria.

### **1.2.8 Pronóstico**

La recidiva local constituye un problema en el tratamiento de tumores de la cavidad nasal y afecta negativamente a la supervivencia. Cuando se trata con cirugía y radioterapia adyuvante, el control local a cinco años es del 50 al 80 por ciento y la supervivencia global del 50 a 70 por ciento <sup>(72)</sup>. Los factores asociados a un peor pronóstico incluyen un mayor estadio T, el tratamiento con radioterapia sola, compromiso de los ganglios linfáticos, CE, estesioneuroblastoma, carcinomas indiferenciados y la invasión de la órbita, la placa cribiforme, o la duramadre.

### **1.2.9 Seguimiento**

Los pacientes deben ser educados para el control de los factores de riesgo y acerca de posibles signos y síntomas de recidiva del tumor, incluyendo la ronquera, dolor, disfagia, sangrado y agrandamiento de los ganglios linfáticos.

Del 80 al 90 por ciento de todas las recidivas después del tratamiento con intención curativa se producirán en los 2 a 4 primeros años.



## **2 ANGIOGÉNESIS Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

El término *Angiogénesis* designa el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular preexistente.

Las células endoteliales se encuentran entre las de más larga vida media del cuerpo. Forman una monocapa que tapiza la superficie interna de todos los vasos sanguíneos, independientemente de su calibre. Estas células se encuentran ligadas a la lámina basal, un tipo de matriz extracelular que rodea los vasos sanguíneos y que a su vez está relacionada estrechamente con células musculares y con el tejido conectivo circundante. Las células endoteliales, por formar parte de las estructuras capilares responsables del abastecimiento de nutrientes hasta todos los puntos del organismo, son extraordinariamente sensibles a los cambios de las necesidades nutricionales de los tejidos que irrigan, cambios que se manifiestan en forma de señales químicas procedentes de las células de dichos tejidos. Por tanto, aunque la angiogénesis se encuentra normalmente suprimida, en diversos procesos fisiológicos ha de producirse necesariamente para satisfacer las necesidades de nutrición y de excreción de tejidos que se están desarrollando activamente, tanto durante el desarrollo embrionario como en el individuo adulto. En este último, la angiogénesis queda reducida a determinados procesos relacionados con los ciclos reproductivos (formación del cuerpo lúteo, vascularización del endometrio, desarrollo placentario) y a la cicatrización de heridas y la reparación de fracturas óseas. En todos estos casos, la angiogénesis tiene lugar como un proceso finamente regulado y transitorio, de forma que, cuando desaparece el estímulo original, el proceso se detiene y eventualmente se produce la desaparición de los vasos sanguíneos. Por contra, la angiogénesis mantenida y persistente es característico de enfermedades como la diabetes, psoriasis o artritis reumatoide y es esencial para el crecimiento tumoral y las

metástasis <sup>(50,52)</sup>.

El estudio de la angiogénesis y de los mecanismos que la regulan no es sólo de interés biológico sino que también puede contribuir a un diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas, tanto para su inhibición en el tratamiento de varias enfermedades en las que está implicada una angiogénesis mantenida y persistente, como para su estimulación en el tratamiento de patologías asociadas a una deficiente irrigación. Esto último constituye lo que se denomina *angiogénesis terapéutica*.

## **2.2 ANGIOGÉNESIS TUMORAL**

### **2.2.1 Cáncer: bases comunes dentro de la diversidad y complejidad del problema**

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte. Aunque se reconocen más de un centenar de enfermedades neoplásicas y cada una presenta peculiaridades específicas, es posible describir pautas y patrones comunes en la génesis y desarrollo de la práctica totalidad de los tumores <sup>(70)</sup>.

En la evolución de un tumor, pueden distinguirse tres fases:

- 1) Transformación neoplásica.
- 2) Progresión tumoral *in situ* dependiente de la angiogénesis.
- 3) Invasión y metástasis.

No todos los tumores pasan por las tres fases. Así, en las leucemias no se puede hablar de un crecimiento *in situ*, al tratarse de células sanguíneas circulantes. Por otra parte, hay numerosos ejemplos de tumores que permanecen encapsulados y nunca manifiestan capacidad invasiva no dando por tanto lugar a metástasis.

Los tumores son monoclonales, es decir, derivan de una sola célula. El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica la acumulación sucesiva de alteraciones en los genes a lo largo de un período de crecimiento

que dura años o décadas hasta que se hace aparente. La inestabilidad genética que caracteriza a las células cancerosas las llevará posteriormente a adquirir capacidad invasiva y metastásica.

La transformación neoplásica es la consecuencia de mutaciones que producen la expresión anormal de un número reducido de genes: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN. Como resultado de la acumulación de mutaciones, las células neoplásicas adquieren un potencial replicativo ilimitado, son capaces de proliferar en ausencia de señales estimuladoras de la proliferación, se hacen insensibles a señales antiproliferativas y/o adquieren capacidad para evadir la muerte celular programada o apoptosis <sup>(70)</sup>.

El crecimiento de un tumor, tanto primario como secundario, a partir de un cierto diámetro (de tan sólo 2-3mm<sup>3</sup>) requiere su vascularización. Sin ella, las células tumorales mueren por deficiencia de nutrientes y oxígeno, y por falta de eliminación de sustancias de desecho. La angiogénesis es, por tanto, esencial para la progresión tumoral. Las células tumorales que adquieren el fenotipo angiogénico son capaces, por sí mismas o en cooperación con células del estroma del huésped, de inducir una respuesta proangiogénica en células endoteliales vasculares relativamente cercanas. El resultado final es la formación de una nueva red vascular, derivada de la preexistente, que irriga el tumor, aportándole los nutrientes y el oxígeno que requiere para expandirse <sup>(51)</sup>.

La adquisición de la capacidad angiogénica favorece, además, la diseminación del tumor. Para ello las células tumorales deben acceder a la circulación sanguínea o linfática atravesando las paredes de los vasos. Para formar metástasis, las células deben soportar deformaciones que dependerán de la rigidez de las paredes y la disparidad entre su propio diámetro y el del vaso, y también sobrevivir al probable ataque del sistema inmune, adherirse a la pared de los vasos y extravasarse. Tras esta extravasación, las células tumorales inician una segunda etapa de proliferación descontrolada y angiogénesis para dar lugar a tumores secundarios <sup>(50)</sup>.

Debe remarcar que las metástasis son dependientes de la angiogénesis en dos fases de la cascada metastásica. Primero, un tumor primario tiene que

haberse vascularizado antes de que se liberen de él células típicamente metastásicas. Segundo, al llegar al órgano diana, las células metastásicas dependen de nuevo de angiogénesis para crecer a un tamaño detectable clínicamente <sup>(50)</sup>.

Para alcanzar la fase de invasión y metástasis, las células tumorales deben haber adquirido no sólo un fenotipo angiogénico sino, además, un fenotipo invasivo. La invasividad es, por tanto, la característica esencial del tumor maligno. Si bien conocemos muchas mutaciones que explican el aumento en la proliferación celular, es menos conocido la implicación de las mutaciones responsables de la invasión celular. La invasividad incluye a su vez varios procesos: pérdida de la adhesión celular, degradación de la matriz extracelular y movilidad. El proceso de aparición de células invasivas comienza en una fase relativamente temprana. Es muy probable que cuando se detecta inicialmente un tumor existan ya en él células que son potencialmente invasivas y angiogénicas <sup>(53)</sup>.

### **2.2.2 La angiogénesis tumoral es un sello distintivo de la progresión tumoral y la metástasis**

Buena parte de la investigación sobre cáncer desarrollada en los pasados 50 años se ha dedicado al análisis de las diferencias celulares y moleculares entre células transformadas y no transformadas, con especial énfasis en los genes que se expresan en las células tumorales de forma diferente a como se expresan en sus contrapartidas no tumorales. Este enfoque, que ha sido denominado *geno-céntrico*, ha producido, sin lugar a dudas, una enorme cantidad de información valiosa acerca de los orígenes del cáncer y su progresión. Sin embargo, este paradigma prevalente puede conducir a la errónea simplificación de asumir que el cáncer es el resultado, exclusivamente, de mutaciones génicas específicas y que, por tanto, podría ser tratable sólo con revertir dichas alteraciones mutacionales o utilizando a las mismas como diana para eliminar el tumor. Sin embargo, cada vez se hace más abrumadora la acumulación de evidencias científicas en favor de la importancia de los mecanismos epigenéticos y las influencias de las células del entorno y del

propio medio extracelular en la progresión tumoral <sup>(49)</sup>. Parece claro, pues, que el cáncer es algo más que una enfermedad causada por alteraciones de genes específicos. Más bien, una característica común a todo tipo de cáncer es la elevada inestabilidad del genoma de la célula tumoral <sup>(20)</sup>.

Estas limitaciones del *enfoque geno-céntrico* han conducido a que algunos científicos como Hanahan y Weinberg <sup>(70)</sup> sugieran que el vasto catálogo de genotipos neoplásicos sea una manifestación de seis alteraciones en la fisiología celular que colectivamente dictan el crecimiento tumoral maligno:

- 1) Autosuficiencia en señales para el crecimiento.
- 2) Insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento.
- 3) Evasión de la muerte celular programada.
- 4) Potencial replicativo ilimitado.
- 5) Angiogénesis mantenida.
- 6) Invasión y metástasis.

Es preciso constatar que una *angiogénesis mantenida y persistente es un sello distintivo del cáncer*. Basado en esta perspectiva, se ha propuesto un paradigma *endotelio-céntrico*, que permite trascender los detalles de la presentación genética de las neoplasias. Se centra, en cambio, en aspectos generales del comportamiento de los tumores que no están sujetos a los problemas y limitaciones asociados a la alta tasa de mutación de las células tumorales. Además, como las células endoteliales no tienen la inestabilidad genética de las células neoplásicas, cabría esperar que estrategias terapéuticas basadas en este *enfoque endotelio-céntrico* pudieran ser aplicables a muy distintos tipos de cáncer y con menor riesgo de que aparezcan mecanismos de resistencia que en terapias antineoplásicas más convencionales <sup>(52)</sup>.

### **2.2.3 Vascularización de los tumores: Conexión del interruptor angiogénico**

Las células requieren oxígeno y nutrientes para sobrevivir y, por tanto, se hallan localizadas a no más de 100-200 micras (el límite de difusión del oxígeno) de un vaso capilar sanguíneo <sup>(21)</sup>. Las células tumorales no son una

excepción a estos requerimientos. Un gramo de tumor vascularizado contiene aproximadamente 20 millones de células endoteliales y entre 100 y 1000 millones de células tumorales. Así que cada 10-100 nuevas células tumorales requieren al menos una nueva célula endotelial <sup>(49)</sup>. Para iniciar la neovascularización, un tumor avascular debe adquirir un fenotipo angiogénico que le permite "encender" el *interruptor angiogénico*. Obviamente, el mecanismo mediante el que se "conecta" el interruptor angiogénico debería involucrar sensores de presiones parciales de oxígeno suficientemente sensibles para detectar rápidamente la hipoxia (al menos parcial) producida en el interior del tumor sólido avascular. De hecho, la respuesta a la hipoxia es un tema de plena actualidad, habiéndose ya demostrado la participación de un factor transcripcional inducible por hipoxia (HIF-1) en la inducción de genes claves en el control de las respuestas fisiológicas a la hipoxia <sup>(15, 152)</sup>, una de las cuales es justamente la inducción de la angiogénesis; en este contexto, la inducción del gen que codifica el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el más potente inductor angiogénico descrito, en condiciones de hipoxia es especialmente relevante pero, muy probablemente, otros factores pueden presentar un papel de importancia para la respuesta del tumor a la hipoxia.

Gullino demostró en 1976 <sup>(67)</sup> que las células de tejidos precancerosas adquieren capacidad angiogénica en su proceso de transformación en cancerosas y propuso este concepto para diseñar estrategias para prevenir el cáncer. Posteriormente, ha quedado plenamente confirmado que la adquisición del fenotipo angiogénico ocurre en etapas tempranas del desarrollo tumoral y es un paso limitante en la progresión tumoral <sup>(21, 50, 69)</sup>.

Actualmente se admite que el *interruptor angiogénico* está "apagado" mientras el efecto de las moléculas proangiogénicas quede contrarrestado por el de moléculas antiangiogénicas y que dicho interruptor se enciende cuando el balance neto se desplaza a favor de la angiogénesis <sup>(69)</sup>. La actividad angiogénica de un tumor es, pues, el resultado del desequilibrio entre señales estimuladoras e inhibitoras. Los tumores pueden permanecer en estado latente durante años a causa de un equilibrio entre proliferación y apoptosis. Los

propios tumores primarios generan promotores angiogénicos de corta vida media e inhibidores de vida media más larga. Como consecuencia de su mayor vida media, la concentración sistémica de antiangiogénicos puede exceder la de proangiogénicos e inhibir el crecimiento de metástasis en sitios distales <sup>(21)</sup>. La resección de un tumor primario podría, por tanto, conducir la eliminación de los inhibidores dando como resultado un crecimiento de metástasis <sup>(55)</sup>.

El "encendido" del *interruptor angiogénico* tiene varios efectos sobre los pasos dianas. Hay un perfil de expresión diferente al que caracteriza al endotelio quiescente, con proteínas expresadas preferentemente, tal como la endogлина (CD 105). El propio endotelio secreta diversos factores de crecimiento como el de fibroblastos (FGF), el derivado de plaquetas (PDGF) o el similar a la insulina (IGF), que pueden actuar de formas auto y paracrina, amplificando la respuesta angiogénica. La lámina basal y el estroma que rodean los capilares son degradados proteolíticamente, posibilitando la migración endotelial para formar un nuevo tubo. El nuevo brote capilar va creciendo por incorporación de células endoteliales que migran del vaso parental y por proliferación endotelial en la base del "brote". El endotelio inicialmente migra como un cordón sólido, pero subsecuentemente desarrolla espacios inter e intracelulares que forman luz vascular, los extremos de los nuevos capilares se anastomosan para formar una nueva red capilar y se genera una nueva lámina basal <sup>(55)</sup>.

Para que prospere la angiogénesis tumoral, han de producirse modificaciones en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, moduladas por muchas de las moléculas que están implicadas en la respuesta inmune y en la inflamación. Otros mecanismos, como la "intisolación" y la vasculogénesis a partir de precursores endoteliales circulantes reclutados, también pueden estar implicados en la vascularización de los tumores <sup>(55)</sup>.

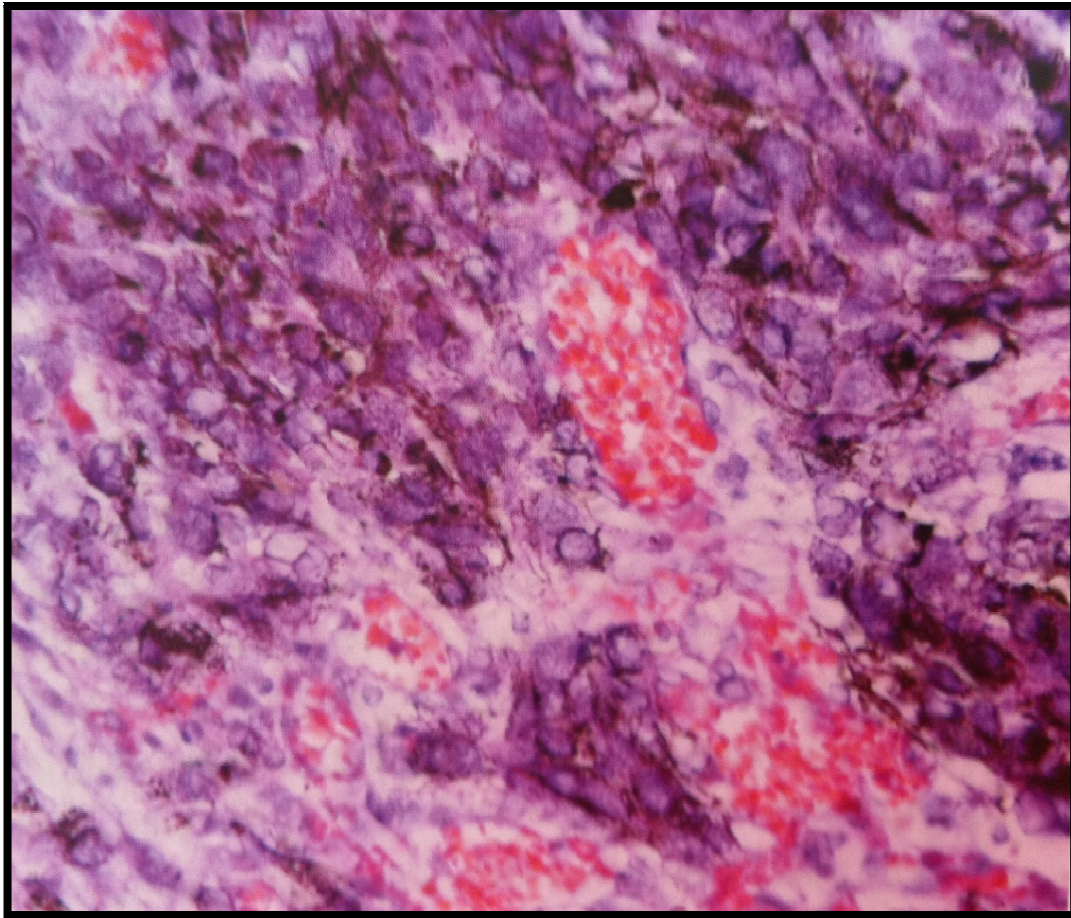
Una vez se ha establecido la vascularización tumoral, continúa una remodelación de vasos. Es probable que este proceso de remodelado esté relacionado con una exagerada respuesta al estrés y, por tanto, que esté muy influenciado por el microambiente tumoral incluyendo el lugar, el flujo sanguíneo, la concentración de glucosa y la hipoxia. Algunos estímulos actúan sinérgicamente con determinados oncogenes.

#### **2.2.4 Características de los vasos tumorales e implicaciones clínicas**

El *enfoque endotelio-céntrico* del cáncer pone el énfasis en que la base para las diferencias entre la fisiología del tejido tumoral y del tejido normal se encuentra en la vascularización tumoral, compuesta de dos tipos de vasos: los vasos preexistentes en el tejido normal invadido por el tumor y los microvasos que surgen por angiogénesis estimulada por factores producidos por las células tumorales.

Los vasos sanguíneos tumorales resultantes son arquitectónica y estructuralmente anormales <sup>(55)</sup>. Son vasos muy irregulares, tortuosos y dilatados, con diámetro irregular (Figura 4). Presentan numerosas ramificaciones y conexiones arterio-venosas, fondos ciegos, carecen muchas veces de musculatura lisa acompañante o de inervación y tienen los revestimientos endoteliales y las láminas basales incompletas. Además, las células endoteliales tienen formas anormales y crecen unas sobre otras, proyectándose hacia la luz del vaso <sup>(21)</sup>.





**Figura 4.** Vascularización de un melanoma de ratón. Las células del melanoma se reconocen por su contenido de melanina. Se observan los vasos, dilatados y de paredes delgadas (color rosa), entre los cúmulos de células tumorales (color azul). (Rodríguez de Quesada A<sup>(129)</sup>)

Como resultado de todo ello, el flujo sanguíneo es irregular y, desde el punto de vista funcional, los vasos presentan una permeabilidad vascular aberrante. Estas condiciones disminuyen la efectividad terapéutica, modulan la producción de factores pro y antiangiogénicos y seleccionan las células cancerosas más malignas y metastásicas <sup>(21,55)</sup>.

Los vasos linfáticos funcionales suelen estar ausentes en el interior de un tumor y agrandados en su periferia. Estos vasos linfáticos periféricos agrandados pueden coleccionar fluido intersticial y células cancerosas que se liberan de la superficie del tumor, facilitando así la metástasis linfática.

### **2.2.5 Las nuevas estrategias terapéuticas antineoplásicas basadas en este enfoque endotelio-céntrico**

Como ya queda dicho, el estudio de la angiogénesis no es sólo de interés biológico sino que también puede contribuir a un diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas. Sólo en los últimos años, el conocimiento de la fisiología endotelial y de los mecanismos de angiogénesis tumoral han proporcionado la base conceptual necesaria para el desarrollo de estrategias antiangiogénicas efectivas. Este enfoque tiene muchas ventajas sobre las terapias convencionales, incluyendo la directa accesibilidad a través de la circulación. Además, como el endotelio es genéticamente estable, la aparición de fenómenos de resistencia a fármacos es menos probable. Por lo demás, cabría esperar que los efectos secundarios fueran poco importantes, dado que la angiogénesis en adultos está restringida <sup>(46,55)</sup>.

A partir de los primeros ensayos clínicos, han emergido ciertos principios generales, que Folkman <sup>(51)</sup> propone como guía para el uso terapéutico de inhibidores de angiogénesis en una influyente revisión sobre el tema:

- 1) La terapia antiangiogénica suele tener baja toxicidad. Se dirige principalmente sobre células endoteliales capilares proliferantes y no provoca supresión de la médula, síntomas gastrointestinales o pérdida de cabello.
- 2) Su eficacia óptima parece obtenerse como tratamiento diario o intermitente durante largos periodos de tiempo (meses a un año) sin intervenciones en la terapia.
- 3) La aparición de fenómenos de resistencia a fármacos no ha sido un problema significativo en estudios con animales a largo plazo o en ensayos en fases I y II.
- 4) Se están empleando métodos cuantitativos para monitorizar la eficacia de la terapia antiangiogénica en fase clínica.
- 5) Una combinación de terapia antiangiogénica y terapia citotóxica puede ser curativa en animales portadores de tumor para los cuales cada estrategia por separado es sólo inhibidora.

Como el bloque del crecimiento tumoral requiere una inhibición crónica del reclutamiento vascular, definido por Hanahan<sup>(69)</sup> y Folkman<sup>(53)</sup> como

"*angiostasis*" es necesario que el tratamiento sea a largo plazo. Por tanto, se necesita identificar y caracterizar moléculas angiostáticas con baja o nula toxicidad. Se entiende por quimioprevención del cáncer el uso de agentes que disminuyan la progresión de la carcinogénesis, produzcan su reversión o su inhibición, con la intención de disminuir el riesgo de desarrollar una enfermedad invasiva o clínicamente relevante. Los agentes quimiopreventivos pueden interferir con el proceso angiogénico en distintas fases de la carcinogénesis. El "encendido" del *interruptor angiogénico* que ocurre en fases tempranas preneoplásicas podría ser bloqueado por agentes *angiopreventivos* antes que cambios fenotípicos y moleculares produjeran una progresión desde la displasia al cáncer invasivo <sup>(147)</sup>.

Sin embargo, en contraste con los estudios que emplean *xenoinjertos* (tumores de una especie, normalmente humanos, implantados en otra especie, normalmente ratones de laboratorio) en los que se han observado "curas", las respuestas en los ensayos de las terapias antiangiogénicas de primera generación no han mostrado muchos signos de regresión. Aunque esta falta de efectos puede ser en parte consecuencia de los objetivos clínicos médicos <sup>(55)</sup>. Otra explicación es que los tumores humanos emplean múltiples mecanismos para establecer un aporte sanguíneo, posibilitando la subversión de estos tratamientos. Además, no está clara la razón por la cual los tumores grandes son menos sensibles que los menores a fármacos antiangiogénicos, aunque una posibilidad es que en los tumores grandes predominen vasos más maduros mucho menos susceptibles a una terapia diseñada para ser selectiva frente a una vascularización proliferante e inmadura <sup>(21)</sup>. Por tanto, una comprensión detallada de los mecanismos implicados en la angiogénesis humana es esencial para diseñar terapias más efectivas.

### **2.2.6 Analogías funcionales entre angiogénesis tumoral, invasión tumoral y metástasis**

Las analogías funcionales entre invasión tumoral y metástasis, por una parte, y angiogénesis, por otra, han sido puestas en evidencia <sup>(102)</sup>. En ambos casos, el proceso global es el resultado de un desequilibrio entre elementos de

regulación positiva y negativa. Para que la progresión tumoral tenga lugar, el cáncer tiene que adquirir un *fenotipo invasivo* que dota a las células tumorales de unas capacidades proliferativas, migratorias y de invasión y remodelado de la matriz extracelular similares a las que presentan las células endoteliales angiogénicas <sup>(102)</sup>. Como ya queda dicho, la metástasis es dependiente de angiogénesis en dos etapas. Ahora bien, las relaciones funcionales y de dependencia entre angiogénesis y metástasis pueden inducir a ciertas confusiones. Así, ya en su famoso editorial de 1990, Folkman <sup>(53)</sup> señalaba que la capacidad de los tumores para inducir angiogénesis no siempre se correlaciona con su malignidad y que hay una considerable confusión en la literatura sobre este hecho. El adenoma adrenal, por ejemplo, es un tumor benigno altamente angiogénico. Sin embargo, está firmemente establecido que para diversos tipos de tumores, como el carcinoma de mama, la densidad vascular puede servir como variable pronóstica independiente, de forma que densidades vasculares significativamente incrementadas son un fiable indicio de mayor grado de metástasis y menor expectativa de supervivencia <sup>(43)</sup>.

En 1889 Paget, cita del artículo de J. Fidler <sup>(47)</sup>, investigó sobre los factores de los que depende que un órgano sufra metástasis en caso de un cáncer diseminado. En sus estudios concluyó que las metástasis sucedían sólo cuando ciertas células tumorales favorecidas tenían una especial afinidad por el medio de crecimiento proporcionado por ciertos órganos específicos. Por tanto, la formación de metástasis requeriría la interacción de las células neoplásicas adecuadas con el medio tisular compatible con su establecimiento y proliferación. La definición actual de la hipótesis de la " semilla y el suelo" consta de tres principios:

- 1) Las neoplasias son biológicamente heterogéneas y contienen subpoblaciones de células con diferentes propiedades angiogénicas, invasivas y metastásicas.
- 2) Aunque algunos de los pasos del proceso contienen elementos estocásticos, la metástasis como un todo favorece la supervivencia y el crecimiento de unas pocas subpoblaciones de células que preexistían en el tumor primario. Por tanto, la metástasis puede tener un origen clonal y diferentes metástasis se

pueden originar a partir de la proliferación de diferentes células.

3) La progresión de la metástasis depende de múltiples interacciones de las células metastásicas con mecanismos homeostáticos que las células tumorales pueden usurpar.

### **2.3 APOPTOSIS Y ANGIOGÉNESIS**

La apoptosis es un proceso normal de muerte celular programada, sin reacción inflamatoria, que interviene en numerosos momentos del desarrollo incluyendo la morfogénesis, remodelación vascular, eliminación de neuronas o de células del sistema inmune. La apoptosis implica una fragmentación celular que es fagocitada por macrófagos. Diferente de la necrosis, donde existe una muerte celular con proceso inflamatorio asociado, no está programado genéticamente y existe una ruptura celular con vertido de su contenido (lipasas, nucleasas y proteasas) que afecta negativamente a las células vecinas.

La apoptosis está exquisitamente regulada por una serie de proteínas que incluyen a la familia Bcl-2, Apaf (factor activador de proteasas apoptóticas) y la familia de las caspasas. Todas estas proteínas inhiben, inducen o ejecutan un programa apoptótico en respuesta a daños graves de la maquinaria celular o a señales transmitidas desde el exterior de la célula. De esta forma, Bcl-2 y otras proteínas antiapoptóticas de su familia, protegen a la célula de estímulos proapoptóticos o apoptogénicos <sup>(2)</sup>.

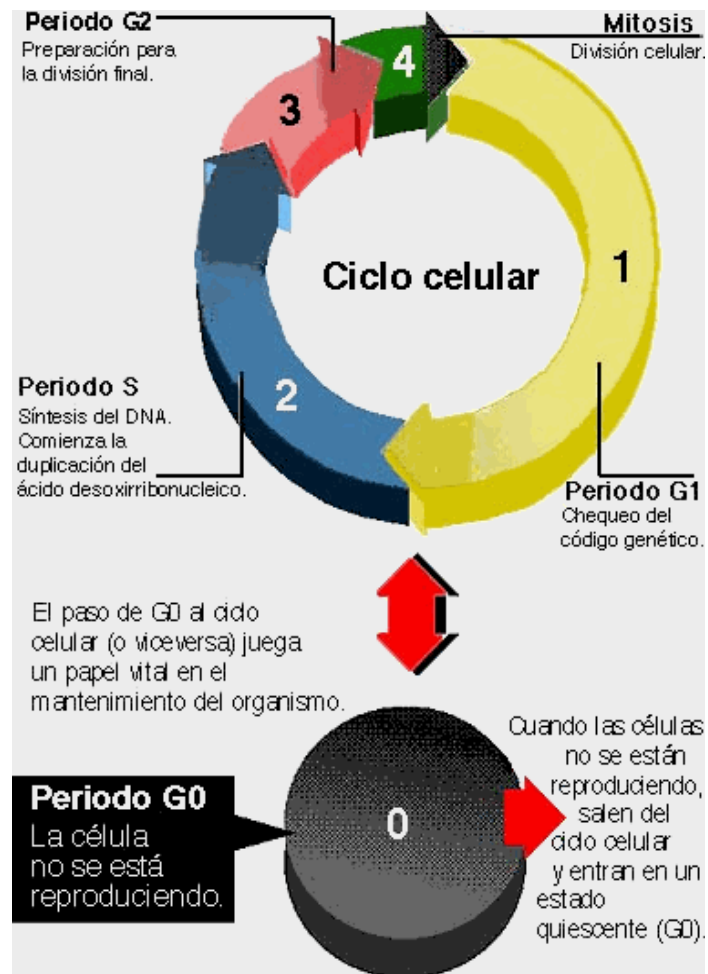
La apoptosis parece ser esencial en la iniciación del proceso angiogénico, de la misma forma que lo es en los procesos de remodelación vascular por los que se eliminan vasos superfluos. Una de las funciones de VEGF durante el proceso angiogénico es precisamente la de incrementar la protección de las células endoteliales frente a la apoptosis. El óxido nítrico parece tener también un papel en la supervivencia endotelial, ya que la inhibición de la enzima que sintetiza esta molécula en el endotelio (eNOS), aumenta la apoptosis en el endotelio de aorta bovina en cultivo <sup>(103)</sup>.

De forma opuesta al efecto protector de VEGF y FGF-2, diversos factores externos pueden promover la apoptosis en células endoteliales, especialmente

los factores de crecimiento transformante TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Por lo tanto, durante la angiogénesis no sólo se establece un equilibrio dinámico entre señales pro y antiangiogénicas, sino también entre señales de supervivencia y muerte celular.

## **2.4 ANGIOGÉNESIS Y PROTEÍNA P53**

El gen que más frecuentemente aparece mutado en relación con el cáncer humano es el gen que codifica la proteína p53. Su función es detener el ciclo celular (Figura 5) al final de la fase G1 cuando el DNA está dañado o mutado para permitir su reparación o bien la muerte celular programada también llamada apoptosis. Por tanto, el gen p53 es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en el control del ciclo celular y la apoptosis. Un gen p53 defectuoso no es capaz de regular el ciclo celular conduciendo a una proliferación celular descontrolada origen del tumor. Alrededor de un 50 por ciento de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53. Hay numerosos trabajos que relacionan mutaciones de la proteína p53 con el carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) <sup>(64)</sup> y existe una relación estadísticamente significativa entre la incidencia de mutaciones de p53 y grado histológico tumoral <sup>(92)</sup>.



**Figura 5:** Ciclo celular. La proteína p53 puede detener el ciclo celular al final de la fase G1, chequeo del código genético, cuando el DNA está dañado o mutado para permitir su reparación o bien la muerte celular programada también llamada apoptosis<sup>(179)</sup>.

La proteína p53, no solo frenaría el crecimiento tumoral y sería capaz de eliminar las células preneoplásicas induciendo apoptosis, sino que además podría impedir el desarrollo de los tumores, bloqueando la angiogénesis<sup>(34)</sup>. Su mutación origina la activación de factores proangiogénicos como el VEGF, FGF-2 y HIF-1.

Las células tumorales deben adquirir en su progresión tumoral un fenotipo angiogénico para crear la nueva vascularización de la que va a depender su propio crecimiento. Un ejemplo son los fibroblastos cultivados de pacientes con el síndrome de Li Fraumeni y los niveles de la glicoproteína thrombospondina -1 (TSP-1)

inhibidor de la neovascularización y génesis tumoral. El síndrome de Li Fraumeni es un trastorno hereditario por el cual se incrementa el riesgo de padecer varios tipos de tumor como sarcomas, tumores de encéfalo o leucemias. Los fibroblastos cultivados del citado síndrome son diploides, segregan elevadas cantidades de TSP-1 y tienen un alelo de wtp53 (alelo normal o salvaje) y otro mutante mtp53 en los primeros pases del cultivo o primeros subcultivos. Tras varios pases continuos pierden espontáneamente su alelo wtp53, haciéndose aneuploides e inmortales, aunque no tumorigénicos, decaen los niveles de TSP-1 y permanecen sólo con el alelo mtp53 adquiriendo un fenotipo angiogénico<sup>(34)</sup>.

Existen diferentes proteínas de tipo trombospodina y solo los tipos TSP-1 y TSP-2 tienen dominios que influyen en la angiogénesis. De estos dos tipos, solo el TSP-1 es regulado por la proteína p53.

Otros estudios, como el de Kieser en 1994<sup>(90)</sup>, han ligado la mutación de la proteína p53 con la angiogénesis tumoral, por la potenciación de la proteinquinasa C, regulador también del ciclo celular, en la inducción de algunos factores de crecimiento vasculares.

## **2.5 EL PAPILOMA VIRUS Y PROTEÍNA P53 EN EL CECC**

Existen oncoproteínas virales del virus del papiloma humano (HPV) como la E6 y E7 que se unen a la p53 y son capaces de inactivarlo y originar algunos tipos de tumor, entre ellos el CECC (cavidad oral). Los genotipos de HPV relacionados con carcinogénesis y con el carcinoma de cervix uterino son el 16, 18, 31, 33, 35, 39 y 45. El genotipo 16 es el que más frecuentemente aparece en el CECC<sup>(92)</sup>. Aproximadamente el 20 por ciento de este tipo de tumor presenta positividad para el HPV aumentando la incidencia hasta el 50 por ciento cuando el origen es orofaríngeo<sup>(60)</sup>.

