



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

Estudio *in vitro* del Efecto Sinérgico del
Cisplatino y la Heparina de Bajo Peso Molecular
sobre el Carcinoma Oral de Células Escamosas

D^a Tamara Gómez Albentosa
2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

*Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y
Medicina Física*

*“In vitro evaluation of the synergic effect of cisplatin and
low molecular weight heparin in the treatment of oral squamous
cell carcinoma”*

Tesis Doctoral con mención Internacional para optar al grado de
Doctor Internacional:

D.^a Tamara Gómez Albentosa

Directores:

Ricardo Elías Oñate Sánchez y Fabio Camacho Alonso

Murcia, 2017



D. **Fernando Chiva García**, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología y Presidente de la Comisión Académica del programa de doctorado en **CIENCIAS ODONTOLÓGICAS Y ESTOMATOLÓGICAS***,
INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "**Estudio in vitro del efecto sinérgico del cisplatino y la heparina de bajo peso molecular sobre el carcinoma oral de células escamosas**", realizada por D^a. **Tamara Gómez Albentosa**, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Fabio Camacho Alonso y D. Ricardo Elías Oñate Sánchez, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha **19/05/2017**, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, 19 de mayo de 2017



Doctorando: D^a. Tamara Gómez Albentosa

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*

“All is possible **at the end II**”

AGRADECIMIENTOS

En un año como éste donde todo parece no ser esa pieza del puzzle que falta, doy a luz a este gran bebé que ahora, parece ya todo un adulto. Una gran andadura me ha llevado hasta aquí pero, por fin puedo decir, que he llegado a la cima, aunque nunca sabemos si la cima puede ser cada vez más alta.

Esta andadura que comentaba trae consigo una ayuda incondicional de muchas de las personas que me rodean y, por ello, aprovecho este espacio para agradecerles todo lo que han hecho, hacen y harán por mí.

Quería dar las gracias a mis directores de tesis. En primer lugar, al Dr. Ricardo Oñate quien, con su discreción característica, me invitó a recorrer este camino con él. Sin este primer paso, quizá me pudiera haber encontrado igualmente en esta situación, pero no de la misma manera. Por todo ello, gracias. Asimismo, quería dar las gracias también a mi otro director, el Dr. Fabio Camacho por haberme transmitido su profesionalidad, con el fin de enseñarme la minuciosidad de la ciencia odontológica. Gracias también por confiar en mí.

Agradecer enormemente a todo el personal del SACE la labor realizada, no sólo en sus tareas científicas, sino también en la implicación y empatía mostradas, en especial, conmigo. Os lo agradezco de corazón.

Cómo no iba a nombrar a aquellas personas que un día aparecieron en mi vida sin esperar nada a cambio, y que lo dieron todo. Sois vosotras, Rosario Tudela y Barbara Cvikel, unas personas ejemplares tanto profesional como personalmente. Sin vuestra ayuda e implicación, mis experimentos nunca hubieran siquiera, empezado. Gracias por enseñarme tanto.

También quiero agradecer al Dr. Reinhard Gruber su cortesía y profesionalidad mostradas, ya que eso hace que todos aprendamos a ser mejores en el trabajo día a día. Por supuesto, es también importante subrayar el talento del Dr. Adrian Lussi quien,

además de ser un excelente profesional, su cargo no le impidió depositar en mí su confianza y hacerme sentir realizada. Siempre te estaré enormemente agradecida.

Agradecer también a muchos amigos su interés y apoyo, sobre todo a Tronky, Nki, Guille, Coral y Crístiane Meira Assunção. Todos vosotros y algunos más, habéis aportado vuestro granito de arena para la consecución de esta tesis en distintos momentos y en diversos aspectos. Muchas gracias.

Es un honor para mí este agradecimiento a mi ángel de la guarda, Alexandra Stähli. Nadie sabe dónde está ese ángel hasta que lo encuentra y, yo tengo la suerte de haberlo encontrado. Ella es única y un ejemplo allá donde vaya. Eres un referente para mí y te adoro.

Finalmente, quiero hacer un pequeño homenaje a esas esencias que dan perfume a mi vida: mis padres y Aitor (también a "la abuela"). Aunque no existen las palabras que expresen todo el apoyo que me prestáis de forma incondicional, me gustaría haceros saber una vez más que sois el pilar de mi vida, la corrección de mis emociones y, en definitiva, mi hobby preferido. Simplemente, gracias por ser como sois. Os quiero.

Por último, gracias a esas personas que ya no están a mi lado pero cuyas frases y acciones me sirven cada día más para avanzar...

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

COCE: Carcinoma Oral de Células Escamosas

VPH: Virus del Papiloma Humano

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

μM: Micro Molar

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

ADH: Alcohol Deshidrogenasa

VHB: Virus de la Hepatitis B

VHC: Virus de la Hepatitis C

VIH⁺: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

TNM:

T: Tamaño tumoral

N: Afectación de ganglios linfáticos regionales

M: Presencia de metástasis a distancia

EHNS–ESMO–ESTRO: European Head and Neck Society-European Society of Medical Oncology-European Society for Radiotherapy and Oncology

RIM: Radioterapia Intensidad Modulada

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

mg/m²: Miligramo por metro cuadrado

TMD: Terapias Moleculares Dirigidas

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

JM: Johnson Matthey

ICR: Institute of Cancer Research

CTR1: transportador de cobre 1

GSH: Glutación

ETV: Enfermedad Tromboembólica Venosa

FT: Factor Tisular

TNF- α : Factor De Necrosis Tumoral Alfa

NETs: Trampas Extracelulares De Neutrófilos

PAI-1: Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1

HNF: Heparina No Fraccionada

TIH: Trombocitopenia Inducida por Heparina

HBPM: Heparina De Bajo Peso Molecular

ESMO: European Society of Medical Oncology

U/Kg: Unidades por Kilogramo

AVK: Antagonistas de la Vitamina K

INR: Ratio Internacional Normalizado

ml/min: Mililitro por minuto

CHEST: American College of Chest Physicians

ASCO: American Society of Clinical Oncology

BCSH: British Committee for Standards in Haematology

ACOs: Anticoagulantes Orales

VEGF: Factor De Crecimiento Endotelial Vascular

FXa: Factor X activado

FVIIa: Factor VII activado.

AT: Antitrombina

bFGF: Factor De Crecimiento Fibroblástico Básico

MEC: Matriz Extracelular

TEM: Transición Epitelio-Mesenquimal

MMPs: Metaloproteinasas

PGHS: Proteoglicanos De Heparán Sulfato

HS: Heparán Sulfato

μg/ml: Microgramo por mililitro

NK: Natural Killer

TME: Transición Mesénquimo-Epitelial

DMEM: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco

SBF: Suero Bovino Fetal

ml: Mililitro

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

SAI: Servicio de Apoyo a la Investigación

RF-: sin Rojo Fenol

DMSO: Dimetil Sulfóxido

PBS: Tampón Fosfato Salino

mg/l: Miligramo por litro

mg/ml: Miligramo por mililitro

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

DT: Desviación Típica

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

RESUMEN

OBJETIVO: La relación que existe entre el cáncer y la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es bien conocida debido a la participación del sistema hemostático en la angiogénesis y la metástasis tumorales. El objetivo consiste en investigar el efecto *in vitro* de las heparinas de bajo peso molecular (HBPMs), particularmente, la enoxaparina sódica, y el cisplatino en el carcinoma oral de células escamosas (COCE).

MATERIAL Y MÉTODOS: La línea H357 del COCE fue tratada independientemente y simultáneamente con enoxaparina sódica a 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ y/o con cisplatino a las concentraciones de 1, 2, 4, 8 and 10 μM durante 24, 48 y 72 horas de incubación. Se realizaron diversos experimentos de viabilidad celular, apoptosis y migración celular con el fin de conocer los efectos de dicho tratamiento combinado.

RESULTADOS: El quimioterápico cisplatino y la enoxaparina sódica redujeron la viabilidad celular del COCE. El mayor efecto inhibitorio fue observado mediante la combinación de 8 y 10 μM de cisplatino y 100 $\mu\text{g/ml}$ de enoxaparina sódica. Asimismo, las concentraciones de 8 y 10 μM de cisplatino en combinación con la enoxaparina sódica, aumentaron significativamente la apoptosis tras 48 horas de incubación ($p=0,008$; $p=0,009$ respectivamente). La capacidad de migración celular fue también inhibida mediante el tratamiento concomitante a las 18 y 24 horas.

CONCLUSIONES: La enoxaparina sódica, en combinación con el cisplatino, aumenta la apoptosis y reduce la viabilidad celular así como la capacidad de migración tumoral.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The relationship between cancer and venous thromboembolism (VTE) is well-established due to the involvement of hemostatic system on tumor angiogenesis and metastasis. To investigate the *in vitro* effect of low-molecular-weight heparins (LMWHs), particularly, sodium enoxaparin, and cisplatin in oral squamous cell carcinoma (OSCC).

MATERIALS AND METHODS: The OSCC cell line H357 was treated independently or simultaneously with sodium enoxaparin at 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ and/or cisplatin at 1, 2, 4, 8 and 10 μM concentrations after 24, 48, and 72 h of incubation. The combination effects of sodium enoxaparin and cisplatin were evaluated by measuring cell viability, apoptosis as well as migration ability.

RESULTS: Anti-cancer drug-cisplatin and sodium enoxaparin reduced OSCC cell viability. The most significant inhibitory effect was observed at 8 and 10 μM cisplatin concentrations in combination with 100 $\mu\text{g/ml}$ sodium enoxaparin. Likewise, 8 and 10 μM cisplatin and sodium enoxaparin doses significantly increased apoptosis after 48 hours of incubation ($p=0,008$; $p=0,009$ respectively). Migratory ability was also inhibited by this concomitant treatment after 18 and 24 hours.

CONCLUSIONS: Sodium enoxaparin, in combination with cisplatin, increases apoptosis and reduce cell viability and tumour-migration ability.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	1
1.1.1. Contextualización e incidencia.....	1
1.1.2. Etiopatogenia	4
1.1.3. Estadiaje TNM	12
1.1.4. Pronóstico y Tratamiento	14
1.2. CISPLATINO.....	21
1.2.1. Mecanismo de acción	23
1.2.2. Resistencia al cisplatino.....	24
1.3. LA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA (ETV) Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER.....	27
1.4. LAS HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR	30
1.4.1. Acción anti-proliferativa.....	36
1.4.2. Acción anti-metastásica	41
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	50
2.1. JUSTIFICACIÓN	50
2.2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAL Y MÉTODOS	54
3.1. MATERIAL.....	54
3.1.1. Cultivos celulares.....	54
3.1.2. Medios, soluciones y reactivos	57
3.1.3. Equipos	58
3.1.4. Cisplatino	59
3.1.5. Enoxaparina sódica	59
3.2. MÉTODOS	60
3.2.1. Diseño del estudio	60
3.2.2. Estudio <i>in vitro</i> del efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular.....	60
3.2.3. Estudio <i>in vitro</i> del efecto de la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular.....	62

3.2.4. Estudio <i>in vitro</i> del efecto del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular	62
3.2.5. Estudio <i>in vitro</i> del efecto del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la apoptosis	63
3.2.6. Estudio <i>in vitro</i> del efecto del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la migración celular	65
3.2.7. Método estadístico	66
4. RESULTADOS	69
4.1. EFECTO DEL CISPLATINO Y LA ENOXAPARINA SÓDICA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR H357	69
4.1.1. Efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular.....	69
4.1.2. Efecto de la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular ...	70
4.1.3. Efecto combinado del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular	72
4.2. EFECTO DEL CISPLATINO Y LA ENOXAPARINA SÓDICA SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR H357	80
4.2.1. Efecto del cisplatino 8 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la apoptosis celular	80
4.2.2. Efecto del cisplatino 10 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la apoptosis celular	82
4.3. EFECTO DEL CISPLATINO Y LA ENOXAPARINA SÓDICA SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR H357	83
4.3.1. Efecto del cisplatino 8 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la migración celular	84
4.3.2. Efecto del cisplatino 10 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la migración celular	86
5. DISCUSIÓN.....	89
6. CONCLUSIONES.....	96
6. CONCLUSIONS	97

7. BIBLIOGRAFÍA.....	99
-----------------------------	-----------

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

1.1.1. Contextualización e incidencia

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) define el término “**cáncer**” como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Éste suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. También indica que muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco. Además, la detección y tratamiento precoces, aumentarían los índices de curación.

El **cáncer** es la principal causa de muerte en países desarrollados como en aquéllos en vías de desarrollo. La incidencia para todos los cánceres es más frecuente (casi el doble) en países desarrollados que en países en vías de desarrollo (tanto en hombres como en mujeres), sin embargo, el índice de mortalidad en países desarrollados sólo es entre un 8%-15% mayor. Todo ello es debido a que en los países en vías de desarrollo la dieta es nutricionalmente pobre (escasa ingesta de frutas y verduras), el hábito tabáquico se desarrolla a partir de tabaco inmaduro, y las infecciones son frecuentes (Torre y cols., 2015).

El **cáncer de cabeza y cuello** es uno de las diez cánceres más comunes en todo el mundo, el sexto concretamente, afectando a más de 500.000 individuos cada año (Rivera y Venegas, 2014; Hyakusoku y cols., 2016). Los cánceres de cabeza y cuello constituyen un grupo de tumores malignos localizados en los senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral (mucosa labial y bucal, encía, paladar duro, suelo de boca, trigono retromolar y dos tercios anteriores de la lengua), orofaringe (paladar blando, amígdalas palatinas, base de lengua, pliegues del músculo palatogloso, valéculas epiglóticas y pared posterior de la faringe), hipofaringe, laringe, y glándulas salivares. Dentro de esta clasificación se excluyen los tumores de la piel, los cerebrales y los

tiroideos (Noguti y cols., 2012; Huang y O'sullivan, 2013; Chi y cols., 2015; Friemel y cols., 2016).

El carcinoma de cavidad oral es el más frecuente, siendo la lengua la localización más frecuentemente afectada y la que peor pronóstico presenta. Más del 90% de los tumores de la cavidad oral y orofaringe son **carcinomas orales de células escamosas** (COCEs). Se trata de una neoplasia derivada del epitelio escamoso estratificado de la mucosa oral (Rivera y Venegas, 2014; Chi y cols., 2015). El COCE representa el 6% de todas las malignidades (Ahn y cols., 2016), alcanzando la octava posición a nivel mundial (Ng y cols., 2017). El COCE en su localización más habitual (lengua) siempre ha sido un tumor predominante en hombres de 50-60 años asociados a los factores de riesgo tabaco y alcohol (Ng y cols., 2017). No obstante, existe un aumento de casos de COCE relacionados con el virus del papiloma humano (VPH) en hombres con múltiples parejas sexuales y sin exposición a los tradicionales factores de riesgo (Marur y Forastiere, 2016). Asimismo, también comienzan a aparecer casos de mujeres jóvenes y sin exposición a dichos factores. Este fenómeno todavía hoy no tiene una base concluyente, por lo que se requiere una gran implicación por parte de la OMS y de la IARC para su estudio y resolución (Ng y cols., 2017).

A nivel mundial, se estiman alrededor de 686.000 nuevos casos y 376.000 muertes relacionadas por año (Ahn y cols., 2016; Yadav y cols., En prensa). Se predice una incidencia de 856.000 casos en 2035 debido a los cambios demográficos (Shield y cols., 2017). La mortalidad por COCE a nivel mundial sigue siendo alta, debido a que la mayoría son diagnosticados en estadíos avanzados, y debido también a los fracasos de los tratamientos, ya sea por recurrencias loco-regionales (15-50%) o por metástasis a distancia (Hyakusoku y cols., 2016; Sakamoto y cols., 2016).

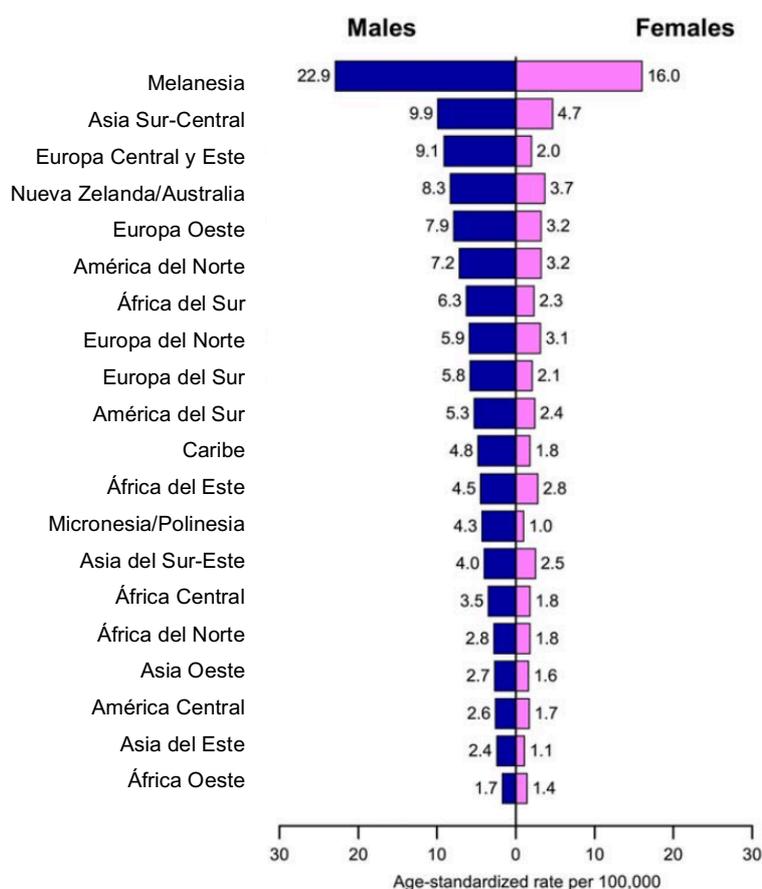
Si valoramos la incidencia del cáncer de labio y cavidad oral según el **área geográfica**, Melanesia y Asia sur-central (especialmente en la India) son los lugares donde existe una mayor incidencia de COCE tanto en hombres como en mujeres por su elevada exposición al tabaco. Los cánceres de labio son muy frecuentes en Europa central y oriental (por el hábito tabáquico), y en Australia (por las radiaciones solares) (Torre y cols., 2015; Shield y cols., 2017) (Figura 1).