Los tumores que presentan HPV tienen sobreexpresión de la proteína p16 (proteína supresora de tumores y activadora de pRB) y baja expresión de la proteína pRB (frena la progresión del ciclo celular) y ciclina D1 (inhibe a la proteína pRB y por tanto estimula la progresión del ciclo celular) junto con raras mutaciones de la p53. Aquéllos tumores HPV negativos tienen poca



expresión de la proteína p16, alta de la pRB y ciclina D1 y muchas mutaciones de la p53 asociándose a un peor pronóstico. Es frecuente observar que aquellos pacientes que presentan HPV positivo no tienen otros factores de riesgo como el tabaco o el alcohol. Así, los pacientes con carcinoma de amígdala HPV positivo tienen mejor pronóstico que los HPV negativo debido a que suele ocurrir en sujetos no fumadores ni bebedores y p53 no presenta muchas mutaciones <sup>(121)</sup>.

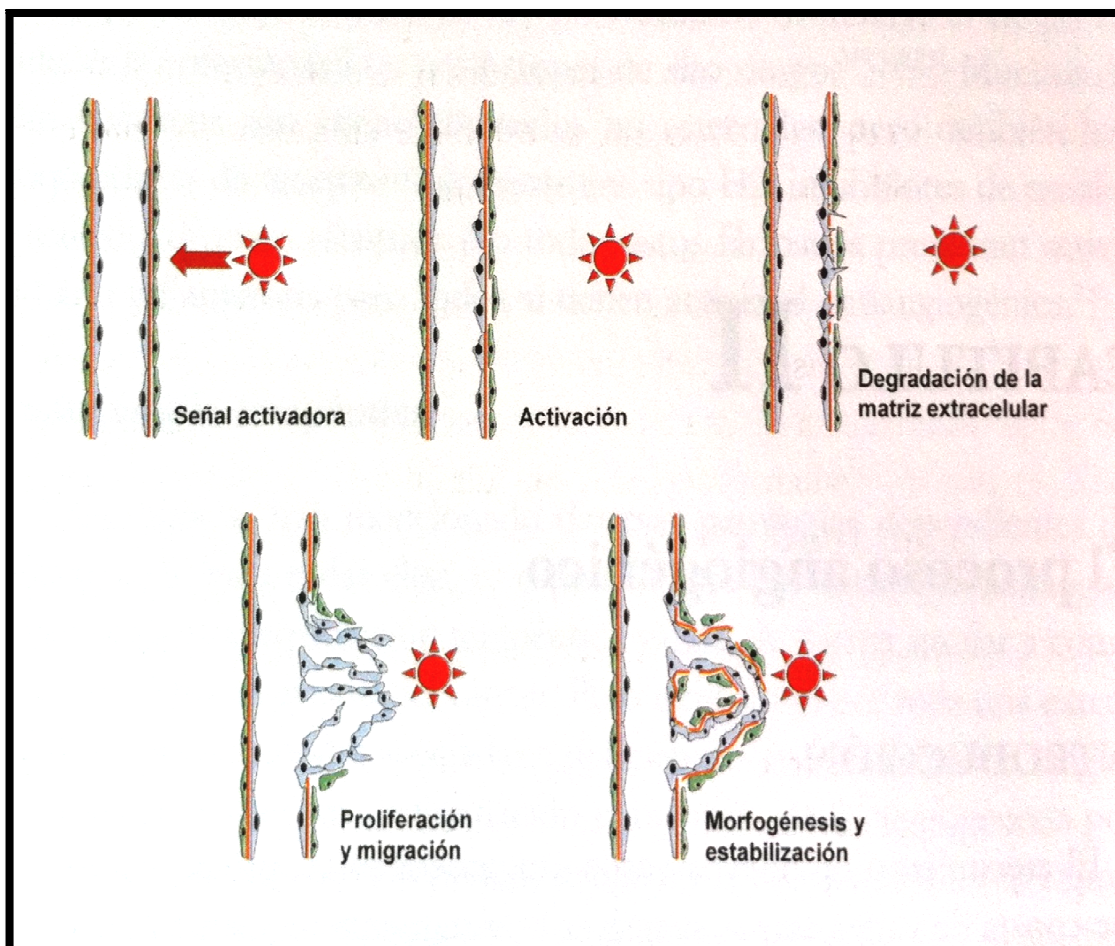
### 3 EL PROCESO ANGIOGÉNICO

El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es un proceso complejo que consta de varias etapas sucesivas estrictamente reguladas en el tiempo y el espacio. Cada paso implica una complicada interrelación entre reactividad celular, factores solubles y componentes de la matriz extracelular. Se pueden distinguir cuatro etapas en el proceso angiogénico (Figura 6):

- a) La primera etapa consiste en la **activación angiogénica** donde el endotelio es inducido a un cambio de fenotipo que implica su proliferación y migración. La quiescencia en las células endoteliales y su activación angiogénica, son el resultado del equilibrio que se establece en cada momento entre señales de estabilización y señales activadoras<sup>(21,69)</sup>. Cuando las segundas predominan sobre las primeras, el endotelio hasta ese momento estable, se activa el proceso angiogénico.
- b) La segunda etapa se caracteriza por la **degradación proteolítica de la matriz extracelular** que permite la progresión de las células endoteliales a través de la misma. Una vez que las células endoteliales se han activado, se produce la expresión y liberación de una serie de proteasas que le permitirán no sólo disolver su lámina basal y progresar a través de la matriz extracelular, sino que también participarán en la formación del nuevo lumen vascular. Es preciso tener en cuenta que la migración celular es el resultado de la degradación localizada de la matriz extracelular y de la adhesión a porciones no degradadas de la misma. Por otro lado, la pérdida de adhesión puede desencadenar el fenómeno de apoptosis inducida por falta de señales de supervivencia dependientes de la adhesión.
- c) En la tercera etapa se produce la **migración del endotelio** mediante un proceso complejo de adhesión selectiva a la matriz extracelular. En respuesta al estímulo angiogénico, las células endoteliales desarrollan cambios en su citoesqueleto y la expresión de moléculas de superficie les permiten migrar desde el lecho vascular hacia dicho estímulo. La

migración de las células endoteliales implica su interacción con moléculas de la matriz extracelular tales como la fibronectina, laminina y vitronectina. Esta interacción está mediada por una serie de proteínas denominadas integrinas. Por otro lado, una serie de proteínas de adhesión celular intervienen en las interacciones entre las propias células endoteliales.

- d) La última etapa viene caracterizada por la **morfogénesis**, en la que las células endoteliales cesan su proliferación y migración, sintetizan una nueva lámina basal y reclutan células perivasculares (pericitos y células musculares lisas) que contribuyen a su estabilización. Se produce así la rediferenciación de las células endoteliales migradoras para dar lugar a la formación de capilares.



**Figura 6.** Etapas del proceso angiogénico. Se presentan las células en azul, las perivasculares (pericitos y músculo liso) en verde y la lámina basal en naranja. (Rodríguez de Quesada A <sup>(130)</sup>).

### 3.1 SEÑALES DE INICIACIÓN DEL PROCESO ANGIOGÉNICO

La hipoxia, es decir, el descenso de la concentración tisular de oxígeno, es el principal fenómeno desencadenante de la activación angiogénica. En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de los mecanismos que relacionan la falta de oxígeno con la expresión de factores promotores de la angiogénesis. El papel central en estos mecanismos lo desempeña el HIF-1.

#### 3.1.1 HIF-1: Generalidades y estructura.

HIF-1 es el principal regulador de la respuesta celular a la hipoxia activando la transcripción de más de 200 genes que participan en la angiogénesis, proliferación/supervivencia celular, eritropoyesis y metabolismo del hierro y de la glucosa entre otros. Estos mecanismos van a ser cruciales para la adaptación de las células a la hipoxia.

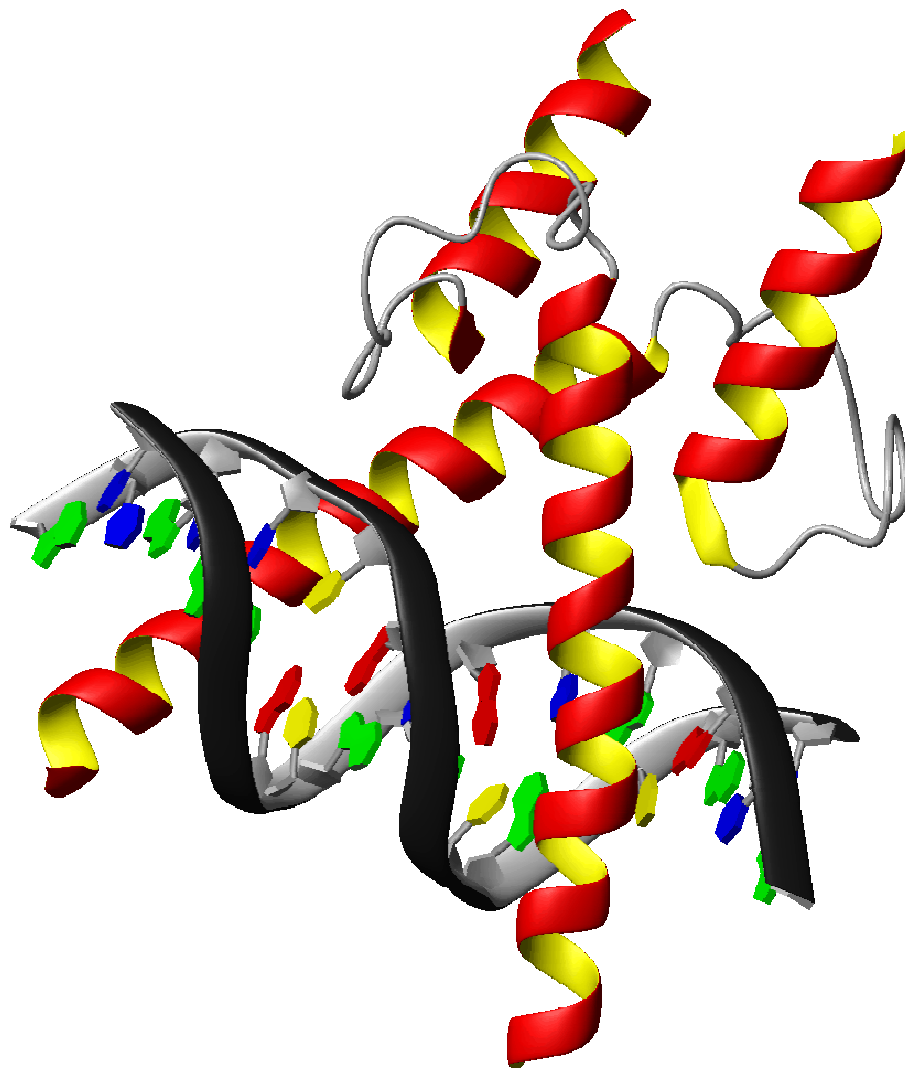
HIF-1 es un heterodímero formado por dos subunidades: HIF-1 $\alpha$  cuya estabilidad, localización subcelular y actividad transcripcional van a ser reguladas por los niveles de oxígeno <sup>(100)</sup> y HIF-1 $\beta$  que se expresa de forma constitutiva. La estructura de ambas subunidades (Figura 7) es similar estando compuesta por:

- Dominio N-Terminal: un dominio bHLH (basic hélix-loop-helix) para unirse al DNA.
- Región central: Per-ARNT-Sim, PAS, implicado en la heterodimerización de las subunidades.
- Dominio C- Terminal: Regula la transcripción de proteínas.
- La subunidad HIF-1 $\alpha$  contiene además dos dominios de transactivación, TAD, que van a ser los responsables de las funciones transactivadora y reguladora de la subunidad  $\alpha$  en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno <sup>(133)</sup>:
  - Su extremo N-terminal contiene el dominio de transactivación TAD-N que se localiza dentro de la región ODD (dominio de degradación

dependiente de oxígeno). El HIF-1 $\alpha$  contiene dos sitios de hidroxilación prolina, Pro 402 y Pro 564, dentro del dominio ODD <sup>(107)</sup>.

- Su extremo C-terminal contiene el dominio de transactivación TAD-C que puede interactuar con coactivadores como P300/CBP y es necesario para la actividad de HIF. Este dominio contiene un residuo de asparagina en posición 803 que también se puede hidroxilar <sup>(97)</sup>.

- La subunidad HIF-1  $\beta$  también conocida como ARNT (translocador nuclear del receptor aril hidrocarburo) sólo presenta un dominio de transactivación en su extremo C-terminal.



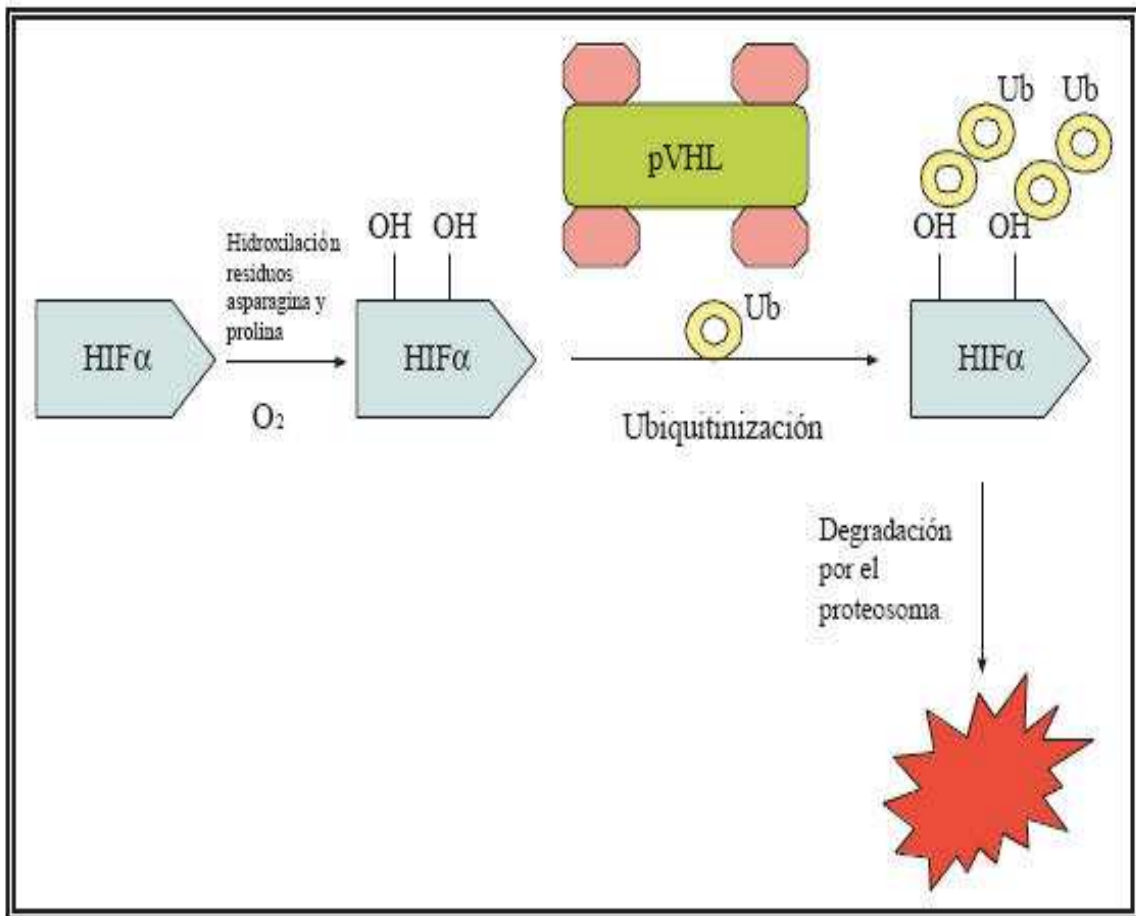
**Figura 7.** HIF-1 es un heterodímero de doble hélice <sup>(178)</sup>.

Se han descrito tres isoformas de la subunidad  $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  es la más caracterizada y se expresa en casi todos los tipos celulares. HIF-2 $\alpha$ , aunque también está ampliamente expresada, es predominante en algunos tipos celulares como células endoteliales vasculares, hepatocitos, fibroblastos de riñón, células gliales, células intersticiales del páncreas o neumocitos tipo II. HIF-3 $\alpha$  es el menos conocido y parece tener un papel inhibitorio<sup>(128)</sup>.

### **3.1.2 Regulación del HIF-1**

#### *3.1.2.1 Mecanismos de activación y acumulación de HIF-1 $\alpha$ dependientes de la concentración de oxígeno*

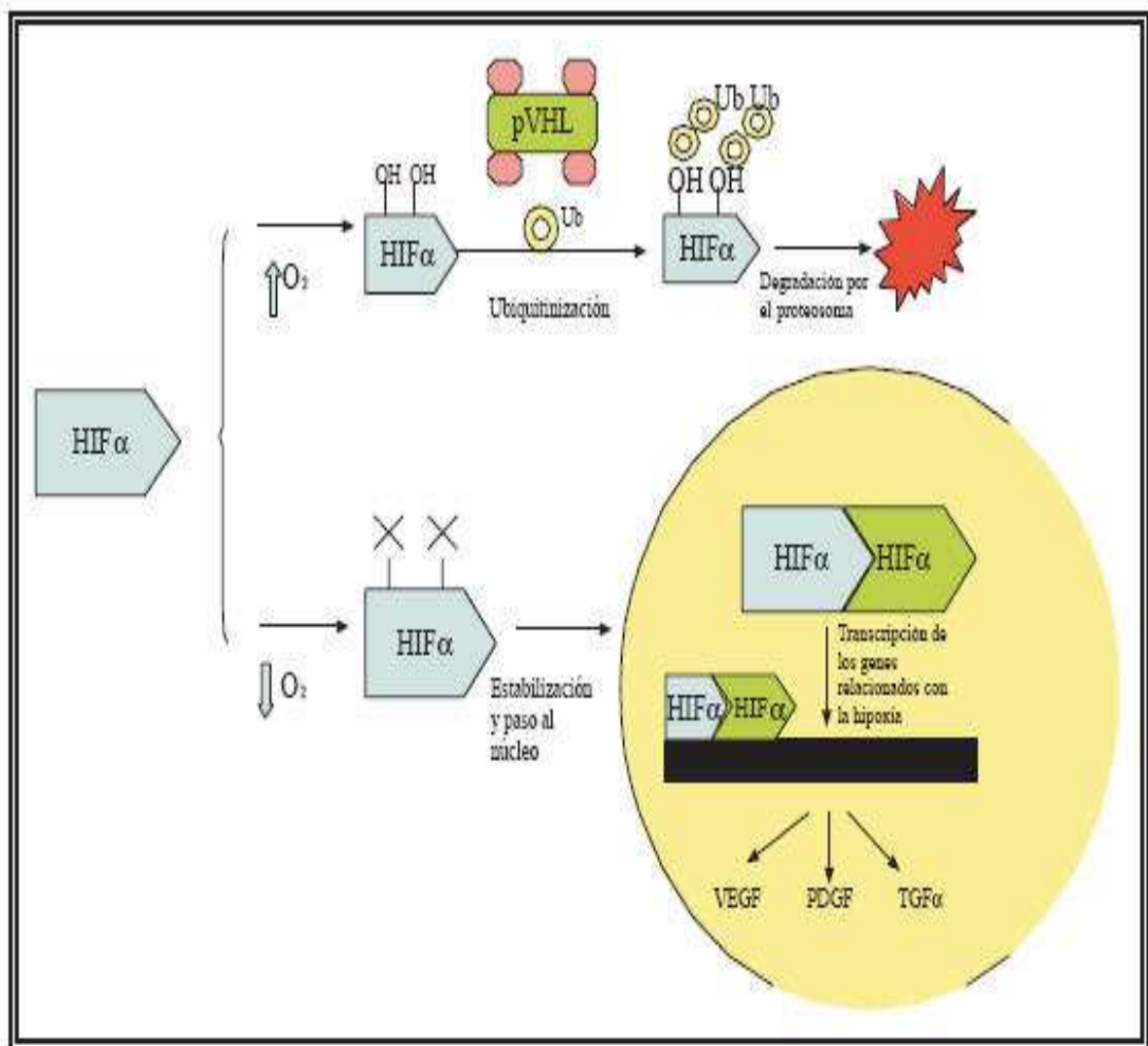
En condiciones de normoxia HIF-1 $\alpha$  se degrada por hidroxilación en los residuos de prolina 402 y/o 564 por prolil-hidroxilasas (PHDs) que usan oxígeno, hierro y 2-oxoglutarato como cofactores. Por lo que se propone a las PHDs como uno de los principales sensores de oxígeno celular. Esta hidroxilación es necesaria para que HIF-1 $\alpha$  sea reconocido por la proteína de Von Hippel-Lindau (pVHL) que forma parte del complejo E3 ubiquitin ligasa. Esta unión de pVHL a HIF-1 $\alpha$  va a dar lugar a la poliubiquitinización de HIF-1 $\alpha$  y su posterior degradación por el proteosoma (Figura 8).



**Figura 8.** Proceso de ubiquitinización en presencia de concentraciones adecuadas de oxígeno (normoxia) y funcionamiento correcto del complejo proteico supresor tumoral, pVHL (Grande Pulido E y cols <sup>(66)</sup>).

En condiciones de hipoxia las reacciones de hidroxilación están inhibidas puesto que las PHDs no pueden actuar sin la presencia de oxígeno y en consecuencia el HIF-1 $\alpha$  no es poliubiquitinado ni degradado por el proteosoma. HIF-1 $\alpha$  se acumula y se une a la subunidad HIF-1  $\beta$  para dar lugar al HIF-1 y formar un dímero funcional que se va a unir a secuencias específicas del ADN de genes diana que contienen elementos de respuesta a hipoxia en sus promotores.

Los niveles de HIF-1 aumentan exponencialmente cuando disminuye la concentración de oxígeno a nivel tisular. Una concentración normal de oxígeno en un tejido, e incluso un aumento significativo de dicha concentración no va a dar lugar a variaciones en la concentración de HIF-1, pero una ligera disminución de la concentración de oxígeno tisular va a dar lugar a un aumento exponencial de la concentración de HIF-1, y con ello cambios en la cascada por estimulación de los genes regulados por el HIF-1 y sus efectos posteriores (Figura 9).



**Figura 9.** Proceso de transcripción de genes relacionados con la hipoxia en condiciones de falta de oxígeno en comparación con las condiciones de normoxia. (Grande Pulido E y cols<sup>(66)</sup>).



### 3.1.2.2 *Mecanismos de activación y acumulación de HIF-1 $\alpha$ independientes de la concentración de oxígeno*

Hay otros mecanismos de regulación de HIF-1 $\alpha$  que son menos dependientes de la disponibilidad de oxígeno y dependen más de las condiciones celulares específicas como el calcio o la presencia de factores de crecimiento entre otros<sup>(154)</sup>.

Muchas citocinas y factores de crecimiento son conocidos como estabilizadores de HIF-1 $\alpha$  bajo condiciones de normoxia, entre ellos se encuentran la insulina, el IGF-2, la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El mecanismo de acumulación de HIF-1 $\alpha$ , en este caso, viene asociado a un aumento en la síntesis de proteínas en contraposición al mecanismo de acumulación durante hipoxia, que se asocia a un descenso en la degradación de HIF-1 $\alpha$ . La unión de estos factores de crecimiento a sus receptores puede dar lugar a la activación de vías de señalización que participan en proliferación/supervivencia celular<sup>(25)</sup>.

### 3.1.3 **Expresión génica mediada por HIF-1**

El HIF-1 $\alpha$  está involucrado en la respuesta a la hipoxia y también en la homeostasis del oxígeno, en la respuesta a la isquemia del miocardio, isquemia cerebral, isquemia de la retina, hipertensión pulmonar, la preeclampsia, el retraso en el crecimiento intrauterino y el cáncer. Tiene un papel central tanto en los mecanismos fisiológicos homeostáticos, como en los etiopatológicos. HIF-1 actúa sobre genes diana siendo el principal regulador de la expresión génica mediada por oxígeno (Tabla 4).

Molécula	Función
VEGF	Angiogénesis
Eritropoyetina	Eritropoyesis
GLUT-1	Glucólisis
TGF- $\alpha$	Invasión y metástasis
Transferrina	Apoptosis
Endotelina	Tonus vascular
CA 9	Regulador pH
iNOS	Resistencia a fármacos
IGFBP-1, 2, 3	Homeostasia

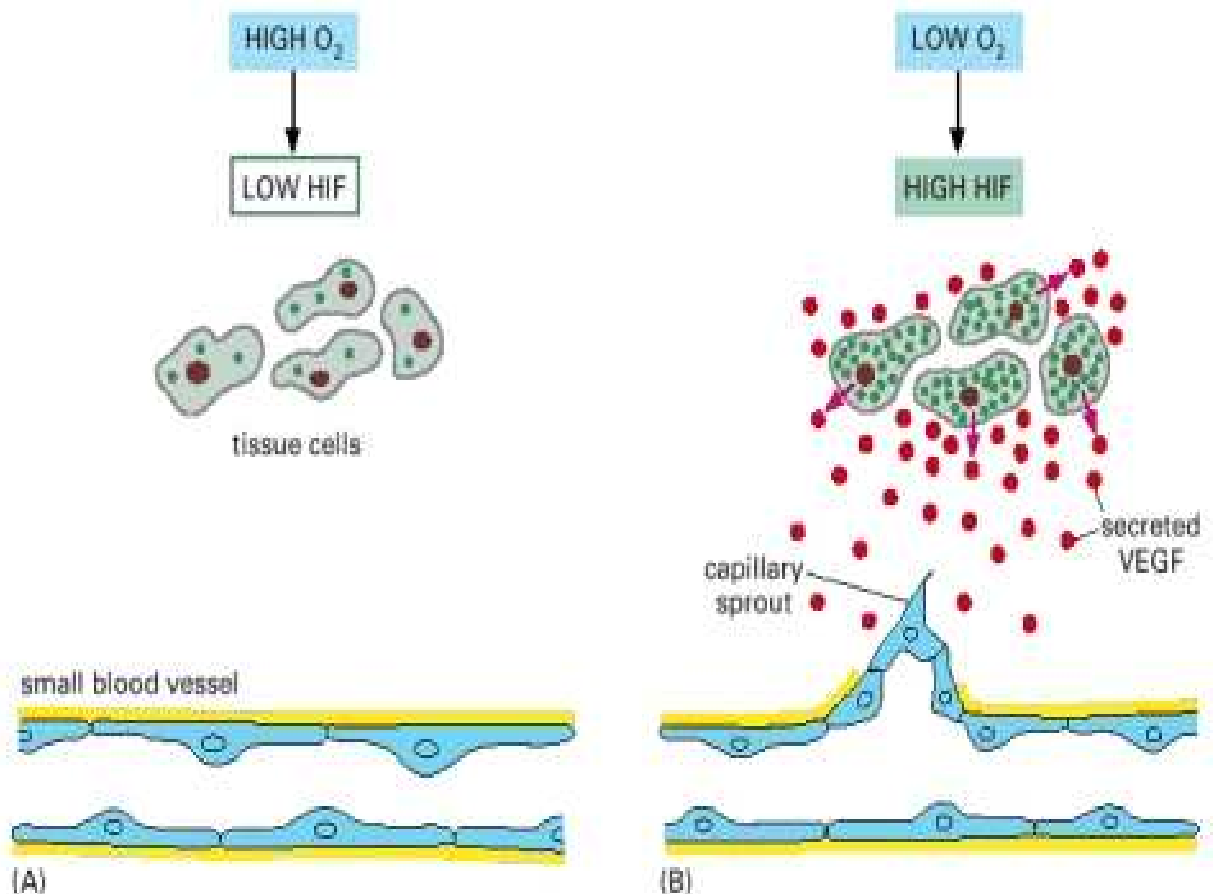
**Tabla 4.** Moléculas reguladas por el HIF-1 y su acción fisiopatológica. (Fraga A y cols.<sup>(56)</sup>).

- **Angiogénesis:**

Situaciones patológicas o fisiológicas de hipoxia inducen al HIF-1 la activación de genes proangiogénicos y formación de nuevos vasos sanguíneos (Figura 10).

El HIF-1, en condiciones de hipoxia, activa la expresión del VEGF, un regulador clave de la angiogénesis como ya se ha explicado. El VEGF promueve la degradación de la matriz extracelular, la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia endotelial. Es un potente mitógeno específico de células endoteliales. Además de la hipoxia, se citará mas adelante numerosas moléculas que inducen la expresión del VEGF en diferentes tipos celulares, produciendo así un efecto angiogénico.

El HIF-1 además activa coordinadamente muchos más genes implicados en la angiogénesis como son el factor derivado del estroma celular (SDF-1), factor de crecimiento placentario (PLGF), angiopoyetina 1 y 2 y PDGF <sup>(138)</sup>.



**Figura 10.** Regulación de la angiogénesis mediada por niveles de oxígeno y relación con el VEGF. (Alberts B y cols.<sup>(5)</sup>)

#### - Eritropoyesis y metabolismo del hierro:

HIF participa en la inducción del gen de la eritropoyetina (EPO). EPO es una hormona glicoproteica de gran importancia para la formación de glóbulos rojos, ya que estimula a las células de la médula ósea para la producción de eritrocitos. Además HIF-1 también participa en la regulación de genes que

intervienen en el metabolismo del hierro como la ceruloplasmina, necesaria para la oxidación del hierro, transferrina y receptor de transferrina <sup>(56)</sup>.

- **Metabolismo de la glucosa:**

En condiciones de hipoxia las células cambian a vías metabólicas independientes de oxígeno y usan la glicolisis como principal mecanismo para la obtención de ATP. Se han descrito muchos genes diana de HIF-1 que participan en el metabolismo de glucosa y la glicolisis. Así, HIF-1 regula la expresión de enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa como hexoquinasa-2, Glut-1 y 3 <sup>(26)</sup>. HIF-1 también media la activación de la piruvato deshidrogenasa cinasa que participa en la conversión de piruvato en Acetil coenzima A, regulando la cantidad de piruvato que entra en el ciclo de Krebs <sup>(56)</sup>.

### **3.1.4 Hipoxia tumoral**

Los tumores sólidos presentan frecuentemente áreas de hipoxia debido a regiones con alta tasa de proliferación celular y formación aberrante de vasos sanguíneos. Se estima que la mitad de los tumores sólidos presentan niveles de oxigenación menores de 10mm de Hg y aquellos con niveles menores de 7 mm de Hg desarrollan mutaciones genómicas, aberraciones cromosómicas, amplificación de genes y poliploidía. Éstos últimos presentan peor pronóstico ya que conducen a una mayor invasión, angiogénesis tumoral y metástasis. Además, las células tumorales con hipoxia permanecen en un estado quiescente que las hace más resistentes al tratamiento con quimioterápicos ya que éstos actúan sobre todo en las células en estado de proliferación <sup>(139)</sup>.

La adaptación de las células tumorales a la hipoxia es crítica para su supervivencia. La hipoxia induce la expresión de HIF-1 que a su vez activa la transcripción de genes responsables de sintetizar proteínas que median las principales respuestas de adaptación a la hipoxia <sup>(139)</sup>. Entre ellos se encuentran los genes que sintetizan el VEGF, la eritropoyetina, nucleótidos, oxido nítrico sintetasa, lactato deshidrogenasa o relacionados con el

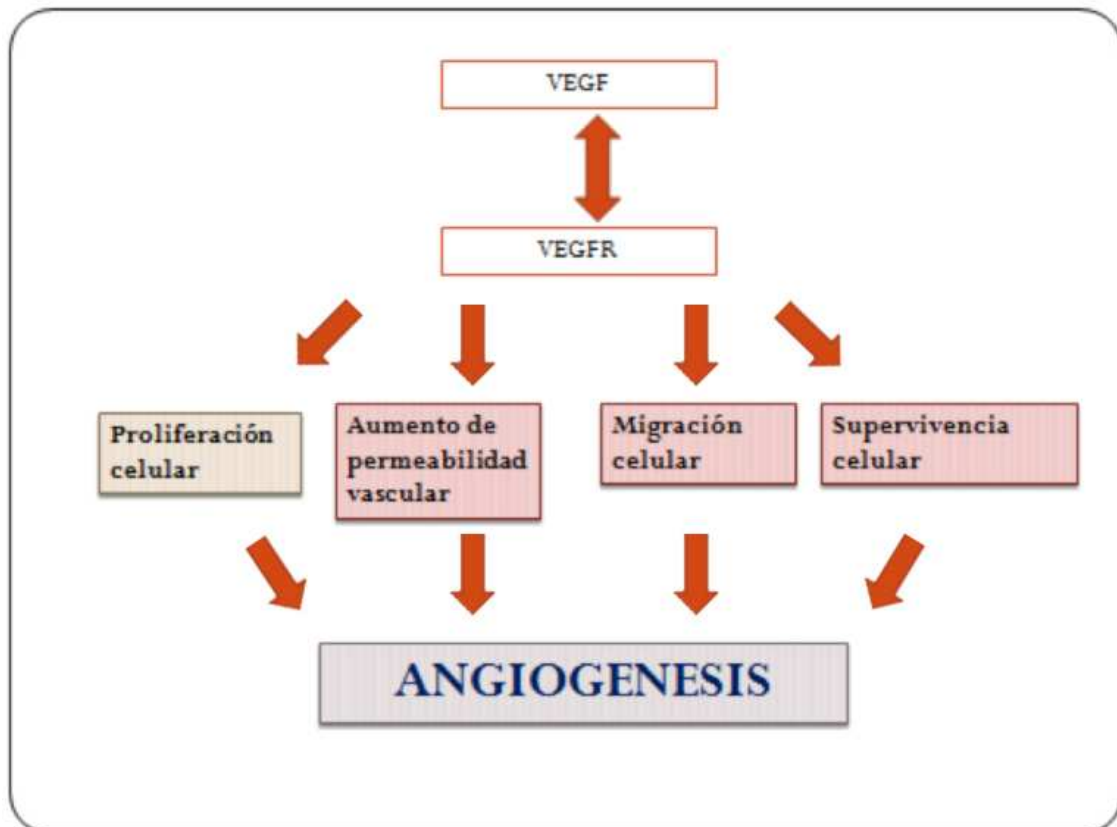
metabolismo de la glucosa como ya se ha explicado. El hecho de que HIF-1 regule la expresión de proteínas de múltiples genes implicados en el metabolismo y la vascularización del tumor sugiere que un mayor efecto contra el cáncer se puede lograr mediante la inhibición de HIF-1<sup>(40)</sup>.