En comparación con décadas pasadas, la incidencia de cáncer de labio y cavidad oral ha aumentado en mujeres, en diversos países del sur y oeste de Europa, lo que refleja el aumento del consumo del tabaco por parte de este sexo (Torre y cols., 2015).

La incidencia de cánceres orofaríngeos es elevada en América del Norte y Europa, especialmente en Hungría, Slovakia, Alemania y Francia, y parece estar asociada con el alcohol, el tabaco y el VPH (Shield y cols., 2017).

La incidencia de cánceres nasofaríngeos es elevada en África del norte y sur y este de Asia, asociado con la susceptibilidad genética y la infección por el virus de Epstein-Barr así como con la exposición a factores de riesgo carcinogénicos (Shield y cols., 2017).

Figura 1. Tasa de incidencia de cáncer de cavidad oral por sexo y área geográfica (Torre y cols., 2015).



1.1.2. Etiopatogenia

Actualmente, existen una serie de factores de riesgo íntimamente relacionados con la aparición del COCE. De entre ellos, algunos no pueden ser modificados, por ser endógenos (edad, sexo, raza o enfermedades sistémicas de tipo hormonal, hepática o metabólica). En cambio, los factores de riesgo exógenos constituyen el principal riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, por lo que su desaparición, lo reduciría de forma significativa. En el desarrollo de los cánceres de la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe, el alcohol y el tabaco con los principales factores de riesgo exógenos. En el cáncer de nasofaringe y en el de orofaringe las infecciones por virus como el VPH, están fuertemente relacionados con su desarrollo (Descamps y cols., 2016; Friemel y cols., 2016; Marur y Forastiere, 2016).

Cabe destacar que pequeños grupos de población aislados pueden presentar cáncer oral sin ningún tipo de contacto con estos factores de riesgo altamente asociados a este cáncer. En el artículo del año 2016 de Faden y cols. (Faden y cols., 2016), un grupo de pacientes estadounidenses jóvenes (menores de 45 años) desarrollaron cáncer de lengua sin haber tenido contacto alguno con el tabaco, alcohol, VPH u otros virus, e incluso con cualquier otro factor carcinogénico. Las mutaciones del gen supresor tumoral p53 mostraron, en un 55% de los casos de este estudio, similitudes con aquellas mutaciones encontradas en pacientes expuestos a los factores etiopatogénicos conocidos y que también desarrollaron el COCE. Aunque sus resultados no son concluyentes ni extrapolables a la población general, se han de tener en cuenta para futuras investigaciones (Faden y cols., 2016).

* Tabaco

El tabaco es el factor etiológico principal en el desarrollo de cánceres de cabeza y cuello (Zhang y cols., 2015). El riesgo global de desarrollar cáncer oral en pacientes fumadores es entre 7-10 veces mayor que para aquellos no fumadores (Xu y cols., 2007), incluso en pequeñas cantidades (Zhang y cols., 2015). No obstante, existe un riesgo más elevado de desarrollarlo cuanto mayor sea el tiempo en que se mantiene

el hábito tabáquico, cuando el tipo de tabaco es negro, cuando se comienza a fumar en una edad temprana, y cuando la inhalación del humo es profunda (D' Mello y *cols.*, 2016). También supone un mayor riesgo cuando el tabaco es **mascado o sin combustión**, y se combina con otras sustancias como el paan o el betel. Aunque la composición del betel varía según la localización geográfica, generalmente está compuesto de hoja de betel, nuez de areca y lima, con o sin tabaco. Al menos 2 alcaloides de los aproximadamente 6 que están presentes en la nuez de areca, se han identificado como posibles carcinógenos (D' Mello y *cols.*, 2016). Este tipo de hábito tabáquico es el principal factor de riesgo en países como India y China. En la India, su consumo ha aumentado desde un 19% en 1998 hasta un 25% en 2010 (entre 15-49 años) (Sinha y *cols.*, 2016) llegando a representar el primer cáncer que afecta a hombres y el tercero de entre las mujeres indias (D' Mello y *cols.*, 2016). Actualmente, el tabaco (fumado y mascado) es el responsable del 90% de los cánceres orales acontecidos en el sudeste asiático (D' Mello y *cols.*, 2016). El 71% de las muertes relacionadas con el cáncer de labio, cavidad oral y faringe en países desarrollados están relacionadas con el tabaco. Así, es también causante de un 37% de las muertes en países en vías de desarrollo.

El cigarrillo, especialmente cuando **combustiona**, genera cientos de tóxicos y carcinógenos (más de 7000) que son inhalados, como los benzopirenos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosaminas específicas del tabaco, benceno (causante de leucemias), formaldehído (un irritante y carcinógeno), monóxido de carbono y cianuros (asfixiantes), acroleína (un irritante), y polonio (un carcinógeno radiactivo). Éstos contribuyen a la carcinogénesis a través de su unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) y la producción de mutaciones que pueden llevar a la transformación celular o incluso a la muerte celular. Asimismo, desencadenan también procesos de inflamación, estrés oxidativo, y cambios epigenéticos (Gao y *cols.*, 2013).

La **nicotina** es el principal componente del cigarrillo. Originariamente se pensaba que sólo producía efectos adictivos, sin embargo, hoy sabemos que altera algunas funciones celulares relacionadas con la mitosis, la angiogénesis y el crecimiento de muchos tipos celulares, incluyendo las células cancerígenas de cabeza y cuello. Además, hay estudios afirman que la nicotina inhibe la apoptosis inducida por el

cisplatino (Xu y cols., 2007; Arias y cols., 2010). En el estudio in vitro de Arias LR. y cols. (Arias y cols., 2010), la línea celular CAL27 derivada del cáncer oral de células escamosas en lengua, fue estimulada con 20 μ M de cisplatino en concomitancia con diferentes concentraciones de nicotina (0.1 μ M; 0.5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M) para determinar si la adición de nicotina inhibía la apoptosis celular inducida por cisplatino. Sus resultados determinaron que, a las concentraciones de 0.5 μ M y 1 μ M de nicotina, se observó el mayor efecto inhibitorio. A la concentración de 0.1 μ M no se observó ningún efecto y, en las altas concentraciones de 5 μ M y 10 μ M, disminuyó su función inhibitoria. No obstante, el crecimiento celular siempre estuvo más disminuido (existió más apoptosis) cuando sólo se estimularon las células con cisplatino. Estos resultados están relacionados con aquellos estudios clínicos que muestran que los pacientes con cáncer que continúan fumando, presentan porcentajes de supervivencia menores que aquellos que eliminaron el hábito tabáquico antes del tratamiento del cáncer (Warnakulasuriya y cols., 2005).

Cabe también citar la aparición en 2007 de los **cigarrillos electrónicos** en EEUU. Éstos contienen propilenglicol, glicerina vegetal, saborizantes y/o nicotina, y otras sustancias cuya composición no ha sido revelada. Su combustión a altas temperaturas libera compuestos carcinogénicos tales como el formaldehído, acetaldehído y la acroleína; además de oxidantes y especies reactivas de oxígeno, metales pesados y compuestos orgánicos volátiles tales como el tolueno. Aunque todavía se necesitan estudios que revelen el mecanismo por el cual los cigarrillos electrónicos rompen las cadenas del ADN, existe evidencia científica que revela la citotoxicidad de los mismos, aumentando así los porcentajes de apoptosis y necrosis celular. Por todo ello, son necesarios más estudios que indiquen si el daño producido en el ADN puede llevar a mutaciones y, en última instancia, a producir cáncer (Yu y cols., 2016).

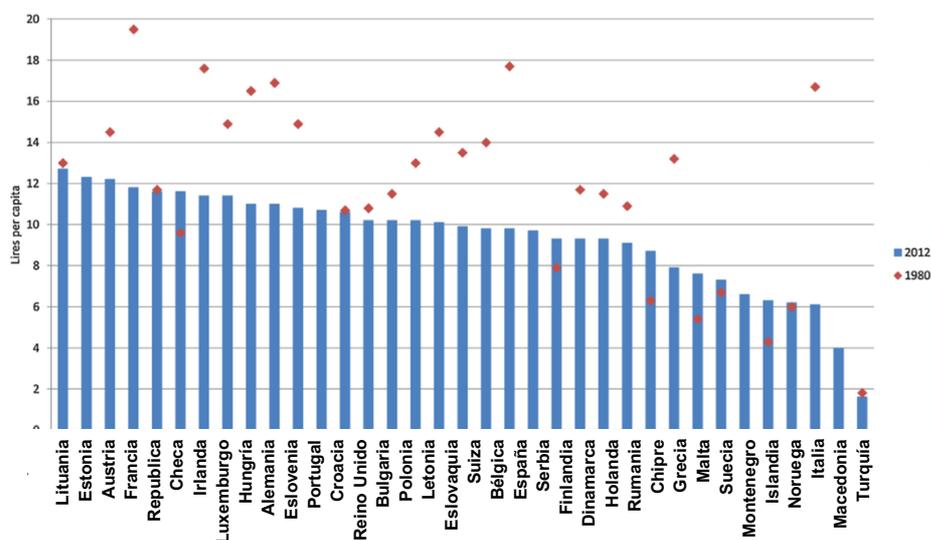
* Alcohol

En Europa, el alcohol es el tercer factor de riesgo causante de enfermedad y mortalidad después del tabaco y la hipertensión (Scoccianti y cols., 2016). Está relacionado con alrededor del 10% de todos los cánceres que ocurren en hombres

Europeos; así como con el 3% de aquéllos acontecidos en mujeres. El riesgo de desarrollar cáncer de la cavidad oral y faringe es alrededor de 5 veces mayor en bebedores que en no bebedores; ascendiendo a 35 veces mayor el riesgo en aquellos que son también fumadores en comparación con los que ni fuman ni beben (López-Lázaro, 2016). Los efectos y riesgo carcinogénicos son similares para todas las bebidas alcohólicas, debido a que el etanol es el factor causal común. La posibilidad de desarrollar COCE estará relacionado con la cantidad y frecuencia de alcohol ingerido, así como con su concentración (Scocciati y cols., 2013; López-Lázaro, 2016; Scocciati y cols., 2016). El alcohol no sólo aumenta el riesgo de cáncer en estas áreas, también de desarrollarlo en la laringe, esófago, hígado, colon, recto y mama (Bagnardi y cols., 2015).

Además, el sexo masculino o femenino, la edad y el nivel socioeconómico, son **determinantes** influyentes en los niveles de consumo de alcohol. Los hombres y, sobre todo si son jóvenes o de mediana edad suelen beber más alcohol, sobre todo en los países de Europa Central, Oeste y Norte (Scocciati y cols., 2016). Datos recientes de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) (Figura 2) muestran que los individuos de 15 años o más, beben una media de 9,4 litros de alcohol puro al año.

Figura 2. Consumo medio de ingesta de alcohol de individuos europeos ≥ 15 años en 1980 y 2012 (litros/capita/año) (Scocciati y cols., 2016).



El consumo tiende a ser mayor en países del este o del centro de Europa (Estonia, Lituania y Austria) con un consumo medio mayor de 12 litros per cápita. En cambio, los países del mediterráneo (Italia, Malta, Grecia) y países nórdicos (Noruega, Suecia, Islandia) tienen menores niveles de consumo, unos 6-8 litros per cápita. En cuanto al nivel socioeconómico cabe indicar que, las mujeres con mayor nivel cultural, tienden a beber más alcohol; mientras que los hombres con menos nivel educativo, son los que más suelen ingerir alcohol (Scocciati y cols., 2016).

El mecanismo biológico por el cual el alcohol causa cáncer, no está todavía claro porque el etanol no es un factor mutagénico en sí. En cambio, ciertas sustancias presentes en las bebidas alcohólicas como N-nitrosodietilamina (en cervezas y whiskeys), e hidrocarburos policíclicos aromáticos (en algunos whiskeys) son carcinógenos (Reidy y cols., 2011). Sin embargo, es la metabolización del alcohol la que produce un agente con un alto potencial mutagénico, el **acetaldehído**, el cual es considerado el principal agente carcinógeno del alcohol, por su capacidad de dañar el ADN celular. Esta metabolización ocurre mayoritariamente en el hígado; sin embargo, los niveles de acetaldehído salivales altos en bebedores, reflejan que la metabolización también ocurre en la cavidad oral (Kurkivuori y cols., 2007; Connor, 2016). Son algunas bacterias del grupo Streptococcus las encargadas de dicha metabolización del etanol a acetaldehído a través de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Este mecanismo podría explicar el por qué pacientes con una higiene oral deficiente tienen un riesgo aumentado también (no sólo los bebedores) de desarrollar cáncer oral (Kurkivuori y cols., 2007; Reidy y cols., 2011).

Otra posible explicación al mecanismo biológico por el cual el alcohol está relacionado con la aparición de cáncer oral, viene reflejado en el estudio de Miguel López-Lázaro (López-Lázaro, 2016). Éste destaca la importancia del efecto citotóxico local que el alcohol ejerce sobre las células del epitelio oral. De esta manera, cuando la ingesta de alcohol es regular y, por ende, el efecto citotóxico, aumenta el tiempo en que las células de la mucosa oral y esofágica se dividen (14-20 días y 21 días respectivamente). Son entonces las **células madre** que se encuentran en capas más profundas de la mucosa y que no estuvieron en contacto con el etanol, comienzan a dividirse para reemplazar a las células muertas del epitelio. Cada vez que las células

se dividen, están expuestas a más errores asociados al proceso de división celular (mutaciones durante la replicación del ADN, aberraciones cromosómicas, ...) lo que las hace altamente vulnerables a mutágenos endógenos y exógenos (especies reactivas de oxígeno, tabaco, acetaldehído, ...). Por lo tanto, cuantas más divisiones celulares acumule una célula madre a lo largo de su vida, más alteraciones podrá acumular en el ADN, y mayor será el riesgo de transformación maligna. A través de este proceso, el alcohol permite la penetración de factores carcinógenos.

La posible relación entre el uso de **enjuagues bucales** con alcohol y el desarrollo de cáncer oral, fue por primera vez informado por Weaver y cols. en 1979 (Weaver y cols., 1979). El etanol es empleado como solvente en muchos enjuagues dentales, con concentraciones entre el 5% y el 27% del volumen. Sus características antisépticas, su fácil disponibilidad y su bajo coste lo hacen muy atractivo para las empresas. Actualmente, no existe un consenso acerca de la posible relación entre el uso de dichos enjuagues bucales con contenido alcohólico y el cáncer oral. Siendo necesarios, de este modo, estudios epidemiológicos comparativos mejor diseñados (Lachenmeier y cols., 2009; Reidy y cols., 2011).

* VPH

De los 2.635.000 nuevos casos de cáncer (excluyendo los cánceres de piel no-melanoma) que acontecieron en la Unión Europea en 2012, se estima que aproximadamente 185.000 están relacionados con la infección con el VPH, los virus de la hepatitis B y C (VHB, VHC), y el *Helicobacter pylori*. Los cánceres causados por el VPH incluyen todos los cánceres de cuello de útero, la mayoría de los cánceres anales (88%), y cánceres de vagina (70%), vulva (43%), pene (50%), y orofaríngeos (26%). Son 12 los tipos de VPH reconocidos por la IARC como carcinógenos humanos-VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59-. En concreto, el VPH16 está relacionado con el 95% de los cánceres orofaríngeos (Villain y cols., 2015).

En la última década se ha producido un aumento del carcinoma orofaríngeo, sobre todo en las amígdalas y en la base de la lengua (tercio posterior), y una disminución

de los carcinomas de hipofaringe y laringe. Este cambio ha acontecido en paralelo con una exposición al VPH. Los cánceres orofaríngeos causados por el VPH se corresponden con hombres de mediana edad, de piel blanca, no fumadores, con un nivel socio-económico alto y una historia de múltiples parejas sexuales (Tabla 1) (Torre y cols., 2015; Marur y Forastiere, 2016).

Tabla 1. Características del COCE con VPH+ y VPH- (Marur y Forastiere, 2016).

Variable	VPH +	VPH -
Raza	Blanca >negra	Blanca >negra
Edad (años)	40-60	>60
M:F	8:1	3:1
Estatus socioeconómico	Alta	Baja-Media
Tabaco/alcohol	No o mínimo	Significativo
Marihuana	Fuerte asociación	Desconocida
Experiencia sexual temprana	Fuerte asociación	Desconocida
Parejas sexuales múltiples	Fuerte asociación	Desconocida
Estadío T	Estadíos iniciales	Estadíos + avanzados
Estadío N	Estadíos + avanzados	Estadíos iniciales

La respuesta a los tratamientos anticancerígenos es mayor en los cánceres de orofaringe relacionados con el VPH ya que éstos no están relacionados con mutaciones de genes supresores tumorales como por ejemplo el p53, como los relacionados con un consumo de alcohol y tabaco. Es por ello que, el comportamiento de aquellos cánceres orales asociados con esos factores de riesgo (tabaco y alcohol), es más agresivo que el de los cánceres orales relacionados con el VPH. Además, su pronóstico es peor, pues se pueden hacer resistentes al tratamiento (Marur y Forastiere, 2016; Sano y Oridate, 2016).

Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, son los factores virales responsables del inicio y progresión de los cánceres relacionados con el VPH, que ocasionan una inestabilidad genómica, alteraciones en la integración del ADN, alteraciones

epigenéticas que llevan a producir una transformación neoplásica (con una expresión genética única) y una progresión del tumor (Sano y Oridate, 2016).

* Otros factores de riesgo exógenos

Una **dieta** rica en frutas y verduras y baja en productos de origen animal, está asociada con un bajo riesgo de cáncer de la cavidad oral y faríngeo, así como otros tipos de cáncer. Este efecto protector se atribuye a sustancias como los carotenoides, las vitaminas C y E, los folatos, los flavonoides, la fibra o el licopeno. Por el contrario, aquellos pacientes con déficit de hierro presentan un riesgo aumentado de desarrollar COCE (Chi y cols., 2015).

Se ha demostrado que existen diferencias en la **microbiota oral** entre aquellos pacientes sanos y los pacientes con COCE de la cavidad oral, especialmente se encuentran mayores niveles de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Sin embargo, no está claro si está directamente relacionado con la carcinogénesis o si simplemente refleja diferencias en cuanto a la capacidad de la microbiota de adaptarse al medioambiente tumoral (Whitmore y cols., 2014; Chi y cols., 2015).

Infecciones causadas por virus como el virus de Epstein-Barr o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH⁺) así como los receptores de trasplantes, están relacionados con una mayor incidencia de cáncer de la cavidad oral o faríngeo (Chi y cols., 2015; Guidry y Scott, 2017).

La **exposición ocupacional** a radiaciones ultravioleta, disolventes o polvo de metal, madera o cemento también presenta una mayor incidencia de COCE en constructores, pintores, carpinteros, trabajadores del metal, etc. (Langevin y cols., 2013; Chi y cols., 2015).

El **factor genético** también es otro factor de riesgo para el desarrollo de COCE. La predisposición familiar debe ser considerada si los miembros de la familia de primer grado han tenido un cáncer de cabeza y cuello, particularmente si el inicio ocurrió antes

de los 50 años, en cuyo caso el riesgo aumenta más del doble en el caso de hermanos (Majchrzak y cols., 2014). Independientemente de esta predisposición familiar, la base genética del desarrollo del cáncer viene explicada por diversas teorías. La teoría más aceptada indica que genéticamente el cáncer se produce a través de un proceso de activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores (como la p53) desencadenado por uno o varios de los factores de riesgo mencionados, junto con una estimulación inflamatoria del microambiente tumoral. Se trata de un proceso multiseccional que implica una serie de alteraciones discretas, irreversibles y complementarias en los genes que controlan el crecimiento, la muerte y la diferenciación celular (Dosne C y cols., 2003; García V y cols., 2005; Walsh y cols., 2007).

1.1.3. Estadiaje TNM

Un sistema de estadiaje constituye una guía para definir la extensión y pronóstico de un cáncer, y sirve para comparar los resultados entre los distintos centros. Existen varios sistemas de clasificación, pero el más utilizado es el TNM clínico que categoriza al cáncer y, en este caso en particular, al COCE, en función de T (tamaño tumoral), N (afectación de ganglios linfáticos regionales) y M (presencia de metástasis a distancia (Solbin LH y cols., 1988; Chi y cols., 2015)

En las Tablas 2,3 y 4, se expone la clasificación del cáncer de orofaringe en función de estas tres características y, en la Tabla 5, el estadiaje tumoral resultante de su combinación.

Tabla 2. Clasificación TNM. Tumor primario (T).

T _x	No puede evaluarse el tumor primario
T ₀	No existe evidencia de tumor primario
T _{is}	Carcinoma in situ
T ₁	Tumor menor o igual a 2 cm

T ₂	Tumor mayor de 2 cm pero menor de 4 cm
T ₃	Tumor mayor de 4 cm
T ₄	Tumor que invade estructuras adyacentes
T _{4a}	Enfermedad local moderadamente avanzada (el tumor sólo invade estructuras adyacentes: hueso cortical -mandíbula o maxilar superior-, musculatura profunda lingual, seno maxilar, piel de la cara)
T _{4b}	Enfermedad local muy avanzada (el tumor invade el espacio masticador, la apófisis pterigoides o la base del cráneo y/o rodea la arteria carótida interna)

Tabla 3. Clasificación TNM. Ganglios linfáticos regionales (N).

N _x	No pueden evaluarse ganglios linfáticos regionales
N ₀	No existe metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N ₁	Metástasis en un único ganglio en el mismo lado menor o igual a 3 cm
N ₂	Metástasis en uno o varios ganglios en el mismo lado, el contrario o bilaterales menores de 6 cm
N _{2a}	Metástasis en un ganglio en el mismo lado mayor de 3 cm pero menor de 6 cm
N _{2b}	Metástasis en múltiples ganglios del mismo lado, no mayores de 6 cm
N _{2c}	Metástasis en ganglios bilaterales o contrarios no mayor de 6 cm
N ₃	Metástasis en ganglios mayores de 6 cm

Tabla 4. Clasificación TNM. Metástasis a distancia (M).

M ₀	Ausencia de metástasis
M ₁	Metástasis distancia

Tabla 5. Estadíos TNM.

Estadío	Clasificación TNM		
0	T _{is}	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1,T2,T3	N1	M0
IV			
IVA	T1,T2,T3	N2	M0
	T4a	N0,N1,N2	M0
IVB	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.1.4. Pronóstico y Tratamiento

La tasa de supervivencia a los 5 años es de más del 80% de entre los cánceres de cabeza y cuello tratados en estadio precoz. En cambio, cuando la enfermedad se ha diseminado a los nódulos del cuello, este porcentaje se ve reducido al 40%; llegando incluso a menos del 20% de supervivencia a 5 años en las metástasis (Kalavrezos y Bhandari, 2010; Yadav y cols., En prensa). La presencia de metástasis a nódulos linfáticos es el factor más relacionado con el pronóstico del COCE. Constituye el primer signo de diseminación tumoral (Noguti y cols., 2012). No obstante, existen otros factores también se consideran influyentes en su pronóstico, entre ellos, la edad del paciente, el tipo de tumor, el estadio del tumor primario en el momento del diagnóstico o su localización (Brana y Siu, 2012; Luryi y cols., 2015). Por ejemplo, el cáncer orofaríngeo asociado al VPH tiene mejor pronóstico que aquéllos COCE no relacionados con este virus (Feinstein y cols., 2017).

Los pacientes con nódulos linfáticos positivos presentan tasas de curación un 50% menores que aquellos pacientes sin metástasis en nódulos. Además, en los pacientes con nódulos linfáticos positivos, un signo adicional de peor pronóstico es la presencia de diseminación extracapsular. Este hecho ocurre en más del 60% de los nódulos mayores de 3 cm y hasta en un 23% de los nódulos menores de 1 cm (Walsh y cols., 2007). Además, entre un 15-50% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, presentará recurrencias locorregionales. Las recurrencias son difíciles de tratar debido a múltiples razones como por ejemplo, los efectos derivados del tratamiento anticancerígeno previo o la naturaleza invasiva del cáncer (Chang y cols., En prensa).

Aunque son numerosos los avances realizados en los tratamientos anticancerígenos por mejorar el control del COCE, el porcentaje de supervivencia no ha mejorado significativamente en las últimas tres décadas (Yadav y cols., En prensa). Por todo ello se siguen planteando posibles modalidades de tratamiento. Aun así, una serie de recomendaciones son esenciales para una mayor eficacia del tratamiento empleado. En primera instancia, se recomienda que los pacientes abandonen los hábitos considerados como factores de riesgo. Asimismo, es importante que el paciente siga una dieta con alto contenido en frutas y verduras, ya que la deglución puede volverse dificultosa por el tratamiento anti-cancerígeno y por la enfermedad en sí. Y, además, que lleven a cabo una correcta higiene bucodental, lo cual, reducirá la aparición de infecciones orales o lesiones mucosas (Chi y cols., 2015; Friemel y cols., 2016).

Las opciones de tratamiento del COCE se basan en las directrices de la European Head and Neck Society-European Society of Medical Oncology-European Society for Radiotherapy and Oncology (EHNS–ESMO–ESTRO) en relación al estadio TNM, es decir, la primera opción de tratamiento viene generalmente determinada por el estadiaje de la enfermedad (Grégoire y cols., 2010; Omura, 2014). Es por ello que en este estudio de tesis se exponen las distintas opciones de tratamiento basándonos en el estadio TNM. No obstante, existen también otros factores a tener en cuenta y que también están detallados dentro de cada estadio, como son el estado de los márgenes quirúrgicos, el grosor o la presencia de invasión perineural y/o perivascular (Majchrzak y cols., 2014). Asimismo, el tratamiento debe adaptarse individualmente a las

necesidades del paciente, imperando su calidad de vida, así como su supervivencia (Omura, 2014).

A continuación, se enumeran las siguientes modalidades de tratamiento, atendiendo a su estadio TNM:

Plan de tratamiento para estadios I y II

En los estadios I y II, la **radioterapia** o la **cirugía conservadora**, dan resultados similares con respecto al control local del tumor (Grégoire y cols., 2010; Noguti y cols., 2012). Su elección dependerá de las necesidades de tratamiento del paciente teniendo siempre en cuenta preservar, dentro de los límites de la enfermedad, sus funciones de masticación, deglución, mantenimiento de la competencia oral y la fonación (Omura, 2014).

Debido a que una extirpación quirúrgica defectuosa desencadena un alto riesgo de recurrencias loco-regionales y disminuye la supervivencia a largo plazo, se tiende a realizar una resección quirúrgica con amplios márgenes. En ausencia de diseminación a los nódulos linfáticos cervicales, se emplea la cirugía conservadora con márgenes quirúrgicos amplios y un seguimiento clínico posterior. Sin embargo, por la localización del COCE, unos márgenes quirúrgicos amplios tienen una gran implicación en el paciente, a nivel estético y funcional (Omura, 2014). Es por ello que, aunque la incidencia de metástasis ocultas loco-regionales son frecuentes en los estadios I y II (Noguti y cols., 2012) y son diversas las pautas de actuación al respecto, la recomendación actual consiste en realizar la disección ganglionar cervical (o vaciamiento de los ganglios linfáticos del cuello) sólo cuando el riesgo de metástasis ocultas sea mayor al 20%, cuando forme parte de la extirpación del tumor primario, o cuando sea poco probable el seguimiento clínico del paciente (Omura, 2014).

En cuanto al tratamiento con radioterapia, los avances recientes como la radioterapia intensidad modulada (RIM), permite que los haces de radiación, lleguen de forma más precisa al tumor y eviten en la mayor medida posible, a los tejidos que rodean al tumor, proporcionando unas buenas tasas de supervivencia incluso en recurrencias (Grégoire y cols., 2010; Chang y cols., En prensa).

Plan de tratamiento para estadíos III y IV

En general, un tumor podría considerarse **operable** o resecable cuando existe la seguridad de que una vez extirpado el tumor no quedarán células cancerosas, preservando la funcionalidad de los órganos afectados y proporcionando un buen resultado estético con o sin cirugía reconstructiva y, a menudo con radioterapia postoperatoria (Noguti y cols., 2012; Hasegawa y cols., 2017). Cuando los márgenes del tumor son positivos (infiltrados por el tumor), o éste se disemina más allá del revestimiento externo de los ganglios linfáticos (diseminación ganglionar extracapsular), se recomienda quimiorradioterapia postoperatoria (**tratamiento coadyuvante** a la cirugía) a base de platino (cisplatino o carboplatino) (Chen y cols., 2016). El tratamiento quirúrgico combinado con la quimiorradioterapia postoperatoria, ha mejorado el control locoregional del COCE con respecto a la radioterapia postoperatoria. Sin embargo, las tasas de supervivencia y las complicaciones son muy similares. El control de las metástasis supone una limitación del tratamiento mediante quimiorradioterapia postoperatoria (Hasegawa y cols., 2017; Tangthongkum y cols., En prensa).

Aunque la cirugía seguida de radioterapia postoperatoria presenta mejores índices de supervivencia que la quimiorradioterapia sola como tratamiento exclusivo del COCE (Spiotto y cols., En prensa), el hecho de que la **quimiorradioterapia** preserve la función de los órganos (Kang y cols., 2015), podría hacer de éste una opción de tratamiento, no sólo para cuando no se plantea una solución quirúrgica, sino también como alternativa a la cirugía.

Asimismo, la **radioterapia** también es una alternativa cuando se desestima la cirugía como tratamiento, por afectar a estructuras técnicamente muy difíciles de operar o incluso, cuando el resultado podría no ser aceptable para el paciente desde un punto de vista estético y funcional (Noguti y cols., 2012). No obstante, la **quimiorradioterapia** muestra ser más efectiva que la radioterapia empleada como único tratamiento (Grégoire y cols., 2010).

Además, la cirugía también representa el tratamiento de elección en los COCEs recurrentes. No obstante, también la radioterapia o la quimiorradioterapia,

proporcionan una opción de tratamiento para aquellos COCEs recidivantes donde se desestima la cirugía (Chang y *cols.*, En prensa).

El concepto de “**terapia de inducción o neoadyuvante**” mediante quimioterapia (cisplatino y 5-fluorouracilo; o cisplatino, 5-fluorouracilo y taxanos, entre otras combinaciones), es otra posibilidad de tratamiento, que se administra previamente al tratamiento local de cirugía, radioterapia o quimiorradioterapia, con el objetivo de reducir el tamaño del tumor y mejorar su posibilidad de curación. Su empleo, debe ser justificado en situaciones específicas como por ejemplo, en cánceres muy avanzados, en pacientes sintomáticos, cuando se va a retrasar el inicio del tratamiento. No obstante, no existe una prueba clara de que dicha terapia mejore la supervivencia tumoral (Zhong y *cols.*, 2015; Marur y Forastiere, 2016), aunque sí parece estar relacionada con una mejoría significativa de las metástasis (Ma y *cols.*, 2012).

El quimioterápico más comúnmente empleado y mejor estudiado en la quimiorradioterapia, es el **cisplatino** (Kang y *cols.*, 2015). Una mejoría del 6,5% en el porcentaje de supervivencia ha sido demostrado mediante este tratamiento concomitante (quimioterapia y radioterapia) y, actualmente es el tratamiento de elección en las guías de prácticas clínicas tanto europeas como estadounidenses (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para el tratamiento local y/o regional del COCE de cabeza y cuello avanzado (estadios III-IV) después de la cirugía o cuando no se plantea una solución quirúrgica. La causa de esta mejoría radica en las propiedades radiosensibilizantes del cisplatino a través de la inhibición de la reparación del ADN y de la detención del ciclo celular, lo que mejoraría la eficacia de la radioterapia (Marcu, 2013; Ahn y *cols.*, 2016; Strojan y *cols.*, 2016). Además, cuando su empleo no requiere de una intervención quirúrgica, permite preservar la función de las cuerdas vocales así como mantener la estructura del cuello (Kang y *cols.*, 2015).

El protocolo estándar de tratamiento consiste en administrar altas dosis de cisplatino, en concreto, 100 mg/m^2 en los días 1, 22 y 43 de la radioterapia (aproximadamente cada 3 semanas) (Ahn y *cols.*, 2016; Strojan y *cols.*, 2016). Sin embargo, se están estudiando posibles alternativas como la administración semanal de menores dosis de cisplatino, con el fin de disminuir los efectos adversos derivados del empleo del cisplatino según el protocolo estándar (mucositis, complicaciones

hematológicas y renales). Asimismo, también podría ser una posibilidad de tratamiento para aquellos pacientes jóvenes con cáncer orofaríngeo relacionado con el VPH y sin el hábito tabáquico que no necesitarían altas dosis de quimioterapia (Ahn y cols., 2016). Sin embargo, algunos autores como Osman y cols. (Osman y cols., 2014) estiman que estas dosis de cisplatino podrían ser subóptimas. Incluso, aunque autores como Kang y cols. (Kang y cols., 2015) observan que a menores dosis de cisplatino se reducen los efectos adversos; otros autores como Tsan y cols. (Tsan y cols., 2012) observaron menor toxicidad cuando el tratamiento fue a mayores dosis y cada 3 semanas.

Los **mecanismos de resistencia tumoral** pueden ser causados por una limitación en la penetración de los fármacos dentro de los tumores u otros mecanismos que se detallarán más adelante. Con el fin de eliminar a todas las células tumorales, los tratamientos anti-cancerígenos administrados sistémicamente, necesitan ser distribuidos a través de los vasos sanguíneos tumorales, cruzar las paredes de los vasos sanguíneos, y penetrar en el espacio intersticial para alcanzar finalmente cada célula tumoral a la concentración suficiente como para ser efectivo. El hecho de que las células tumorales proliferen a mayor velocidad que las células endoteliales capilares, favorece la formación, por parte de las células tumorales, de una arquitectura vascular anormal desfavorable para la distribución de fármacos. Por todo ello, se han desarrollado unos fármacos compuestos por **nanopartículas** que tienen la ventaja de liberarse e introducirse en el espacio circundante tumoral aprovechando la excesiva debilidad de los vasos sanguíneos tumorales neoformados (por la presencia de grandes gaps entre las células endoteliales) (Khawar y cols., 2015).

Sin embargo, las nanopartículas por sí solas no son suficientes para la obtención de un beneficio clínico sustancial debido a un efecto insuficiente o a una acumulación en lugares no intencionados. Incluso si alcanzaran el tumor, el microambiente tumoral (vasos sanguíneos anormales, elevada presión de fluido intersticial, estrés sólido tumoral) limitaría su eficacia. Por ello, se presentan unos fármacos, que tienen la finalidad de mejorar la perfusión vascular y la distribución de los tratamientos anti-tumorales a través del tejido conectivo, favoreciendo así su penetración y, por ende,

su eficacia. Éstos se conocen con el nombre de “terapias moleculares dirigidas” (TMD) (Khawar y cols., 2015).

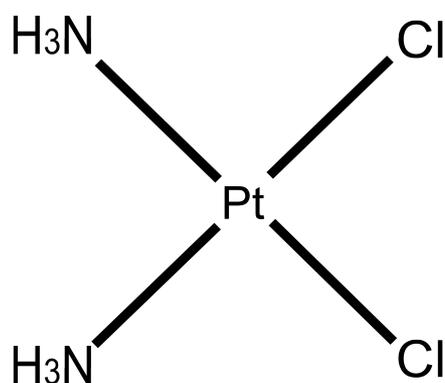
Las **TMD** son pequeñas moléculas o anticuerpos monoclonales que interactúan con genes o proteínas específicos de un tumor o de las condiciones del tejido tumoral, que contribuyen en el crecimiento o progresión tumorales (Huang y cols., 2014). Las mutaciones genéticas desencadenan una serie de alteraciones que hacen que las TMD ya no reconozcan a la molécula específica para la cual fueron diseñadas. Incluso, el tumor también puede encontrar otro modo de desarrollarse (Holoand y cols., 2013; Huang y cols., 2014). Este tipo de mecanismos de resistencia tumoral a las TMD muestran bajas tasas de eficacia. Por ello, no suelen emplearse como monoterapia. Sin embargo, en combinación con citotóxicos como los derivados del platino, presentan resultados óptimos (Kelland, 2007). No obstante, se sigue investigando en el desarrollo de este tipo de terapias más eficaces con el fin de ser más selectivas, dañar menos a las células normales, reducir sus efectos secundarios y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La única TMD aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento del COCE es el **cetuximab**, un anticuerpo monoclonal que se emplea principalmente, en combinación con la radioterapia. Ejerce su acción a través de la unión específica al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Aproximadamente alrededor del 95% de los tumores de cabeza y cuello, presentan una sobreexpresión de este receptor EGFR (Marcu, 2013; Gong y cols., 2017). Este receptor es de gran relevancia, ya que, favorece el crecimiento y proliferación de las células epidérmicas en el crecimiento, proliferación, propagación y angiogénesis de los tumores de cabeza y cuello. Actualmente, algunos estudios comparativos entre el tratamiento local del COCE avanzado mediante la quimiorradioterapia o el cetuximab combinado con la radioterapia, muestran mejores porcentajes de supervivencia a 2 años, menores recidivas y mayor control loco-regional, cuando el tratamiento fue el de quimiorradioterapia (Petrelli y cols., 2014). Es por ello que no se puede emplear indiscriminadamente, sino que resulta imprescindible valorar el estado general del paciente, el estado de su enfermedad y su necesidad de tratamiento individualizada.

1.2. CISPLATINO

El cisplatino, también llamado cis-diaminodicloroplatino (Figura 3), es un compuesto metálico (platino) ligeramente soluble en agua, y en dimetilprimanida y N,N-dimetilformamida. De color blanco o amarillo oscuro-anaranjado, es polvo a temperatura ambiente y estable a temperaturas y presiones normales. El cisplatino tiene un peso molecular de 301,1 g/mol, una densidad de 3.74g/cm³ y un punto de fusión a 270°C (Dasari y Tchounwou, 2014).

Figura 3. Estructura química del cisplatino.



M. Peryone sintetizó por primera vez el cisplatino en 1844, haciendo Alfred Werner en 1893 conocida su estructura química. Sin embargo, no fue hasta la década de los 60 cuando los experimentos de Rosenberg en la Universidad de Michigan crearon un gran interés en este compuesto por su posible uso como agente quimioterápico al provocar la inhibición de la división celular en la *Escherichia coli* (Dasari y Tchounwou, 2014).

En 1978, fue reconocido por la FDA como el primer compuesto de platino empleado en el tratamiento del cáncer, tras un ensayo en el que alcanzó un porcentaje de curación de entre el 5% y el 60% en la metástasis de cáncer testicular (Kelland, 2007). Actualmente, es considerado uno de los quimioterápicos más efectivos utilizados para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres (Montiel y cols.,

2009) como el de vejiga, mama, pulmón, tejidos blandos, huesos, músculos o el de los vasos sanguíneos (Price y cols., 2006). Además, es uno de los más efectivos frente al cáncer testicular y ovárico. Y Es también el quimioterápico más frecuentemente empleado en los tumores de cabeza y cuello (Hiraishi y cols., 2008).

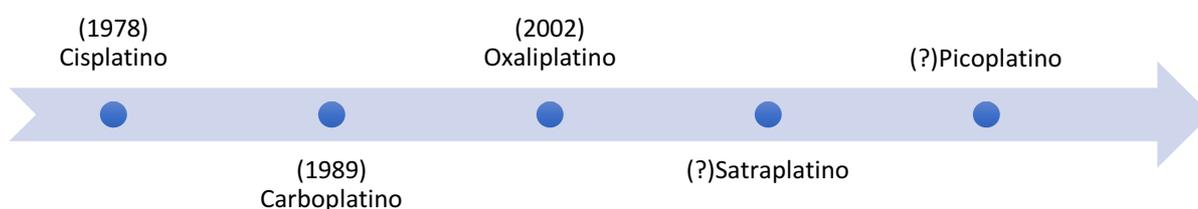
Las náuseas y los vómitos son síntomas comunes. Además, la administración del cisplatino está relacionado con la aparición de toxicidad en diferentes órganos. Es sabido que alrededor del 30% del cisplatino, es excretado del cuerpo en las primeras 24 horas. Por lo que, ejerce su mayor grado de toxicidad en el riñón por ser su principal ruta de excreción. Además, también son conocidas otras toxicidades, entre las principales, la hepatotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad y ototoxicidad. La mayoría de estas toxicidades son dosis y tiempo dependientes, y alcanzan una toxicidad precoz y más severa cuando las infusiones son realizadas de forma rápida (con respecto a infusiones lentas) (Dasari y Tchounwou, 2014; Ahn y cols., 2016).

La nefrotoxicidad asociada al empleo del cisplatino produjo una ola de investigaciones con el fin de desarrollar un análogo menos tóxico pero que mantuviese las mismas propiedades anticancerígenas del cisplatino. Así, a mediados de los 80, la colaboración del Johnson Matthey (JM) Y el Institute of Cancer Research (ICR) en Londres, dieron origen al **carboplatino**, de menor nefrotoxicidad (Figura 4). Sin embargo, el efecto anticancerígeno con el carboplatino se consigue mediante concentraciones entre 20 y 40 veces mayores que con el cisplatino, lo que predispone a la mielosupresión, especialmente a la aparición de trombocitopenia (Kelland, 2007).

Fueron múltiples los intentos de conseguir otros análogos de platino. Sin embargo, ninguno consiguió mostrar beneficios significativos en comparación con los ya conocidos cisplatino y carboplatino, salvo el **oxaliplatino**, originariamente descrito a mediados de los 70, y aprobado por la FDA en 2002 tras mostrar su efectividad contra el cáncer de colon metastásico en combinación con 5-fluoracilo-leucovorina (5FU-LV). Además, es efectivo frente a algunos cánceres resistentes al tratamiento con cisplatino. Sin embargo, éste continuaba siendo administrado de forma intravenosa. De esta forma se planteó la fabricación de otro compuesto derivado del platino que pudiera ser administrado por vía oral, el **satraplatino**, que constituía la versión activa por vía oral del carboplatino (aún en revisión por la FDA). Finalmente, aparece el

picoplatino como una combinación de los dos agentes quimioterápicos anteriores, pues su acción antitumoral *in vivo* se consigue por ambas vías, la venosa y la oral. Presenta efectividad *in vitro* frente a tumores resistentes al cisplatino y al oxaliplatino. Los estudios clínicos realizados con satraplatino y picoplatino han revelado toxicidades similares a las desencadenadas mediante carboplatino, pero sin nefrotoxicidad marcada ni neurotoxicidad (Kelland, 2007). Sin embargo, su efectividad en el tratamiento de tumores recurrentes o metástasis tumorales, es limitada debido a la adquisición de resistencias (Hiraishi y cols., 2008) (Figura 4).

Figura 4. Representación esquemática de los agentes quimioterápicos más relevantes que contienen platino. Aquéllos aprobados por la FDA, vienen acompañados del año de aprobación.



Actualmente, el cisplatino es el principal tratamiento de tumores de origen epitelial (pulmón, vejiga, ginecológicos y de cabeza y cuello) desde hace ya 30 años (Sun y cols., 2017).

1.2.1. Mecanismo de acción

El cisplatino se introduce lentamente en la célula, en comparación con otros tipos de moléculas anticancerígenas. Este hecho está regulado por varios factores como la concentración de los iones sodio y potasio, el pH, la acción de transportadores o la permeabilidad de los canales (Kelland, 2007).

Antes de unirse al ADN celular, en el citoplasma celular, el cisplatino ha de activarse a través del reemplazo de uno de sus átomos de cloro, por moléculas de agua. De este modo, es posible su unión covalente al ADN celular, la cual da lugar a los denominados “aductos de ADN”. El producto resultante puede ocasionar daños en

el ADN de las células cancerígenas, bloqueando su división (bloquea a las células en la fase G2 del ciclo celular, fase de mitosis) y llevándolas a producir la muerte celular por apoptosis (Kelland, 2007; Marcu, 2013; Dasari y Tchounwou, 2014).

El cisplatino, por tanto, induce la muerte celular a través de la **apoptosis**. La apoptosis es un tipo de muerte celular controlada y dependiente de energía, que se produce a través de una serie de mecanismos. Entre ellos, cabría destacar la disminución del tamaño celular, la condensación de la cromatina, y la activación de las caspasas (proteasas) 8 y 9. Este proceso provoca la activación de una cascada de mecanismos, entre ellos, aquellos que llevan a la acción de las caspasas 3 y 7, desencadenando así una serie de procesos bioquímicos destinados a producir la fragmentación del ADN celular y, con ello, la muerte de la célula (Dasari y Tchounwou, 2014).

1.2.2. Resistencia al cisplatino

El desarrollo de resistencias al tratamiento del COCE con cisplatino antagoniza su eficacia clínica a largo plazo. Los mecanismos moleculares responsables son complejos, y pueden acontecer previa o posteriormente a la formación de los “aductos del ADN”. Se especifica a continuación, el momento en el que ocurren los mecanismos de resistencia tumoral (Figura 5), así como se detallan los procesos mediante los que éstos se desencadenan:

* **Mecanismos de resistencia previos a la unión del cisplatino con el ADN celular**

- 1. Restricción de captación de cisplatino al interior celular:** Se produce una disminución de acumulación de cisplatino en el interior celular en comparación con las células parenterales. La entrada de cisplatino a la célula, aunque influenciada por varios factores, está regulada por el transportador de cobre 1 (CTR1) que se encarga de transportar al interior

celular cobre y cisplatino. Una expresión disminuida de este transportador, disminuye la acumulación de cisplatino en el interior celular y, por tanto, la formación de aductos de ADN está disminuida, se reduce la citotoxicidad y aumenta la resistencia tumoral al quimioterápico (Kelland, 2007; Dasari y Tchounwou, 2014; Li y cols., 2016; Sun y cols., 2017).

- 2. Inactivación intracelular del cisplatino:** Cuando el cisplatino entra a las células tumorales, el proceso de activación mediante moléculas de agua, lo hace reconocible para muchas especies reactivas. Es, por tanto, vulnerable a ser inactivado por los componentes intracelulares como el glutatión (GSH) (principal antioxidante de las células), disminuyendo de este modo el agente anti-tumoral disponible para interactuar con el ADN (Siddik, 2003; Zhang, P. y cols., 2016).

- 3. Aumento del eflujo de cisplatino:** Además de los mecanismos citados, la resistencia tumoral al tratamiento está también relacionada con una subpoblación de células (<10%) con las mismas características que la de las células madre. Éstas han sido identificadas en tumores hematopoyéticos y en tumores sólidos como el de mama, cerebro, próstata, pulmón, colon, páncreas, hígado, melanoma, piel y cabeza y cuello. Estas células tienen la capacidad de constituir un tumor y de diferenciarse, además de autorrenovarse *in vivo* para producir más células madre. *In vitro*, pueden ser identificadas por la expresión de marcadores de superficie celular, por su rápida adherencia a los frascos de cultivo o por su disposición a modo de colonias (Harper y cols., 2010; Major y cols., 2013; Jiang y cols., 2015).
Además, presentan una sobreexpresión de **transportadores de tipo ABC**, una familia de proteínas de membrana con una amplia variedad de funciones celulares. Algunas en particular, promueven el flujo hacia el exterior de sustancias como los quimioterápicos (cisplatino). Esta característica tiene implicaciones significativas en los tratamientos antitumorales, pues estas células madre resistentes, son capaces de resistir al tratamiento quimioterápico y reiniciar el tumor, al evadir la apoptosis inducida por el quimioterápico expulsado (Siddik, 2003; Tonigold y cols.,

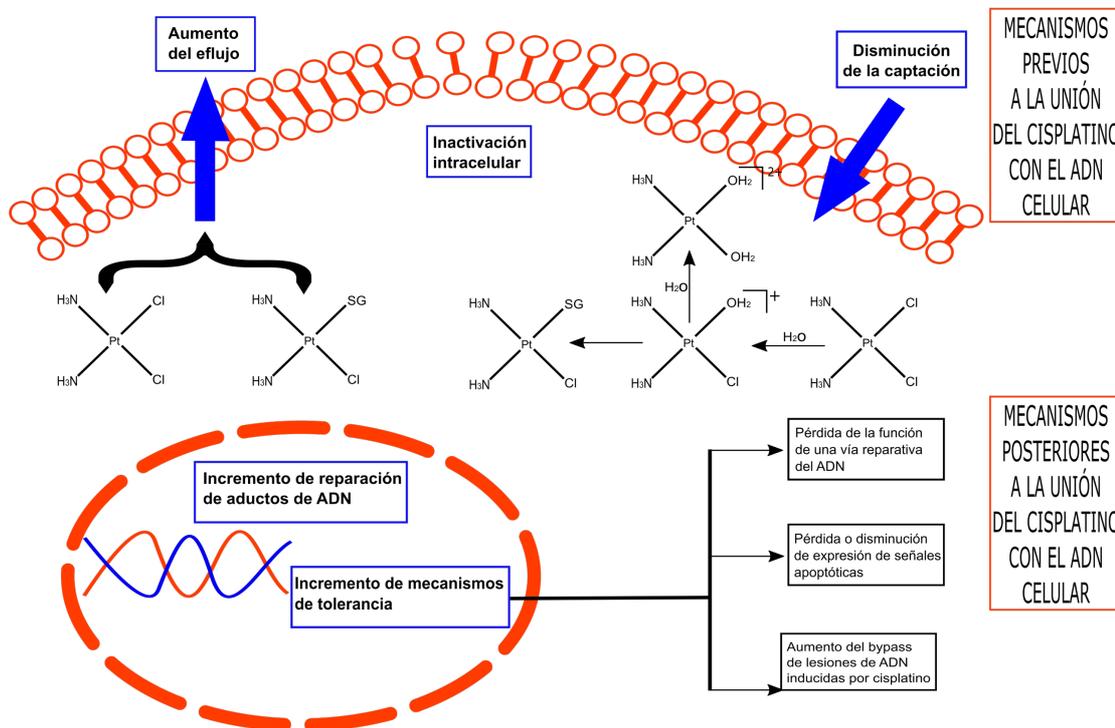
2014). Es por ello que, la fracción de células tumorales que no poseen esa capacidad de autorrenovación son aquellas que con mayor probabilidad sufren el proceso de apoptosis (acción inducida por el quimioterápico), lo cual explicaría la pronta pérdida de la masa tumoral que precede a una posterior recurrencia (Harper y cols., 2010; Major y cols., 2013; Jiang y cols., 2015).

* **Mecanismos de resistencia posteriores a la formación de “aductos de ADN”**

- 1. Aumento de la reparación del ADN:** El cisplatino ejerce su acción citotóxica a través de la formación de “aductos de ADN”. No obstante, las células pueden llevar a cabo procesos de reparación del ADN para sobrevivir a esta toxicidad que, finalmente desencadenen la eliminación de dichos aductos de ADN y, por consiguiente, se hagan resistentes al cisplatino. Procesos reparativos que no culminan, desencadenan finalmente una respuesta apoptótica (Kelland, 2007; Martens-De Kemp y cols., 2013).
- 2. Aumento de la tolerancia celular:** El aumento de la tolerancia al daño del ADN inducido por el cisplatino, puede darse por pérdida de la función de una de las vías de reparación del ADN; por aumento del bypass de las lesiones de ADN inducidas por el cisplatino; o por una pérdida o disminución de expresión de señales apoptóticas (Kartalou y Essigmann, 2001; Kelland, 2007).