### **3.2 SEÑALES DE ACTIVACIÓN DEL PROCESO ANGIOGÉNICO Y SUS RECEPTORES**

El número de moléculas que inducen la activación angiogénica del endotelio *in vivo* o *in vitro* es muy elevado, por lo que citaremos aquí sólo las que probablemente desempeñan un papel más importante en la angiogénesis fisiológica y sus implicaciones en el proceso angiogénico.

#### **3.2.1 VEGFs y sus receptores**

VEGF, también conocido como VEGF-A, es el más importante de una familia de factores de crecimiento específicos de endotelio<sup>(46)</sup>. A esta familia pertenecen también las proteínas VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PLGF. VEGF es un factor clave implicado en todos los pasos de la angiogénesis, como ya se ha mencionado, promoviendo la degradación de la matriz extracelular, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia endotelial. Incrementa la permeabilidad vascular en un proceso que está potenciado por el óxido nítrico (NO), y que ocurre de forma concomitante con la aparición de fenestraciones en las células endoteliales. Este aumento de la permeabilidad es un fenómeno importante para el proceso angiogénico, probablemente debido a la formación de una matriz extravascular de fibrina que promueve la migración endotelial (Figura 11).



**Figura 11.** Funciones del VEGF cuando se une a su receptor VEGF (esquema del autor).

La transcripción de VEGF es rápidamente activada por un descenso en la concentración tisular de oxígeno. Esta respuesta a hipoxia está mediada por HIF-1, como ya se ha visto. Además de la hipoxia, los factores de crecimiento PDGF, EGF, diversos FGFs, IGF-1 y TGF beta así como las citocinas TNF- $\alpha$  y diversas interleucinas inducen la expresión del VEGF. Dichas moléculas van a reclutar células endoteliales en áreas hipóxicas y sin vascularizar, estimulando su proliferación provocando un aumento de la densidad vascular y por tanto una disminución de la distancia para la difusión de oxígeno. Por otro lado, tanto la diferenciación celular como la transformación oncogénica aumentan la expresión del VEGF, lo que está relacionado con una vía angiogénica anómala, independiente de hipoxia, que puede ser desencadenada por el crecimiento tumoral <sup>(83)</sup>.

Los VEGFR son los receptores del VEGF. El endotelio expresa receptores de VEGF del tipo VEGFR1/Flt-1 (también presente en monocitos) y VEGFR2/Flk-1. El primero es activado por VEGF-A,B y PLGF mientras que el segundo se une a VEGF-A,C,D y E. La mayor parte de las múltiples respuestas endoteliales a VEGF se produce a través del receptor VEGFR2. Éste receptor es un receptor tirosín quinasa esencial en la transmisión de la señal VEGF. De hecho su deficiencia en ratones transgénicos es letal a causa de defectos en la diferenciación de células endoteliales, que no llegan a formar vasos <sup>(54)</sup>.

Del mismo modo que sucede con VEGF, el número de sus receptores se incrementa por hipoxia, como se ha comprobado en modelos *in vitro* y en situaciones de isquemia. Sin embargo, sólo el gen VEGFR-1 es directamente activado por elementos inducibles por hipoxia presentes en el promotor, mientras que el aumento de la expresión del VEGFR-2 podría ser resultado de señales paracrinas producidos por los tejidos isquémicos. Además VEGFR-1 no interviene de forma decisiva en la transmisión de señales VEGF, sino que se comporta como un regulador negativo de VEGFR-2 al competir con él por el VEGF disponible. Por otro lado, TGF- $\beta$  disminuye la expresión del VEGFR-2 en células endoteliales mientras que se han publicado efectos contradictorios de TNF- $\alpha$  en cuanto a la regulación positiva o negativa de los receptores del VEGF <sup>(46)</sup>.

### **3.2.2 Familia de los FGFs**

El primer grupo de factores de crecimiento con potencial angiogénico, identificado y caracterizado, corresponde a la familia de los FGFs o también llamados factores de crecimiento con afinidad a la heparina. Inicialmente descritos como mitógenos para fibroblastos, estos factores son hoy conocidos por ser mitógenos para una gran variedad de células que incluyen queratinocitos, osteoblastos inmaduros, oligodendrocitos y células endoteliales.

Gospodarowicz <sup>(65)</sup> aisló los dos primeros factores de crecimiento, aFGF y bFGF conocidos como FGF-1 y FGF-2 respectivamente, en el año 1978. El conocimiento de la biología, estructura y mecanismo de acción de estas moléculas ha sido enorme en los últimos 15 años.

FGF es expresado en mayor o menor grado por todos los tipos celulares, y carece de péptido señal, por lo que no se conoce con precisión su mecanismo de secreción. Se ha propuesto que los FGFs recién sintetizados en los animales adultos, al carecer de una secuencia de secreción, quedarían secuestrados en el interior de la célula y serían liberados al medio extracelular solamente en caso de daño celular. De esta manera, la aparición de los FGFs en el medio extracelular induciría la división de las células allí presentes, provocando así la regeneración del tejido lesionado <sup>(37)</sup>.

FGF-2 presenta efectos mitogénicos, modula la diferenciación, retrasa la senescencia celular, induce la angiogénesis, inhibe la apoptosis y es quimiotáctico desempeñando de esta forma múltiples funciones en reparación, regeneración y homeostasis tisular. En células endoteliales en cultivo induce la proliferación, la atracción quimiotáctica y un incremento de la expresión de la uroquinasa u-PA <sup>(29)</sup>. En el caso de los procesos tumorales, puede ejercer sus efectos en las células endoteliales, siendo responsables de la densa trama vascular para el desarrollo del tumor de un modo paracrino, gracias a la liberación de dichos factores secretados por las células tumorales o por las células del estroma o bien por la movilización desde la matriz extracelular. Asimismo, el FGF-2 también puede ejercer su acción de forma autocrina desde las células endoteliales, según han demostrado numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* <sup>(140)</sup>.

Los efectos angiogénicos de FGF-2 pueden potenciar los del VEGF. La proteólisis desencadenada con el proceso angiogénico iniciado por VEGF provoca la liberación de FGF-2 activo, amplificando así los efectos del primero. Los FGFs, y en particular FGF-1 y FGF-2, se unen con alta afinidad a receptores tirosín-quinasa, denominados FGFR1-4, como ocurría con los VEGFR <sup>(31)</sup>.

### **3.2.3 Citocinas: TNF- $\alpha$ , interleucinas y quimiocinas**

Las citocinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son las responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana,



funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas regulando el mecanismo de la inflamación.

El TNF- $\alpha$  es una citocina que promueve la angiogénesis de forma indirecta al inducir la respuesta inflamatoria y puede ser tan potente como FGF-2 en la inducción angiogénica. Se ha comprobado también que induce un aumento de la expresión de VEGF, IL-8 y FGF-2 por las propias células endoteliales. Sin embargo, una dosis excesiva de TNF- $\alpha$  también resulta citotóxica para dichas células, y el efecto antitumoral que le da nombre ha sido relacionado en parte con su acción apoptogénica sobre el endotelio de los tumores <sup>(30)</sup>.

Las interleucinas son también citocinas sintetizadas principalmente por los leucocitos. Diversas interleucinas inflamatorias tales como IL-1, IL-15 y posiblemente IL-6 son indirectamente angiogénicas al inducir la expresión de VEGF en distintos tipos celulares <sup>(28)</sup>.

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas que participan en la respuesta inflamatoria e inmunitaria y pueden promover la angiogénesis guiando a células hacia tejidos que proporcionan señales críticas específicas para la maduración celular. La quimiocina CXC IL-8 es angiogénica *in vitro* e *in vivo*, y probablemente es mediadora de la angiogénesis inducida por macrófagos. Además puede tener un papel más directo en la angiogénesis, ya que induce la proliferación y la migración en células endoteliales *in vitro*, probablemente a través de los receptores CXCR1 y 2, expresados por el endotelio. La expresión del otro receptor de la misma familia, CXCR4, es incrementada en células endoteliales por FGF-2 y puede mediar en su migración, ya que su ligando, la quimiocina SDF-1 es un potente inductor de la motilidad endotelial. De hecho, los ratones deficientes en CXCR4 o en SDF-1 muestran defectos en la vascularización del tubo digestivo <sup>(45)</sup>.

Existen numerosas señales activadoras que pueden actuar en alguna de las cuatro etapas descritas del proceso angiogénico como son el PDGF, factor de crecimiento de hepatocitos, PLGF o el factor de crecimiento epitelial.

#### **4 MODULACION FARMACOLÓGICA DE LA ANGIOGÉNESIS. TERAPIA ANTIANGIOGÉNICA**

La terapia antiangiogénica, que se dirige a las células endoteliales activadas, presenta una serie de ventajas frente a la terapia tradicional dirigida hacia las células tumorales. En primer lugar, las células endoteliales son una diana genéticamente estable, diploide y homogénea, en la que las mutaciones espontáneas ocurren de forma muy ocasional. Esto contrasta con la alta inestabilidad genética, heterogeneidad y tasa de mutación de las células tumorales, que favorece la selección de subpoblaciones resistentes al fármaco antitumoral administrado, y por tanto la aparición del fenómeno de resistencia a la quimioterapia. Además, el recambio en las células endoteliales tumorales puede ser 50 veces superior al de las del endotelio quiescente en los tejidos normales, y los vasos sanguíneos activados sobreexpresan marcadores específicos, tales como la integrina AV B3, E-selectina, receptores Tie y receptores de VEGF, lo que en principio podría emplearse para dirigir una determinada terapia específicamente al endotelio activado. Por otra parte, el que la terapia antiangiogénica se dirija a las células endoteliales activadas, hace que su diana sea fácilmente accesible mediante la administración sistémica, evitándose el frecuente problema de la escasa penetración del fármaco antitumoral en los tumores sólidos. Finalmente, ya que una única red capilar puede sostener el crecimiento de diferentes poblaciones de células tumorales, la inhibición del crecimiento de los vasos que irrigan el tumor puede afectar el crecimiento de muchas células tumorales <sup>(52)</sup>.

Se pueden utilizar diversas estrategias para modular la angiogénesis, basadas en la modulación de cada uno de los pasos del proceso angiogénico. Así pues, se pueden encontrar moduladores de angiogénesis que ejercen su efecto sobre la señal angiogénica, o sobre una o varias funciones de las células endoteliales activadas (proliferación, adhesión a la matriz extracelular, producción de proteasas, migración, invasión o diferenciación).

En el presente estudio vamos a analizar *in vitro* el efecto de cuatro drogas con propiedades antiangiogénicas y antiproliferativas frente a células tumorales.

#### 4.1 ACRIFLAVINA

La Acriflavina (ACF) o 3,6-Diamino-10-metilacridin-10-ium cloridio ( $C_{14}H_{14}ClN_3$ ) fue descubierta en 1909 por L. Benda y Paul Ehrlich en estudios con tripanosomas según la tesis de Williams realizada en 2005 <sup>(153)</sup>.

En 1917 Browning <sup>(19)</sup> recomendó este compuesto en las heridas cutáneas por su actividad bactericida y fue usada ampliamente en la primera guerra mundial. Se caracterizaba por su eficacia frente a infecciones por protozoos y su actividad antibacteriana y antiviral. Fue administrado por vía oral como antiséptico urinario y tratamiento de la gonorrea <sup>(115)</sup>. Presentaba baja toxicidad y lenta reabsorción desde el sitio de inoculación. Thurber, en 1930<sup>(145)</sup>, publicó una serie de casos clínicos donde la ACF intravenosa podía prevenir la artritis y acortar los episodios de fiebre. Young en 1940 <sup>(156)</sup>, administraba ACF en el postoperatorio a los pacientes tratados de tumor maligno de los senos paranasales. Esta droga disminuía el riesgo de sepsis y parece que presentaba efectos beneficiosos en la enfermedad de estos pacientes. Hirota, en 1957 <sup>(74)</sup>, estudió sus efectos frente a la *Escherichia Coli*, también, por esta época, se investigaron sus acciones frente a las levaduras y como tratamiento inmunosupresor <sup>(134)</sup>. Actualmente se sigue estudiando sus efectos antibacterianos. Kawai, en 2009 <sup>(87)</sup>, analizó la ACF sobre la pared bacteriana del *staphylococcus aureus* mediante microscopía electrónica.

El primer artículo publicado sobre el efecto de la ACF en células tumorales es de Goldie en 1959 <sup>(63)</sup>. Estudió la inhibición en la actividad de células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* (ratas) cuando el compuesto se inyectaba a dosis 0,1 mg/Kg de forma intraperitoneal (i.p) o subcutánea tras la implantación de tumor de mama o vejiga con 10 millones de células.

Estudios *in vivo* demuestran que el tratamiento con ACF inhibe la movilización de células angiogénicas y la vascularización del tumor ya que inhibe la expresión de citocinas intratumorales angiogénicas, la movilización de las

células angiogénicas en sangre periférica y la vascularización del tumor. Esto es debido a que interfiere en la expresión de factores proangiogénicos como el VEGF <sup>(84)</sup>.

#### **4.2 POLIFENOLES Y EFECTO ANTIPROLIFERATIVO: ÁCIDO CAFEICO Y ÁCIDO 2,5 DIHYDROXYCINÁMICO METIL ESTER (DHC-ME)**

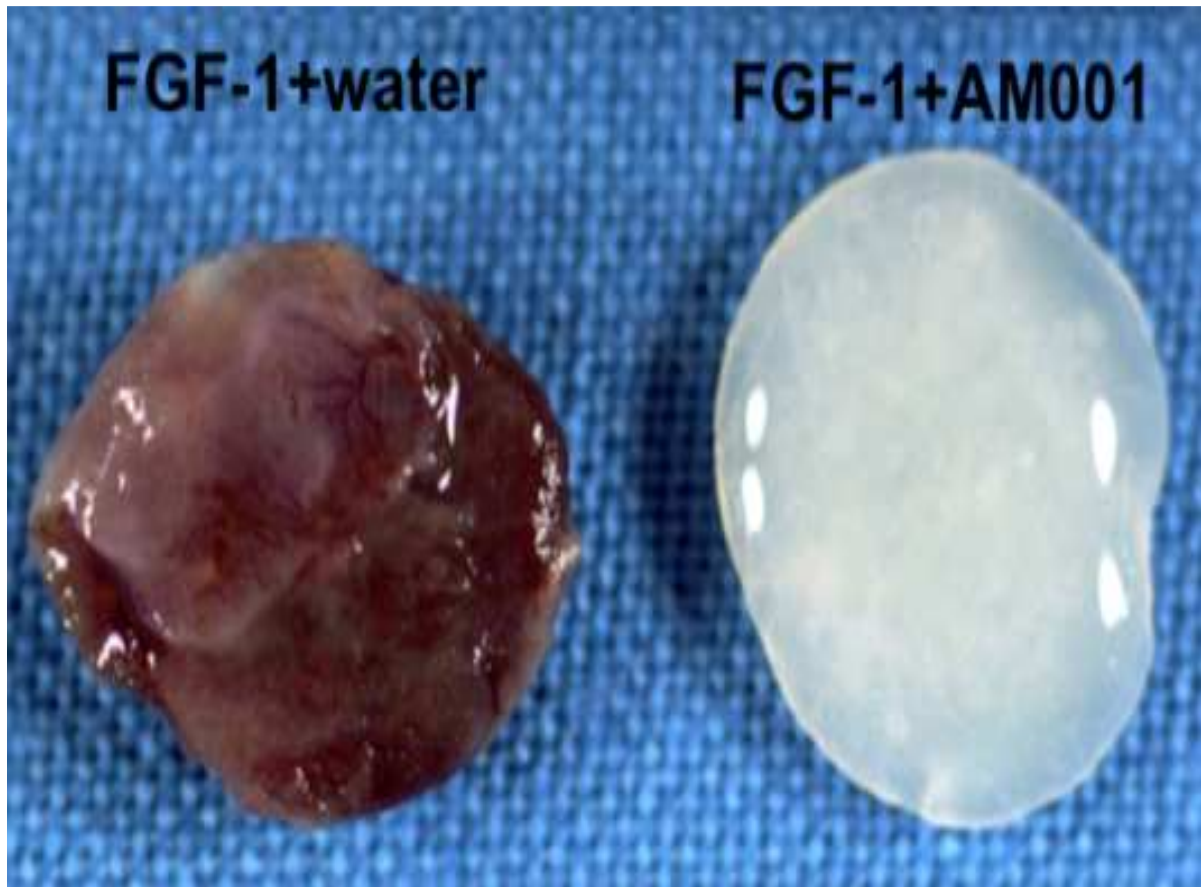
Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas presentes en determinadas plantas caracterizados por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Las principales fuentes de polifenoles son té, miel, cerveza, uvas/vino, aceite de oliva, chocolate/cacao, nueces, maníes, granadas, yerba mate, y otras frutas y vegetales.

Se sabe que el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de tumores. Los radicales libres pueden ocasionar defectos en el genoma celular e inducir a un crecimiento anormal. Este daño oxidativo al material genético que se va acumulando a lo largo de la vida contribuye significativamente al desarrollo de tumores. Estudios experimentales y clínicos sugieren que los polifenoles pueden tener capacidad antioxidante y reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer. Además, tienen propiedades antiangiogénicas inhibiendo la vascularización de tumores <sup>(81)</sup>.

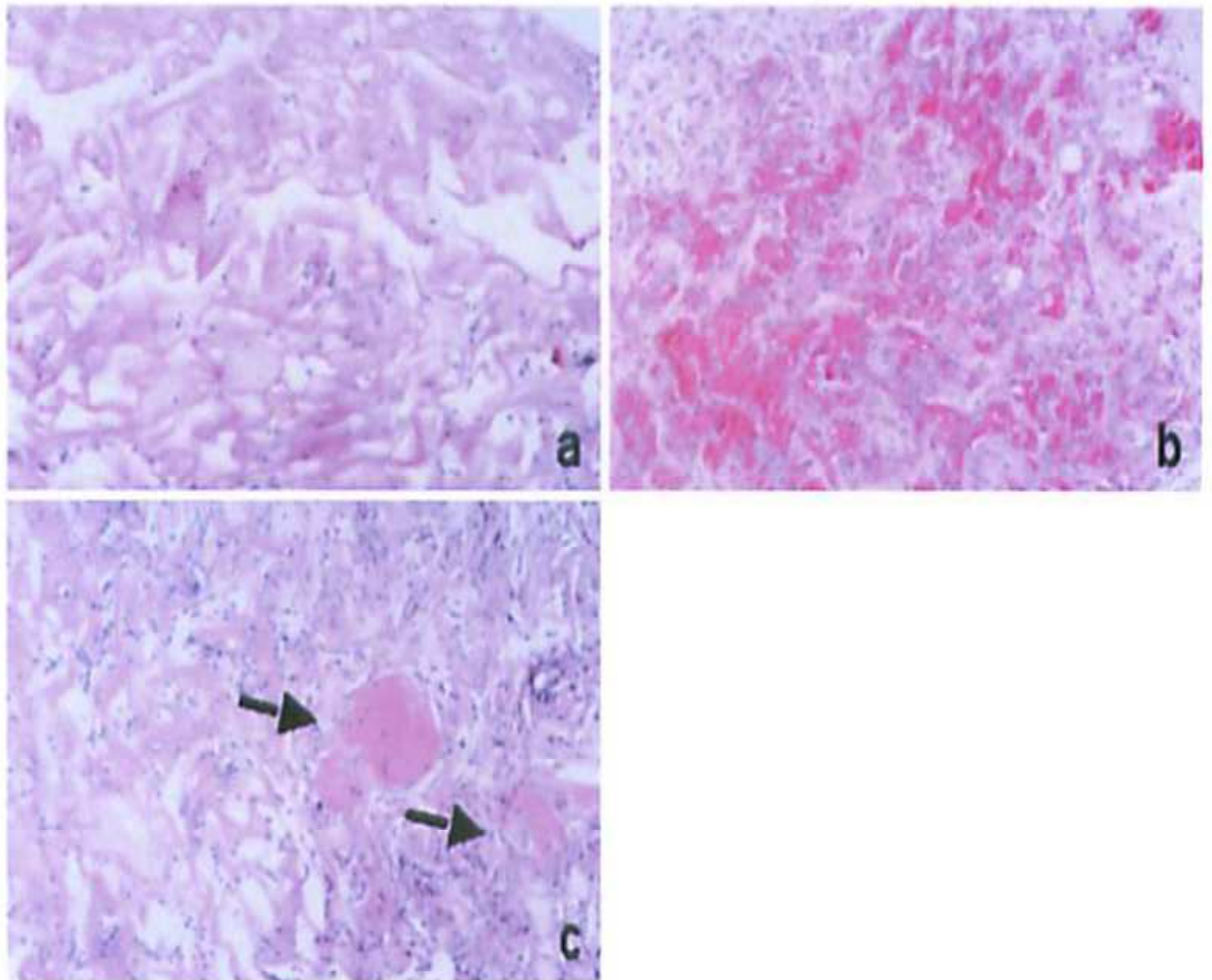
El ácido 3,4 dihydroxycinámico o ácido cafeico y el DHC-ME son polifenoles que se encuentran en la miel o el café. Tienen efectos antioxidantes, antimutagénicos, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, inmunomoduladores y tienen capacidad para inhibir el FGF <sup>(117)</sup>. El ácido cafeico puede suprimir el cáncer de colon en ratas y reducir las metástasis hepáticas <sup>(27)</sup>. También actúa como agente quimiopreventivo del cáncer de piel <sup>(116)</sup>.

### 4.3 DOBESILATO Y EFECTO ANTIANGIOGÉNICO

El Dobesilato cálcico o 2,5-dihidroxi-benceno sulfonato, clasificado como sustancia esclerosante en el Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química, es capaz de inhibir la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* mediante la supresión de la capacidad proliferativa del FGF-1. La demostración *in vivo* <sup>(31)</sup> se basa en la implantación subcutánea en ratas de esponjas de colágeno embebidas en tampón fosfato salino (PBS) con heparina (29 µg/ml). En unos casos esta solución tampón contenía FGF-1 a una concentración de 10 pg/mL, en otros esta misma concentración de FGF-1 más Dobesilato (50 pM) y en otras solamente la solución tampón. La figura 12 muestra el aspecto de estas esponjas, a los ocho días tras ser extraídas y teñidas con hematoxilina-eosina. La figura 13a muestra el aspecto de estas esponjas cuando estaban embebidas exclusivamente con el tampón fosfato heparina. Coincidiendo con numerosas observaciones previas, cuando la solución que embebía la esponja contenía además FGF-1, se observan numerosos vasos sanguíneos de forma irregular que aparecen llenos de eritrocitos (figura 13b). Cuando la solución contiene además Dobesilato (50pM) se observó que la formación de vasos sanguíneos es inapreciable, distinguiéndose difícilmente de las esponjas de la figura 13a.



**Figura 12.** Inhibición de la angiogénesis inducida por el Dobesilato o compuesto AM001 en esponjas de gelatina implantadas subcutáneamente en ratas. (Cuevas P y cols.<sup>(31)</sup>).



**Figura 13.** Efecto del Dobesilato sobre la formación de vasos sanguíneos en esponjas de colágeno implantadas subcutáneamente en el dorso de ratas. **a:** Esponjas embebidas con una solución de PBS+Heparina. **b:** PBS+Heparina+FGF-1. **c:** PBS+Heparina+FGF-1+Dobesilato. Microscopio óptico  $\times 10$ . (Cuevas Pycols.<sup>(31)</sup>).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### **HIPÓTESIS:**

a) Primaria:

- La ACF hipotéticamente disminuye la proliferación celular *in vitro* e inhibe la progresión tumoral *in vivo* de las células tumorales de CE nasal de rata.
- La ACF es capaz de disminuir la angiogénesis *in vivo* y promover la apoptosis en un modelo animal de rata infiltrado con células tumorales de CE a nivel subcutáneo abdominal.

b) Secundaria:

- La ACF mejoraría el pronóstico y la supervivencia del CE.

### **OBJETIVOS:**

- 1- Conseguir una línea celular viable de CE.
- 2- Comprobar los efectos antiproliferativos de la ACF sobre esta línea celular *in vitro*.
- 3- Lograr implantes de CE nasal en animales de laboratorio.
- 4- Evaluar la eficacia de la ACF para inhibir la progresión tumoral en el modelo animal.
- 5- Comprobar los efectos antiangiogénicos y proapoptóticos de la ACF *in vivo* mediante estudio histológico del tumor.
- 6- Demostrar que la ACF no presenta efectos generales negativos para los animales en el modelo animal de experimentación.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

## 1 MATERIAL

El presente trabajo se ha realizado en el Servicio de Histología, Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal, integrado por médicos, biólogos y técnicos de laboratorio y dotado de laboratorio de cultivos celulares e instalaciones para experimentación con animales.

### 1.1 LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES.

El laboratorio de cultivos celulares está dotado de la instrumentación adecuada para el cultivo de células:

- Campana de flujo laminar horizontal y vertical Telstar modelo AV-30/70.
- Incubadora Forma Scientific, Inc modelo 3111.
- Centrifugadora Kubota modelo 2100.
- Microscopio óptico de lámpara halógena de 4, 10 y 20 aumentos marca Nikon modelo TMS.
- Bidones de nitrógeno líquido de la marca MVE. Inc de USA.
- Arcón de congelación a -85°C Ultra Low Freezer de New Brunswick Scientific modelo U41085. Dispone de contenedores de isopropanol con capacidad para 18 criotubos marca Nalgene-Crio catálogo nº 5100-001.
- Recipiente con agua a 37°C.
- Placas de cultivo de 24 pocillos de la marca Costar modelo 3524.
- Soporte para cultivo de células o *flask* de 75 cm<sup>2</sup> de base marca BD Falcon™ Becton, Dickinson and Company USA.
- Tubo o *falcon* de 50ml de polypropylene.
- Criotubos de 1,8ml marca Nalge Nunc International de la empresa NUNC™.
- Microtomo tipo Leitz modelo 1213.
- Nevera.
- Pipeteadoras automáticas.
- Contador de células mediante la cámara de New Bauer.

- Kit para realizar técnica TUNEL (*GenScript EEUU Inc*).

## 1.2 INSTALACIONES PARA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES.

Las instalaciones para experimentación con animales constan de:

- Animalario de 10 m<sup>2</sup> a temperatura de 22°C donde los animales de experimentación permanecen en jaulas.
- Ratas Fischer 344 del laboratorio Harlam<sup>TM</sup> de Barcelona de 100-125gr de peso alimentadas con pienso estándar. Se utilizaron un total de 13 ratas macho y 6 hembras.
- Quirófano para experimentación con animales e instrumental quirúrgico apropiado incluyendo material de microcirugía.
- Microscopio quirúrgico Zeiss modelo focus de Alemania.

## 1.3 CÉLULAS TUMORALES Y CULTIVO:

- Células FAT-7: Son células tumorales de CE nasal de morfología epitelial inducidas en la rata género macho adulto de especie Fischer mediante la inhalación de 15 partes por millón de gas formaldehído durante 6 horas al día y 5 días a la semana en un volumen de 8 metros cúbicos<sup>(88,112)</sup>. La línea celular obtenida es aneuploide con sobreexpresión de citocinas o factores de crecimiento celular TGF- $\alpha$  y receptores del EGF y P53. La mitad de las células contienen una mutación, transversión CGT por CAT en el codon 271, en la región V del gen que codifica la proteína P53 <sup>(14)</sup>. Proceden del laboratorio ATCC (*American Type Culture Collection*) catálogo CRL-2109. Las células se enviaron congeladas a -70°C al Departamento de Histología del Hospital Ramón y Cajal y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización. El total de células adquiridas fue de 3,100.000 en 1 mililitro de suero Ham's F-12K (2mM L-Glutamina y 1500mg/l de

bicarbonato sódico). Las células fueron congeladas por el laboratorio ATCC en octubre del 2006.

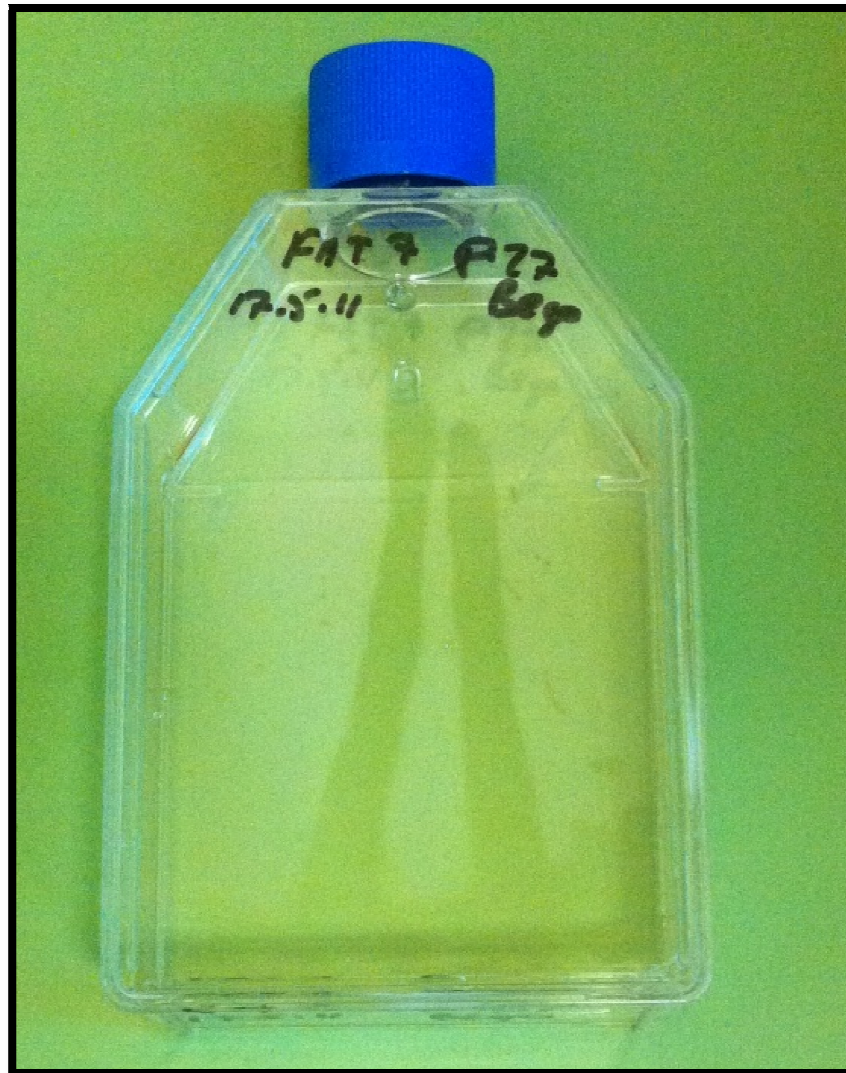
- Medio de cultivo: Es un medio de consistencia líquida necesario para el cultivo celular. Está compuesto de Ham's F12K adquirido también en la empresa ATCC al que se le añadió 0,01 mg/ml de insulina rápida, 250 ng/ml de hidrocortisona, 0,0025 mg/ml de transferrina al 90 por ciento y suero fetal bovino al 10 por ciento y así obtener Ham's F12K suplementado<sup>(14)</sup>. Este medio tiene una viabilidad del 43,3 por ciento al 56,1 por ciento según las especificaciones del fabricante.
- Las placas de cultivo se adquirieron en Corning-Costar (NY, USA). El suero fetal bovino y la tripsina-EDTA se compraron en Biological Industries (Beit-Hamek, Israel) y GIBCO BRM (Paisley, UK) respectivamente.

## 2 MÉTODO

### 2.1 CULTIVO PRIMARIO

Tras recibir el criotubo del vial de células tumorales de rata de carcinoma epidermoide nasal, línea celular FAT-7, se mantuvieron en un contenedor de isopropanol en el arcón de congelación hasta que se dispuso del medio de cultivo.

Se realizó su descongelación mediante agitación rápida durante 40 – 60 segundos en un baño de agua a 37 °C. Una vez descongeladas, se sembraron en un recipiente *flask* de 75 cm<sup>2</sup> de base (Figura 1), al que se le añadió 6 ml del medio Ham's F-12K suplementado y se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 por ciento durante tiempo ilimitado.



**Figura 1.** Flask de 75 cm<sup>2</sup> indicando el tipo de células, la fecha cuando se cambió el medio y el pase celular (p 27) o número de veces que se ha cambiado el medio desde que se inició el cultivo.

El trabajo comenzó en septiembre de 2009 y finalizó en mayo de 2011. Durante este periodo, las células permanecieron congeladas en el arcón de congelación o bien en la incubadora realizándose el cambio de medio de cultivo dos veces por semana, según las instrucciones del fabricante, con el objetivo

de mantener las células vivas y fomentar su división celular. Las células quedaban adheridas a la base del *flask* en forma de empalizada.

## **2.2 SUBCULTIVOS.**

Cuando las células cultivadas, adheridas a la base del *flask*, llegaban a confluir ocupando toda la superficie de la base del *flask* se procedió al despegado de células. Las células despegadas se empleaban para la realización de experimentos o bien para la siembra de un nuevo cultivo (subcultivo) en medio Ham's F12-K suplementado en *flask* de 75cm<sup>2</sup> que correspondía al siguiente pase. Este proceso se repitió hasta el 30º subcultivo, es decir, se realizaron 30 pases. A partir del pase séptimo subcultivo y en sucesivos pases una mayoría de células se emplearon para la realización de experimentos.

### **2.2.1 Despegado de células.**

Una vez que las células adheridas a la base del *flask* llegaban a confluir se procedió a su despegamiento. Para ello, se retiró el medio de cultivo del *flask* y se añadió una solución de EDTA y tripsina al 0,5 por ciento incubando 5 minutos a 37°C. Se retiró todo el sobrenadante donde estaban las células despegadas en suspensión y se llevó a un tubo estéril para centrifugar 5 minutos a 300 x g, descartando el sobrenadante y seleccionando las células o pellet celular (Figura 3). Posteriormente se añadió medio Ham's F12k suplementado y se resuspendieron las células para lavarlas. Una vez lavadas las células se realizaron subcultivos celulares en proporción 1:2.

### **2.2.2 Congelación.**

Las células fueron sometidas a un proceso de congelación para su posterior utilización cuando fuera necesario. Una vez despegadas las células, se contaron y se pipeteó el volumen necesario para conseguir un millón de células; después se centrifugó a 300 x g 5 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células con 900 µl de suero fetal bovino en un criotubo, posteriormente se añadieron 100 µl del crioprotector dimetil sulfóxido (DMSO). A continuación se colocó el vial en una cubeta de congelación y se introdujo en un congelador a -80°C. A las 24 horas se pasó el vial a un contenedor de nitrógeno líquido donde se conservaron las células hasta su uso, anotando el pase en el que se encontraba el subcultivo.

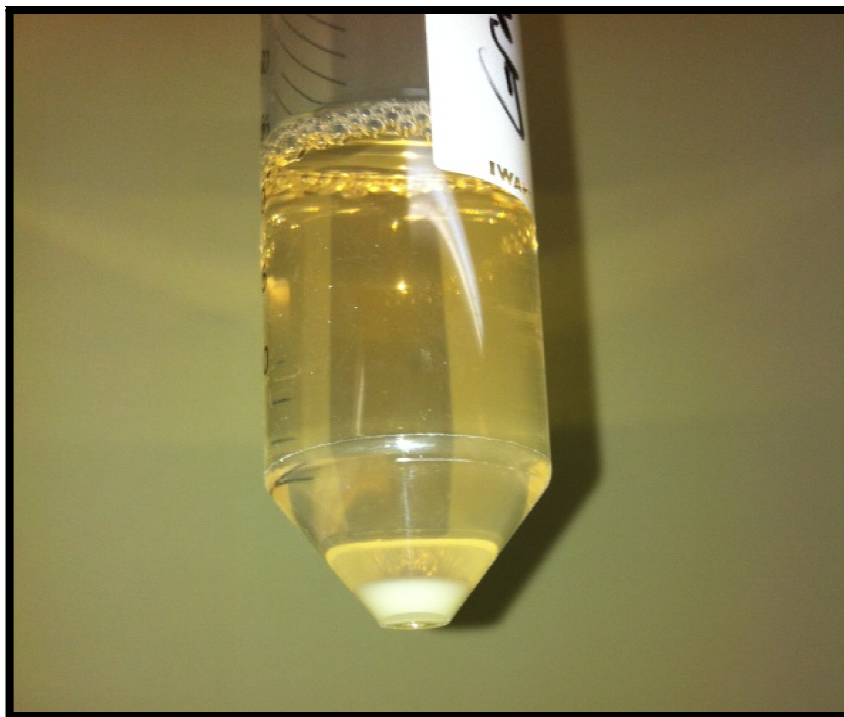
### **2.2.3 Preparación de la jeringa de inyección. Recuento directo de células:**

Una vez despegadas las células, se contaron y se pipeteó el volumen necesario para conseguir 10 millones de células. Para ello, realizamos el contaje celular mediante la cámara de Neubauer (Figura 2) y visualización al microscopio óptico. Al contar bajo el microscopio el número de células presentes en un volumen conocido (20 microlitros) se puede determinar la densidad de células en la suspensión de origen. Estas células fueron previamente teñidas con un colorante natural como es el *azul de Tripano* que nos permite distinguir células viables, que extruyen el colorante, de células muertas. Una vez determinado el número de células en la suspensión (10 millones) se procedió al centrifugado durante 5 minutos a 300 x g descartando el sobrenadante y seleccionando el pellet celular (Figura 3). Posteriormente se añadió 100µl de medio Ham's F12k suplementado sin suero fetal bovino y se aspiraron en una jeringa de 0.5 ml para su posterior inyección subcutánea en la rata (Figura 4).

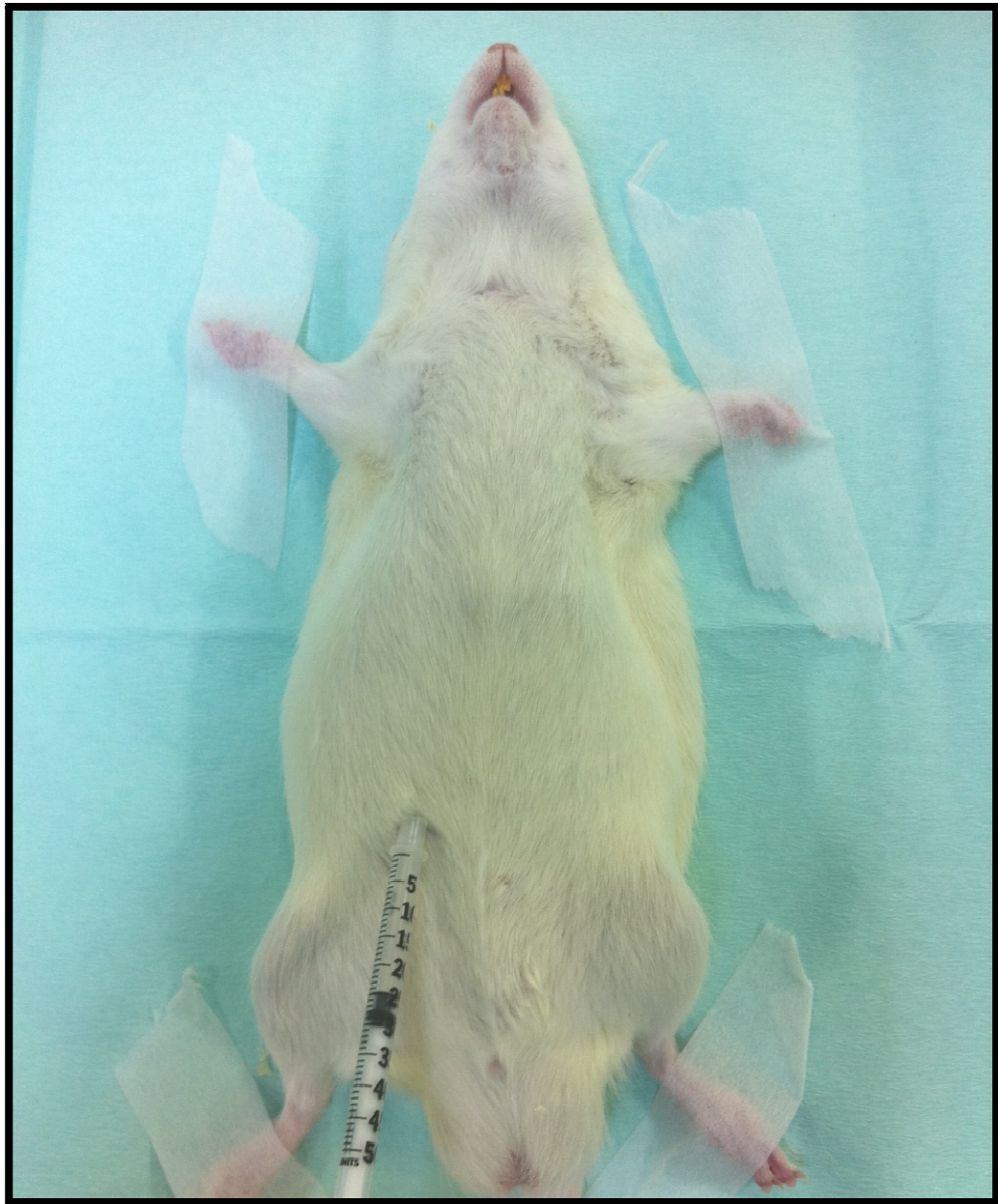




*Figura 2. Contador manual a la izquierda y cámara de Neubauer a la derecha.*



*Figura 3. Pellet celular en la base del tubo separado del sobrenadante situado en la parte superior.*



**Figura 4.** Jeringa de insulina que contiene 10 millones de células FAT-7. En la imagen se aprecia la inyección subcutánea abdominal en una rata Fisher anestesiada.

## 2.3 ESTUDIO *IN VITRO*

### 2.3.1 Ensayo de proliferación celular mediante colorimetría en placas de 24 pocillos.

Se realizaron estudios *in vitro* para evaluar el efecto de diferentes tratamientos sobre la proliferación de las células tumorales. Para ello sembramos las células FAT-7 en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo con medio Ham's F12K suplementado. Los *pocillos basales* son 4 pocillos que se fijaron a las 24 horas con 1ml de glutaraldehído al 1 por ciento durante 10 minutos. 16 de los 24 pocillos se sometieron a los diferentes tratamientos experimentales. En cada caso, el medio de cultivo y los tratamientos se renovaron diariamente. Los 4 pocillos restantes o *pocillos control* no recibieron tratamiento. Se estudió la proliferación celular a 48 horas después. Después de fijar las células para su estudio fueron lavadas con PBS y posteriormente teñidas con colorante violeta cristal (Sigma) al 1 por ciento durante 10 minutos. Tras un lavado exhaustivo con agua destilada, las placas se dejaron secar y se extrajo el violeta cristal de las células mediante la adición de 2ml de ácido acético al 10 por ciento y se transfirieron 250µl de cada pocillo por duplicado a una placa de 96 pocillos<sup>(59)</sup>. El contenido celular en cada pocillo fue determinado mediante la medición de absorción a 595nm en un lector de placas GENios Plus (*TECAN trading AG, Mannedorf, Suiza*). El efecto de los 4 compuestos (ACF, Dobesilato, Ácido Cafeico y DHC-ME) se determinó a distintas concentraciones calculando el porcentaje de absorción respecto al grupo de *pocillos control* de células no tratadas<sup>(123)</sup>. Analizando comparativamente los resultados observamos un mayor efecto con la ACF y, por este motivo, elegimos este compuesto para realizar estudios *in vivo*.

## 2.4 ESTUDIO *IN VIVO*

Los estudios llevados a cabo con animales se realizaron de acuerdo a las normativas de la Unión Europea para el manejo y manipulación de animales de experimentación. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

El animalario del Hospital Ramón y Cajal está dotado de las condiciones necesarias para albergar animales de experimentación. La temperatura es de 22°C y una humedad constante de 70 por ciento.

Las ratas Fischer de 100-125gr, alimentadas con pienso estándar, se aclimataron en el animalario durante 4 semanas hasta llegar al peso de 200gr antes de proceder a la realización de los experimentos. El total de ratas fue 19, 13 machos y 6 hembras.

Los procedimientos quirúrgicos para inyectar las células FAT-7 en ratas Fischer o la extirpación del tumor para su análisis histológico se realizaron en el quirófano de experimentación (Figura 5) con material microquirúrgico y ayuda de un microscopio quirúrgico.





**Figura 5.** Quirófano de experimentación de animales.

#### **2.4.1 Anestesia de ratas Fischer.**

Se les inyectó por vía i.p  $3\text{ml/kg}^{-1}$  de una mezcla de  $2,5\text{mg/ml}^{-1}$  de hidrocloreuro de ketamina (*Pfizer, España*),  $2\text{mg/ml}^{-1}$  de valium (*Roche Farma, España*) y  $0,1\text{mg/ml}^{-1}$  de atropina (*B.Braun s.a., Rubí, España*) <sup>(32)</sup>. Cada rata fue anestesiada 2 veces a lo largo del estudio. La primera vez se realizaba previo a la inyección subcutánea de las células tumorales. La segunda vez al cabo de 3 semanas para realizar la extirpación tumoral y el sacrificio mediante exanguinación intracardiaca para el estudio de hemograma y bioquímica sanguínea. Las ratas no fueron anestesiadas durante las inyecciones intraperitoneales del tratamiento con ACF o de suero.

### **2.4.2 Grupo control.**

Consta de un total de 8 ratas, 2 hembras y 6 machos. A todas ellas se les inyectó a nivel subcutáneo en la región abdominal, craneal a la región inguinal, el preparado de la jeringa de inyección que consistía, como ya se ha mencionado, en una suspensión de 10 millones de células FAT-7 en 100µl de medio de cultivo de suero F12-K suplementado sin suero fetal usando una aguja de calibre 25. Al 8º día se les inyectó i.p 0,3ml de suero salino al 0,9 por ciento NaCl de 0,0015 ml/mg, que se repitió diariamente hasta el día 21º. Al día siguiente, día 22º, se procedió al sacrificio del animal y a la cuidadosa extirpación quirúrgica del tumor que una vez cuantificado su volumen se fijó en 4 por ciento de paraformaldehído para su posterior estudio histológico. Se estudió la evolución tumoral durante 22 días realizando medidas periódicas al 7º, 10º, 13º, 16º y 22º día del peso del animal y del volumen tumoral según la fórmula  $\frac{4}{3} \pi(L/2)(A/2)^2$  o volumen elipsoidal. La rata número 4 del grupo control fue sacrificada a las 6 semanas para evaluar la progresión tumoral a largo plazo.

### **2.4.3 Grupo tratado con Acriflavina.**

Consta de un total de 11 ratas, 4 hembras y 7 machos. A todas ellas se les inyectó el preparado de la jeringa de inyección como en el grupo control. Al 8º día se les inyectó i.p 0,3 ml que contenían 1mg/kg de ACF disuelta en 0,9 por ciento NaCl, que se repitió diariamente hasta el día 21º. Se analizó también la evolución durante 22 días del peso y del volumen tumoral y se practicó la extirpación del tumor y el sacrificio el 22º día como en el grupo control.

## **2.5 ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS: CUANTIFICACIÓN.**

Después de estudiar la evolución del volumen tumoral en todas las ratas como se explicará en el siguiente apartado se realizó la cuantificación de la angiogénesis mediante técnica de visualización directa.

Tras la extirpación del tumor lo fijamos en parafina para realizar los cortes y el estudio histológico al microscopio óptico. Cuantificamos los vasos sanguíneos comparando el grupo control y el grupo tratado con ACF. Para ello, empleamos el software Motic Image capaz de diferenciar, dibujar y realizar un conteo de los vasos en las muestras de tejido tumoral.

Se seleccionó aleatoriamente un corte histológico de cada animal. De ese corte histológico se realizaron 6 fotografías con microscopio óptico a 20 aumentos, de  $0,176\text{mm}^2$  de campo cada una, 4 fotos según los extremos de un eje de coordenadas y 2 fotos del interior del campo. De cada fotografía se colorearon digitalmente mediante el software Motic Image los vasos sanguíneos y se calculó el porcentaje del área coloreada respecto al área total de  $0,176\text{mm}^2$  con el objetivo de cuantificar el área de vascularización. Después se calculó la media del porcentaje de vasos coloreados en las 6 fotografías.

## **2.6 ENSAYO DE LA APOPTOSIS: MÉTODO DE LA TRANSFERASA TERMINAL O TUNEL.**

Los compuestos que promueven específicamente la entrada en apoptosis de células endoteliales son potenciales moduladores de la angiogénesis. Existe una gran diversidad de ensayos para cuantificar la apoptosis. En nuestro estudio realizamos el método de la transferasa terminal o TUNEL (reacción de elongación de extremos 3'-OH con dUTP-biotina mediada por la desoxinucleotidil transferasa terminal).

La valoración de la apoptosis por este método tiene su fundamento en la detección de la rotura del ADN internucleosomal, típica de la apoptosis, en

secciones de tejido fijadas en parafina.

Este método se basa en la reacción enzimática de la transferasa terminal sobre el ADN nuclear fragmentado, por lo que éste incorpora el mononucleótido dUTP marcado con biotina. Previamente, el tejido se somete a desparafinación a la temperatura de 60°C durante 30 minutos, con posterior hidratación y permeabilización en una mezcla de metanol-acetona 1:1 a temperatura ambiente y durante 10 minutos.

Para degradar las proteínas nucleares que obstaculizan el acceso de la enzima y el sustrato al ADN tisular, los cortes seriados de 10 µm se trataron con 20µg de proteinasa K (*Boehringer Mannheim, Alemania*) en un tampón Tris CLH pH 6.6 durante 20 minutos a temperatura ambiente.

La reacción enzimática se realizó añadiendo a cada dos cortes seriados 5 unidades de la enzima transferasa terminal (Nucleósido-trifosfato: ADN deoxinucleotidil transferasa EC 2.7.731, *Boehringer Mannheim, Alemania*) y 10 µg de biotina-dUTP (Biotina 16-2-deoxiuridina-5 trifosfato, *Boehringer Mannheim, Alemania*) en solución tampón Tris CLH pH 6,6, 140mM de cacodilato sódico, 0,25mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino) y 1mM de cloruro de cobalto (*Merck, Alemania*) y posterior incubación a la temperatura de 37°C durante una hora. Con la finalidad de interrumpir la reacción enzimática, los cortes se trataron con un tampón citrato sódico 30mM (*Merck, Alemania*) y cloruro sódico 300mM pH 7 (*Merck, Alemania*).

Para detectar la biotina unida al dUTP incorporado a los fragmentos de ADN, se empleó el Kit de avidina-biotina-peroxidasa (*Vectastain, Vector Laboratories, EEUU*). El revelado de la peroxidasa se hizo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2 por ciento en un paso previo a la reacción enzimática.

Se seleccionó al azar un corte histológico de cada animal. De ese corte histológico se realizaron 6 fotografías con microscopio óptico a 20 aumentos, de 0,176mm<sup>2</sup> de área de campo cada una, 4 fotos según los extremos de un eje de coordenadas y 2 fotos del interior del campo igual que para el estudio de angiogénesis. Se realizó un contaje manual del número de núcleos teñidos de marrón o en apoptosis con el microscopio óptico a 20 aumentos. Se sumaron todos los núcleos apoptóticos contados en cada área y se calculó la media.



## 2.7 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.

Los análisis e interpretación de los datos de este estudio se han realizado mediante las siguientes técnicas de análisis estadístico:

- T de Student: es un test paramétrico que permite decidir si dos variables aleatorias normales (gaussianas) y con la misma varianza tienen medidas diferentes. Se pueden comparar el valor medio de dos poblaciones asumiendo que los dos grupos tienen una distribución normal de campana de gaus. De esta manera, podemos estudiar si la modificación en las condiciones de un proceso esencialmente aleatorio produce una elevación o disminución de la media poblacional. Por ejemplo, valorar la progresión de un tumor en ratas que reciben un placebo y en ratas que reciben tratamiento con drogas. El test opera decidiendo si una diferencia en la media muestral entre dos muestras es estadísticamente significativa, y entonces poder afirmar que las dos muestras corresponden a distribuciones de probabilidad de media poblacional distinta, o por el contrario afirmar que la diferencia de medias puede deberse a oscilaciones estadísticas azarosas.

- U de Mann-Whitney: se usa para comprobar la heterogeneidad de los muestras ordinales. Es una prueba no paramétrica, es decir, las desviaciones estándar son muy diferentes entre las dos poblaciones. Es la versión no paramétrica de la habitual t de student aplicada a dos muestras independientes. Por ejemplo, para estudiar el porcentaje de vascularización en un corte histológico de un tumor en animales tratados y animales control o no tratados donde la desviación estándar puede ser muy diferente. El planteamiento de partida de este análisis es que las observaciones de ambos grupos son independientes; bajo la hipótesis nula, las distribuciones de partida de ambas distribuciones es la misma; bajo la hipótesis alternativa, los valores de una de las muestras tienden a exceder a los de la otra.

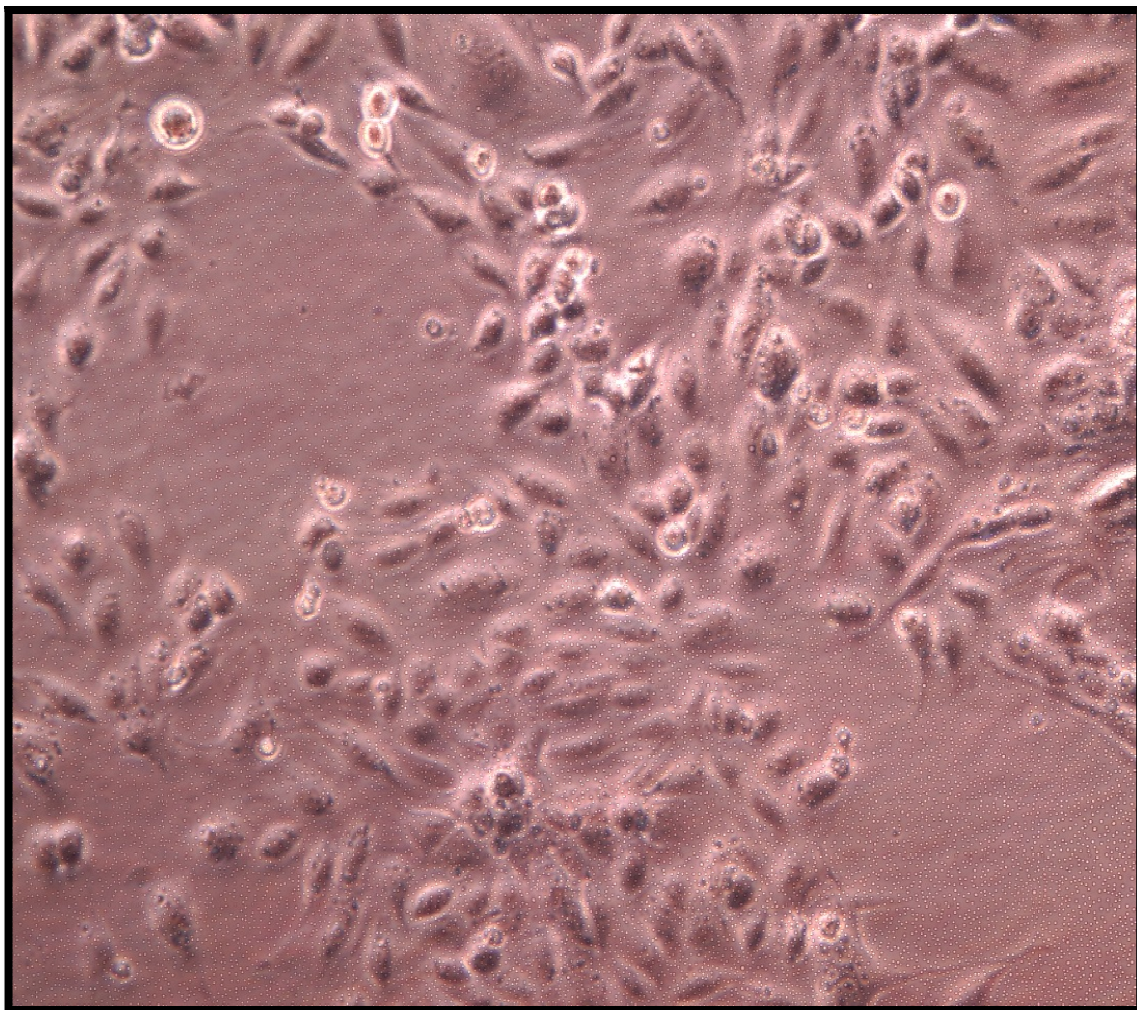
Ambos estudios se han basado en variables continuas, es decir, toman valores a lo largo de un continuo como el peso, el tamaño y el volumen a diferencia de las variables discretas que varían en un conjunto discreto como por ejemplo ser enfermo o sano, raza blanca o raza negra.

## **RESULTADOS**

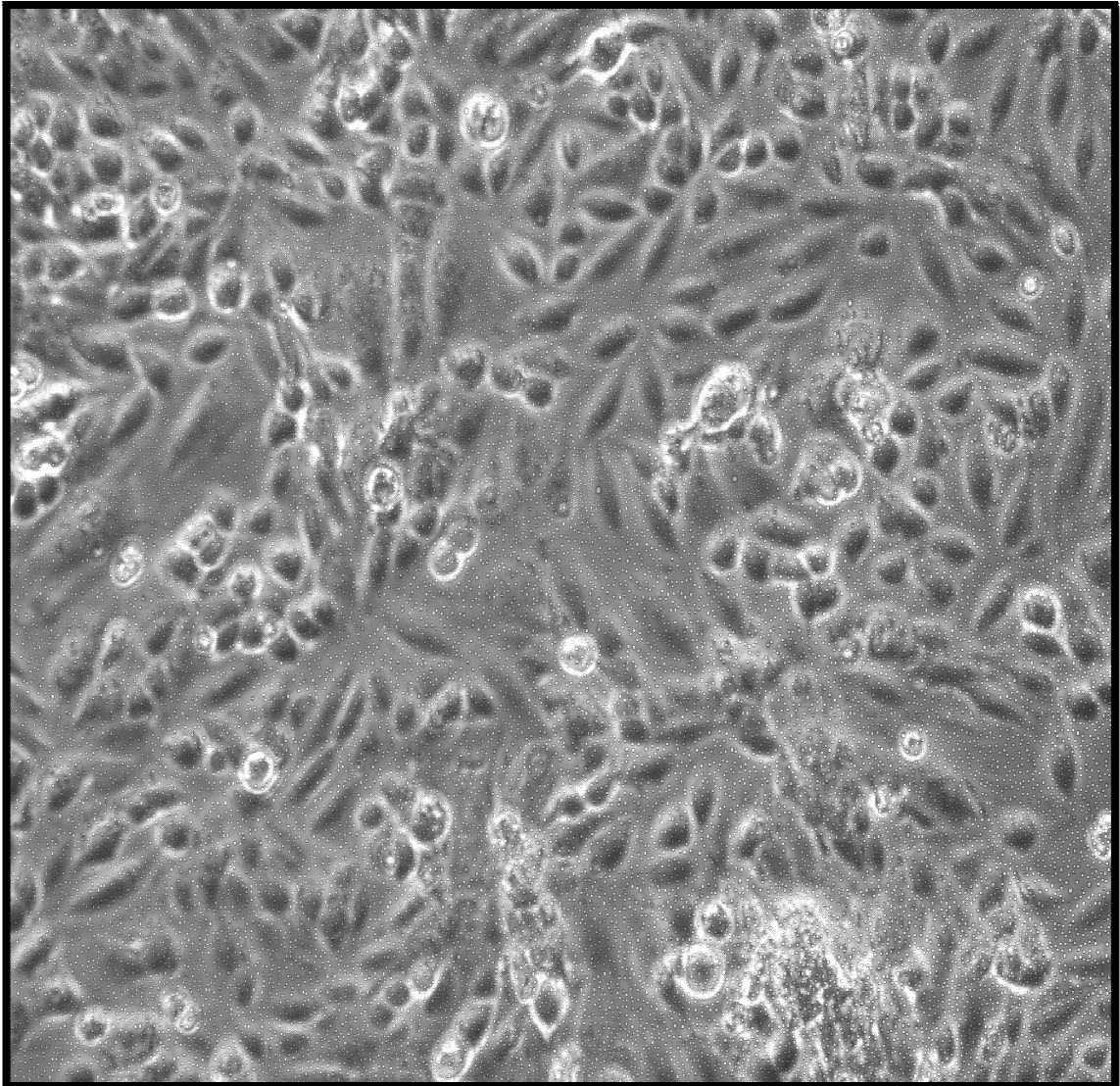
## 1 ESTUDIO *IN VITRO*

### 1.1 MORFOLOGÍA CELULAR

Las células FAT-7, incubadas en el *flask*, muestran una gran capacidad de proliferación, llegando a confluir entre los días 5 y 7, y son capaces de expandirse hasta el séptimo subcultivo. Su morfología (Figuras 1 y 2) es poligonal o redondeada, de tamaño mediano, con citoplasma denso y bien definido. Los núcleos son de diferente tamaño generalmente hipercromáticos y con frecuencia se sitúan de forma excéntrica en el citoplasma. Así mismo, es posible identificar fenómenos de bi y trinucleación y de forma ocasional pueden observarse células de gran tamaño. Al confluir, estas células presentaban una morfología típica de empedrado en un microscopio óptico de lámpara halógena (Figura 2).



**Figura 1.** Imagen al microscopio óptico (x20) de la agregación de las células FAT-7 en medio de cultivo Ham's F12K suplementado.



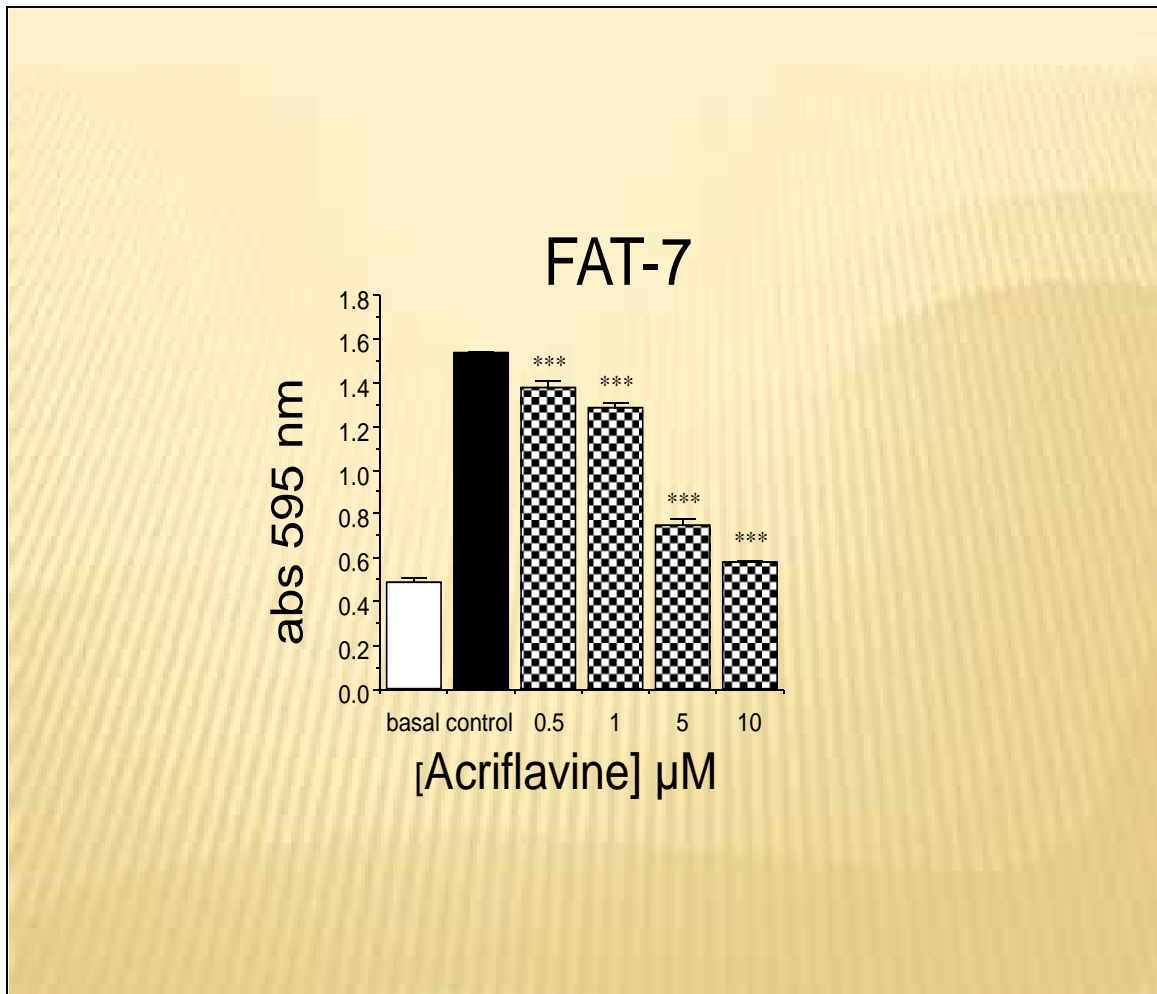
**Figura 2.** Imagen en empalizada al microscopio óptico (x20) de la células FAT-7 en medio de cultivo Ham's F12K suplementado.

## **1.2 RESULTADOS *IN VITRO* DE ACF, DOBESILATO, ÁCIDO CAFEICO Y DHC-ME SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES FAT-7.**

Sembramos las células tumorales FAT-7 en placas de cultivo de 24 pocillos y evaluamos la proliferación celular en presencia de ACF calculando porcentaje de absorción respecto al grupo de *pocillos control* tal y como explicamos en el apartado de material y método. El proceso fue repetido 3 veces para su comprobación.