En definitiva, la existencia de estos mecanismos de resistencia provoca la necesidad de seguir buscando nuevas estrategias de tratamiento. Las heparinas de bajo peso molecular, derivadas del compuesto natural heparina, parecen presentar además de su acción anticoagulante, una inactivación de los factores de la coagulación, factores angiogénicos, factores de crecimiento tumoral y de la heparanasa, la convierten en una opción de tratamiento prometedora.

Figura 5. Mecanismos de resistencia al cisplatino.



1.3. LA ETV Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER

La asociación entre el cáncer y la ETV data del siglo XIX, cuando fue por primera vez identificada por Jean-Baptiste Bouillaud. Armand Trousseau, quien se autodiagnosticó un cáncer basándose en la tromboflebitis que sufría en una de sus extremidades superiores (Ay y cols., 2017), corroboró que la ETV podía ser el primer signo clínico del tumor. De hecho, alrededor del 10% de los pacientes con una ETV no provocada, es decir, no relacionada con una cirugía reciente, tendrán diagnosticado un cáncer durante el año posterior a esa ETV (Khorana y cols., 2016). Incluso, pacientes ya diagnosticados de cáncer, tienen también un mayor riesgo de desarrollar una ETV es de aproximadamente de 4 y hasta de 6,5 veces mayor. En definitiva, aproximadamente el 20% de los pacientes con cáncer desarrollará una ETV (Soria y López, 2015). Cuando coexisten ambas enfermedades, los porcentajes de

supervivencia son significativamente menores y con peor pronóstico (Khorana y cols., 2005; Khorana y cols., 2006; Ay y cols., 2017).

Los factores de riesgo de desarrollar una ETV en pacientes con cáncer se organizan en cuatro grupos (Figura 6):

- a) **Factores relacionados con el tumor:** El lugar de origen tumoral, su estadio, el grado de diferenciación histológica y el tiempo desde que se diagnosticó, son factores que determinarán la posibilidad de aparición de una ETV. En cuanto a los tipos de tumor, los más frecuentemente relacionados con la ETV son los cánceres gástricos y pancreáticos. No obstante, también los cánceres de cerebro, pulmón, riñón, vejiga, hueso, los hematológicos y ginecológicos, también tienen un alto riesgo de desarrollar una ETV (Khorana y cols., 2016; Ay y cols., 2017). Por otro lado, los cánceres que presentan metástasis tumorales tienen mayor riesgo de desarrollar una ETV (Ay y cols., 2017), como es el ejemplo del COCE , del cual aproximadamente el 60% de los casos se encuentran en estadios ya avanzados (estadios III/IV) en el momento del diagnóstico (Rivera y Venegas, 2014; Marur y Forastiere, 2016). La mayoría de ETV comienzan en los primeros 3-6 meses tras el diagnóstico de cáncer. En cuanto al grado de diferenciación histológica, el riesgo es el doble en aquellos cánceres con un alto grado de diferenciación (Ay y cols., 2017).
- b) **Factores relacionados con el paciente:** La edad avanzada (≥ 65 años), la obesidad y la presencia de comorbilidades médicas se consideran factores de riesgo asociados con la ETV en pacientes con cáncer. La presencia de varices o una historia familiar de ETV también se consideran factores de riesgo (Soria y López, 2015; Ay y cols., 2017).
- c) **Factores de riesgo relacionados con el tratamiento:** La quimioterapia basada en compuestos de platino (por ejemplo, el cisplatino), los tratamientos antiangiogénicos (por ejemplo, bevacizumab), los tratamientos hormonales, la cirugía, la radioterapia, las transfusiones sanguíneas, así como la inmovilidad relacionada con la hospitalización, son también factores de riesgo en el desarrollo de una ETV en pacientes con cáncer (Khorana y cols., 2016; Ay y cols., 2017).

d) **Biomarcadores:** La presencia de niveles elevados de algunos biomarcadores está relacionada con la presencia de ETV en pacientes con cáncer. Entre ellos, cabe destacar niveles elevados de algunos marcadores hematológicos como el número de plaquetas, el de eritrocitos y los niveles de hemoglobina. También se encuentran niveles elevados en plasma de la P-selectina, el dímero D, la proteína C reactiva (Khorana y cols., 2016; Ay y cols., 2017).

Figura 6. Factores de riesgo de desarrollar una ETV asociada al cáncer
(Hb= Hemoglobina; dx= diagnóstico).



Las células tumorales contribuyen, de forma directa, al estado de hipercoagulabilidad relacionado con el cáncer, a través de la activación de la cascada de la coagulación mediante la liberación de factores coagulantes tales como el factor tisular (FT), microvesículas que contienen FT, y el factor procoagulante del cáncer. El FT (también conocido como factor fibroblástico de tromboplastina o factor III), es una

glicoproteína de membrana iniciadora de la cascada de la coagulación por la vía extrínseca, de ahí su gran implicación en promover estados de hipercoagulabilidad.

Por otro lado, de forma indirecta, el cáncer per se o el tratamiento quimioterápico, favorece que las células tumorales aumenten los niveles de las citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, la interleucina 6 (IL6) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)), desencadenando una alteración en el balance hemostático, que estimula la liberación de factores procoagulantes (como el FT o el factor von Willebrand) desde las células endoteliales. También la activación de monocitos y neutrófilos promueve la formación de fibrina. Por ejemplo, las trampas extracelulares de neutrófilos (o NETs), unas mallas de fibras de cromatina con proteínas antimicrobianas liberadas por los neutrófilos al espacio extracelular, estimulan la adhesión de las plaquetas así como la activación del factor XII (Ay y cols., 2017).

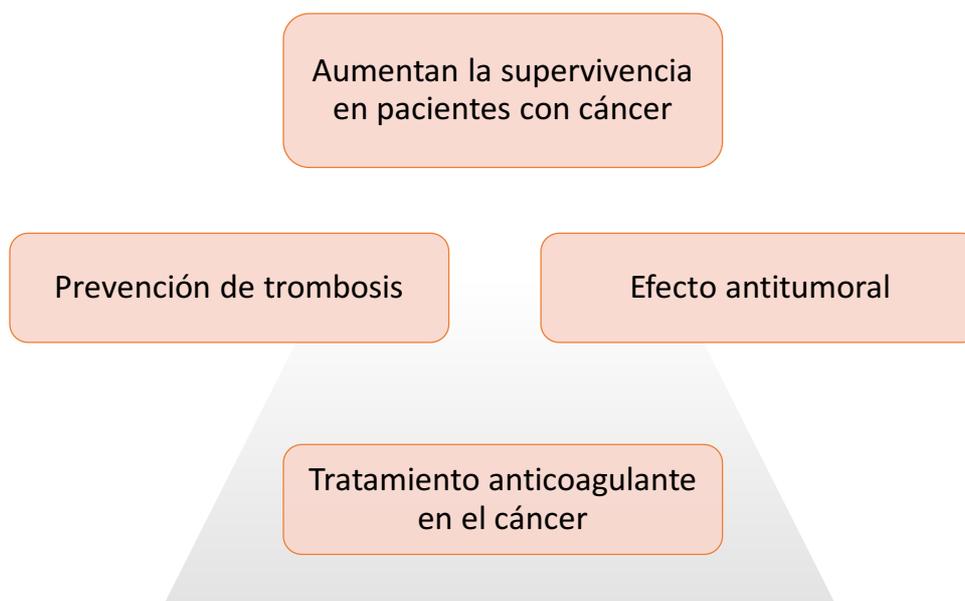
Las células tumorales tienen también la capacidad de expresar inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), el mayor inhibidor del PAI-1, glicoproteína encargada de la disolución de los coágulos sanguíneos. Por ello, a través de la inhibición de la actividad fibrinolítica, las células tumorales favorecen la persistencia de los coágulos sanguíneos en el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer (Ay y cols., 2017).

1.4. LAS HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR

La heparina, un glucosaminoglicano natural, es una mezcla de cadenas sulfatadas de polisacáridos con diferente peso molecular (Hirsh y cols., 2001; Park y cols., 2008; Bendas y Borsig, 2012). Es sintetizada por basófilos y mastocitos, y distribuida ampliamente por los órganos de los mamíferos (Hirsh y cols., 2001). Es ampliamente conocida porque ayuda a prevenir la formación de coágulos, y a reducir el tamaño de los existentes. Además, la heparina se une a una gran cantidad de moléculas (factores de crecimiento o citoquinas) a través de interacciones electrostáticas, adquiriendo así funciones biológicas y/o terapéuticas en procesos como la adhesión y la migración celular o en la regulación de actividades enzimáticas. De este modo, la heparina alcanza un papel importante en el desarrollo del cáncer, constituyendo un pilar

importante en la inhibición de la angiogénesis tumoral y, por ende, en la inhibición del crecimiento y metástasis tumorales (Figura 7) (Park y cols., 2006; Ahmad y Ansari, 2011).

Figura 7. Propiedades de las HBPMs.



Desde principios de 1960, la heparina no fraccionada (HNF) comienza a destacar por su efecto beneficioso contra el cáncer. Sin embargo, los estudios realizados no fueron concluyentes (Hettiarachchi y cols., 1999). A principios de 1980, diversos estudios subrayaron el efecto de la HNF en la profilaxis preoperatoria de pacientes con cáncer (Kakkar y cols., 1995). Asimismo, Lebeau y cols. (Lebeau y cols., 1994) evaluaron por primera vez el efecto de la HNF sobre la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón sometidos a quimioterapia. El efecto biológico de la heparina como anticoagulante, es efectivo siempre a altas dosis y durante un tiempo prolongado, lo que desencadena la aparición de efectos adversos como hemorragias, trombocitopenia inducida por heparina (TIH), y osteoporosis (Park y cols., 2008). Es por ello que, se comenzaron a utilizar las heparinas de bajo peso molecular (HBPMs), compuestos derivados de la HNF con capacidad de disminuir estos efectos colaterales

y de inhibir igualmente el desarrollo del cáncer (la metástasis, la angiogénesis y el crecimiento tumoral) (Park y *co/s.*, 2008) (Figura 7). Las HBPMs fueron aprobadas por la FDA en 1998 como tratamiento anticoagulante (Mitrovska y Jovanova, 2009). Y en 1999, se realizó un estudio comparativo entre las HBPMs y la HNF que mostraba una eficacia mayor de las HBPMs en el tratamiento inicial de la ETV (Hettiarachchi y *co/s.*, 1999).

Las HBPMs se obtienen a través de la despolimerización de la HNF por acción química, enzimática, física y radioquímica. Poseen un peso molecular medio de entre 3 y 6 kDa, y la longitud de las cadenas es de 12 a 18 unidades de sacáridos (Fareed y *co/s.*, 2004) (Tabla 6). Existe una relación lineal entre el número de unidades de sacárido y el peso molecular (por ejemplo, 12 unidades pesan 3600 Da; 18 unidades pesan 5400 Da). La **enoxaparina**, por ejemplo, se obtiene a partir de la bencilación y posterior despolimerización alcalina de la heparina. Y su peso molecular asciende a los 4500 Da (ó 4,5 kDa) (Dogan y *co/s.*, 2011) y posee 15 unidades de sacárido. Debido a que son generadas mediante diferentes vías de despolimerización y sus pesos moleculares son también distintos, sus características farmacocinéticas son distintas, lo que las hace clínicamente no intercambiables.

Tabla 6. Principales características de las HBPMs.

HBPMs	MÉTODO DE DESPOLIMERIZACIÓN	PESO MOLECULAR MEDIO (kDa)	VIDA MEDIA (horas)
Dalteparina	Ácido nitroso	6,0	2,3-2,8
Enoxaparina	Alcalina	4,5	4-4,4
Nadroparina	Ácido nitroso	4,3	3,7
Tinzaparina	Enzimática	6,5	3,0
Certoparina	Nitrito de isoamilo	5,6	3,5
Bemiparina	Alcalina	3,6	5,2-5,4

Actualmente, la **European Society of Medical Oncology** (ESMO) como tratamiento de la ETV, plantea el tratamiento inicial de episodios agudos de ETV (en

pacientes con/sin cáncer) a través de la administración subcutánea de las HBPMs a una dosis ajustada al peso corporal: 200 U/Kg una vez al día (por ejemplo, mediante dalteparina); ó 100 U/kg administrado dos veces al día (por ejemplo, enoxaparina); o HNF intravenoso. En las 24 horas del comienzo de este tratamiento, se comienza también con la administración de antagonistas de la vitamina K (AVK) como la warfarina o el acenocumarol (Ay y cols., 2017). Éstas serán empleadas durante 3-6 meses, al rango terapéutico de un Ratio Internacional Normalizado (INR) entre 2 y 3. Finalmente, tras al menos 5 días de tratamiento con las HBPMs, se suspende dicho tratamiento, dejando sólo la actuación de los AVK, cuando dicho tratamiento mediante AVK haya alcanzado un completo estado anticoagulante durante al menos dos días consecutivos (por ejemplo, con un INR>2.0).

Sin embargo, numerosos aspectos dificultan la administración de la terapia anticoagulante en pacientes con cáncer. Son frecuentes las interrupciones del tratamiento anticoagulante debido a procedimientos invasivos y a la trombocitopenia inducida por la quimioterapia. También existe dificultad de monitorización debido al pobre acceso venoso. Las interacciones medicamentosas, la malnutrición, el vómito y la disfunción hepática son también otras limitaciones que pueden llevar a niveles impredecibles de anticoagulación (Hirsh y cols., 2001). Todo ello supone un alto riesgo de recurrencia de la ETV (3 veces mayor) y del sangrado (de 2 a 6 veces mayor) en aquellos pacientes con cáncer y bajo tratamiento con AVK (sobre todo en pacientes con tratamiento anticoagulante a largo plazo) (Hirsh y cols., 2001; Ay y cols., 2017). Esto hace que se valoren otras opciones de tratamiento más seguras y efectivas (Figura 8) (Ay y cols., 2017). De este modo, la ESMO considera que para aquellos pacientes que van a requerir un **largo tratamiento** (por ejemplo, durante 6 meses), se emplearán sólo **HBPMs** al **75-80%** de la dosis inicial (por ejemplo, 150 U/kg una vez al día), por ser consideradas científicamente un tratamiento más seguro y efectivo que los AVK (Ay y cols., 2017).

En comparación con la HNF, las HBPMs tienen una menor unión a proteínas plasmáticas, menor tendencia a unirse a células endoteliales, menor interacción con las plaquetas, una vida media prolongada y una mayor biodisponibilidad (Fareed y cols., 2004). Sus propiedades farmacocinéticas e interacciones con otros fármacos

son predecibles. Su modo de administración es personalizado (basado en el peso del paciente), no requieren monitorización de forma rutinaria, son de rápida acción a través de una inyección subcutánea, lo que las convierte en una alternativa de tratamiento óptima para pacientes con interrupciones de tratamiento frecuentes (Hirsh y cols., 2001).

Las HBPMs se eliminan por los riñones y, tienen un efecto acumulativo significativo en pacientes con insuficiencia renal. Los pacientes con un aclaramiento de creatinina de hasta 30 ml/min son tratados con dosis terapéuticas estándar de enoxaparina. En cambio, aquéllos con fallo renal severo (aclaramiento de creatinina <25–30 ml/min), se recomienda la pauta terapéutica de HNF intravenosa o de HBPMs (monitorizando la actividad anti-Xa) (Mandalà y cols., 2011).

Actualmente, también otras agrupaciones de alto prestigio, recomiendan el uso de **HBPMs** como tratamiento **a corto y largo plazo** de ETV asociada a pacientes con cáncer durante al menos 3-6 meses: el American College of Chest Physicians (CHEST), la American Society of Clinical Oncology (ASCO), el British Committee for Standards in Haematology (BCSH), el NCCN, y la International Clinical Practice Guidelines. Asimismo, recomiendan también su uso como **trombopprofilaxis** (prevención de ETV) en pacientes hospitalizados y en circunstancias perioperatorias. Sin embargo, no es recomendada de forma rutinaria en pacientes con cáncer y bajo un tratamiento quimioterápico ambulatorio. En aquellos pacientes con tumores sólidos o con mieloma, que reciben tratamiento con terapias dirigidas, la profilaxis podría ser considerada (ácido acetil salicílico, AVK o HBPMs) (Ay y cols., 2017).

En los pacientes con remisión completa, el tratamiento puede ser detenido después de 6 meses. En pacientes con cáncer activo (por ejemplo, enfermedad metastásica y/o bajo tratamiento anticancerígeno), el tratamiento con HBPMs a dosis profilácticas o mediante anticoagulantes orales (ACOs) (dependiendo de la preferencia del paciente/decisión médica) puede continuar con el tratamiento más allá de los seis meses (Ay y cols., 2017).

Los **ACOs** de nueva generación constituyen una nueva opción de tratamiento para la ETV. De entre ellos, destacan los inhibidores directores de trombina (por ejemplo,

el dabigatrán) o los inhibidores directos del factor Xa (por ejemplo, apixabán, rivaroxabán, edoxabán). La relevancia de este tratamiento reside en su cómoda forma de administración (oral), un efecto más predecible, y menor frecuencia de monitorización que los AVK. Algunos estudios, incluso demuestran que los ACOs tienen una eficacia similar y un menor riesgo de sangrado que las HBPMs o la warfarina, en el tratamiento de la ETV. Las HBPMs tienen la limitación de que no pueden ser absorbidas por el intestino debido a su alto peso molecular, a su estructura cargada negativamente, y a sus propiedades hidrofílicas. Es por esta razón por la que la heparina sólo se puede dar de forma parenteral (Lee y cols., 2007).

Figura 8. Opciones de tratamiento en la ETV asociada al cáncer.