### **1.2.1 Efecto de la ACF sobre la proliferación de células tumorales FAT-7.**

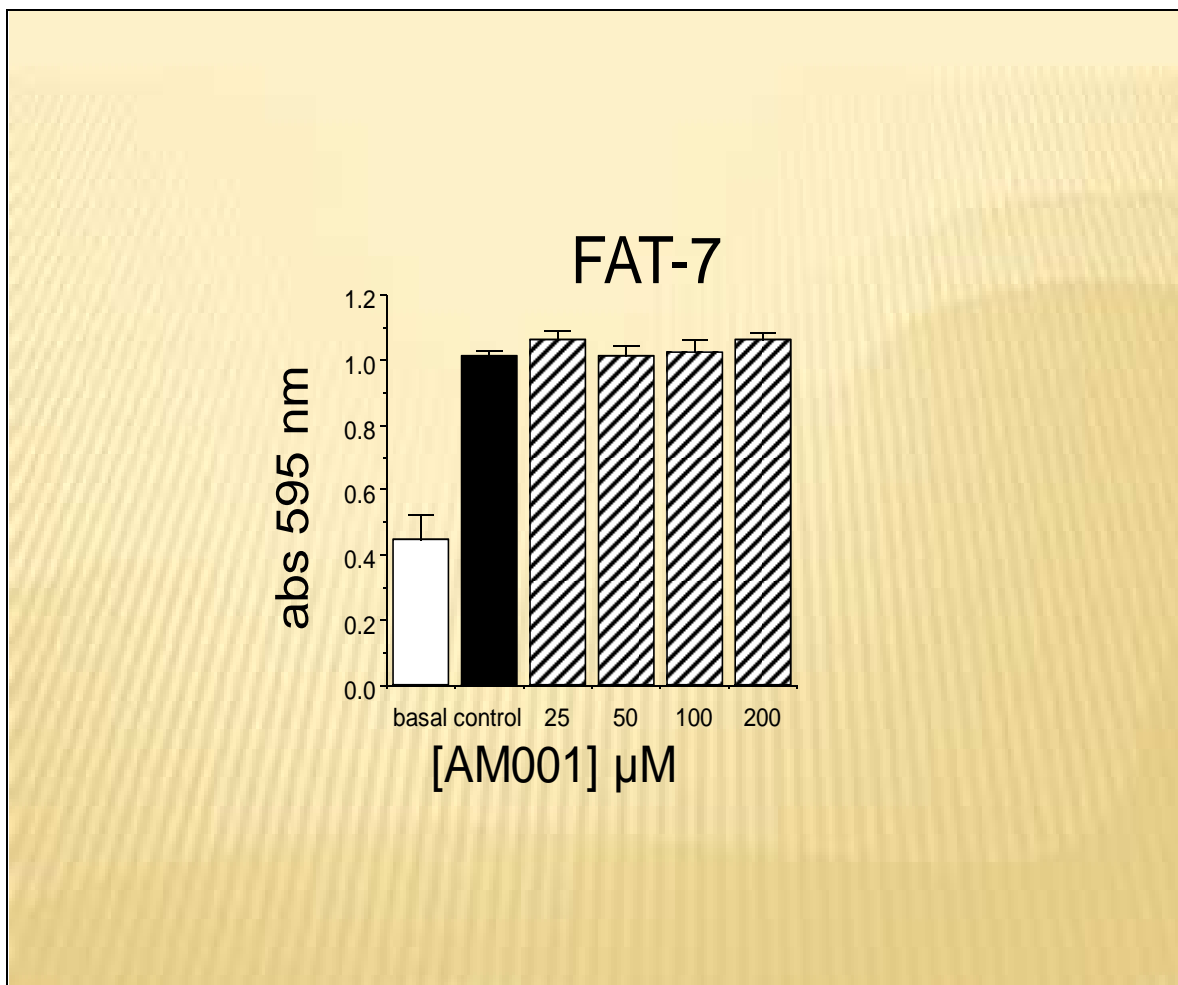
Se objetiva una progresiva reducción de la absorción a concentraciones crecientes de ACF, es decir, inhibición de la proliferación celular directamente proporcional a concentraciones crecientes del compuesto (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** El eje de ordenadas representa el porcentaje de absorción y el eje de abscisas la concentración de ACF. Existe una reducción progresiva del porcentaje de absorción, es decir, una disminución de la proliferación celular a concentraciones crecientes de ACF si lo comparamos con el grupo de pocillos control al que no se le añadió ACF.

### 1.2.2 Efecto del Dobesilato sobre la proliferación de células tumorales FAT-7.

Los niveles de absorción a concentraciones crecientes de Dobesilato no varían respecto al grupo control. Es decir, a nivel *in vitro* no varía la proliferación celular en presencia de este compuesto (Gráfico 2)

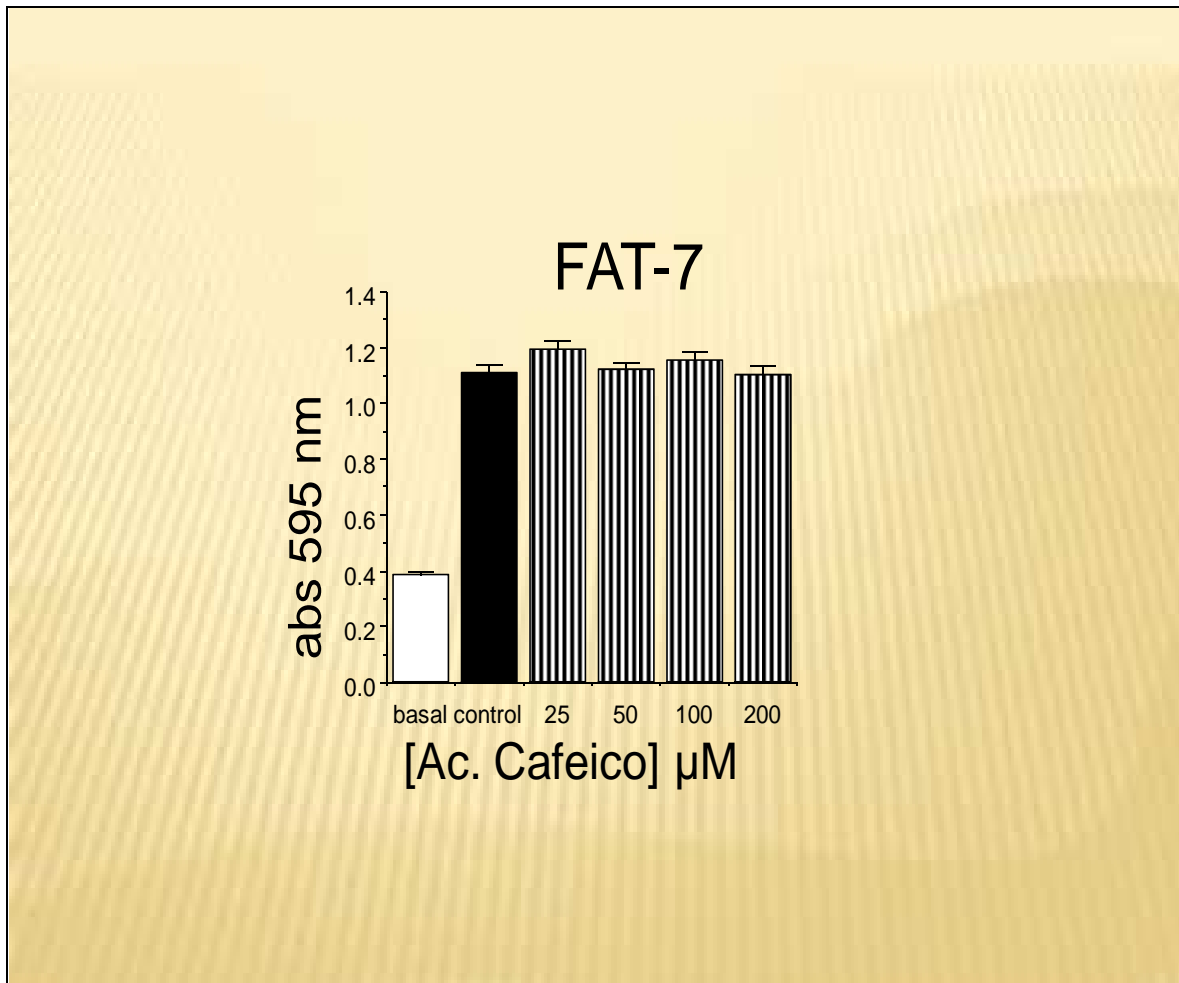


**Gráfico 2.** El porcentaje de absorción se mantiene igual que el grupo control a concentraciones crecientes de Dobesilato (AM001), es decir, la proliferación celular es la misma en los pocillos control que en los pocillos que se añadió este compuesto.



### 1.2.3 Efecto de la Ácido Cafeico sobre la proliferación de células tumorales FAT-7.

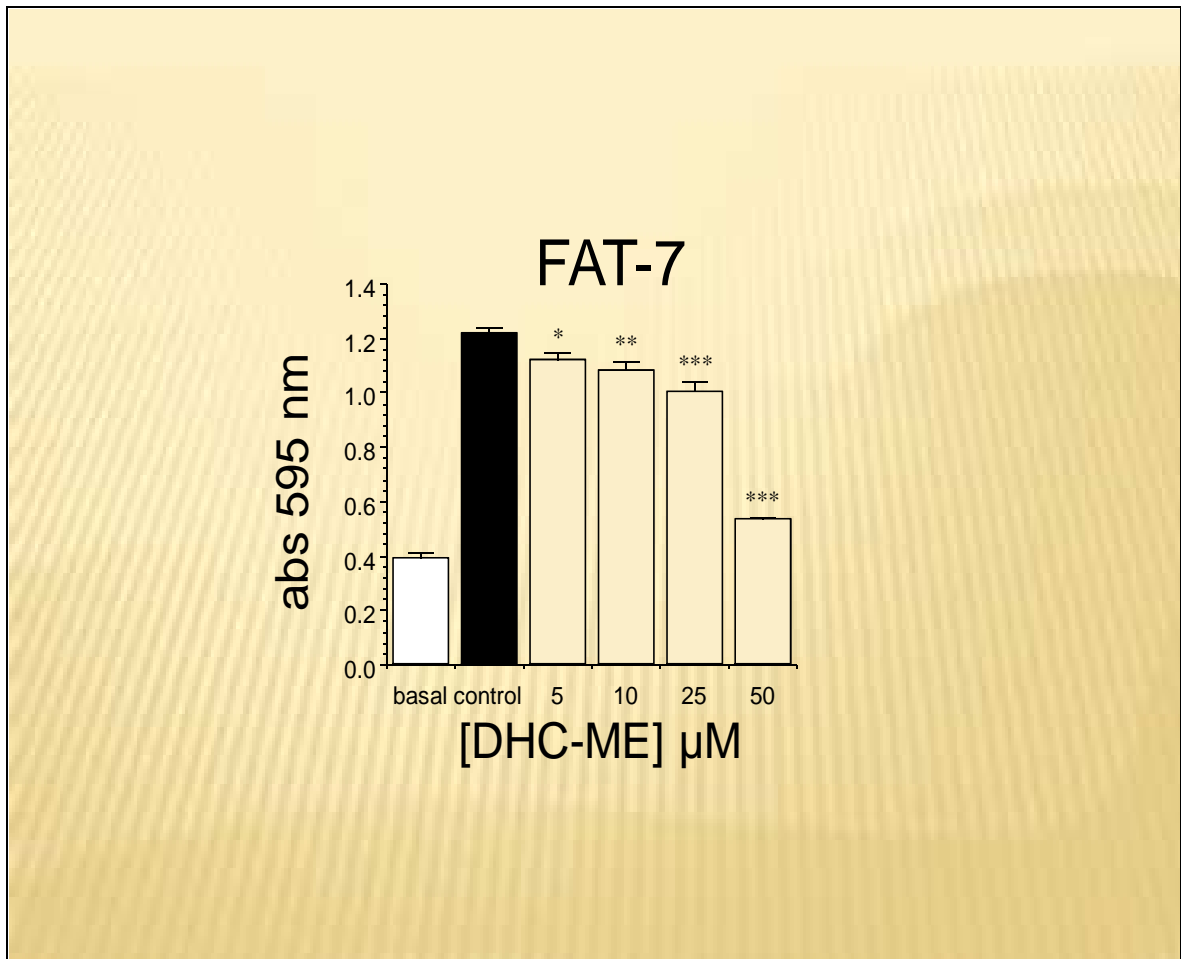
Los resultados son similares que con el Dobesilato. No existe disminución de la proliferación celular cuando añadimos Ácido Cafeico a los pocillos (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** El porcentaje de absorción se mantiene igual que el grupo control a concentraciones crecientes de Ácido Cafeico, es decir, la proliferación celular es la misma en los pocillos control que en los pocillos que se añadió esta droga.

#### 1.2.4 Efecto del DHC-ME sobre la proliferación de células tumorales FAT-7

A grandes concentraciones de este polifenol se produce una reducción de la absorción. Es decir, disminuye la proliferación de células FAT-7 (Gráfico 4).

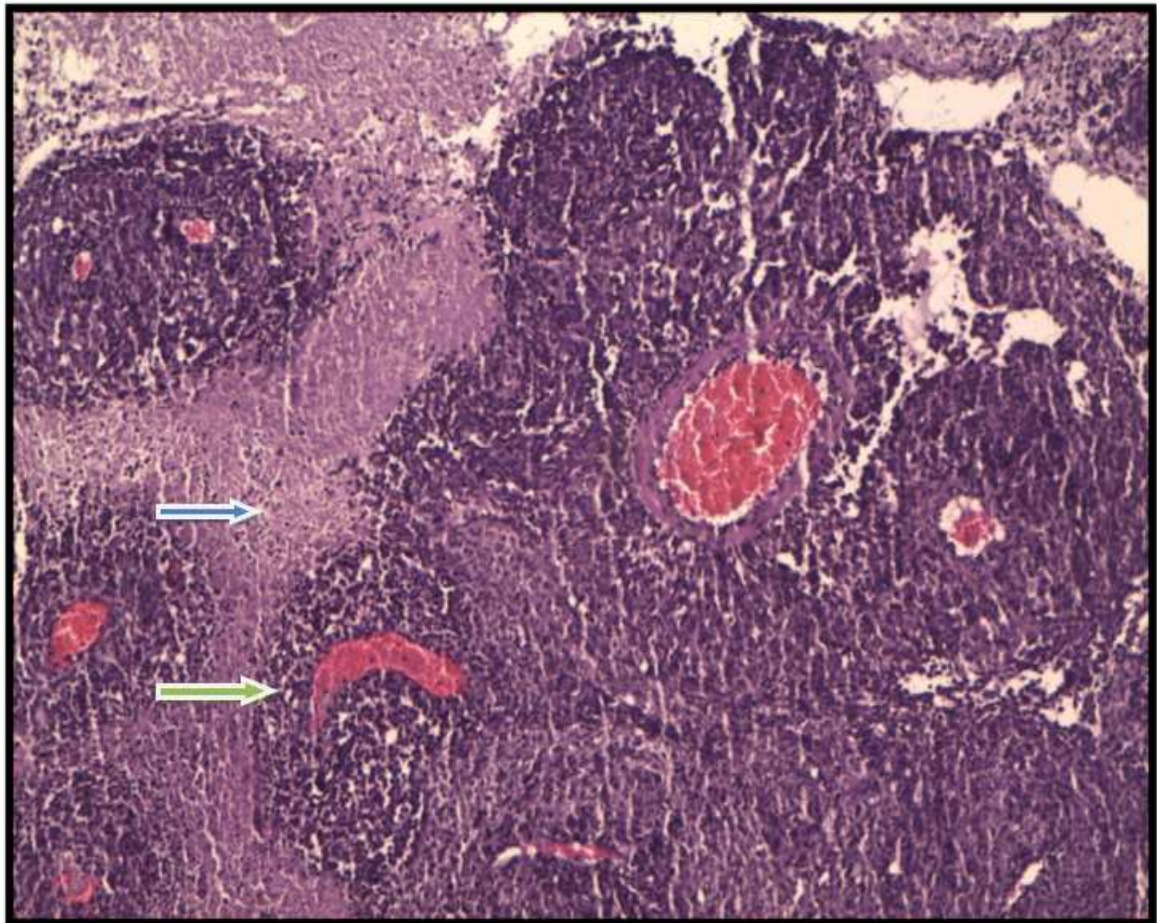


**Gráfico 4.** Reducción progresiva del porcentaje de absorción a concentraciones altas de DHC-ME indicando una disminución de la proliferación celular a altas concentraciones de DHC-ME si lo comparamos con el grupo de pocillos control al que no se le añadió DHC-ME.

## 2 ESTUDIO IN VIVO

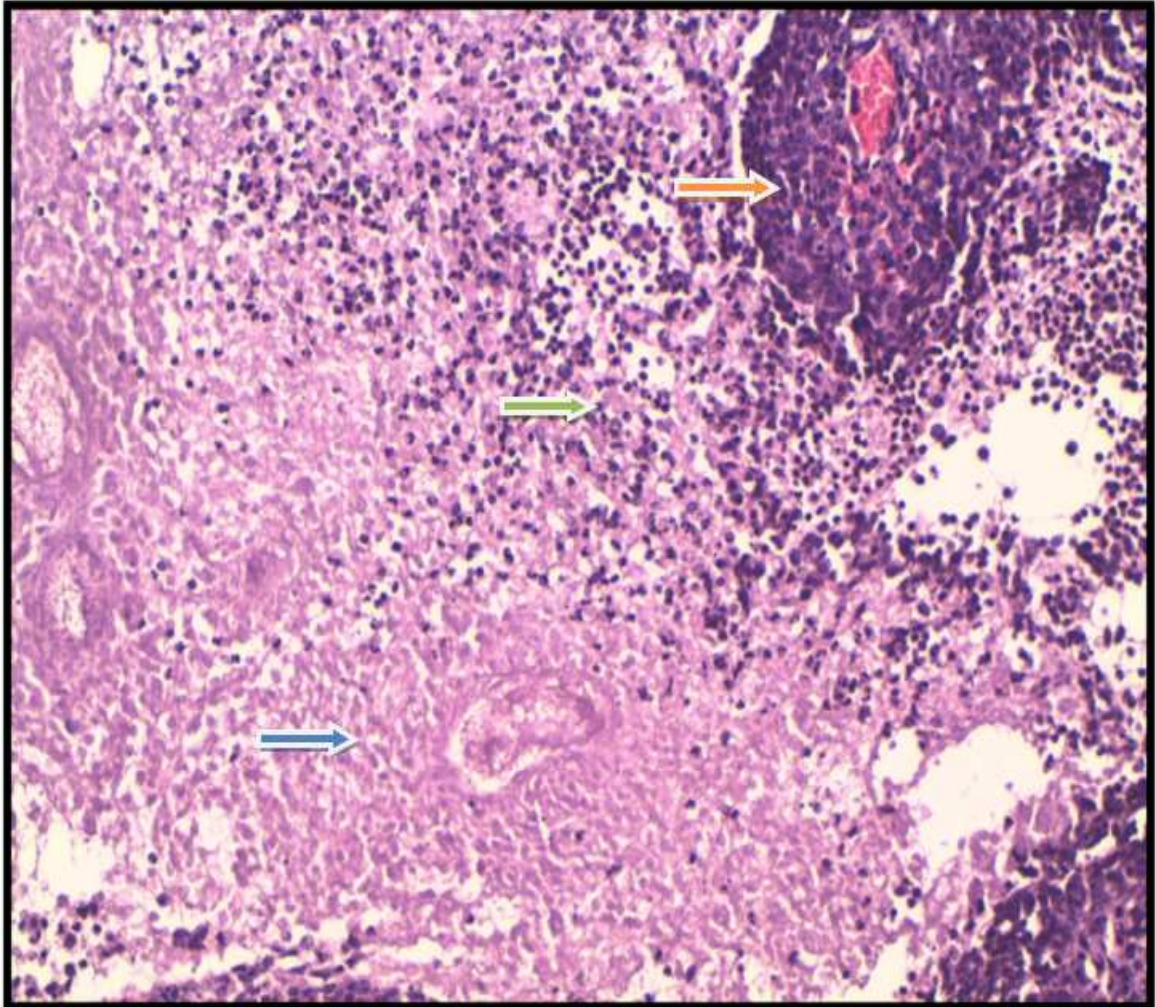
### 2.1 MORFOLOGÍA CELULAR.

En un corte histológico del tumor fijado en parafina y teñido con hematoxilina eosina, las células FAT-7 están escasamente diferenciadas sin un citoplasma típicamente eosinófilo con núcleos ligeramente pleomórficos, grandes, vesiculosos, nucléolo patente, frecuentes imágenes de mitosis típicas y atípicas con ocasionales núcleos apoptóticos (Figuras 3, 4, 5 y 6)

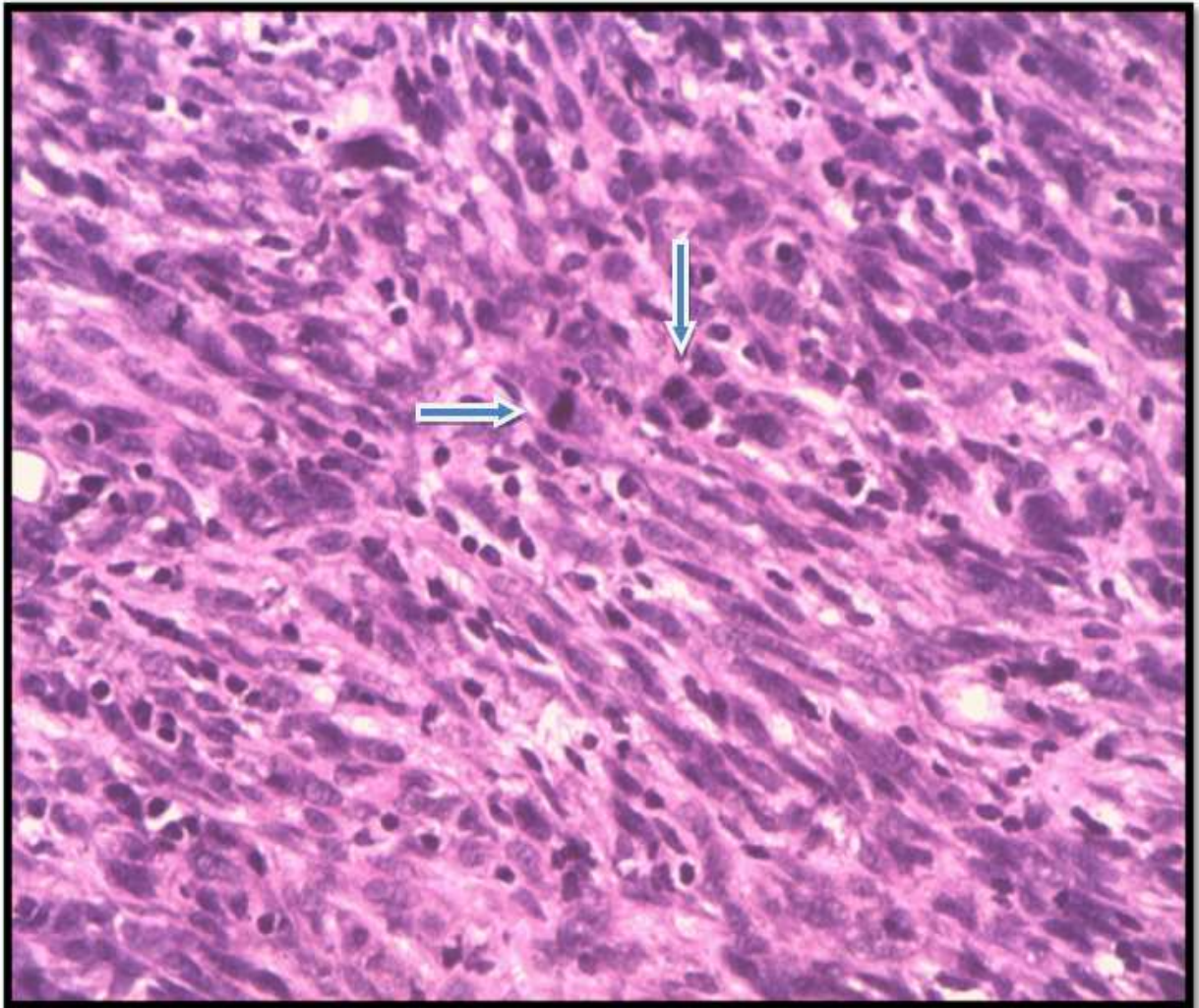


**Figura 3.** Corte histológico ( $\times 10$ ). **Flecha azul:** CE pobremente diferenciado con abundantes focos de necrosis fibrinoide isquémica. **Flecha verde:** disposición perivascular.



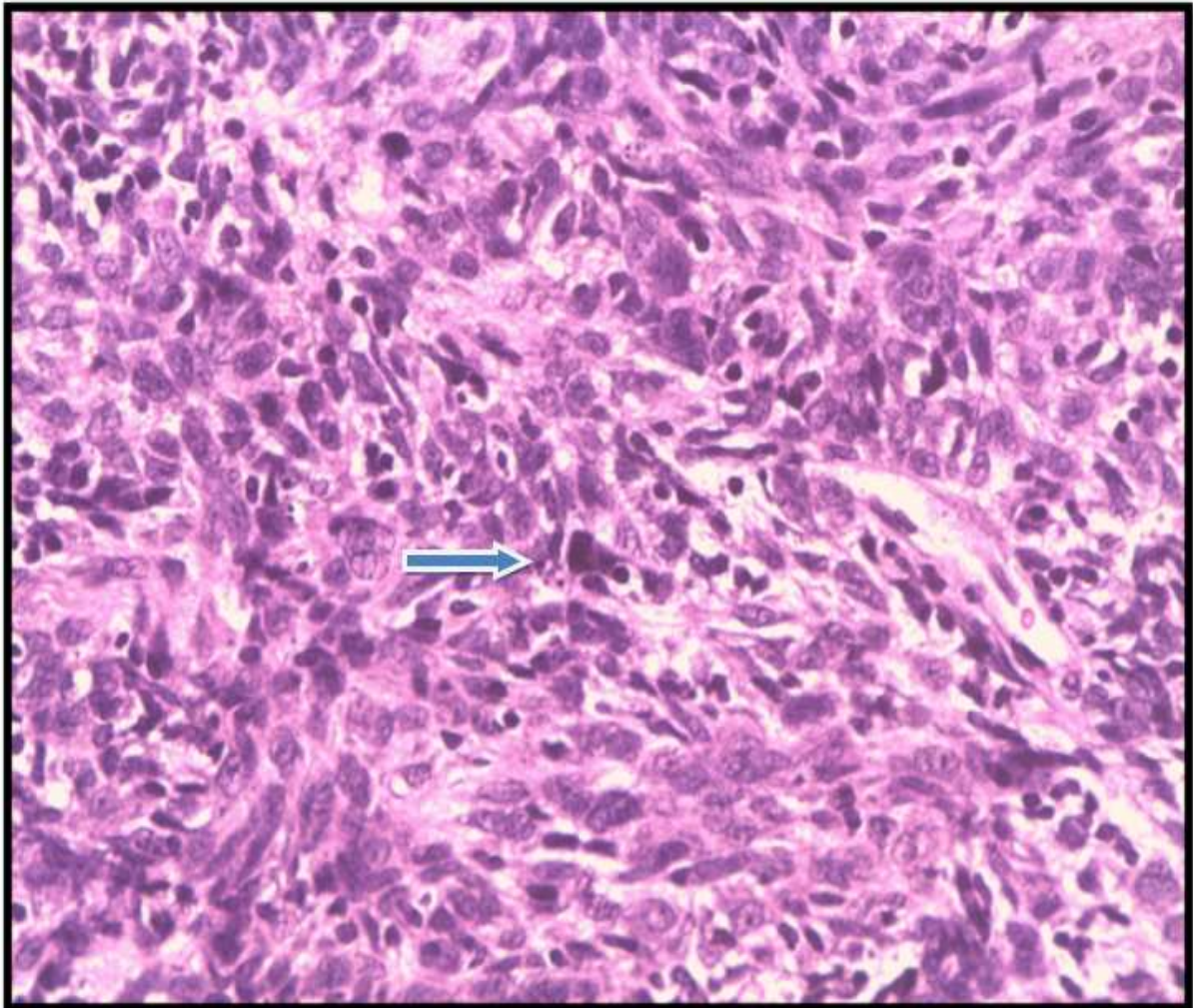


**Figura 4.** Corte histológico (x20). **Flecha azul:** zona de necrosis tumoral isquémica donde se aprecian células tumorales y vasos “en sombra”. **Flecha verde:** Interfase de infiltrado inflamatorio agudo con histiocitos y polimorfonucleares neutrófilos. **Flecha naranja:** células tumorales viables.



**Figura 5.** Corte histológico (x40). Imagen de mitosis celular. Frecuentes imágenes de alto índice mitótico.



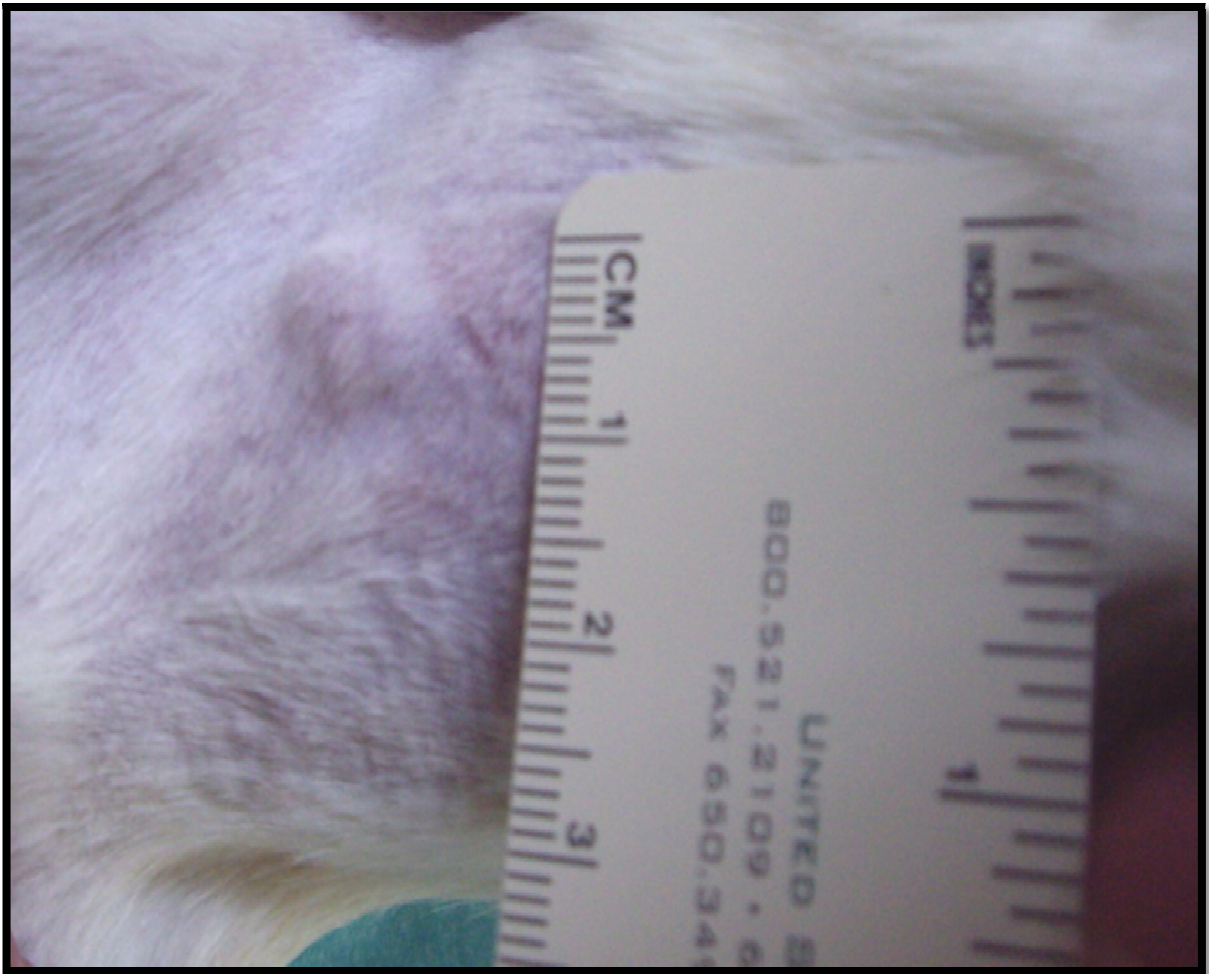


**Figura 6.** Corte histológico (x40). Fenómenos intratumorales de muerte celular programada con fragmentación de nucléolos.

## **2.2 EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN TUMORAL Y DEL PESO DE LA RATA.**

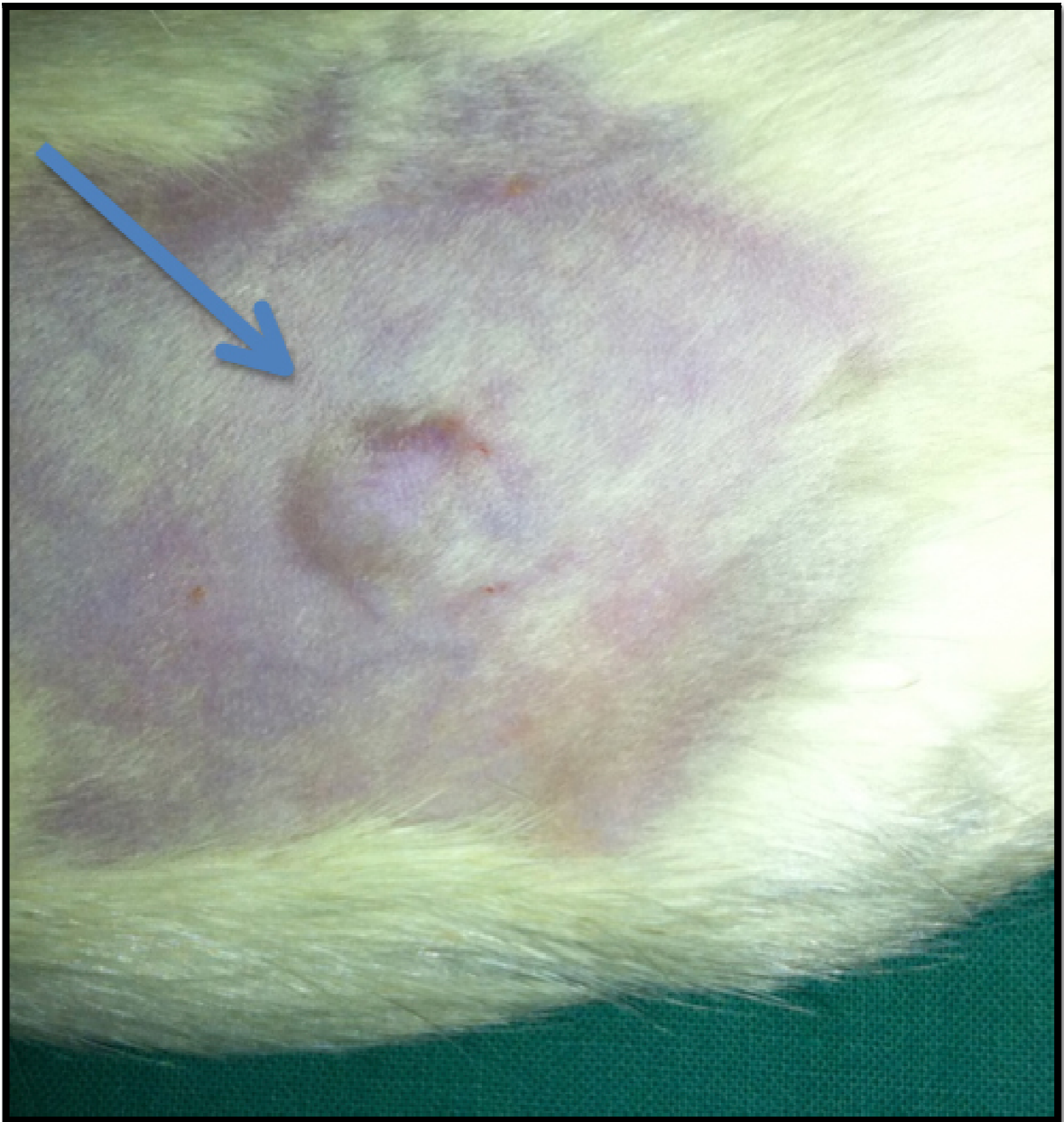
Se objetiva macroscópicamente el tumor a partir del 4º día de la implantación de células tumorales en la rata (Figuras 7 y 8). Las medidas del tumor se realizaron en mm mediante un calibre o una regla (Figura 7) hasta el 22º día que se realizó su extirpación (Figuras 9, a y b).