CLASE DE FÁRMACO	FÁRMACOS	RUTA DE ADMINISTRACIÓN
AVK	Warfarina, Acenocumarol	Oral
HNF	Heparina	Parenteral
HBPMs	Dalteparina, enoxaparina, tinzaparina, nadroparina	Parenteral
ACOs		
Inhibidores directos de la trombina	Dabigatrán	Oral
Inhibidores directos del factor Xa	Apixaban, rivaroxaban, edoxaban	Oral

Los ACOs, teóricamente ofrecerían una mejor opción de tratamiento de la ETV en pacientes con cáncer. Sin embargo, no se confirma a día de hoy que supongan un tratamiento seguro debido a la naturaleza protrombótica del cáncer, a la necesidad de intervenciones que desencadenaría una alteración en el ajuste del fármaco, y a un diseño no estandarizado entre estudios (Posch y cols., 2015; Ay y cols., 2017; Ravikumar y cols., 2017).

Asimismo, es bien sabido que fármacos que interaccionan fuertemente con la enzima CYP3A4 y/o la P-glicoproteína (como la mayoría de quimioterápicos), pueden alterar la farmacocinética de los ACOs, pudiendo interferir así en su metabolismo y biodisponibilidad. Por tanto, existe una falta de estudios científicos comparativos que evalúen en igualdad de aspectos, la eficacia y seguridad de los ACOs versus HBPMs en el tratamiento de ETV de pacientes con cáncer (Ay y cols., 2017), lo que supone que las HBPMs, constituyan una opción de tratamiento segura en este tipo de pacientes.

1.4.1. Acción anti-proliferativa

La activación de las plaquetas y de los factores de la coagulación en pacientes con cáncer no sólo puede desencadenar **complicaciones tromboembólicas**, sino que también puede favorecer el crecimiento del tumor y promover su diseminación (metástasis). La causa radica en que los factores que regulan positiva o negativamente la **angiogénesis tumoral** (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor plaquetario 4, trombospondina, fibrina, productos de degradación de la fibrina, y FT), están relacionados con el sistema hemostático. Por ello, cuando las HBPMs inhiben la expresión de dichos factores para controlar las ETV, están inhibiendo también la angiogénesis tumoral (Mousa y cols., 2006). De este modo se obtiene un doble efecto antitumoral aún más potente que si sólo actuaran frente a cualquiera de las dos vías en solitario (Ahmad y Ansari, 2011).

Cuando las HBPMs se combinan con los quimioterápicos, aumentan su eficacia al bloquear el proceso de coagulación asociado con el tumor, reduciendo por consiguiente la presión intersticial, lo que aumenta el acceso de los quimioterápicos al tejido tumoral. Por todo ello, la acción de las HBPMs junto con la del cisplatino podría ser una asociación efectiva para reducir de forma significativa la angiogénesis tumoral, el crecimiento del cáncer y la ETV (Ahmad y Ansari, 2011; Pfankuchen y cols., 2015).

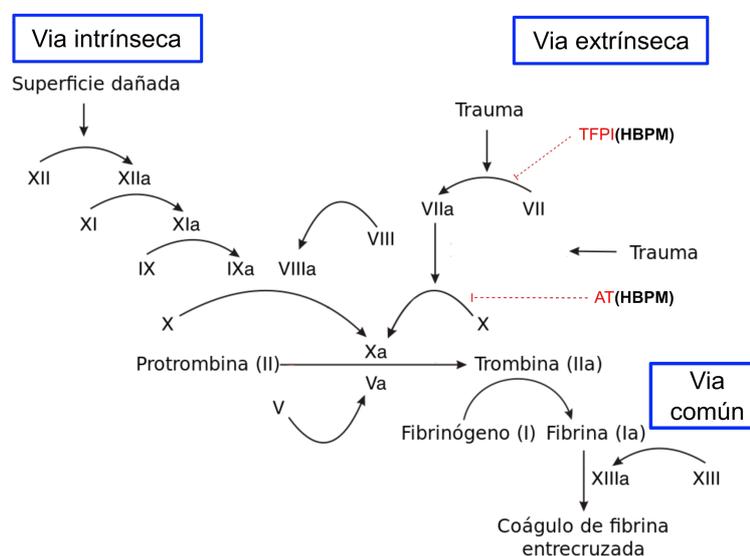
Los mecanismos moleculares que llevan a cabo la inhibición de la angiogénesis tumoral y, por consiguiente producen un efecto anti-proliferativo, se detallan a continuación:

1. Inhibición de la expresión del **factor FT**: El FT es una proteína presente en la membrana de la mayoría de células tumorales, y es el responsable de la actividad procoagulante del tumor por la vía extrínseca. La evidencia científica actual sugiere que la generación de trombina (estímulo procoagulante) vía FT de las células tumorales, así como la subsecuente activación plaquetaria, favorece el proceso de crecimiento (a través de la angiogénesis tumoral) y metástasis hematológica tumorales (Mousa y cols., 2006). El único inhibidor natural (proteína endógena) del FT es el factor inhibidor de la vía del FT (TFPI), presente principalmente en la superficie de las células endoteliales, aunque también en plasma y en menor proporción, en las plaquetas. En plasma, se encuentra principalmente unido a lipoproteínas, siendo aquél TFPI que se encuentra libre, el que mayor acción anticoagulante ejerce. En primera instancia, el TFPI se une e inhibe al factor X activado (FXa) cuando está unido o se encuentra en la vecindad del complejo FT-factor VII activado (FT-FVIIa) en la superficie de la membrana celular. Después, se desencadena una rápida inactivación del complejo FT-FVIIa. Por todo ello, se postula que la inhibición del FXa está medida por el complejo FT-FVIIa (Lwaleed BA y Bass PS 2005; Ahmad y Ansari, 2011). Las heparinas (HNF, HBPMs) son capaces de unirse al TFPI, liberando altas cantidades del mismo, que se encuentran en las superficies de las células endoteliales, para suprimir los efectos mediados por el FT (Mousa y cols., 2006; Ahmad y Ansari, 2011) (Figura 9).

La **heparanasa** es una enzima que suele estar sobre-expresada en la mayoría de tumores humanos, entre ellos, en el cáncer de cabeza y cuello. Además de su efecto enzimático que, se desarrollará en el apartado de “Invasión local, angiogénesis e intravasación” (acción anti-metastásica de las HBPMs), también ejerce un efecto no enzimático. Éste se pone de manifiesto mediante la formación de vasos linfáticos. Es decir, debido a la sobreexpresión de heparanasa en los cánceres de cabeza y cuello, es característico encontrar también en este tipo de

cánceres un aumento de la densidad de vasos linfáticos. De este modo, se favorece la invasión celular por la vía linfática y, por tanto, la diseminación del cáncer. Asimismo, la heparanasa también posee un efecto no enzimático pro-coagulante, ya que actúa como cofactor del FT aumentando los niveles del factor Xa (Nadir y Brenner, 2014). Se constata que las HBPMs inhiben la expresión de la heparanasa (Ramani y cols., 2013; Djaafar y cols., 2016; Heyman y Yang, 2016) y, por consiguiente, son capaces de inhibir sus efectos.

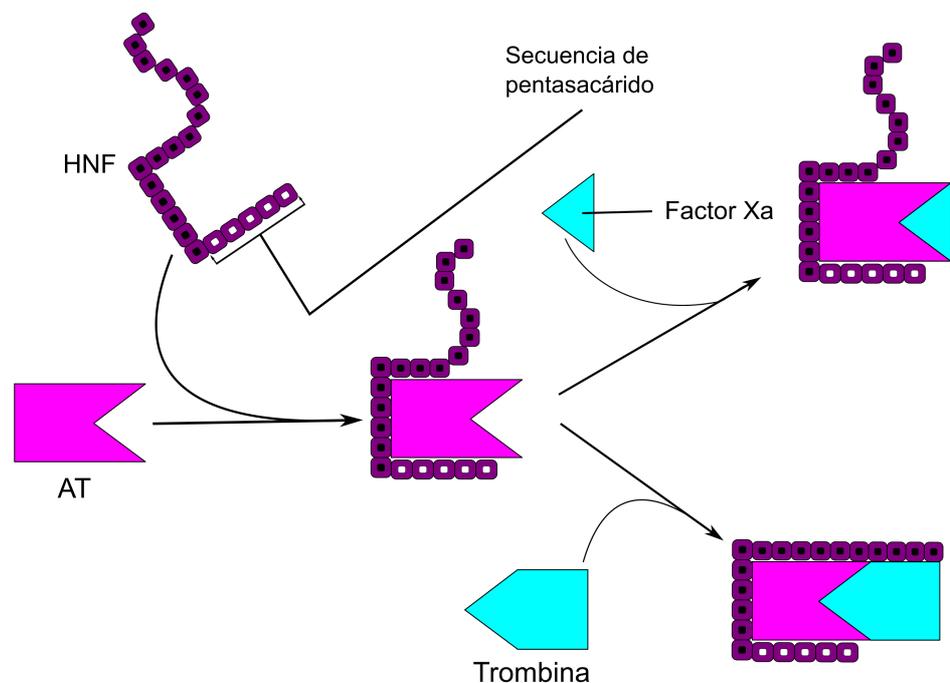
Figura 9. Cascada de la coagulación.

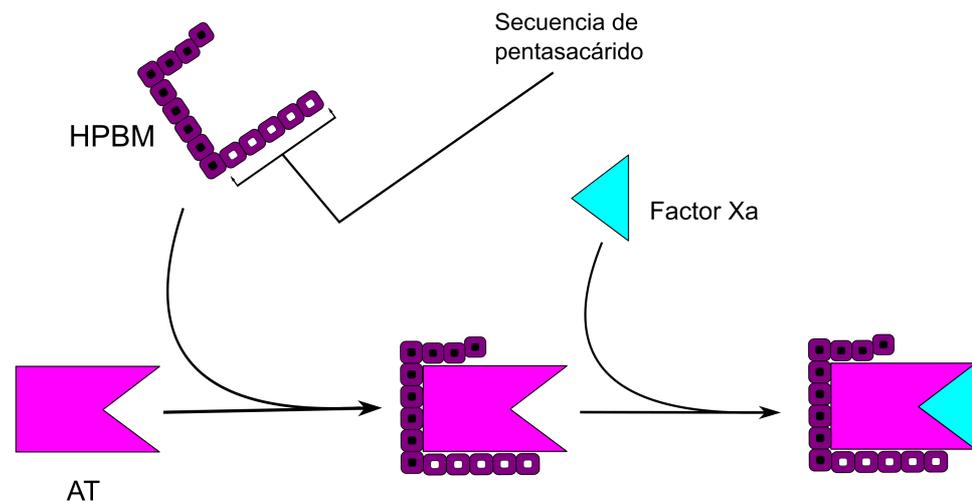


- Inhibición de la formación de **fibrina**: Experimentos *in vitro* demuestran que las heparinas pueden influir en la angiogénesis tumoral mediante su intervención en el proceso de formación de la fibrina (Collen y cols., 2000; Dogan y cols., 2011). El complejo que constituyen la heparina y la antitrombina (AT) inactiva un gran número de enzimas de la coagulación (factor II o trombina, factor X, factor IX, factor XI, factor XII) (Figura 9). De entre ellas, la trombina y el FXa, son los más sensibles a la inhibición, siendo la trombina incluso, alrededor de 10 veces más sensible. La HNF inhibe la formación de fibrina a través de la inhibición de la trombina, para lo cual, el complejo heparina-AT (sólo un tercio de la HNF se une a

la AT) se ha de unir tanto al factor Xa como a la trombina (como ocurre con las HNF) (Figura 10). El complejo ternario AT-trombina-heparina precisa una longitud mínima de 18 unidades de sacáridos, siendo aquéllas heparinas cuya longitud es menor de 18 sacáridos, incapaces de inhibir a la trombina. En cambio, las HBPMs sólo precisan inhibir al FXa para evitar la formación de fibrina, ofreciendo así una mayor regulación de la coagulación y un mejor índice terapéutico (Falanga y *cols.*, 2011). En este caso, sólo es necesario que el complejo heparina-AT se una a dicho factor Xa (excluyendo su unión a la trombina). En este caso, sólo se requiere una secuencia de pentasacáridos para catalizar la inhibición del factor Xa. Asimismo, los efectos anti-proliferativos y anti-angiogénicos de las HBPMs, dependerán de su peso molecular medio (fracciones de heparina con un peso medio inferior a 3000 Da, tienen poco o ningún efecto antiangiogénico) y, posiblemente del porcentaje de sulfatación (Ahmad y Ansari, 2011; Falanga y *cols.*, 2011).

Figura 10. Ilustración comparativa del mecanismo de acción de la HNF y las HBPMs en la Inhibición de la formación de fibrina.





3. Inhibición de la unión de **factores de crecimiento angiogénicos** a su receptor: Los factores de crecimiento angiogénicos tales como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) o el VEGF se pueden unir y quedar almacenados en los proteoglicanos presentes en la superficie de las células endoteliales y/o en la matriz extracelular (MEC). La inhibición de la unión de dichos factores de crecimiento angiogénicos a sus receptores, es mediada por las HBPMs. Éstas se unen a dichos receptores, evitando así que los factores proangiogénicos puedan hacerlo (Dogan y cols., 2011), lo que frena el proceso de proliferación del cáncer. Se ha demostrado que, en comparación con la HNF, las HBPMs son más eficaces en inhibir la angiogénesis *in vivo* regulada por los factores de crecimiento (VEGF, bFGB). El potencial antiangiogénico de las HBPMs depende de su tamaño, el proceso en que fueron sintetizadas y el ensayo utilizado para evaluar su efecto. No obstante, por regla general, se considera que aquellos fragmentos de heparina que poseen menos de 18 sacáridos (por ejemplo, la enoxaparina, con 15 unidades de sacárido) inhiben la actividad del VEGF (Dogan y cols., 2011; Djaafar y cols., 2016); en cambio, aquellos de menos de 10 sacáridos, inhiben la actividad del bFGB (Dogan y cols., 2011).

1.4.2. Acción anti-metastásica

La diseminación de las células cancerígenas de COCE se produce principalmente a través del sistema linfático, donde son transportadas a nódulos linfáticos regionales. Sin embargo, la vía sanguínea es la principal ruta por la que cánceres epiteliales como éste, se diseminan y llegan a producir un crecimiento tumoral en lugares distantes a donde originariamente se formó el tumor (Contaldo y *cols.*, 2013; Jiang y *cols.*, 2015).

Los mecanismos biológicos a través de los que la heparina ejerce su actividad, pueden afectar a varias etapas de la cascada metastásica (Bendas y Borsig, 2012). Es obvio que, algunos de estos mecanismos, son también comunes a la inhibición de la proliferación tumoral (expuestos en el apartado anterior), pues ésta es parte integrante del proceso de metástasis. Se exponen, a continuación, la sucesión de fenómenos biológicos de las HBPMs, ordenados dentro de las distintas etapas del proceso metastásico (Valastyan y Weinberg, 2011; Jiang y *cols.*, 2015):

1) Invasión local, angiogénesis e intravasación: Consiste en la entrada de las células tumorales que, se encontraban bien confinadas en el tumor primario, al estroma circundante del tumor (Valastyan y Weinberg, 2011). Existen al menos tres mecanismos, no excluyentes entre sí, que pueden estar implicados en el desarrollo de este proceso. El primero es debido a la presión mecánica que producen las neoplasias de crecimiento rápido, pudiendo hacer que los cordones de células tumorales ejerzan presión sobre los planos de tejido de menor resistencia. A continuación, se produce una **pérdida** de las fuerzas de **cohesión intercelulares**, que constituía el factor clave en mantener la masa tumoral primaria. En las células epiteliales, la pérdida de esta unión intercelular se asocia con una disminución de la expresión de la E-cadherina principalmente, una glucoproteína de la superficie celular implicada en la cohesión intercelular. La disminución de los niveles de la misma, están asociados con la disminución de la diferenciación celular o tisular y los estadios más avanzados de carcinoma (Noguti y *cols.*, 2012; Jiang y *cols.*, 2015).

El segundo mecanismo desencadenado por los procesos expuestos, lleva al aumento de la movilidad por parte de las células tumorales en respuesta a un gradiente de

factores de crecimiento y quimiocinas y, por ende, favorece su **migración** (Fife y cols., 2014).

Este proceso de migración se lleva a cabo mediante las integrinas, unas glicoproteínas transmembrana que se encuentran en diversos tipos celulares como en las células tumorales y endoteliales y que permiten la adhesión de las células tumorales a los componentes proteicos de la MEC (Jiang y cols., 2015).

A continuación, se desarrolla el tercer mecanismo que consiste en la **secreción** por parte de las células tumorales, de las metaloproteinasas (**MMPs**) y la **heparanasa**, enzimas capaces de degradar la MEC y los componentes de la membrana basal.

Estos tres mecanismos acontecidos en las células tumorales de origen epitelial, han sido el resultado de una serie de cambios bioquímicos y morfológicos (que les permite moverse por los espacios disponibles tras la degradación) con los que han adquirido un fenotipo mesenquimal. Es lo que se conoce como “transición epitelio-mesenquimal” (TEM) (Friedl y cols., 2011; Fife y cols., 2014; Jiang y cols., 2015; Vlodavsky y cols., 2016).