La rata macho control número 4 continuaba viva al cabo de 6 semanas de la implantación y presentaba una gran tumoración abdominal con zonas ulceradas y necróticas (Figura 10). Se procedió en este momento al sacrificio del animal, mediante altas dosis de anestésico pentotal sódico, previa extirpación del tumor para su estudio (Figura 11, a y b).

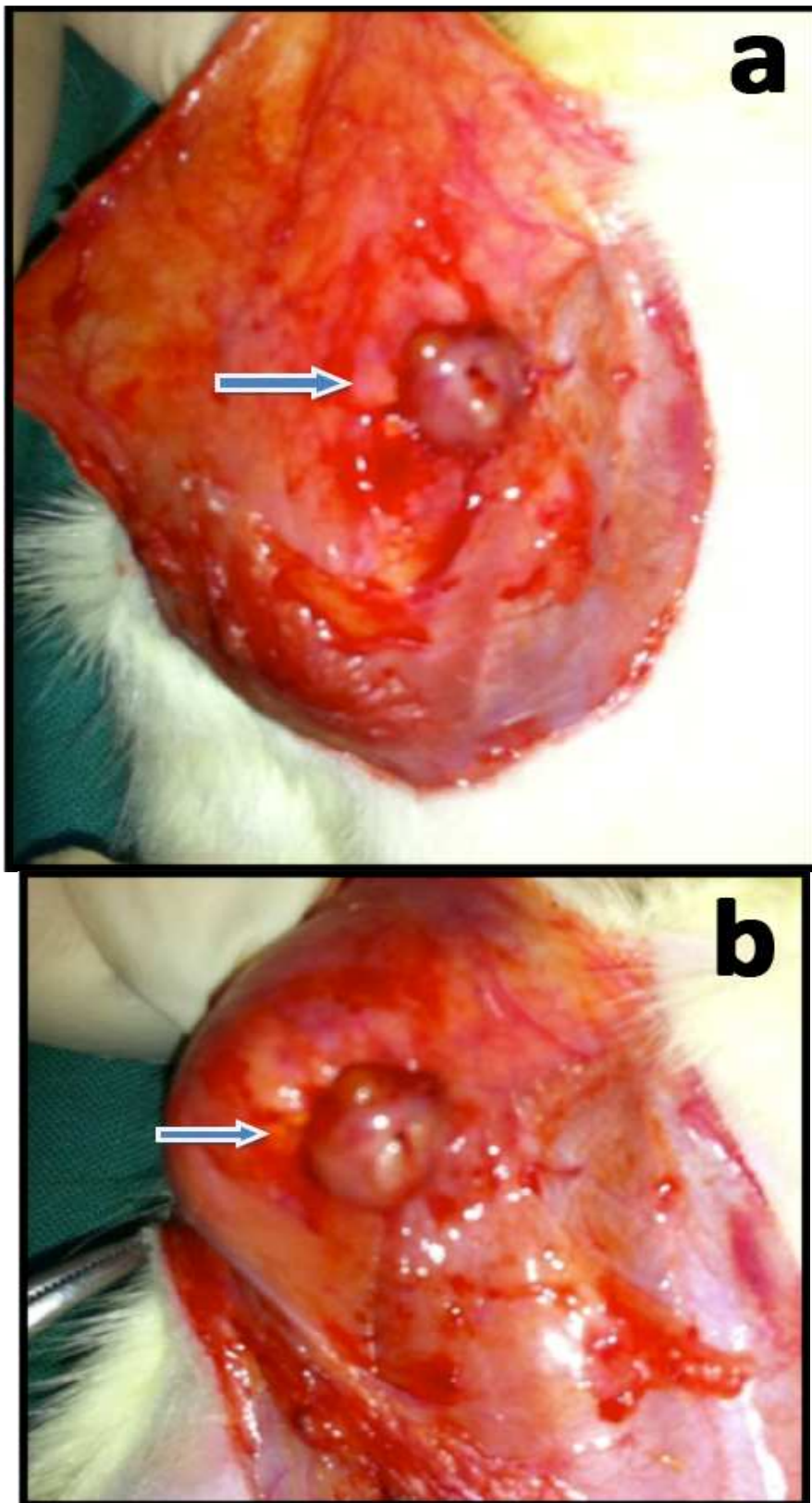


**Figura 7.** Tumor originado al cabo del 4º día de la inyección de células FAT-7





**Figura 8.** Tumor de la rata macho del grupo control en el 22º día.

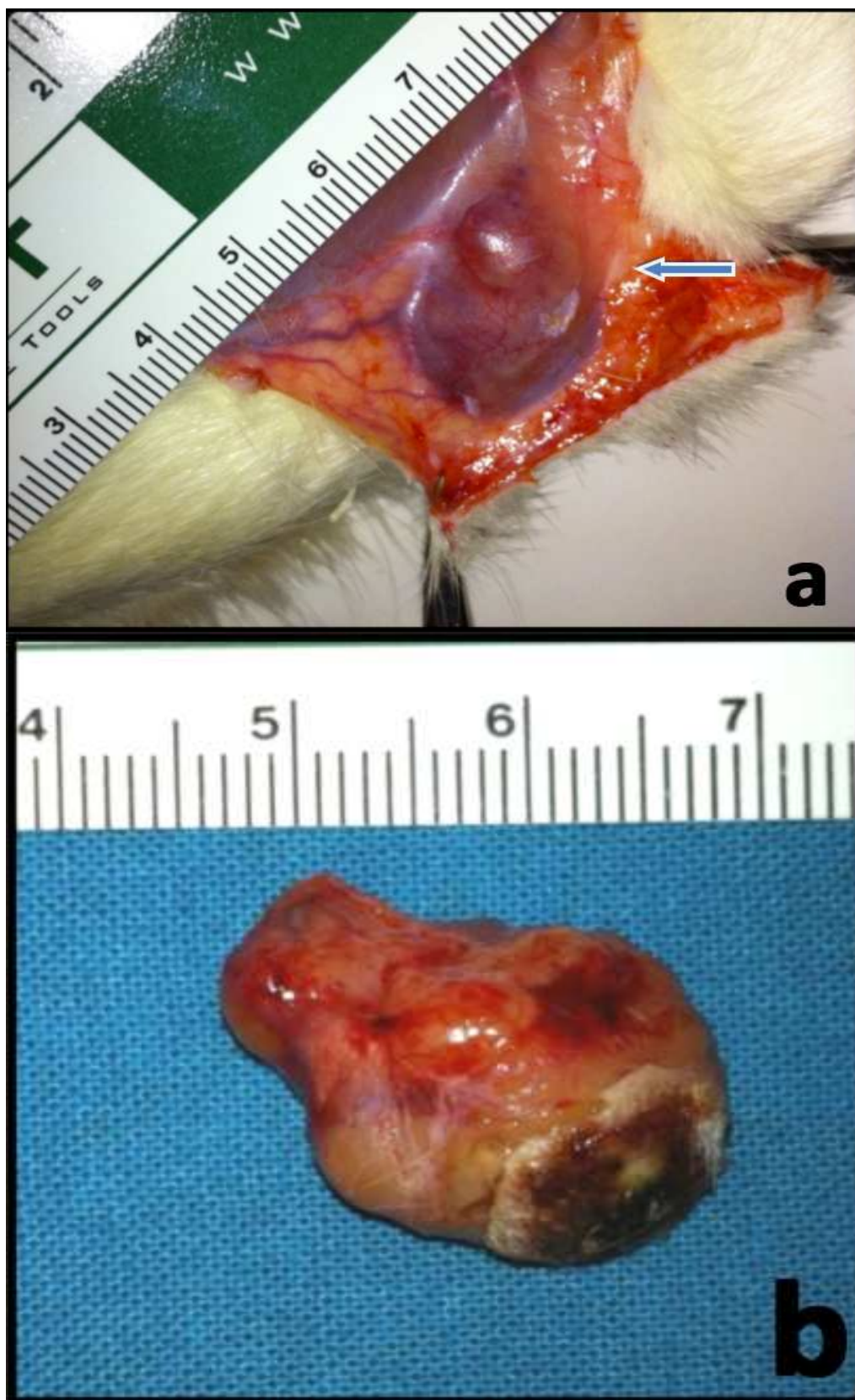


*Figura 9. a y b: Disección del tumor para estudio histológico.*



**Figura 10.** Rata macho número 4 del grupo control con gran tumoración en la pared abdominal al cabo de 6 semanas de la implantación. Se aprecia zona ulcerada en su superficie.





**Figuras 11. a:** Disección de la pared abdominal y extirpación del tumor. **b:** pieza quirúrgica. Rata de la figura 10.

El peso de las ratas apenas varió tanto en machos como en hembras del grupo control y del grupo tratado con ACF como se muestra en las tablas 1, 2, 3 y 4.

Se obtuvieron el diámetro mayor y el menor del tumor en los días 7, 10, 13, 16 y 22 tras la implantación de células tumorales en la rata. Aplicando la fórmula de volumen elipsoidal obtuvimos los siguientes resultados:

**A) Machos control:** Grupo de 6 ratas Fisher. El volumen del tumor fue progresivamente aumentando en todas las ratas hasta el día 22º en que se realizó el sacrificio del animal. Tabla 1.

<b>Machos control</b>	<b>7 d</b>	<b>10 d</b>	<b>13 d</b>	<b>16 d</b>	<b>22 d</b>	<b>Peso (gr)</b>
1	29,8	47.1	55.1	83.7	143.2	301 +/-7 ↓
2	18,8	18.8	28.86	41.88	78.5	330 +/-6 ↑
3	78,53	65.44	205.25	424.11	1150.34	371 +/-13 ↑
4	29.45	169.64	368.61	487.73	696.90	348 +/-10 ↑
5	33.51	628.31	628.31	578.3	696.90	360 +/-9 ↑
6	25.65	368.61	221.22	523.59	575.95	383 +/-10 ↑

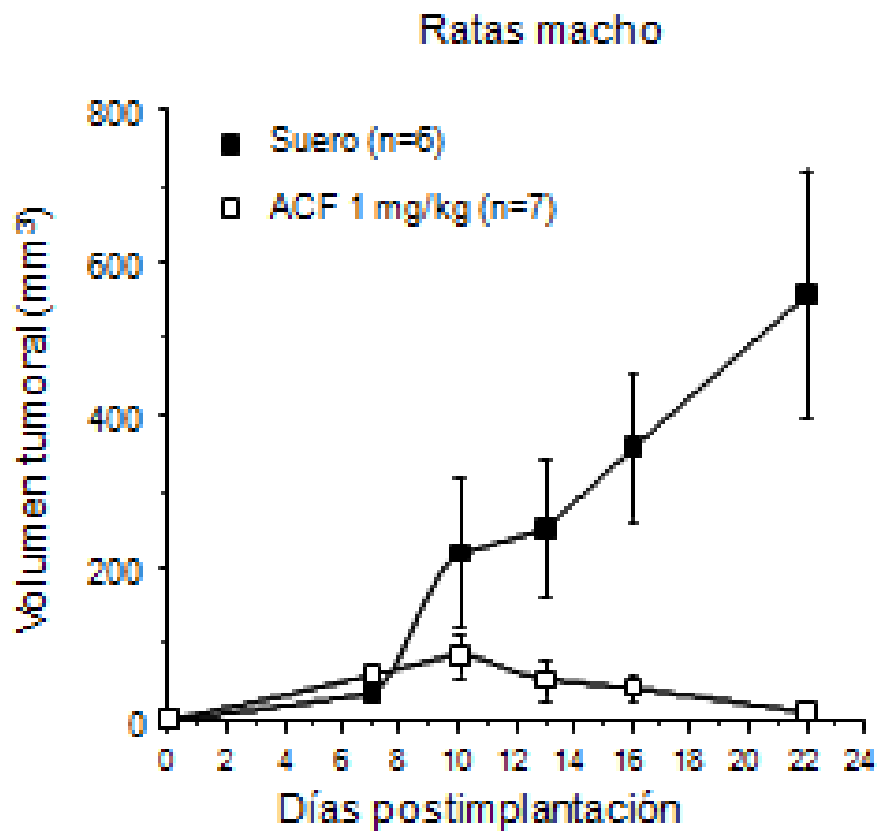
**Tabla 1.** Evolución del volumen tumoral, calculado en  $mm^3$ , del grupo machos control. En la columna de la derecha se muestra la variación del peso del animal. La flecha ↑ indica que el animal pesaba más el día 22º que el primer día. La flecha ↓ indica que el animal pesaba menos el día del 22º que el primer día.

**B) Machos tratados con ACF:** Grupo de 7 ratas Fisher. El volumen del tumor fue progresivamente disminuyendo en todas las ratas hasta el día 22, no objetivándose el tumor en 3 de ellas. Tabla 2.

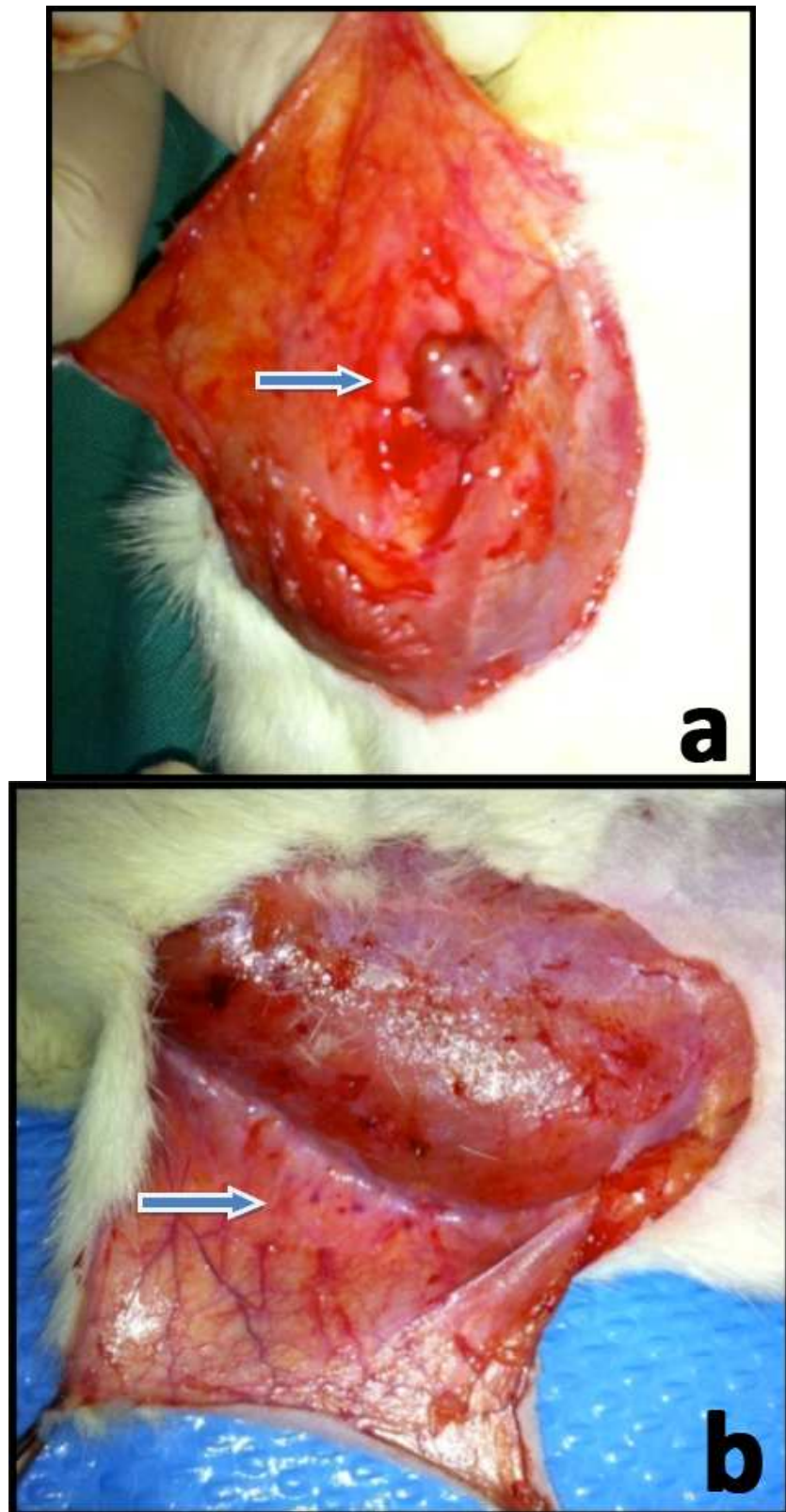
Machos ACF	7 d	10 d	13 d	16 d	22 d	Peso (gr)
1	24.5	23.8	7.88	7.85	6.36	307 +/- 8 ↑
2	23	42.4	7.85	4.1	0	290 +/-10 ↑
3	37.69	47	28.27	10.47	0	403 +/-3 ↔
4	65.4	71.99	41.88	41.89	18.84	308 +/- 6 ↓
5	78.56	117.8	38.48	32.98	0	322 +/-6 ↓
6	50.89	51.9	42.41	36.86	4.23	350 +/-11 ↓
7	119.09	230.9	205.25	150.79	46.07	336 +/-5 ↑

**Tabla 2.** Evolución del volumen tumoral y del peso del animal del grupo de machos tratados con ACF. En la columna del peso, la flecha ↔ indica que la rata pesaba igual el primer día que el último

En resumen, el tratamiento con ACF disminuye el volumen tumoral en ratas macho de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,05$  para *t de student*) como muestra el gráfico 5. Las figuras 12 a y b muestran un ejemplo del efecto de la ACF en el volumen tumoral.



**Gráfico 5.** Gráfico comparativo de la evolución del volumen tumoral en ratas macho tratados con ACF y ratas macho control. Cada pequeño cuadrado indica la media con su error estándar. A los 7 y 10 días no es estadísticamente significativo. A partir del 13º día de evolución empieza a ser estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). El 22º día  $p < 0.01$  mediante un test  $t$  de student



**Figuras 12. a y b** Comparativa de la disección de la pared abdominal de una rata tratada con suero donde se objetiva tumor **(a)** y con ACF donde no se aprecia volumen tumoral **(b)** al cabo de 22 días de la implantación de células FAT-7.



**C) Hembras Control:** Grupo de 2 ratas Fisher. El volumen del tumor fue progresivamente aumentando en una de las ratas hasta el día 22 en que se realizó el sacrificio del animal. Tabla 3.

Hembras control	7d	10d	13d	16d	22d	Peso (gr)
1	95.42	320.7	416.13	256.56	150.98	216 +/-6 ↑
2	63.61	199.09	307.87	269.39	323.97	217 +/-4 ↓

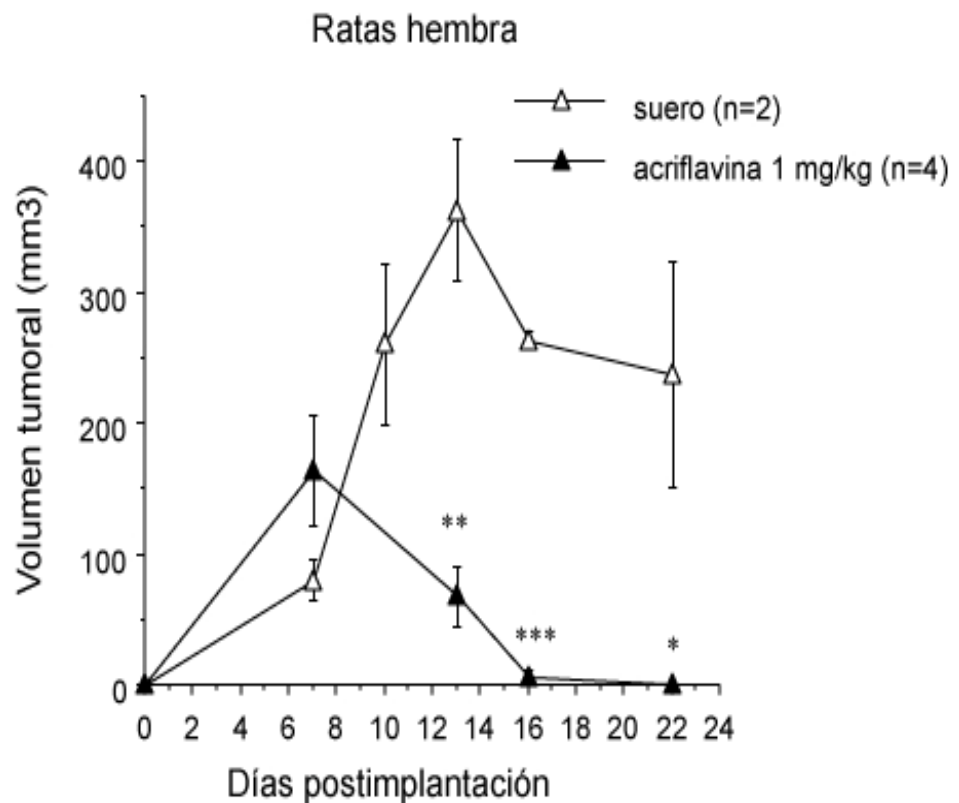
**Tabla 3.** Evolución del volumen tumoral y variación del peso del animal del grupo hembras control.

**D) Hembras tratadas con ACF:** Grupo de 4 ratas Fisher. El volumen del tumor fue progresivamente disminuyendo en todas las ratas hasta el día 22 donde no se objetivó volumen tumoral. Tabla 4.

Hembras ACF	7d	10d	13d	16d	22d	Peso (gr)
1	226,19		41,88	0	0	183 +/-10 ↑
2	91,62		33,51	0	0	197 +/-3 ↔
3	91,62		58,64	18,84	0	205 +/-5 ↑
4	245,04		134,63	4,18	0	178 +/-5 ↔

**Tabla 4.** Evolución del volumen tumoral y del peso del animal del grupo de hembras tratadas con ACF. El día 10 no se realizó medición del volumen.

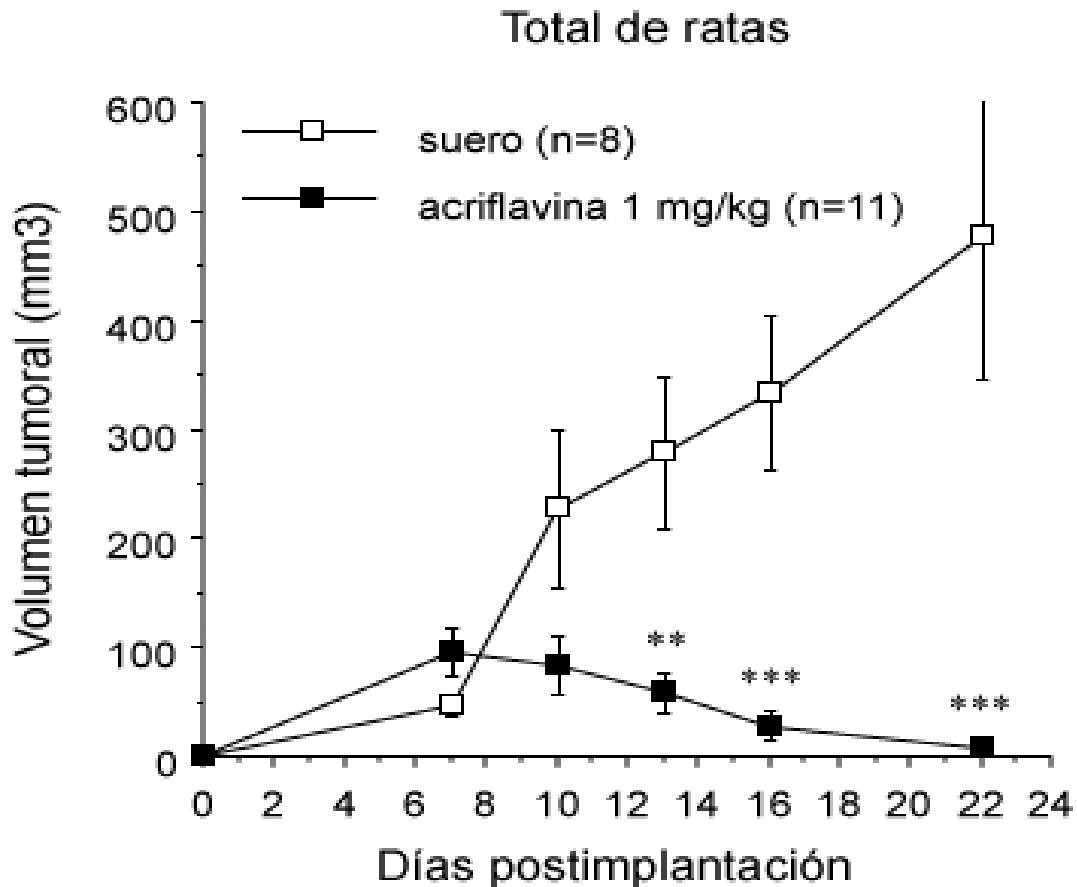
En resumen, el tratamiento con ACF disminuye el volumen tumoral en ratas hembra de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,05$  para *t de student*) como muestra el gráfico 6.



\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  mediante un test *t* de Student

**Gráfico 6.** Gráfico comparativo de la evolución del volumen tumoral en ratas hembra tratadas con ACF y ratas hembra control. Cada pequeño triángulo indica la media con su error estándar. A los 7 días no es estadísticamente significativo. A partir del 13º día de evolución empieza a ser estadísticamente significativo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  mediante un test *t* de Student.

El siguiente gráfico reúne los resultados de machos y hembras comparando todas las ratas del grupo control y del grupo tratado con ACF (Gráfico 7).



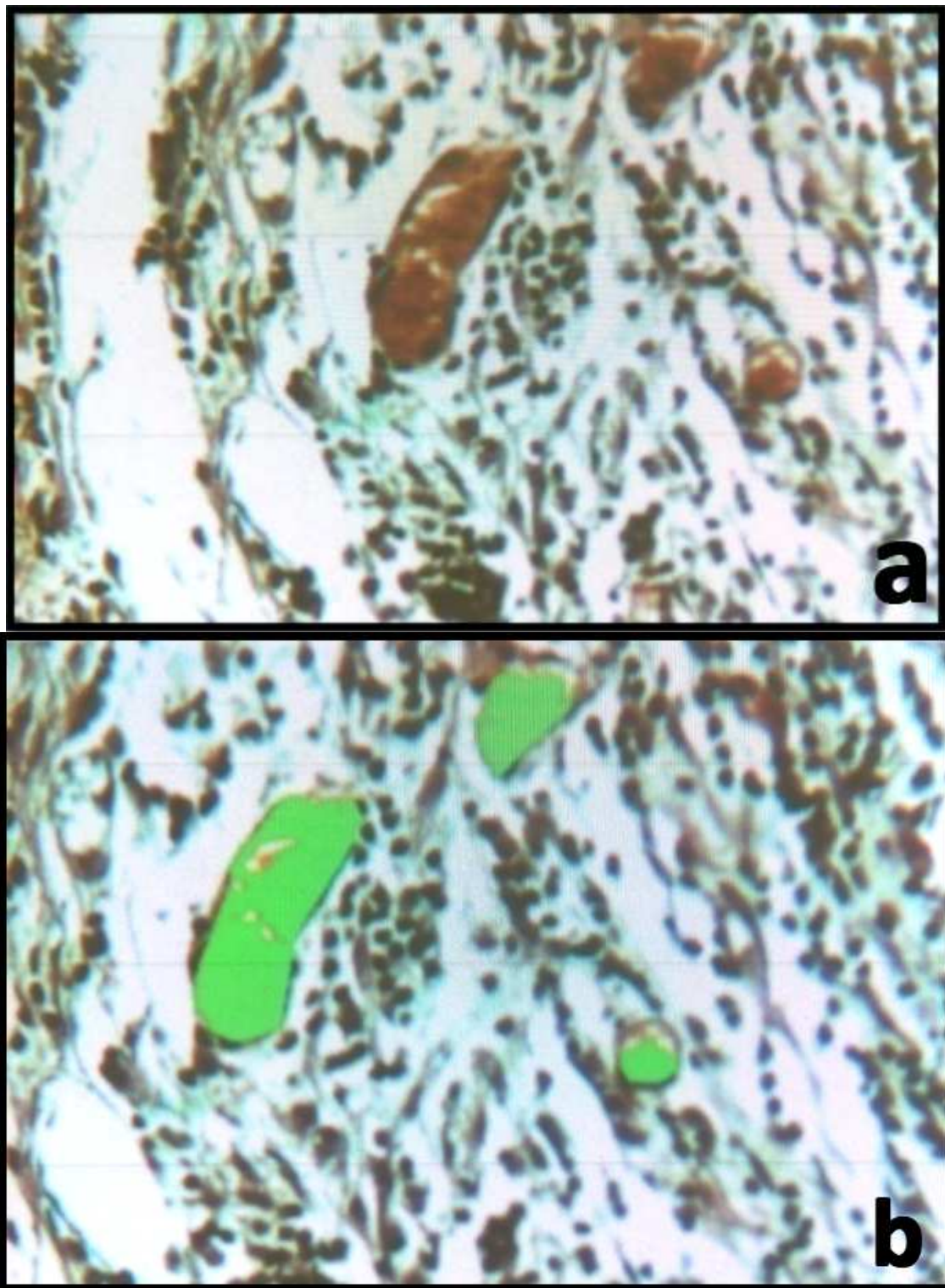
\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  mediante un test  $t$  de Student

**Gráfico 7.** Gráfico comparativo de la evolución del volumen tumoral en el total de ratas tratadas con ACF y ratas control. Cada pequeño cuadrado indica la media con su error estándar. A los 7 días no es estadísticamente significativo. A partir del 13º de evolución empieza a ser estadísticamente significativo. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  mediante un test  $t$  de Student.

Por tanto, la ACF, en nuestro modelo de estudio animal, es capaz de disminuir el tamaño y la progresión del tumor de manera estadísticamente significativa sin modificar el peso del animal.

### **2.3 ANGIOGÉNESIS TUMORAL.**

Se realizó un estudio comparativo de la angiogénesis entre los cortes histológicos del tumor de las ratas control y las tratadas con ACF. Mediante el software Motic Image se pudo seleccionar los vasos que aparecían en cada corte histológico (Figura 13) marcándolos con una coloración digital.

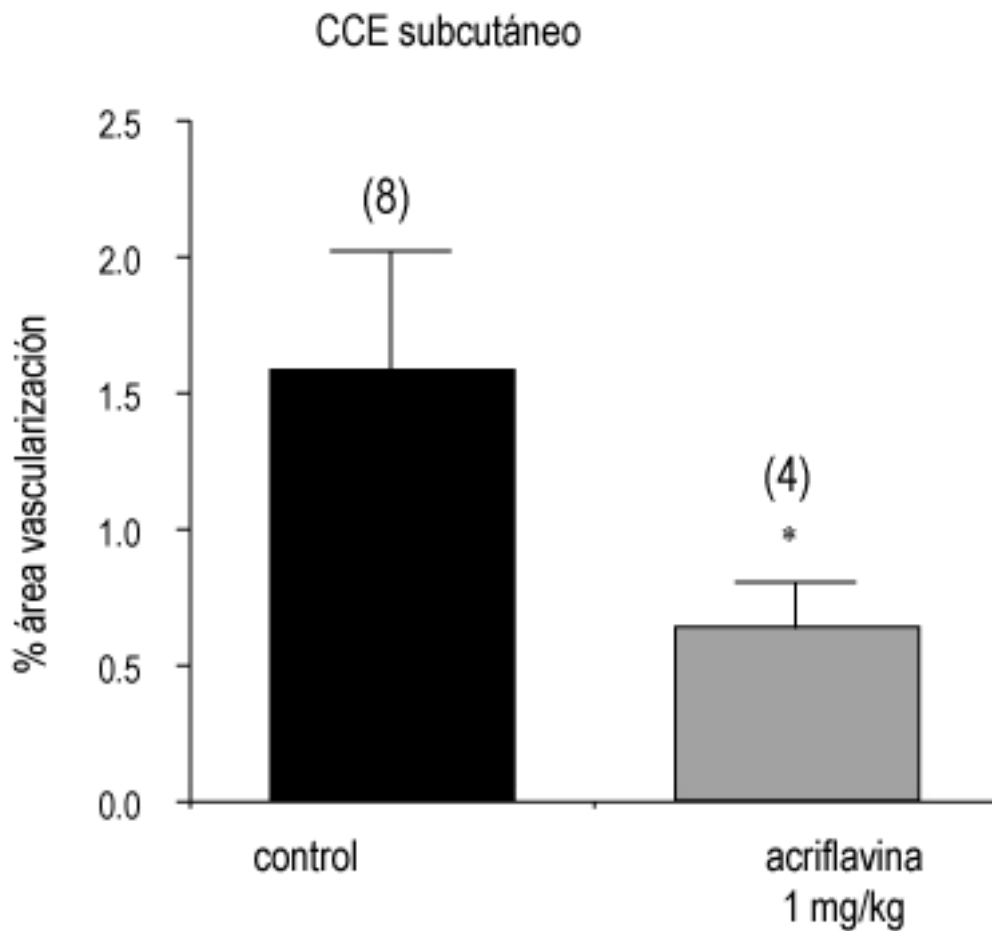


**Figuras 13. a:** Corte histológico (x20) del tumor teñido con hematoxilina eosina. **b:** Mediante el software Motic Image se ha coloreado digitalmente de verde los vasos sanguíneos.

Calculando el porcentaje de área coloreada respecto al área seleccionada, 0,176 mm<sup>2</sup>, se obtiene el tanto por ciento de área de vasos de una de las fotos de un corte histológico como se explica en el apartado métodos. (Tabla 5, gráfico 8).

<b>MACHOS ACF</b>	<b>ACF1</b>	<b>ACF2</b>	<b>ACF3</b>	<b>ACF4</b>		
	0,516	1,136	0,403	0,504		
<b>MACHOS CONTROL</b>	<b>CTR1</b>	<b>CTR2</b>	<b>CTR3</b>	<b>CTR4 **</b>	<b>CTR5</b>	<b>CTR6</b>
	0,73	1,798	1,367	4,562	0,829	1,257
<b>HEMBRAS CONTROL</b>	<b>CTR7 H</b>	<b>CTR8 H</b>				
	0,808	1,283				

**Tabla 5.** Porcentaje medio del área vascularizada en los cortes histológicos de cada una de las ratas tratadas con ACF y control. El CTR4\*\* corresponde al macho control de larga evolución que se sacrificó al cabo de 6 semanas de evolución tumoral.



\*  $p < 0.05$  vs control, test no paramétrico Mann-Whitney

**Grafico 8.** Resultados del área de vascularización de los cortes histológicos de los tumores en ratas control y tratadas con ACF.  $p < 0.05$  Mann-Whitney.

El gráfico 8 muestra que los tumores de los animales tratados con ACF presentan un porcentaje de área vascular menor que en el grupo control.

Es característico el gran porcentaje de área vascular que presenta la rata control de larga evolución sacrificada al cabo de 6 semanas.

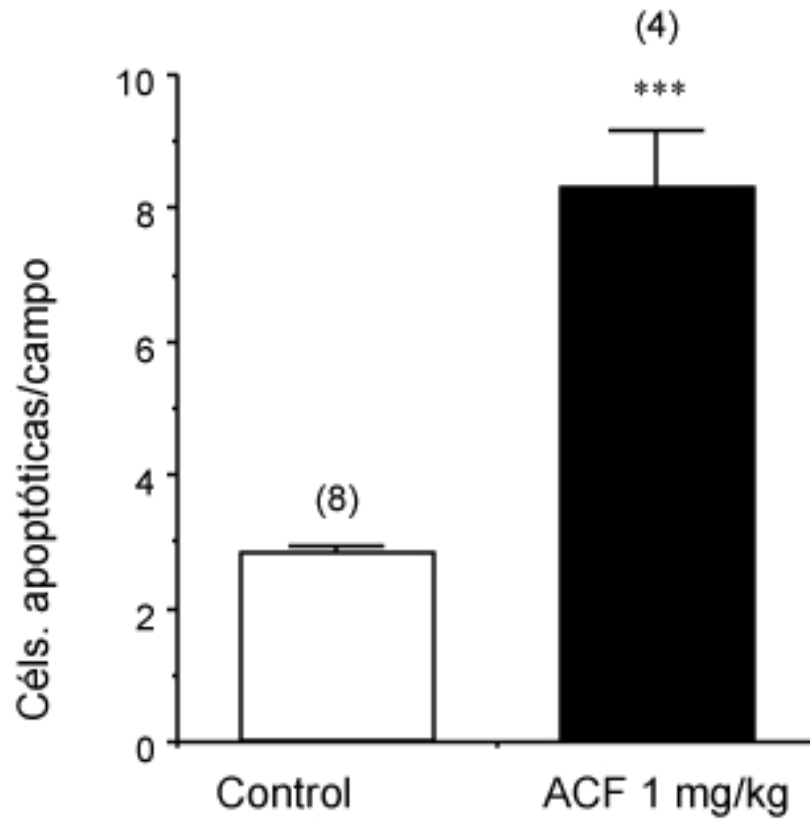
## 2.4 ESTUDIO DE APOPTOSIS MEDIANTE TÉCNICA TUNEL

De cada corte histológico se realizaron 6 fotografías (figura 14 a y b), como se explica en el apartado métodos, para contaje manual de los núcleos teñidos de marrón o apoptóticos. Se sumaron todos los núcleos apoptóticos contados en cada área y se calculó la media (Tabla 6). Existe aumento de la apoptosis en los cortes histológicos de los tumores tratados con ACF (Gráfico 9).

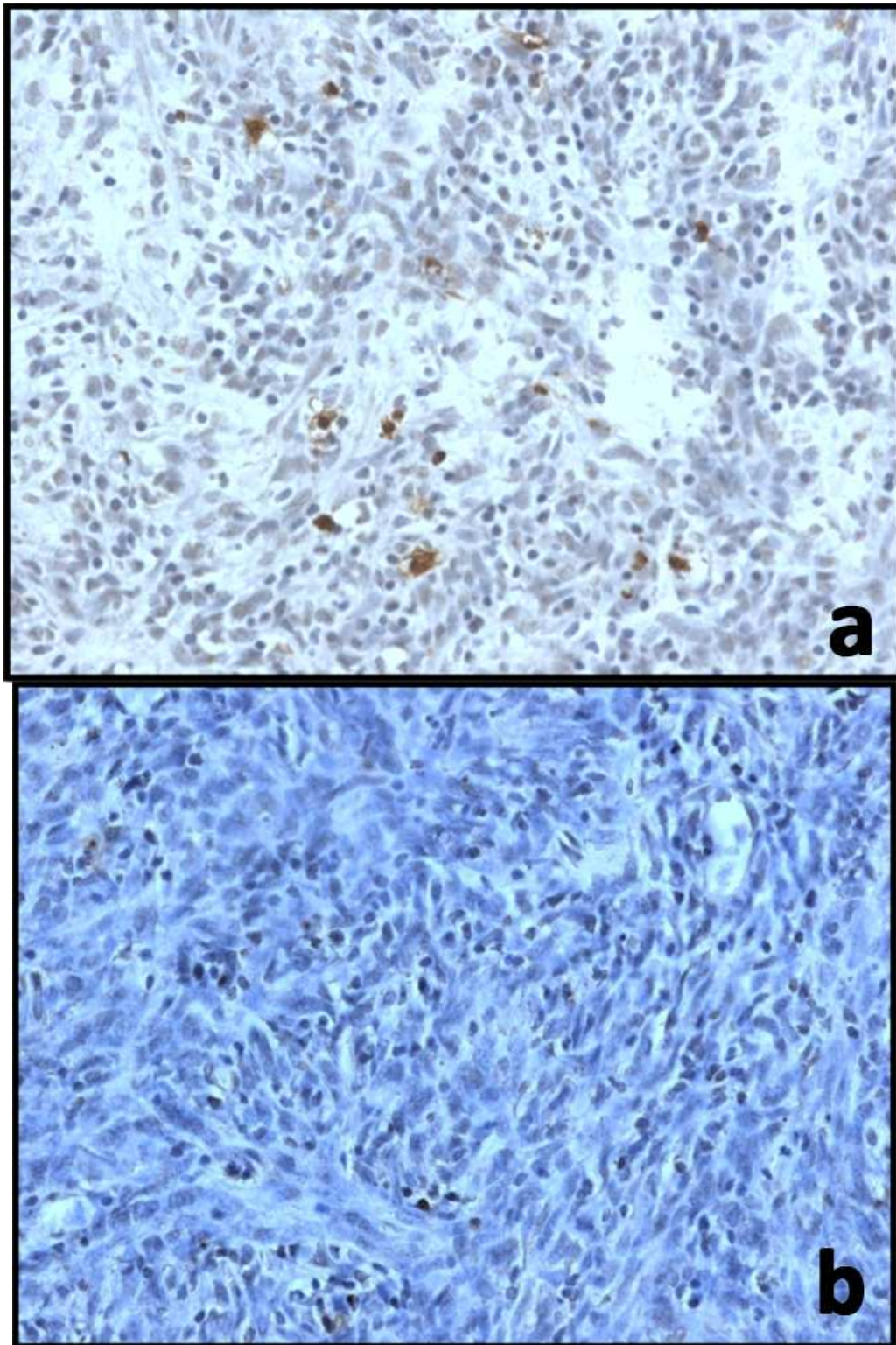
<b>MACHOS ACF</b>	<b>ACF1</b>	<b>ACF2</b>	<b>ACF3</b>	<b>ACF4</b>		
	10	8,2	9	6		
<b>MACHOS CONTROL</b>	<b>CTR1</b>	<b>CTR2</b>	<b>CTR3</b>	<b>CTR4</b>	<b>CTR5</b>	<b>CTR6</b>
	3	2,6	3,4	3,1	2,5	2,5
<b>HEMBRAS CONTROL</b>	<b>CTR7 H</b>	<b>CTR8 H</b>				
	2,9	2,7				

**Tabla 6.** Media del número de núcleos apoptóticos contados en 6 áreas de 0,176mm<sup>2</sup> con microscopio óptico x20.





**Grafico 9.** Muestra comparativa del número de células apoptóticas en grupo control y grupo tratado con ACF. Existe mayor número de células apoptóticas en el grupo tratado con ACF.  $p < 0.0001$  mediante un test t de student.



**Figura 14.** **a:** Corte histológico ( $\times 20$ ) de tumor tratado con ACF. Los núcleos apoptóticos aparecen teñidos de marrón. **b:** Corte histológico ( $\times 20$ ) de tumor control donde no se observan núcleos apoptóticos. Los cortes se contrastan con técnica TUNEL tinción hematoxilina.

## 2.5 ESTUDIO BIOQUÍMICO

Se realizaron determinaciones bioquímicas tras la muerte por exanguinación de las ratas Fisher para comparar el grupo control y el grupo tratado. En la tabla 7 se añaden los valores de referencia que son los valores medios obtenidos en suero de ratas Fisher de 11-12 semanas aportados por el criador (*Harlam Laboratorios, EEUU*). Las transaminasas, GOT y GPT, disminuyen en el grupo tratado con ACF, la creatinina e iones apenas presentan variación.

Tratamientos	Creatinina (mg/dL)	Sodio (mM)	Potasio (mM)	Cloro (mM)	GOT (U/L)	GPT (U/L)
<b>Control (n=8)</b>	0.74±0.04	143.8±1.1	6.02±0.81	99.5±1.1	131.5±25.0	67.3±5.1
<b>ACF (n=11)</b>	0.65±0.04	142.7±0.7	6.62±1.07	98.2±2.2	101.2±4.8	50.5±3.8*
<b>Valores de referencia</b>	0.58	151	5.4	98	144	81.5

**Tabla 7.** Efecto del tratamiento con ACF en diferentes parámetros bioquímicos en ratas implantadas con células FAT-7. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media, determinados en muestras de suero obtenidas en el momento del sacrificio para la extirpación del tumor.

## **DISCUSIÓN**

El tratamiento quimioterápico actúa interfiriendo con la capacidad de crecimiento y reproducción de las células cancerosas. Es un tratamiento inespecífico e ineficaz ya que afecta también a células normales, sobre todo las que se dividen más rápidamente, conllevando muchos efectos secundarios.

El conocimiento de las bases moleculares implicadas en la génesis tumoral, propagación y metástasis ha permitido en los últimos años el desarrollo de nuevos compuestos dirigidos específicamente a neutralizar las vías de señalización intracitoplasmática que se encuentran anómalas expresadas en los cánceres. El desarrollo de estos medicamentos se ha dirigido fundamentalmente a la inhibición de la activación del VEGF, FGF y EGF que se encuentran hiperactivados en muchos cánceres como el de cabeza y cuello. Las recientes investigaciones demuestran que la terapia molecular dirigida a estos factores de crecimiento puede ser eficaz en el tratamiento del CECC y ofrece nuevas opciones terapéuticas para pacientes graves que no toleran la quimioterapia o radioterapia <sup>(62)</sup>. Estos factores de crecimiento son proteínas que, al unirse a sus receptores específicos, activan señales intracelulares que, a su vez, actúan sobre diferentes genes de las células tumorales que controlan la diferenciación, la proliferación y la supervivencia. Además, tanto el FGF como el VEGF son dos potentes inductores de la angiogénesis tumoral. Por todo ello, el sistema constituido por el ligando y su receptor (FGF/FGFR; VEGF/VEGFR y EGF/EGFR) es una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. La inhibición farmacológica de este sistema puede conseguirse de tres maneras distintas:

- Modificando la estructura del factor de crecimiento para impedir su unión con el receptor como el *Avastin*<sup>®</sup> (Bevacizumab) que interactúa en la unión VEGF/VEGFR.
- Modificando el receptor para neutralizar el acoplamiento del receptor con el ligando.
- Inhibiendo la fosforilación del dominio intracitoplasmático con actividad tirosín quinasa como los fármacos *Tarceva*<sup>®</sup> (Erlotinid) e *Iressa*<sup>®</sup> (Gefitinib) que actúan a través del receptor EGFR.

De las tres posibilidades, la tercera es la que puede dar lugar a más efectos secundarios severos, debido a los numerosos procesos de fosforilación de proteínas que existen en las células y la alta semejanza entre ellos. En general, tanto los fármacos destinados a modificar la estructura del ligando como la porción extracelular del receptor son anticuerpos de ratón humanizados. Al ser proteínas, estos fármacos deben ser administrados por vía intravenosa condicionando su uso hospitalario. Los fármacos dirigidos a inhibir la porción intracitoplasmática del receptor son compuestos sintéticos y por tanto se administran por vía oral.

El empleo clínico de estos compuestos, *Avastin*<sup>®</sup>, *Tarceva*<sup>®</sup> e *Iressa*<sup>®</sup>, no ha cumplido las expectativas que inicialmente despertaron y además se asocian a efectos secundarios importantes. El primero de ellos, *Avastin*<sup>®</sup>, no parece prolongar la supervivencia libre de enfermedad en el tratamiento de las metástasis del cáncer de colon y de pulmón <sup>(110)</sup>. Parece tener resultados alentadores cuando se combina con pemetrexed como ocurre en el tratamiento de las metástasis de CECC <sup>(8)</sup>. Se asocia a efectos secundarios como fatiga, cefalea, hipertensión, hemorragias, tromboembolismo, isquemia arterial, retraso la cicatrización de heridas, insuficiencia cardiaca o proteinuria. Los compuestos *Tarceva*<sup>®</sup> e *Iressa*<sup>®</sup> se han estudiado en el cáncer microcítico de pulmón y de ovario en combinación con quimioterápicos agentes de platino y parece aumentar la capacidad anticancerígena<sup>(114)</sup>. Se han realizado ensayos de fase I con el *Tarceva*<sup>®</sup> en combinación con Celecoxib y radioterapia recurrente en pacientes con recidiva de CECC <sup>(86)</sup> pero se necesitan más estudios que prueben su eficacia. El tratamiento se asocia a frecuentes efectos secundarios como diarrea, prurito generalizado, sequedad de piel, pérdida de peso, pérdida de pelo, náuseas y vómitos, astenia, fiebre, depresión, cefalea, dolor de estómago y queratoconjuntivitis.

Recientemente, el HIF-1 ha sido foco de atención de compañías farmacéuticas para inhibirlo. El *Albendazol*<sup>®</sup> es un compuesto derivado de los benzimidazoles que se viene utilizando en la infecciones parasitarias pero que es capaz de inhibir al HIF-1 y presenta efecto anti VEGF <sup>(126,127)</sup>. Se han realizado estudios del *Albendazol*<sup>®</sup> *in vitro* y en xenoinjertos en modelos

animales que demuestran supresión del crecimiento tumoral en la carcinogénesis peritoneal de origen colorrectal <sup>(125)</sup>. Induce apoptosis a través de la vía de la activación de la caspasa-3, potente inductor de la apoptosis.

En el presente trabajo hemos estudiado la actividad de la ACF, una sustancia que posee un mecanismo de acción similar al *Albendazol*<sup>®</sup>.

Los ensayos *in vitro* muestran que la ACF inhibe la proliferación de las células FAT-7. No se evidencia efecto alguno del Dobesilato o el Ácido Cafeico en esta línea de células. Sin embargo, el DHC-ME, es capaz de inhibir también la proliferación pero sólo a dosis muy altas. La dosis de ACF necesaria para inhibir la proliferación celular al 50 por ciento del grupo control es de 5µM mientras que para el DHC-ME es de 50µM, es decir, 10 veces más. Esto puede explicarse porque el mecanismo de acción de la ACF es diferente al del Dobesilato, DHC-ME y Ácido Cafeico. El primero interacciona a través de HIF-1 y VEGF <sup>(84)</sup> como se explicará más adelante mientras que las otras drogas inhiben FGF <sup>(31)</sup>. Es probable que la proliferación de nuestra línea celular no muestre sobreexpresión de FGF, al contrario de lo que ocurre con células endoteliales. Tong <sup>(146)</sup> publicó en 2008 que las células de CECC producen altos niveles de VEGF en cultivos celulares y por tanto, una de las vías de tratamiento sería la terapia inhibitoria del VEGF para evitar sus efectos proangiogénicos y protumorigénicos.

Nuestros resultados *in vitro* se correlacionan con los obtenidos por Goldie en 1959 <sup>(63)</sup>. Fue el primer artículo que relacionó la ACF con células tumorales. Describe los efectos tópicos de la ACF en el crecimiento e invasión de células tumorales de vejiga y mama. Realizó estudios *in vitro* e *in vivo*. Los primeros, demostraron que la ACF era capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales Krebs-2 o S-180 porque interfería con los metabolitos de adenina.

Los ensayos *in vivo* son esenciales para confirmar resultados obtenidos *in vitro*, y deben ser simples, rápidos, efectivos, reproducibles, fiables y causar el menor daño posible a los animales de experimentación <sup>(10,57)</sup>. Era de gran interés realizar estudios *in vivo* con la ACF debido a los buenos resultados obtenidos *in vitro*. La función de la ACF de inhibir la proliferación celular tenía que ser demostrada también en animales de experimentación.

El tratamiento diario con 1mg/kg de ACF i.p entre los días 8 y 21 desde la implantación subcutánea de células FAT-7 disminuye el volumen tumoral en ratas Fisher de manera estadísticamente significativa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por KangAe en 2009 <sup>(84)</sup>: realizó un ensayo de proliferación celular similar al nuestro y demostró que la ACF, a dosis 1mg/kg y tras 7 días de administración diaria i.p, inhibía el crecimiento tumoral en ratones inducidos por implante de células de cáncer de próstata humano. Otros estudios como los de Chakraborty, 1984 <sup>(23)</sup>, o Kim, 1997 <sup>(91)</sup>, demuestran el efecto antitumoral de la ACF a dosis 1mg/kg frente a células tumorales de carcinoma de Ehrlich implantadas en modelos animales. Es capaz de inhibir la tasa de crecimiento tumoral en aproximadamente un 30 por ciento y su efecto puede llegar hasta un 65 por ciento cuando se asocia con guanosina. Goldie en 1959 <sup>(63)</sup> valoró en ratones la concentración de células tumorales en líquido ascítico tras ser implantados con una suspensión de células tumorales Krebs-2 y S-180 en una solución de suero salino comparado con una solución de ACF a 1mg/ml. La ACF inhibía el crecimiento tumoral, la invasión tumoral sistémica, la implantación en el tejido peritoneal y presentaba una baja toxicidad. Se practicó también la administración tópica y precoz de ACF a dosis 0,2mg en 2 ml de suero en las regiones del escroto y el cuero cabelludo donde habían sido implantadas las células tumorales a nivel subcutáneo y se comprobó su efecto antiproliferativo. No existe ningún trabajo hasta la fecha que estudie el efecto de la ACF frente al CECC en un modelo animal.

Como la angiogénesis es un proceso biológico esencial en el crecimiento y metástasis tumorales hemos realizado una selección aleatoria de un corte histológico de cada uno de los tumores que se extirpó previo al sacrificio del animal para cuantificar la vascularización tumoral. Sólo hemos podido estudiar el efecto antiangiogénico de la ACF en 4 de ellos, todos ratas macho, ya que en el resto de animales se objetivó remisión completa tumoral. Los resultados obtenidos apoyan que el crecimiento tumoral en los animales no tratados viene acompañado de mayor número de vasos sanguíneos y de mayor calibre y que los tumores tratados presentan una densidad menor de vasos; por tanto, existe un efecto antiangiogénico en los tumores tratados con ACF. Dray <sup>(39)</sup> estudió la



angiogénesis como marcador pronóstico en el CECC y presentó resultados similares a los nuestros. Estableció que existía correlación entre crecimiento tumoral y metástasis y un conteo alto de microvasos en los cortes histológicos de CECC. Artese en 2001 <sup>(9)</sup> publicó que no existía asociación entre la secreción de VEGF y la densidad de microvasos. Estos datos sugieren que la expresión de VEGF puede cumplir otras funciones además de la angiogénesis en el CE como inductor de la proliferación y aumento de la invasión celular <sup>(94, 146)</sup>.

El mecanismo de acción de la ACF se explica porque:

- a)** La ACF inhibe la dimerización de HIF-1 $\alpha$  (o HIF 2 $\alpha$ ) con HIF- 1 $\beta$  de forma concentración dependiente y es capaz de disminuir la actividad de transcripción del HIF-1 como demuestran los estudios de coimmunoprecipitación. Para ello, se une directamente al subdominio PAS-B del HIF-1 $\alpha$  y HIF- 2 $\alpha$  e interrumpe su interacción con el HIF-1 $\beta$ . La ACF no induce la homodimerización del HIF-1 $\alpha$ . Además Inhibe la unión y transcripción del HIF-1 al ADN inhibiendo el ARNm del VEGF y de la proteína GLUT-1 de forma también dosis dependiente <sup>(84)</sup>. Por tanto, la ACF es un compuesto antiangiogénico pues inhibe la actividad del VEGF que es un potente inductor de la angiogénesis.
- b)** La ACF reduce la expresión del VEGF, del factor derivado del estroma extracelular o citocina SDF-1, del factor de células madre SCF, de GLUT1 y de las kalicreínas HK1 y HK2, todos ellos implicados en la angiogénesis y por tanto guardan relación con la invasión y progresión tumoral <sup>(84)</sup>. Los VEGF, SDF-1 y SCF inducen la movilización de células angiogénicas (CACs, término que designa a una población heterogénea que incluye células progenitoras endoteliales, células madre mesenquimales y otras células que estimulan la angiogénesis tumoral) desde la médula ósea a la sangre periférica. El HIF-1 juega un papel fundamental en estos procesos debido a que interfiere en la señal de VEGF ya que los niveles de VEGFR2 (receptor de VEGF que media las respuestas celulares) / CD117 (ligando del SCF que se expresa en timocitos, melanocitos y células del tracto digestivo), VEGFR2 / CD34

(molécula de adhesión que se expresa en células endoteliales progenitoras), CXCR4 (ligando de SDF-1) se incrementan aproximadamente 5 veces en los ratones portadores de tumor en comparación con los ratones sin tumores<sup>(40)</sup>. La ACF inhibe la expresión de ARNm que codifica VEGF, SDF1, y SCF (que son los ligandos unidos por VEGFR2, CXCR4, y CD 117, respectivamente) en xenoinjertos PC-3 (células cancerosas prostáticas humanas).

Los tumores precisan de una neovascularización para su crecimiento y proliferación. El efecto antiangiogénico provoca que las células tumorales no puedan recibir nutrientes ni oxígeno para sobrevivir y replicarse indefinidamente. Por tanto, factores angiogénicos favorecerían la progresión y la invasión tumoral. Según esta hipótesis se han realizado estudios que establecen la relación entre los factores angiogénicos y el pronóstico del cáncer. Stacker en 2001<sup>(143)</sup> estableció una relación entre metástasis tumoral y nivel altos de VEGF. Sin embargo, varios estudios retrospectivos mostraron que no existe correlación entre los niveles de VEGF y el pronóstico del CECC<sup>(135)</sup> mientras que otros ponen de manifiesto que niveles altos de VEGF se asocian a mayor progresión tumoral, mayor recidiva tumoral y menor supervivencia<sup>(120)</sup>. Estas discrepancias pueden estar motivadas por un enfoque metodológico distinto. Los anticuerpos neutralizantes anti VEGF reducen los niveles de VEGF y son capaces de inhibir la angiogénesis y bloquear el crecimiento de tumores experimentales murinos<sup>(16,73)</sup>. Al menos 3 receptores tirosina kinasa se han identificado para el VEGF en el CE, entre los cuales, el VEGFR-2 se considera el mediador dominante de la mitogénesis en las células endoteliales<sup>(85)</sup>. Se pensaba que los receptores del VEGF se expresaban exclusivamente en células endoteliales pero recientes estudios han demostrado que las células epiteliales del cáncer, incluyendo el CECC, también expresan VEGFR-1 y/o VEGFR-2<sup>(95,144)</sup>. Altos niveles de VEGF en tumores de CECC se correlacionaban con la expresión de VEGFR-2 y progresión tumoral<sup>(94)</sup>.

Existen además otros factores angiogénicos que guardan reacción con el CECC: Weimin estableció que niveles altos de factor de crecimiento de fibroblastos unido a

proteínas (FGF-BP) vinculado a la actividad angiogénica del CECC se encuentran en tumores primarios y algunas células metastásicas de CECC pero no en los tejidos sanos <sup>(150)</sup>. La endoglina es un marcador de neovascularización en los tumores sólidos. Funciona como una proteína accesoria que interactúa en la unión de los receptores con la familia TGF- $\beta$  (factor de crecimiento celular, proliferación celular, diferenciación y apoptosis). Sirve para el correcto desarrollo de los vasos sanguíneos y es un marcador asociado a la proliferación endotelial. En el CE los niveles altos de endoglina y VEGF podrían relacionarse con mayor tamaño tumoral (T), metástasis linfáticas cervicales (N) y pobre diferenciación del tumor a nivel histológico <sup>(135)</sup>. Por tanto, si se consigue interferir en la señal angiogénica de un tumor podremos evitar su progresión.

Con la técnica del TUNEL hemos observado un mayor efecto apoptótico en los cortes histológicos de los tumores que fueron tratados con ACF respecto a los tumores control. Histológicamente, la célula apoptótica aparece como una masa redondeada u oval de citoplasma fuertemente eosinófilo con fragmentos de cromatina nuclear densa. La constricción celular y la formación de cuerpos apoptóticos tienen un comienzo abrupto y una duración de pocos minutos. Sin embargo, los cuerpos de apoptosis permanecen en el tejido aproximadamente dos horas hasta que son degradados o fagocitados. Por otro lado, la apoptosis al contrario que la necrosis, no produce respuesta inflamatoria, lo que la hace más difícil de detectar desde un punto de vista histológico. Debido a estas dificultades, el método más adecuado para identificar células en estado de apoptosis es el marcaje *in situ* del ADN fragmentado o técnica del TUNEL <sup>(58)</sup>. Es un método para la detección de fragmentos internucleosomales. Es decir, en las últimas etapas de la apoptosis se activan endonucleasas que fragmentan el ADN del núcleo de las células. Éstas endonucleasas digieren el ADN internucleosomal, produciendo fragmentos múltiple de 180 pares de bases aproximadamente. Mediante esta técnica se visualizan por medio de tinción nuclear aquellas células que presentan fragmentos de ADN características de apoptosis. Incluso se detectan células con características bioquímicas de apoptosis y sin rasgos morfológicos celulares aún de apoptosis (preapoptosis).

No existen datos que demuestren el efecto apoptótico de la ACF en células tumorales. Sin embargo, está demostrado, mediante microscopía electrónica, que la ACF causa apoptosis y necrosis en la levadura *Cándida Utilis* en cultivos celulares <sup>(89)</sup>. El mecanismo por el cual se objetivan más apoptosis en los tumores tratados con ACF puede relacionarse con la interacción sobre el HIF-1 <sup>(75)</sup>. Varios estudios experimentales indican que la interrupción de HIF-1 inhibe la señalización del crecimiento tumoral en modelos de ratón <sup>(139)</sup>. Por tanto, la inhibición de HIF-1 pueda ser una diana terapéutica para el tratamiento del CE nasal y por extensión del CECC. Para ello se tendrían que cumplir las siguientes premisas:

- a) Los niveles de HIF-1 estén elevados en el CECC. Así lo demuestran los trabajos de Brennan <sup>(17)</sup> sobre el CE de suelo de boca publicando que los niveles de HIF-1 se encuentran incrementados en el CECC. Demostró que la expresión HIF-1 era dependiente de las enzimas sintetasas de NO sin llegar a establecer un mecanismo de acción. Secades publicó en 2009 <sup>(137)</sup> que los niveles de HIF-1 $\alpha$  estaban elevados en el CECC y así las células tumorales podían estar alertas ante un medio de hipoxia celular. Aumento de los niveles de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  se encuentran no sólo en el CECC sino también en el cáncer de pulmón, de colon, mama y próstata humano y se asocian con progresión de la enfermedad y una mayor mortalidad de los pacientes <sup>(139)</sup>.
- b) Los niveles altos de HIF-1 se correlacionen con un peor pronóstico en la enfermedad. Aebersold <sup>(3)</sup> estudió los niveles de HIF en el CECC (orofaringe) y concluyó que las células tumorales bajo condiciones de hipoxia presentaban altos niveles de HIF-1 y eran más resistentes a la radioterapia y quimioterapia. Por tanto, eran tumores con un peor pronóstico. La expresión del HIF-1 $\alpha$  se correlaciona con mayor invasión tumoral, metástasis linfáticas cervicales y a distancia, márgenes positivos quirúrgicos y menor supervivencia en el carcinoma escamoso de esófago <sup>(93)</sup>. Eckert, en 2011 <sup>(42)</sup>, realizó una investigación en ochenta y dos muestras de CE de cavidad oral. Analizó mediante inmunohistoquímica los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  y del

transportador de glucosa GLUT-1. Concluyó que la coexpresión de altos niveles de GLUT-1 y HIF-1 $\alpha$  se asocia con mal pronóstico y disminuye la supervivencia en este tipo de tumor. Los pacientes cuyos tumores habían aumentado los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  y de GLUT-1 tenían un riesgo 5,13 veces mayor de muerte relacionada con el tumor ( $p = 0,017$ ).

- c) La inhibición de HIF-1 posee un efecto antitumoral. Artículos recientes como el de Zhu en 2011 <sup>(157)</sup> proponen la inhibición del HIF-1 $\alpha$  como terapia válida para el tratamiento del CE de esófago gracias a sus estudios realizados en xenoinjertos en ratones. Con la inhibición de HIF-1 $\alpha$  descienden los niveles de VEGF y esto conlleva una inhibición de la angiogénesis como se ha mencionado y un efecto antiproliferativo ya que la expresión de VEGF puede cumplir otras funciones además de la angiogénesis en el CE como aumento o mantenimiento de la proliferación celular y por tanto mayor invasión de los carcinomas <sup>(94,146)</sup>. Actualmente existe un gran interés en la búsqueda de antiguos fármacos utilizados en diferentes patologías que pueden ser útiles en el tratamiento de carcinomas debido al efecto inhibitorio del HIF. Presentan varios mecanismos de acción como la reducción en los niveles de ARNm del HIF-1 o actuando en la transactivación de genes diana o interfiriendo en el ADN <sup>(109)</sup>: 2-3-(5'-hidroximetil-2'-furilo)-1-bencil-indazol (YC1) se utilizó anteriormente como un inhibidor de la agregación plaquetaria. Disminuye la cantidad de ARNm de la EPO y VEGF, suprime la capacidad de HIF-1 de unirse al ADN y reduce la cantidad de HIF-1 $\alpha$ . El YC1 se administró a ratones inmunodeficientes que recibieron xenoinjertos de cinco tipos diferentes de tumores humanos. En todos los casos, la molécula reduce la expresión de HIF1 $\alpha$  y la vascularización tumoral. A dosis clínicamente eficaz presenta baja toxicidad celular. Su mecanismo molecular no está claro <sup>(155)</sup>. Geldanamicina, Radicol o sus derivados, KF58333, tienen un efecto antitumoral significativo y disminuyen la expresión y actividad de transactivación de la subunidad  $\alpha$  de HIF-1 y por tanto la angiogénesis e invasión tumoral en células tumorales de próstata <sup>(7, 118)</sup>.

Tiorredoxina (TRX1) es una proteína que participa en la reducción de los residuos de cisteína de muchas proteínas, incluyendo factores de transcripción. Altos niveles de esta proteína se relacionan con tumorigénesis y peor pronóstico en el CE de lengua <sup>(158)</sup>. Su inactivación conduce a la inhibición de HIF1 $\alpha$  y a una disminución en la expresión de la proteína VEGF <sup>(151)</sup>.

Sin embargo, existen publicaciones que demuestran que el HIF-1 puede funcionar como un gen supresor de tumores. Puede suprimir oncogenes que se asocian a mal pronóstico e inducir genes proapoptóticos en neoplasias epiteliales y en el CECC <sup>(136)</sup>. Aunque todavía las interacciones de HIF-1 con p53 en el ciclo celular o con proteínas de la familia c-Myc sigue siendo controvertida. Los trabajos de Beasley <sup>(13)</sup> o de Fillies <sup>(48)</sup> presentan interesantes resultados al respecto. El primero nos muestra en un análisis multivariante una mejor supervivencia en tumores de cabeza y cuello con sobreexpresión del HIF-1 $\alpha$  cuando el tratamiento era la resección quirúrgica. El segundo relaciona niveles altos de HIF-1 con pronóstico tumoral favorable en aquellos carcinomas epidermoides de suelo de boca de estadios iniciales (T1 o T2) y sin metástasis cervical (N<sub>0</sub>). Sin embargo no explican la correlación entre oncogenes y niveles de HIF.