La acción de las MMPs desencadena la liberación de factores del crecimiento (entre ellos, los factores de crecimiento angiogénicos VEGF y bFGF), secuestrados en la MEC y en la membrana basal, que favorecen la proliferación del tumor (Valastyan y Weinberg, 2011). Por otro lado, la heparanasa, que suele estar sobre-expresada en la mayoría de tumores humanos, interacciona con los proteoglicanos de heparán sulfato (PGHS), un núcleo proteico unido a cadenas lineales de heparán sulfato (HS) presente en la MEC y en la membrana basal. Dicha unión libera proteínas unidas al HS como son las citoquinas, quimioquinas, los factores de crecimiento angiogénicos (VEGF, bFGF), aumentando también así la formación de vasos sanguíneos en el interior del tumor (angiogénesis), a la vez que favoreciendo el crecimiento y las metástasis tumorales (Dogan y cols., 2011; Djaafar y cols., 2016; Vlodavsky y cols., 2016). A todo ello habría que añadirle la función de las integrinas (en este contexto, presentes en las células endoteliales) en la adhesión a los componentes de la MEC, contribuyendo también así a la invasión y migración de las células endoteliales al lugar del tumor primario. Este lecho vascular neoformado, está compuesto por débiles interacciones entre las células endoteliales, lo que lo hace propenso a la filtración y, bajo un estado de reconfiguración continua. Es por ello, que facilita la intravasación de las células

tumorales al interior de estos vasos sanguíneos neoformados (Valastyan y Weinberg, 2011).

Las **HBPMs** frenan el proceso de angiogénesis a través de la inhibición de la unión de los factores de crecimiento a sus receptores, como ya se expuso en el apartado anterior “Acción anti-proliferativa” de las HBPMs. Pero también disminuyen hasta un 70% la diseminación tumoral, a través de su acción sobre la heparanasa (Ramani y cols., 2013; Djaafar y cols., 2016; Heyman y Yang, 2016). El estudio de Djaafar y cols. (Djaafar y cols., 2016) evidenció que *in vitro*, 200 µg/ml de **enoxaparina** durante 24 horas, disminuyeron la expresión de la heparanasa en células MCA38 (carcinoma de colon de ratón), reduciéndose significativamente el potencial angiogénico y metastásico de dichas células tumorales.

2) Circulación y diseminación de las células tumorales: La capacidad de las células tumorales de llegar a invadir un órgano secundario distante a donde originariamente se constituyó el tumor, está relacionada con su capacidad de migración (previamente a través de pérdidas de adhesión) y de establecer contactos con las células endoteliales que configuran los vasos sanguíneos a los que se ha migrado. Esta interacción se lleva a cabo a través de moléculas de adhesión denominadas **selectinas** (selectina-P, selectina-E) e **integrinas**. Las células tumorales pueden también establecer interacción, a través de las selectinas, con los componentes sanguíneos que en su superficie las presentan. En los leucocitos, la selectina-L y en las plaquetas, la selectina-P. Por otro lado, muchas células tumorales expresan ligandos de selectinas para que estos contactos se puedan llegar a producir (Barthel y cols., 2007; Gout y cols., 2008; Bendas y Borsig, 2012).

Además del estrés desencadenado por la desunión de las células tumorales de la MEC, éstas deben vencer el daño provocado por las fuerzas hemodinámicas y evadir la respuesta inmune, principalmente liderada por las células “natural killer” (NK). Es por ello que, la formación de un trombo de células tumorales unidas a plaquetas (mediante selectinas), ayuda a eludir dicha respuesta inmune y, por consiguiente, son capaces de persistir en la circulación hasta que son reclutadas por un órgano secundario (Valastyan y Weinberg, 2011; Bendas y Borsig, 2012). Además, el reclutamiento de leucocitos en lugares distantes contribuye a la formación de un nicho

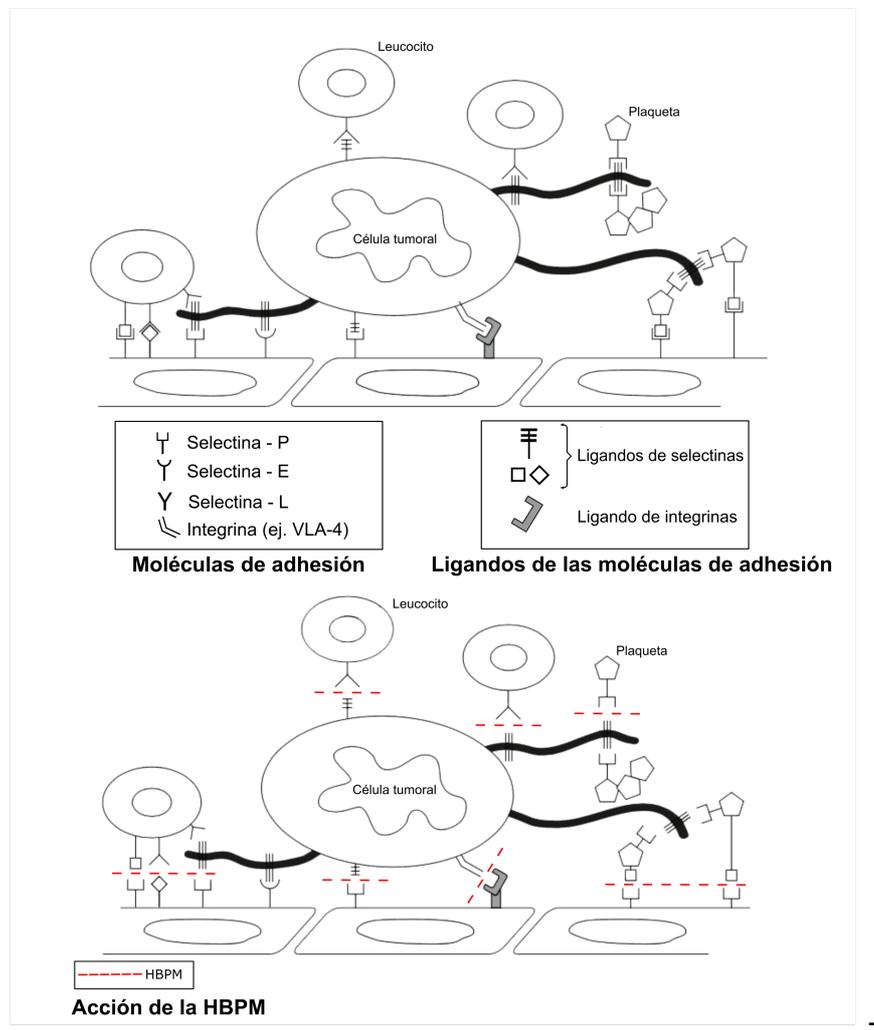
metastásico que las células tumorales tenderán a colonizar (Bendas y Borsig, 2012). En casos de déficit de selectinas, este trombo no se podría constituir, y las células NK eliminarían a las células tumorales (Valastyan y Weinberg, 2011; Bendas y Borsig, 2012).

Estudios *in vivo* confirman que las **heparinas**, independientemente de su modo de despolimerización, dosis, tiempo de aplicación, tipología de tumor, etc. atenúan la metástasis tumoral a través de su unión a las selectinas P y L. Esta acción de las heparinas es efectiva sólo cuando las células tumorales están en la circulación sanguínea (Läubli y cols., 2006; Ahmad y Ansari, 2011; Bendas y Borsig, 2012).

Las **integrinas** son glucoproteínas transmembrana, presentes en diversos tipos celulares que también permiten que se establezcan interacciones intercelulares que facilitan la progresión del proceso de metástasis. Su estructura consiste en dos cadenas distintas, la subunidad α y la β , que conforman un heterodímero. Existen diferentes tipos de integrinas. La integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ presente en las plaquetas, la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ presente en algunas células tumorales y en las células endoteliales asociadas al tumor (también en estas se encuentra la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{5}$), la integrina $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (o VLA-4) presente en células derivadas de la médula ósea y también en células tumorales (Sun y cols., 2014; Bendas y Borsig, 2012).

La inhibición de la integrina VLA-4 por parte de las **HBPMs** es su acción más conocida. En este caso, el tamaño de las heparinas sí que es un factor influyente. Por ejemplo, los fragmentos cortos, no son capaces de unirse a la VLA-4. Además, la densidad de sulfatación es crítica para el reconocimiento de la VLA-4. Asimismo, el tipo de selectina o integrina que contenga la célula tumoral, también repercute en este proceso. Por ejemplo, las células del melanoma (B16F10) poseen una alta expresión de VLA-4, en cuyo caso, la acción de las heparinas sería relevante para inhibir la metástasis tumoral. No obstante, todavía se necesitan estudios *in vivo* que confirmen también dicha acción (Fritzsche y cols., 2008; Bendas y Borsig, 2012) (Figura 11).

Figura 11. (Ilustración superior) Selectinas e integrinas favorecen interacciones entre células tumorales y constituyentes sanguíneos. (Ilustración inferior) Interrupción de dichas interacciones por acción de las HBPMs.



3) Arresto (o captación) y extravasación en un órgano secundario: Cada tipo de carcinoma forma metástasis en un limitado subconjunto de órganos diana. Se postula que la disposición anatómica de la red vascular y el diámetro de los vasos sanguíneos, determinará por qué órgano serán captadas las células tumorales (a través de los vasos sanguíneos de dicho órgano). La hipótesis alternativa plantea una predilección predeterminada de las células tumorales por alojarse en ciertos tejidos regulada por un gradiente de quimiocinas o quimioquinas (migración celular dependiente de quimiocinas). Éstas se encontrarían unidas a cadenas de glicosaminoglicanos presentes en la superficie de células epiteliales, endoteliales vasculares, o en la MEC (Valastyan y Weinberg, 2011; Bendas y Borsig, 2012; Jiang y cols., 2015). La inducción

migratoria desencadenada por las quimiocinas, junto con la interacción directa de las células tumorales con plaquetas, leucocitos y componentes solubles, contribuye significativamente a la adhesión y extravasación de las células tumorales y, por consiguiente, a la metástasis tumoral (Bendas y Borsig, 2012).

Una vez que las células tumorales han alcanzado los pequeños vasos sanguíneos de los órganos distantes, inician un crecimiento intraluminal y forman una microcolonia que rompe las paredes de los vasos, dejando a las células tumorales en íntimo contacto con el parénquima. En otras ocasiones, las células tumorales son capaces de segregar una serie de factores que inducen la hiperpermeabilidad vascular, cruzan entonces la luz vascular y, penetran directamente en el parénquima (Valastyan y Weinberg, 2011).

Las **HBPMs** pueden desplazar a las quimiocinas, evitando su presentación en las superficies celulares, y reduciendo así la adhesión celular y el reclutamiento de las células tumorales para producir metástasis (Bendas y Borsig, 2012).

4) Salida de la estructura vascular (extravasación**) e invasión del nuevo territorio:** El microambiente del lugar donde las células tumorales metastatizan, es ampliamente diferente a donde se formó el tumor primario. Es por ello que, al principio, estas células están pobremente adaptadas, por lo que, desarrollan mecanismos complejos para modificar los microambientes del órgano invadido, con el fin de sobrevivir y formar pequeñas micrometástasis. De esta manera, todavía no está garantizado que las células tumorales proliferen y formen grandes metástasis macroscópicas. La mayoría sufren una lenta degeneración durante períodos de semanas y meses; otras, persisten como microcolonias en un estado de latencia aparente a largo plazo, manteniendo la viabilidad en ausencia de cualquier ganancia o pérdida neta en el número total de células. Esta ausencia de ganancia de células tumorales se debe a incompatibilidades con el microambiente que les rodea. De forma alternativa, las células tumorales ocultas en micrometástasis, pueden proliferar continuamente. Sin embargo, puede no ocurrir un aumento neto en su número total, debido a la alta tasa de apoptosis (Valastyan y Weinberg, 2011).

Se constata que los cánceres de mama y próstata son más predisponentes a metastatizar el hueso; mientras que el cáncer gastrointestinal metastatiza frecuentemente al pulmón e hígado. En general, la mayoría de los cánceres tienden a metastatizar el hígado, pulmón, hueso y cerebro. En cambio, las metástasis en bazo y corazón rara vez se producen (Jiang y *co/s.*, 2015). Aunque el control loco-regional de este tipo de cáncer ha mejorado debido a los avances en el diagnóstico y tratamiento, el número de pacientes con metástasis a distancia ha aumentado gradualmente. El lugar donde los cánceres de cabeza y cuello metastatizan con mayor frecuencia, es el pulmón. Otras localizaciones son el hueso, la piel o el hígado. Son varios los factores relacionados con la aparición de metástasis a distancia, entre ellos, la edad, el estadio avanzado, una pobre diferenciación, la diseminación extracapsular, la recurrencia local y regional, los niveles 4 y 5 del cuello o el tipo de cáncer. En cuanto al tipo de cáncer, los tumores de gran tamaño acontecidos en hipofaringe, orofaringe y cavidad oral son los que mayores metástasis a distancia producen. No obstante, de entre todos esos factores antes mencionados, es la recurrencia local fue el factor que más estuvo relacionado con la aparición de metástasis a distancia (Ferlito y *co/s.*, 2001; Sakamoto y *co/s.*, 2016). Es sabido que las recurrencias loco-regionales ocurren en un 15-50% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello y que esto contribuye a las tasas de mortalidad acontecidas por este tipo de cáncer (Chang y *co/s.*, En prensa).

El éxito de la colonización metastásica radica en la existencia dentro del tumor primario, de un subgrupo de **células madre tumorales** (<10%) que pueden ser diferenciadas del resto de células del tumor. Estas células madre tumorales tienen capacidad de auto-renovación, y son capaces de reproducir la heterogeneidad tumoral (subpoblación tumorigénico y no tumorigénico) en lugares distantes a donde originariamente se constituyó el tumor primario a través del proceso conocido con el nombre de “transición mesénquimo-epitelial” (TME). Es decir, una vez que las células madre tumorales llevaron a cabo el proceso de TEM (en la primera fase del proceso metastásico) que aumentó su habilidad para migrar e invadir, sufren este proceso inverso, TME, de reversión desde su estado mesenquimal a su estado epitelial original, para producir crecimiento de otro tumor con las mismas características que el primario, pero en un lugar distante a éste (forman metástasis) (Jiang y *co/s.*, 2015).

Al resolver simultáneamente las incompatibilidades microambientales y el proceso de auto-renovación celular llevado a cabo por una pequeña minoría de células del carcinoma, el proceso de colonización metastásica se puede completar, y así generar metástasis macroscópicas y clínicamente detectables (Valastyan y Weinberg, 2011).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La mortalidad por COCE a nivel mundial sigue siendo alta debido, entre otros factores, a los fracasos encontrados en los tratamientos (Hyakusoku y cols., 2016; Sakamoto y cols., 2016) como son los mecanismos de resistencia tumoral o las recurrencias loco-regionales. Asimismo, la aparición de complicaciones tromboembólicas (patología fuertemente asociada con el cáncer), también repercuten considerablemente en los índices de mortalidad. El control de éstas podría mejorar significativamente los porcentajes de supervivencia y el pronóstico del cáncer (Ay y cols., 2017). La ETV está relacionada con la activación de las plaquetas y de los factores de la coagulación. La ESMO considera que para aquellos pacientes que van a requerir un tratamiento durante un largo período de tiempo (por ejemplo, durante 6 meses), se empleen exclusivamente las HBPMs al 75-80% de la dosis inicial (Ay y cols., 2017).

En la actualidad, no sólo se conoce el uso de las HBPMs como tratamiento preventivo y curativo de procesos trombo-embólicos, sino que también es reconocida su capacidad de regular el crecimiento y diseminación tumorales (Mousa y cols., 2006; Heyman y Yang, 2016; Vlodavsky y cols., 2016) así como la capacidad de revertir la resistencia tumoral a los quimioterápicos (Pfankuchen y cols., 2015).

Por todo ello, se plantean nuevas vías terapéuticas mediante el tratamiento concomitante de los agentes quimioterápicos y las heparinas de bajo peso molecular. Esta combinación ha sido contrastada en diversos tipos de cáncer (mama, pulmón, tracto gastrointestinal y genitourinario, páncreas, hígado, útero, ovario, cabeza y cuello). Los resultados en cuanto a la mejoría de los porcentajes de supervivencia son bastante dispares debido a varios motivos. En primer lugar, por la inclusión de distintos tipos de cáncer en el mismo estudio, lo que podría dar lugar a resultados inconsistentes entre los diferentes estudios, puesto que se observa una efectividad influenciada por el tipo de cáncer. Por otro lado, cada tipo de HBPM empleada posee unas propiedades químicas y biológicas debido al métodos de despolimerización por el que fueron

obtenidas. Asimismo, la dosis y los protocolos de tratamiento también influyen en la respuesta al tratamiento. Finalmente, también las HBPMs parecen ser más eficaces en estadíos iniciales del cáncer o en pacientes con una esperanza de vida estimada más larga (Altinbas y cols., 2004; Kakkar y cols., 2004; Klerk y cols., 2005; Lazo-Langner y cols., 2007; Icli y cols., 2007; Agnelli y cols., 2009; Lecumberri y cols., 2015; Pelzer y cols., 2015).

Por todo ello, intentamos aportar en este estudio, una nueva investigación *in vitro* sobre la línea celular H357 de COCE, que constituye uno de los cánceres más frecuentes a nivel mundial y que, sin embargo, existen menos estudios que examinen la repercusión de las HBPMs en su proliferación y diseminación. Por tanto, se pretende determinar si la HBPM, enoxaparina sódica, ejerce un efecto sinérgico *in vitro* con el cisplatino en este tipo de cáncer, lo que podría contribuir a futuras investigaciones.

2.2. OBJETIVOS

El **objetivo general** fue el estudio *in vitro* del efecto sinérgico del cisplatino y la HBPM sobre el COCE.