Lo anteriormente expuesto justifica la hipótesis de que la ACF puede tener efecto antiangiogénico y proapoptótico. El estudio realizado con ACF tanto *in vitro* como *in vivo* se ha realizado en condiciones de normoxia. Los niveles de HIF-1 aumentan exponencialmente cuando disminuye la concentración de oxígeno a nivel tisular, y por tanto, se produce la estimulación de los genes regulados por el HIF-1 y sus efectos posteriores como ya se ha explicado. Hay otros mecanismos de regulación de HIF-1 $\alpha$  que son menos dependientes de la disponibilidad de oxígeno y dependen más de las condiciones celulares específicas como el calcio o la presencia de factores de crecimiento entre ellos la insulina, IGF-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\beta$  y EGF <sup>(154,25)</sup>. El medio de cultivo empleado para las células FAT-7 fue suplementado con suero fetal bovino, hidrocortisona, transferrina e insulina rápida. Se necesitarían más estudios para comprobar si

la insulina añadida al medio F12K ha sido factor añadido o determinante de que aumentaran los niveles de HIF-1 en las células FAT-7.

Como hemos demostrado en los resultados, existe una disparidad en la respuesta al tratamiento de ratas macho y hembra. El volumen tumoral remite por completo en todas las hembras que fueron tratadas con ACF al cabo de los 22 días de evolución. El tamaño tumoral de las ratas hembra control disminuía en una de ellas a partir del 13<sup>o</sup> día a diferencia del grupo de machos control donde todas ellas desarrollaron tumor que progresivamente fue creciendo a lo largo de las 3 semanas.

Existen diferentes factores que, sin tener un papel directo en el proceso angiogénico, sí desempeñan funciones moduladoras que pueden potenciar o inhibir los efectos de otros factores directamente implicados. De la larga lista de moduladores angiogénicos descritos vamos a destacar los estrógenos: El estradiol y sus metabolitos tiene unos efectos bien conocidos sobre la pared vascular, que afectan al metabolismo lipídico y al tono vascular y que implican un retraso en procesos de engrosamiento de dicha pared relacionados con la edad. Los estrógenos potencian los efectos de VEGF en los tejidos que experimentan angiogénesis fisiológica en el ciclo reproductivo femenino (cuerpo lúteo, endometrio) <sup>(80)</sup>. Por este motivo, ratas ovariectomizadas muestran una menor respuesta angiogénica cuando son inyectadas con matrices de matrigel conteniendo FGF-2, respuesta que es recuperada con la aplicación subcutánea de estrógenos <sup>(68)</sup>.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo comparando machos y hembras podrían explicarse por:

- Las células tumorales inyectadas podrían expresar receptores de estrógenos que al unirse con el estradiol o sus metabolitos interfieren en la progresión del tumor.
- El papel de los estrógenos, en cualquier caso, debe ser más complejo, ya que mientras que el estradiol potencia la morfogénesis de las células endoteliales, el metabolito 2-metoxiestradiol inhibe la angiogénesis en modelos animales <sup>(113)</sup>.

En cualquier caso, se necesitarían más estudios para evaluar estas hipótesis.

En nuestro estudio *in vitro* e *in vivo* se ha constatado la ausencia de toxicidad de la ACF. No ha habido diferencias significativas en cuanto al peso del animal en ratas control y tratadas. Tampoco ha existido hepato o nefro toxicidad por la invariabilidad en los niveles de transaminasas o creatinina respectivamente. Incluso, las primeras han bajado respecto al grupo de referencia y grupo control. Tampoco han variado los niveles de sodio, potasio o cloro en el estudio.

Es importante destacar que, a diferencia de los fármacos citostáticos, no se ha descrito en la bibliografía que la ACF tuviera importantes efectos secundarios en su experiencia clínica como antiséptico de heridas cutáneas<sup>(63, 84)</sup>. Hay una publicación de Marshall en 1936<sup>(106)</sup> sobre un caso clínico que fue tratado con ACF vía oral durante dos meses por infección uretral y murió de fallo hepático agudo con toxicidad cardiaca asociada. El artículo concluye que se necesitan trabajos experimentales que confirmen este hallazgo.

La terapia con ACF sigue los principios sobre inhibidores de angiogénesis de Folkman<sup>(49,52,53)</sup> descritos entre los años 1996 y 2000 a excepción de que el estudio realizado no se ha dirigido a células endoteliales sino a células malignas. Según Folkman la terapia antiangiogénica suele tener baja toxicidad y se dirige principalmente sobre células endoteliales capilares proliferantes y no provoca mielosupresión, síntomas gastrointestinales o pérdida de cabello. Además, su eficacia óptima parece obtenerse como tratamiento diario o intermitente durante largos periodos de tiempo (meses a un año) sin intervenciones en la terapia. Por último, una combinación de terapia antiangiogénica y terapia citotóxica puede ser curativa en animales portadores de tumor para los cuales cada estrategia por separado es sólo inhibidora.

Por tanto, la ACF podría ser una de las estrategias de tratamiento oncológico sin los conocidos efectos secundarios de los citostáticos.

La ACF se podría plantear como tratamiento adyuvante contra el CECC en fase clínica ya que podría disminuir las resistencias al tratamiento con quimioterapia y radioterapia por sus interacciones con HIF-1. Otros compuestos



antiangiogénicos así lo han demostrado. Ning <sup>(119)</sup> publicó como los efectos de los antiangiogénicos SU5416 y SU6668 incrementaban los efectos antitumorales cuando se combinaban con la radioterapia fraccionada. Se han comenzado a realizar estudios fase I clínica con el *Albendazol*<sup>®</sup>, compuesto con similar mecanismo de acción que la ACF como ya se ha citado. Los resultados obtenidos en pacientes con carcinomas en estadio avanzado sugieren buena tolerancia a la dosis administrada, relativa seguridad y evidencia de efecto antitumoral para aquéllos pacientes resistentes al tratamiento convencional<sup>(126)</sup>.

A pesar del elevado número de inhibidores de angiogénesis que se han descrito, y que algunos de ellos son conocidos desde hace más de una década, hasta el momento no hay ninguna terapia antitumoral basada en este tipo de compuestos que se aplique preferentemente en la clínica sin efectos secundarios graves. Aunque en los estudios preclínicos se han conseguido regresiones tumorales completas, como es nuestro caso con el tratamiento de ACF, en la mayor parte de los ensayos clínicos los inhibidores de la angiogénesis han demostrado una eficacia muy discreta, en particular para inhibir el crecimiento de los tumores primarios <sup>(111)</sup>.

Las causas de este hecho pueden ser varias, y abarcan desde los métodos empleados para el descubrimiento de estos inhibidores, hasta el diseño de las pruebas clínicas en las que se ha probado su efectividad.

Así, algunos de los ensayos *in vivo* no tiene en cuenta el microentorno tumoral, en otros se emplean tumores de rápido crecimiento y/o animales que no se ajustan a la realidad clínica. En la mayoría de los tumores que se hacen crecer en los animales de experimentación, la angiogénesis es más elevada que los tumores humanos, en los que además existe una heterogeneidad intrínseca que puede disminuir la efectividad de un inhibidor de la angiogénesis<sup>(11)</sup>. Incluso en aquellos casos en que se han empleado modelos de tumores humanos implantados en animales inmunodeprimidos (*xenografts*), hemos de tener en cuenta que, aunque las células del tumor son de origen humano, las células endoteliales son las del animal de experimentación como en el estudio de KangAe <sup>(84)</sup>. De esta forma, si un compuesto determinado muestra una capacidad inhibidora de la angiogénesis en este modelo, será

porque ha actuado sobre el endotelio del animal, no sobre células endoteliales humanas. Sin embargo, las células de CECC expresan intrínsecamente VEGFR2 como describió Lalla <sup>(95)</sup> y Stewart <sup>(144)</sup>, por tanto un compuesto, como la ACF, que interfiere con el VEGF podría ser efectivo contra esta línea tumoral. En todo caso, el desarrollo de nuevos modelos animales para el estudio de los inhibidores de angiogénesis para las enfermedades humanas debe ser una de las prioridades de la investigación en este campo <sup>(131)</sup>.

Varios miles de pacientes se han sometido a monoterapias antiangiogénicas en los estudios clínicos llevados a cabo hasta el momento. Entre ellos, algunos no han respondido a la terapia, en otros se ha logrado una estabilización de la enfermedad, y en otros se ha logrado una regresión tumoral. Las causas de esta heterogeneidad en las respuestas a los tratamientos pueden estar en las características inmunológicas de los pacientes y en el grado de angiogénesis de sus tumores. Datos recientes de biología molecular han mostrado que cuando se inhibe una vía de señalización de la angiogénesis controlado por un factor angiogénico específico se expresan otras vías como efecto compensador. Por ejemplo, la inhibición del VEGF produce una resistencia al tratamiento farmacológico debido a que otros factores angiogénicos se expresan en estos pacientes. Hoy podemos constatar que el mecanismo de resistencia al tratamiento con moléculas que inhiben el VEGF se debe, entre otras circunstancias, a la sobreexpresión de FGF <sup>(22)</sup>. Creemos que sería deseable en un futuro hacer una selección previa de la población a la que se va a aplicar un determinado tratamiento antiangiogénico, en función de las características de cada uno de estos sistemas huésped-tumor, eligiendo en cada caso la estrategia terapéutica más adecuada.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios se han dedicado a medir los niveles de FGF-2 o VEGF, demostrándose su valor pronóstico en diversos tipos de tumores. En el futuro, deberían considerarse también los niveles de inhibidores endógenos, pues su disminución puede producir la activación del proceso angiogénico y, por tanto, la progresión de la enfermedad <sup>(101)</sup>.

Por otra parte, no es correcto aplicar a una terapia antiangiogénica los parámetros habituales en la evaluación de las pruebas clínicas oncológicas

convencionales, pues la mayoría de los compuestos antiangiogénicos no son citotóxicos para las células tumorales. Así pues la relevante buena tolerancia y baja toxicidad de los compuestos antiangiogénicos, como es el caso de la ACF, hacen poco relevante la determinación de las dosis máximas toleradas en los estudios en fase I, aconsejando determinar en su lugar la dosis óptima biológica, en la que se observa una máxima inhibición de la angiogénesis. Esto tropieza con la necesidad de clarificar cuáles son los marcadores angiogénicos intermedios más relevantes en cada caso, así como de disponer de métodos que permitan determinar los cambios en la vascularización tumoral con el tratamiento. En los estudios en fase II deberían emplearse parámetros como estabilización de la enfermedad, supervivencia libre de enfermedad o tiempo hasta la progresión, en lugar de la regresión tumoral. Estos parámetros son más difícilmente evaluables, y requieren mayores poblaciones de pacientes. Además, a veces habrá que prolongar considerablemente la duración del tratamiento antes de poder observar un efecto evaluable. Valga como ejemplo en la eficacia del INF- $\alpha$  en pacientes con hemangioma sólo se pone de manifiesto tras varios meses de tratamiento <sup>(108,148)</sup>. La validación y estandarización de las técnicas de monitorización para la terapia antiangiogénica son necesarias para el éxito del desarrollo farmacéutico en este campo. De los resultados clínicos obtenidos hasta el momento parece desprenderse la conclusión de que el futuro éxito de los inhibidores de la angiogénesis en la clínica puede proceder de su empleo en combinación con la quimioterapia o la radioinmunoterapia. Las terapias combinadas ofrecen la posibilidad de actuar a la vez sobre las células tumorales y las endoteliales, pudiendo obtenerse en algunos casos una sinergia de ambas terapias ocasionada porque la inhibición de la vascularización del tumor puede aumentar la penetración de los agentes quimioterapéuticos en el mismo <sup>(18)</sup> así como la radiosensibilidad de las células tumorales <sup>(105)</sup> y provocar una hipoxia que conllevará a un incremento en los niveles de factores angiogénicos como el HIF.

## **CONCLUSIONES**

**1-** El cultivo de la línea celular FAT-7, es decir, células de CE nasal de rata Fisher, es viable en los recipientes *flask* con medio de cultivo de consistencia líquida Ham's F12K suplementado, en incubadora a 37°C, cambiando el medio dos veces por semana.

**2-** La ACF, en estudios *in vitro*, presenta efectos antiproliferativos frente a esta línea celular directamente proporcional a la dosis del compuesto.

**3-** Las ratas Fisher, cuando se les implanta células FAT-7 subcutáneamente en la región abdominal, desarrollan tumor macroscópico al cabo de 4 días y un crecimiento progresivo del tumor en días posteriores.

**4-** La ACF, inyectada diariamente i.p y al cabo de una semana de la implantación de células FAT-7, según nuestro trabajo, es capaz de inhibir la progresión tumoral llegando hasta la remisión completa del tumor al cabo de dos semanas de tratamiento.

**5-** Los tumores extirpados cuando finalizó el tratamiento con ACF, presentan histológicamente una disminución en el número de vasos sanguíneos y aumento de apoptosis comparándolos con aquéllos que no fueron tratados. Por tanto, según nuestra experiencia, la ACF inhibe la angiogénesis y presenta un efecto proapoptótico en esta línea celular implantada en ratas Fisher.

**6-** La ACF, a la dosis y frecuencia administrada, no presenta efectos negativos generales en los animales de experimentación. Las determinaciones analíticas no se alteran, y por lo tanto, la ACF sugiere la seguridad del compuesto.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Abbondanzo SL, Wenig BM. Non-Hodgkin's lymphoma of the sinonasal tract. A clinicopathologic and immunophenotypic study of 120 cases. *Cancer* 1995; 75:1281-1291.
2. Adams JM, Cori S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:61-66.
3. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001; 61:1911-1916
4. AJCC Cancer Staging Manual, 7<sup>a</sup> Edition, 2010, published by Springer New York, Inc.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the cell*. 4<sup>a</sup> Edición, 2002, New York: Garland Science.
6. Allen MW, Schwartz DL, Rana V, Adapala P, Morrison WH, Hanna EY et al. Long-term radiotherapy outcomes for nasal cavity and septal cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71:401-406.
7. Alqawi O, Moghaddas M, Singh G. Effects of geldanamycin on HIF-1 alpha mediated angiogenesis and invasion in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2006; 9: 126-135.
8. Argiris A, Karamouzis MV, Gooding WE, Bransletter BF, Zhong S, Raez LE et al. Phase II trial of pemetrexed and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1140-1145.
9. Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21: 689–695.
10. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 2003; 49: 32-40.
11. Augusting HG. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 216-222.

12. Baris G, Visser AG, van Andel JG. The treatment of squamous cell carcinoma of the nasal vestibule with interstitial iridium implantation. *Radiother Oncol* 1985; 4:121-125.
13. Beasley NJ, Leek R, Alam M. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 2002; 62: 2493–2497.
14. Bermudez E, Chen Z, Gross EA, Walker CL, Recio L, Pluta L et al. Characterization of cells lines derived from formaldehyde-induced nasal tumors in rats. *Mol Carcinog* 1994; 9: 193-199.
15. Brahimi- Horn C, Berra E, Pouyssegur J. Hypoxia: the tumor's Gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 32-36.
16. Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 2000; 60: 5117-5124.
17. Brennan PA, Quintero M, Moncada S, Thomas G. Regulation of hipoxia-inducible factor 1(HIF-1) by nitric oxide in oral squamous cell carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl* 2005; 87: 153-158
18. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2001; 60: 1878-1886.
19. Browning CH, Gulbransen R, Thornton LH. The antiseptic properties of acriflavine and proflavine, and brilliant gree: with special reference to suitability for wound therapy. *Br Med J* 1917; 2: 70-75.
20. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and Darwinian selection tumors. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 57-60.
21. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
22. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by



- evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005; 8: 299-309.
23. Chakraborty n, Bose SR, Chowdhury JR . Acriflavine-induced surface changes in three tumor cell types and differential sensitivity to lectins. *Tumori* 1984;70: 127-130
  24. Chen AM, Daly ME, Bucci MK, Xia P, Akazawa C, Quivey JM et al. Carcinomas of the paranasal sinuses and nasal cavity treated with radiotherapy at a single institution over five decades: are we making improvement? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69:141-147.
  25. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 2001; 276: 9519-9525.
  26. Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.* 2001; 61: 2429-2433.
  27. Chung T-W, Moon S-K, Chang Y-C, Ko JH, Lee YC, Cho G et al. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal* 2004; 18: 1670-1681.
  28. Cohen T, Nahar D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271:736-741.
  29. Coulier F, Pontarotti P, Roubin R , Hartung H, Goldfarb M, Birnbaum D. Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF-receptors families. *J Mol Evol* 1997; 44:43-56.
  30. Crobaya B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells *in vitro*. *Am J Pathol* 1991; 138:
  31. Cuevas P, Sánchez I, Lozano RM, Gimenez-Gallego. Dobesilate is an angiogenesis inhibitor. *Eur J Med Res* 2005; 10: 369-372

32. Cuevas P, de Paz V, Cuevas B, Marín-Martínez J, Picón Molina M, Reyes A et al. Osteopromotion for Cranioplasty: An experimental study in rats using acidic fibroblast growth factor. *Surg Neurol* 1997; 47:242-246.
33. Daele JJ, Poorten V, Rombaux P, Hamoir M. Cancer of the nasal vestibule, nasal cavity and paranasal sinuses. *B-ENT* 2005; Suppl 1: 87-94.
34. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584
35. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:425-437.
36. Dirix P, Nuyts S, Geussens Y, Jorissen M, Vander Poorten V, Fossion E et al. Malignancies of the nasal cavity and paranasal sinuses: long-term outcome with conventional or three-dimensional conformal radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69:1042-1050.
37. Dow JK, deVere-White RW. Fibroblast growth factor-2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000; 55:800-806.
38. Dowley A, Hoskison E, Allibone R, Jones NS. Squamous cell carcinoma of the nasal vestibule: a 20-year case series and literature review. *J Laryngol Otol* 2008; 122:1019-1023.
39. Dray TG, Hardin NJ, Sofferan RA. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104:724-729.
40. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E et al. HIF-1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. 2008; 13:206-220.
41. Dulguerov P, Allal AS. Nasal and paranasal sinus carcinoma: how can we continue to make progress? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14:67-72.

42. Eckert AW, Lautner MH, Un Schütze, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U. Coexpresion of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopatology* 2011; 58: 1136-1147.
43. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and breast cancer metastasis. *Lancet* 1995; 346: 388-390.
44. Evensen JF, Jacobsen AB, Tausjø JE. Brachythe cell carcinoma of the nasal vestibule. *Acta Oncol* 1996; 35 Suppl 8:87-92.
45. Feil C, Augustin HG. En dothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247:38-45.
46. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immonol* 1999; 237:1-10.
47. Fidler IJ, Host-Tumor interactions. *Cancer control: JMCC* 1998; 5: 8-9.
48. Fillies Th, Werkmeister R, Van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Buerger H. HIF- $\alpha$  overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous ell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 2005, 5:84
49. Folkman J, Hahnfeldt P, Hlatky L. Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 76-79.
50. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
51. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
52. Folkman J. Fighting cáncer by attacking its blood supply. *Sci Am* 1996; 275(3): 150-154.
53. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
54. Fong GH, Rossant J, Getsenstein M, Breltman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-69.

55. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol* 2001; 2: 278-289.
56. Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urológica Españolas* 2009; 33:941-951
57. Frank S, Hubner G, Breir G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995; 270: 12607-12613.
58. Gavrieli Y, Sherman Y, and A. Ben Sasson S. Identification of programmed Cell Death In Situ via specific Labeling of Nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
59. Gillies R.J., Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 1986; 159:109-13.
60. Gillison ML, Shank KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 57-65
61. Goepfert H, Guillaumondegui OM, Jesse RH, Lindberg RD. Squamous cell carcinoma of nasal vestibule. *Arch Otolaryngol* 1974; 100:8-10.
62. Goerner M, Seiwert TY, Sudhoff H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer – update of recent developments. *Head and Neck Oncol* 2010; 14:2-8.
63. Goldie H, Walker M, Graham T, Williams F. Topical effect of Acriflavine Compounds on growth and spread of malignant Cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1959; 23: 841-855.
64. González-Moles MA, Galindo P, Gutierrez Fernandez J, Sanchez Fernandez E, Rodriguez Archilla A, Ruiz Avila I, Bravo M: p53 protein expression in squamous cell carcinoma. Survival analysis. *Anticancer Res* 2001; 21: 2889-2894.
65. Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor bovine pituitary. *J Biol Chem* 1975; 250: 2515-2520.

66. Grande Pulido E, Martín Centeno A, Maroto Rey P, Solsona Narbón. Biología molecular del carcinoma de células renales : Principios para un tratamiento selectivo. E. *Actas Urol Esp* 2007; 31: 233-243
67. Gullino PM. Angiogenesis and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978; 41: 1329-1341.
68. Gura T. Estrogen: key player in heart disease among women. *Science* 1995; 269: 771-773.
69. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
70. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
71. Harbo G, Grau C, Bundgaard T, Overgaard M, Elbrond O, Sogaard H et al. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses. A clinicopathological study of 277 patients. *Acta Oncol* 1997; 36:45-50.
72. Haynes WD, Tapley N. Proceedings: Radiation treatment of carcinoma of the nasal vestibule. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1974; 120:595-602.
73. Hicklin DJ, Witte L, Zhu Z, Liao F, Wu Y, Li Y, Bohlen P. Monoclonal antibody strategies to block angiogenesis. *Drug Discovery Today* 2001; 6: 517-528.
74. Hirota Y, Lijima T. Acriflavine as an effective agent for eliminating F-factor in *Escherichia Coli* K-12. *Nature* 1957; 180: 655-656.
75. Hong SW, Jung KH, Lee HS, Choi MJ, Zheng HM, Son MK et al. Apoptotic and anti-angiogenic effects of *Pulsatilla koreana* extract on hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2011; 10: 1204-1212.
76. Hoppe BS, Stegman LD, Zelefsky MJ, Rosenzweig KE, Wolden SL, Patel SG et al. Treatment of nasal cavity and paranasal sinus cancer with modern radiotherapy techniques in the postoperative setting--the MSKCC experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67:691-702.
77. Howard DJ, Lund VJ, Wei WI. Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses: a 25-year experience. *Head Neck* 2006; 28:867-873.

- 
78. [Http://cs.stedwards.edu/chem/chemistry/CHEM43/CHEM43/hypoxia/structure.htm](http://cs.stedwards.edu/chem/chemistry/CHEM43/CHEM43/hypoxia/structure.htm)
  79. [Http://sonicando.wordpress.com/2008/12/25/entender-el-cancer/](http://sonicando.wordpress.com/2008/12/25/entender-el-cancer/)
  80. Hyder SM, Stancel GM, Chiappetta C, Murthy L, Boettger Tong HL, Makela S. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res* 1996; 56: 3954-3960.
  81. Jaganathan SK and Mandal M. Antiproliferative effects of Honey and of its Polyphenols: A review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009; 2009: 830616.
  82. Jeannon JP, Riddle PJ, Irish J, O'sullivan B, Brown DH, Gullane P. Prognostic indicators in carcinoma of the nasal vestibule. *Clin Otolaryngol* 2007; 32:19-23.
  83. Josko J, Gwóźdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit.* 2000; 6: 1047-1052
  84. Kang Ae L, Huafeng Z, Quian D.Z, Rey S, Jun O. Liu and Semenza G.L. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *PNAS* 2009; 106: 17910-17915.
  85. Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K et al. Roles of two VEGF receptors, flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogen* 2000; 19: 2138–2146.
  86. Kao J, Genden EM, Chen CT, Rivera M, Tong CC, Misiukiewicz K et al. Phase I trial of concurrent erlotinib, celecoxib, and reirradiation for recurrent head and neck cancer. *Cancer* 2011; 117: 3173-3181.
  87. Kawai M, Yamagishi J. Mechanism of action of acriflavine: electron microscopic study of cell wall changes induced in staphylococcus aureus by acriflavine. *Microbiol Immuno* 2009; 53: 481-486.
  88. Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long term inhalation exposure. *Cancer Res* 1983; 43: 4382-4392.

89. Keyhani E, Khavari-Nejad S, Keyhani J, Attar E. Acriflavine mediated apoptosis and necrosis in yeast candida utilis. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 284-291.
90. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-969
91. Kim SG, Kim CW, Ahn ET, Lee KY, Hong EK, Yoo BI et al. Enhanced anti-tumour effects of acriflavine in combination with guanosine in mice. *J Pharm Pharmacol.* 1997; 49:216-222.
92. Kozomora R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-Magic M, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 2005; 33: 342-348.
93. Kurokawa T, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Kawarada T, Itoh T et al. Overexpression of hypoxia-inducible-factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in oesophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *British Journal of Cancer* 2003; 89: 1042-1047.
94. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Mod Pathol.* 2005; 18: 485–494.
95. Lalla RV, Boisoneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 882–888.
96. Langendijk JA, Poorter R, Leemans CR, de Bree R, Doornaert P. Radiotherapy of squamous cell carcinoma of the nasal vestibule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59:1319-1325.
97. Lee JW, Bae SH, Jeang JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004; 36: 1-12.

98. Levendag PC, Nijdam WM, van Moolenburgh SE, Tan L, Noever I, van Rooy P, Mureau MA, Jansen PP, Munte K. Interstitial radiation therapy for early-stage nasal vestibule cancer: a continuing quest for optimal tumor control and cosmesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66 :160-169.
99. Levendag PC, Pomp J. Radiation therapy of squamous cell carcinoma of the nasal vestibule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19:1363-1367.
100. Li H, Ko HP, Whitlock JP. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*. 1996; 271: 21262-21267.
101. Lieckens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 253-270.
102. Liotta L, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.
103. Lopez-Farre A, Farre J, Sánchez de Miguel L, Romero J, González Fernández F, Casado S. Disfunción endotelial: una respuesta global. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51 Supl 6:18-22.
104. Luce D, Leclerc A, Bégin D. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2002; 13:147-152.
105. Lund EL, Bastholm L, Krisjansen PEG. Therapeutic synergy of TNP- 470 - and ionizing radiation: effects on tumor growth, vessel morphology, and angiogenesis in human glioblastoma multiforme xenographs. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 971-978.
106. Marshall O.C. Acriflavine and liver damage, with a report of a fatality associated with its use. *Cal West Med*. 1936; 45: 356-358.
107. Masson N, William C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 2001; 20:5197-5206.
108. Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 2001; 6: 1005-1024.



- 
109. Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis* 2007; Rev 26: 341-352.
  110. Metter Van ME, Kim ES. Bevacizumab current updates in treatment. *Curr Opin Oncol* 2010; 22: 586-591.
  111. Molema G, Griffioen AW. Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply. *Immunol Today* 1998; 19: 392-294.
  112. Monticello TM, Morgan KT. Chemically-induced nasal carcinogenesis and epithelial cell proliferation: a brief review. *Mutat Res* 1997; 380: 33-41.
  113. Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC et al. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells *in vitro* and in a murine model. *Circulation* 1995; 91: 755-763.
  114. Murphy M, Stordal B. Erlotinib or gefitinib for the treatment of relapse platinum pretreated non-small cell lung cancer and ovarian cancer: a systematic review. *Drug Resist Update* 2011; 14: 177-190.
  115. Murray D.H. Acriflavine: Its use by intravenous injection in treatment of gonorrhoea. *J. Roy. Army M. Corps* 1930; 54: 19-27.
  116. Nam Joo Kang, Ki Won Lee, Bing Jik Shin, Sung Keun Jung, Mun Kyung Hwang, Ann M. Bode et al. Caffeic Acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn Kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 2009; 30: 321-330.
  117. Natarajan K, Singh S, T. R. Burke Jr, Grunberger D, Aggarwal B.B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 1996; 93: 9090-9095.
  118. Neckers LM. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 2002 ; 8 : 55-61
  119. Ning S, Laird D, Chemington JM, Knox SJ. The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. *Radiat Res* 2002; 157: 45-51.
  120. Onesto C, Hannoun-Levi JM, Chamorey E, Formento JL, Ramaioli A, Pages G. Vascular endothelial growth factor-A and Poly (A)

- binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance, *Br J Cancer* 2006; 94:1516-1523.
121. Palka KT, Robbert J, Slebos P, Chung C.H. Update in Molecular Diagnostic Tests in Head and Neck Cancer. *Semin Oncol.* 2008; 35: 198–210.
  122. Patel P, Tiwari R, Karim AB, Nauta JJ, Snow GB. Squamous cell carcinoma of the nasal vestibule. *J Laryngol Otol* 1992; 106:332-336.
  123. Peiró C, Llergo JL, Angulo J, López-Novoa JM, Rodríguez-López A, Rodríguez-Mañas L et al. Effects of captopril, losartan, and nifedipine on cell hypertrophy of cultured vascular smooth muscle from hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Br J Pharmacol.* 1997; 121:1438-1444.
  124. Poulsen M, Turner S. Radiation therapy for squamous cell carcinoma of the nasal vestibule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27:267-272.
  125. Pourgholami M.H, Akhter J, Wang L, Lu Y, Morris DL. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: *in vitro* and in xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemoter Pharmacol* 2005; 55: 425-432
  126. Pourgholami M.H, Cai ZY, Badar S, Wangoo K, Poruchynsky MS, Morris DL. Potent Inhibition of tumoral hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by albendazole. *BMC Cancer* 2010; 10: 143-146.
  127. Pourgholami M.H, Szwajcer M, Chin M, Liauw W, Seef J, Galettis P et al. Phase I clinical trail to determine maximum tolerated dose of oral albendazole in patients with advance cancer. *Cancer Chemoter Pharmacol* 2010; 65: 597-605.
  128. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32: 389-397.
  129. Rodriguez de Quesada Ana, en *Angiogénesis*, 1ª Edición, editado por el Consejo Social de la Universidad de Málaga, 2006, Capítulo I, La Angiogénesis y sus Implicaciones Clínicas, pág 30.

130. Rodriguez de Quesada Ana, en Angiogénesis, 1ª Edición, editado por el Consejo Social de la Universidad de Málaga, 2006, Capítulo II, El Proceso Angiogénico, pág 42.
131. Rosenberg MP, Bortner D. Why transgenic and Inockout animal models should be used (for drug efficacy studies in cancer). *Cancer Metastasis Rev* 1999; 17: 295-299.
132. Rosenthal DI, Barker JL Jr, El-Naggar AK, Glisson BS, Kies MS, Díaz EM Jr et al. Sinonasal malignancies with neuroendocrine differentiation: patterns of failure according to histologic phenotype. *Cancer* 2004; 101:2567-2573.
133. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 2002; 277: 38723-38730.
134. Samuelson JS, Stewart PB, Kraft SC, Farr RS. The effectiveness of acriflavine and ineffectiveness of proflavine as immunosuppressant agents. *J Immunol* 1965; 95: 314-322.
135. Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J Craniomaxillofac Surg* 2004; 32:176-181.
136. Scortegagna M, Matin RJ, Kladney RD, Neumann R, Arbeit J. Hypoxia-Inducible Factor-1 suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial mesenchymal transition. *Cancer Res* 2009; 69: 2638-2646.
137. Secades P, Rodrigo JP, Hermsen M, Alvarez C, Suarez C, Chiara MD. Increase in gene dosage is a mechanism of HIF-1 alpha constitutive expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 441-454.
138. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*. 2009; 24:97-106
139. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cáncer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:721-731.

140. Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity purification of a tumor derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 1984; 223: 1296-1299.
141. Sobotta J, Atlas de Anatomía Humana. 20ª edición, 2010, Editorial Médica Panamericana, Madrid; Tomo I, pág 85.
142. Sobotta J, Atlas de Anatomía Humana. 20ª edición, 2010, Editorial Médica Panamericana, Madrid; Tomo I, pág 87.
143. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R et al: VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-191.
144. Stewart M, Turley H, Cook N, Pezzella F, Pillai G, Ogilvie D et al. The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation an immunohistochemical study. *Histopathology* 2003; 43: 33–39.
145. Thurber D.S. The results of the use of acriflavine hydrochloride in the treatment of undulant fever. *Can Med Assoc J* 1930; 23: 665-668.
146. Tong M, Lloyd B, Pei P, Mallery SR. Human Head and Neck squamous cell carcinoma cells are both targets and effectors for the angiogenic cytokine, VEGF. *J Cell Biochem* 2008; 105: 1202–1210.
147. Toseti F, Ferrari N, De Flora S, Albini A. Angioprevention: Angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J* 2002; 16: 2-14.
148. Von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K et al. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 437-448.
149. Wallace A, Morris CG, Kirwan J, Amdur RJ, Werning JW, Mendenhall WM. Radiotherapy for squamous cell carcinoma of the nasal vestibule. *Am J Clin Oncol* 2007; 30:612-616.
150. Weimin Li, Chuan Wang, Steven K.J, Ondrey F.G, Jizhen Lin.

- Expression of Fibroblast Growth Factor Binding Protein in Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 135: 896–901.
151. Welsh S, Williams RR, Birmingham A, Newman DJ, Kirkpatrick DL, Powis G. The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor formation. *Mol Cancer Ther* 2003 ; 2 : 235-43
152. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub> – sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub> – regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-1162.
153. Williams K J. British pharmaceutical industry, synthetic drug manufacture and the clinical testing of novel drugs, 1895-1939. Capitulo 2. Thesis submitted to the University of Manchester, 2005.
154. Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33: 526-534.
155. Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, et al. YC-1 : a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 516-525.
156. Young G, Charteris A.A. Use of proflavine and acriflavine in a throat and nose department. *Br. Med J* 1940; 2:489
157. Zhu H, Feng Y, Zhang J, Zhou X, Hao B, Zhang G et al. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  expression suppresses the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2011; 11:981-987.
158. Zhu H, Huang C, Peng B. Overexpression of thioredoxin system proteins predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol* 2011; 47: 609-614.