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permitan sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio:

Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto del cisplatino (1, 2, 4, 8 y 10 μM), la enoxaparina sódica (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$) y la combinación de ambos, sobre la viabilidad celular en la línea celular H357 de COCE (a las 24, 48 y 72 horas de incubación).
2. Analizar la acción combinada del cisplatino (8 y 10 μM) y la enoxaparina sódica (100 $\mu\text{g/ml}$) sobre la apoptosis de la línea celular H357 de COCE (a las 24, 48 y 72 horas de incubación).

3. Valorar el efecto combinado del cisplatino (8 y 10 μM) y la enoxaparina sódica (100 $\mu\text{g/ml}$) sobre la capacidad de migración de la línea celular H357 de COCE (a las 18 y 24 horas de incubación).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

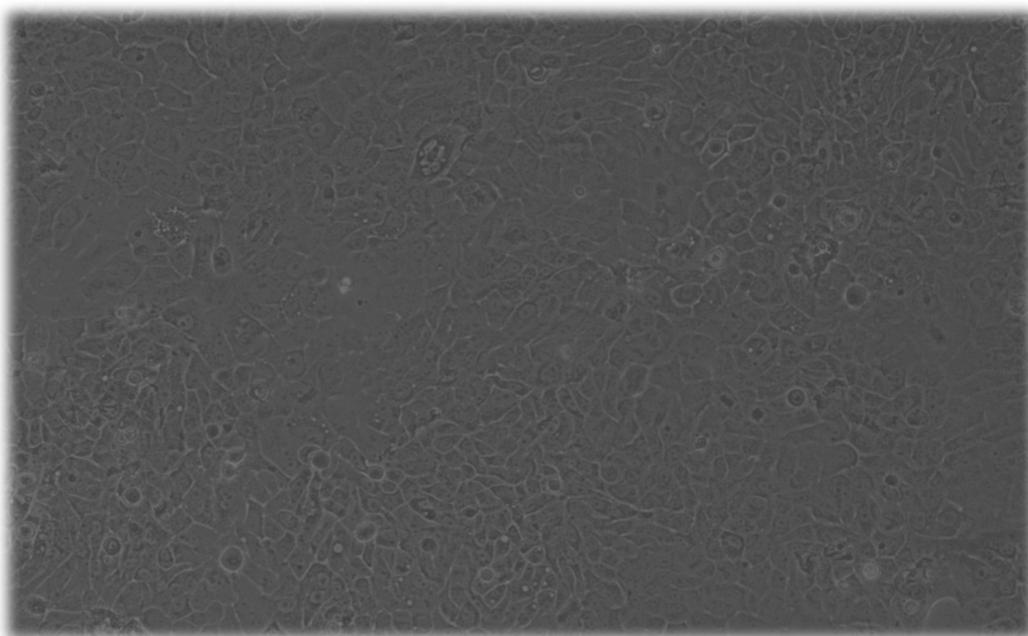
3.1. MATERIAL

3.1.1. Cultivos celulares

* Línea celular

La línea celular H357 (European Collection of Cell Cultures) pertenece a un COCE en estadio I (T1N0M0). Está localizado en lengua y mide 20mm . Pertenece a un varón de 74 años de edad. Las células H357 son adherentes y con morfología poligonal (Figura 12). Después de su compra, las células fueron congeladas en nitrógeno líquido a -196°C en alícuotas, a partir de las cuales se fueron cultivando con un máximo de 10 pases para mantener sus propiedades cinéticas y funcionales a un nivel óptimo. Asimismo, las células fueron examinadas rutinariamente por el Servicio de Cultivos Celulares de la Universidad de Murcia, para evitar contaminación por micoplasmas.

Figura 12. Imagen de un cultivo celular al 70-80% de confluencia de la línea celular H357 realizada mediante un objetivo 4x en un microscopio óptico de contraste de fases.



El medio de cultivo que requieren estas células contiene medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM): HAMS F12 (1:1), suplementado al 10% con suero fetal bovino (SBF), glutamina (2mM) y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de succinato sódico de hidrocortisona. A todo ello, se le añadió antibiótico (penicilina/estreptomicina) para reducir la posibilidad de contaminación.

Los cultivos se incubaron a 37°C, con una humedad relativa del 90-95%, en 1 atmósfera de presión, y con un 5% de CO₂ (Figura 13).

Figura 13. Incubador de CO₂ refrigerado Heraeus mod. BBK 6220.



* Método de cultivo celular

El manejo de la línea celular COCE H357 se realizó siempre en condiciones de esterilidad y seguridad biológica, a través de la cabina de flujo laminar y, empleando en todo momento, material y soluciones estériles. Tras la descongelación de los viales a través de un baño a 37°C, se introducía el contenido celular del vial en un tubo de

centrífuga que contenía 9 ml de medio de cultivo previamente preparado. Éste se centrifugó durante 10 minutos a 200 G, se decantó y se incorporó nuevamente medio de cultivo para proceder al recuento celular mediante la técnica del azul tripán y la cámara de hemocitómetro. Una vez realizado el recuento y, siguiendo las recomendaciones de la ficha técnica de este tipo celular de cultivarlas a la densidad de **5000 células/cm²**, se procedió al cálculo (a través de una regla de 3) de la cantidad de volumen celular necesario para sedimentarlas en frascos de 75 cm². Las células permanecerían así incubadas de nuevo a 37°C, con una humedad relativa del 90-95%, 1 atmósfera de presión, y un 5% de CO₂ en el incubador.

* Subcultivo celular

Según las especificaciones de la ficha técnica de las células COCE H357, la rutina de subcultivo celular ha de realizarse cuando se haya alcanzado el **70-80% de confluencia**, es decir, aproximadamente cada 5-6 días. Una vez pasado este tiempo y, observando a través del microscopio que la morfología y distribución celular eran óptimos, se procedió a llevar a cabo el protocolo de subcultivo celular. Tras la retirada del medio de cultivo, un lavado fugaz con 1 ml de tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,25%/0,02% fue el preámbulo de dicho protocolo, eliminando así posibles restos de SBF que ralentizarían el despegamiento celular. Se añadieron 2 ml de tripsina/EDTA 0,25%/0,02% y, se dejaron incubar en una estufa a 37°C durante aproximadamente 4 minutos para su despegamiento. Finalmente, se observó a través del microscopio que las células se habían despegado debido a que el EDTA secuestra el ión Ca²⁺ necesario para que se mantengan adheridas. A continuación, se inactivó la tripsina/EDTA con medio de cultivo y, se recogieron las células en tubos de centrífuga, procediendo así a su centrifugación durante 10 minutos a 200 G (Figura 14). Una vez decantado el sobrenadante y, resuspendidas las células con el nuevo medio de cultivo, se realizó el recuento celular en el hemocitómetro a través de la técnica del azul tripán. La viabilidad celular siempre debía ser alta, entre un 80-100%. Para concluir, se realizaron unos cálculos para sembrar de nuevo a las células en sus frascos de cultivo, teniendo siempre en cuenta la densidad celular recomendada, el tipo/s de experimento/s que se iban a realizar y la capacidad del

frasco en el que se iban a cultivar. Las células permanecerían así incubadas de nuevo a 37°C, con una humedad relativa del 90-95%, 1 atmósfera de presión, y un 5% de CO₂.

Asimismo, se cambió el medio de cultivo cada 2-3 días para favorecer el crecimiento celular en óptimas condiciones.

Figura 14. Centrífuga refrigerada HERAEUS mod. Megafuge 1.0R.



3.1.2. Medios, soluciones y reactivos

-Medio de cultivo específico para las células H357, el DMEM con 1g de glucosa sin rojo fenol (RF-) combinado con HAMS F12 en proporción 1:1; 2mM de glutamina; 10% SBF (Sigma-Aldrich, Madrid, España); 0,5µg/ml de succinato de hidrocortisona. A todos estos requerimientos para el medio de cultivo, se le añadió también penicilina/estreptomicina, un antibiótico para evitar cualquier tipo de contaminación.

-Azul tripán.

-Tripsina/ EDTA 0,25%/0,02% (Sigma Aldrich, Madrid, España).

- MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) de Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Dimetil sulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Kit de detección de muerte celular o kit de apoptosis (ELISA plus) (Roche®, Alemania).

3.1.3. Equipos

Los siguientes equipos e instrumental han sido facilitados por el Servicio de Cultivo de Tejidos del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia:

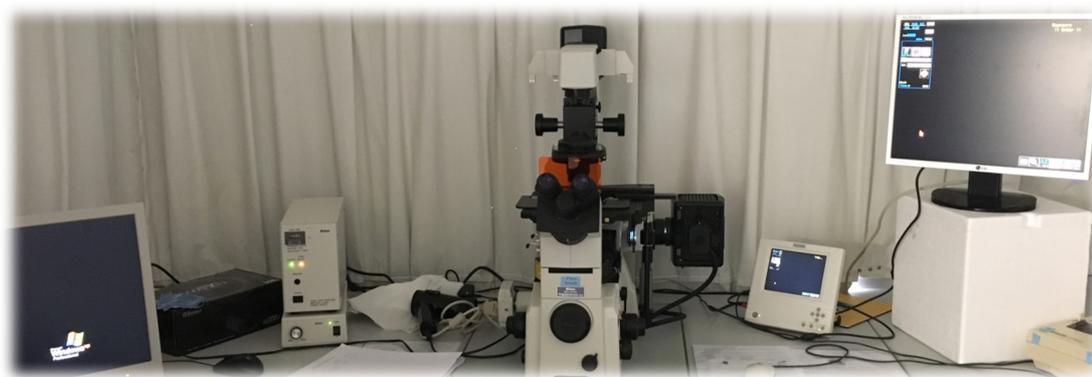
- Depósito de nitrógeno líquido.
- Cabina de flujo laminar Telstar Bio-II-A.
- Incubador de CO2 refrigerado Heraeus mod. BBK 6220.
- Estufa de tripsinización JP Selecta®.
- Centrífuga refrigerada HERAEUS mod. Megafuge 1.0R.
- Hemocitómetro de recuento celular automático BIO-RAD TC10.
- Lector de placas modelo FLUOstar Omega (BMG Lab. Technologies, USA) (Figura 15).

Figura 15. Lector de placas FLUOstar Omega



- Balanza de precisión Mettler Toledo® mod. AE50.
- Agitador orbital ELMi skyline digital DOS-20M.
- Microscopio óptico con contraste de fases, campo claro y oscuro con objetivos de 10, 20, 40 y 100 aumentos. Nikon TMS. Japón.
- Microscopio óptico invertido Nikon con contraste de fases y fluorescencia. Posee objetivos de 4, 10, 20 y 40 aumentos. Modelo Eclipse TE 2000-U. Equipo de fotografía digital acoplado (Figura 16).

Figura 16. Microscopio óptico invertido con sistema de fotografía digital acoplado.



3.1.4. Cisplatino

El cisplatino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) o cis-diaminodicloroplatino, es un compuesto sólido en forma de polvo. Se debe almacenar a temperaturas entre $\pm 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ debiendo estar protegido de la luz. Tiene una solubilidad en agua ≥ 1 (1-10) mg/l y, al ser altamente soluble en DMSO, se procedió a su disolución a través de este compuesto a la concentración de 1mg/l y, se almacenó en alícuotas para emplear según su necesidad.

3.1.5. Enoxaparina sódica

La enoxaparina sódica (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se debe almacenar entre $\pm 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y protegido de la luz. En este estudio se procedió a su disolución en tampón

fosfato salino (PBS) a la concentración de 1mg/l y, se almacenó en alícuotas para emplear según su necesidad.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Diseño del estudio

Los cultivos y mediciones fueron realizados siempre por el mismo investigador y en las mismas condiciones. Los aparatos utilizados fueron debidamente calibrados para las longitudes de onda requeridas en los distintos estudios.

Tras la descongelación de la línea celular, se procedió a su cultivo y se realizaron los subcultivos necesarios para que las células alcanzaran su nivel óptimo de crecimiento, según las indicaciones. Cuando dicho nivel era alcanzado, se procedió a la realización de los diferentes estudios.

Si la línea celular tras la realización de un estudio sobrepasaba el número de subcultivos que según las indicaciones se consideraba óptimo, éstas células eran desechadas y se procedía a la descongelación de una nueva muestra celular.

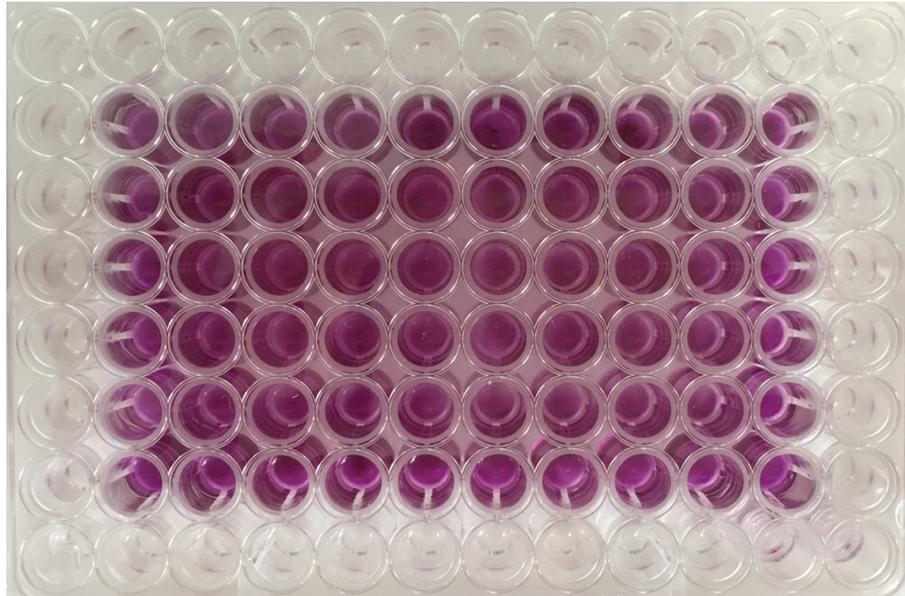
Los tratamientos fueron administrados siempre transcurrido el mismo tiempo desde la siembra de las placas (24 h). Dicho tiempo era el necesario para que las células se adhirieran a la placa y alcanzaran su metabolismo habitual.

3.2.2. Estudio *in vitro* del efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada por triplicado, realizando réplicas de 10 para cada concentración, a través de ensayos con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) a las 24, 48 y 72 horas de la adición del cisplatino a distintas concentraciones: 1, 2, 4, 8 y 10 μ M. Las células fueron inicialmente cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3200 células/pocillo. Después de 24 horas

tras la siembra celular, las células fueron tratadas con las diferentes concentraciones de cisplatino, realizando 10 réplicas para cada tratamiento (Figura 17).

Figura 17. Placa de 96 pocillos dispuesta para su lectura.



Pasadas las 24, 48 ó 72 horas del tratamiento celular con cisplatino, se retiró el medio de cultivo que contenía las distintas concentraciones de cisplatino, y se reemplazó por 200 μ l de MTT disuelto en medio (1mg/ml), que se dejó incubar (sin contacto con la luz) durante 4 horas a 37°C, con una humedad relativa del 90-95%, en 1 atmósfera de presión, y al 5% de CO₂. Finalmente se retiró el MTT de los pocillos y se reemplazó por 100 μ l de DMSO para solubilizar el formazano producido por las células viables. Se procedió entonces, previa agitación a 100 r.p.m. durante 5 minutos, a la medición de la absorbancia en el lector de placas FLUOstar Omega, empleando una longitud de onda de 570nm para la lectura, y 690 nm como longitud de onda de referencia.

3.2.3. Estudio *in vitro* del efecto de la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada por duplicado mediante ensayos de MTT a las 24, 48 y 72 horas de la adición de la enoxaparina sódica a distintas concentraciones: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$. Las células fueron inicialmente cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3200 células/pocillo en 100 μl de medio. Después de 24 horas tras la siembra celular, las células fueron tratadas con las diferentes concentraciones de enoxaparina sódica, realizando réplicas de 6 para cada tratamiento.

Pasadas las 24, 48 ó 72 horas del tratamiento celular con enoxaparina sódica, se retiró el medio de cultivo que contenía las distintas concentraciones de enoxaparina sódica, y se reemplazó por 200 μl de MTT disuelto en medio (1mg/ml), que se dejó incubar (sin contacto con la luz) durante 4 horas a 37°C, con una humedad relativa del 90-95%, en 1 atmósfera de presión, y al 5% de CO₂. Finalmente se retiró el MTT de los pocillos y se reemplazó por 100 μl de DMSO para solubilizar el formazano producido por las células viables. Se procedió entonces, previa agitación a 100 r.p.m. durante 5 minutos, a la medición de la absorbancia en el lector de placas FLUOstar Omega, empleando una longitud de onda de 570nm para la lectura, y 690 nm como longitud de onda de referencia.

3.2.4. Estudio *in vitro* del efecto del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular

Las células fueron inicialmente cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3200 células/pocillo. Después de pasadas 24 horas tras la siembra celular, cada placa fue tratada con las distintas concentraciones antes mencionadas de enoxaparina sódica y mediante una sola concentración de cisplatino. Es decir, en cada placa se empleó la misma concentración de cisplatino en todos los pocillos y, en réplicas de 6, cada una de las concentraciones de enoxaparina con el fin de combinar ambos

tratamientos. Se realizaron por duplicado un total de 15 ensayos de viabilidad celular (MTT)– 5 ensayos a las 24 horas, 5 ensayos a las 48 horas, 5 ensayos a las 72 horas.

Pasadas las 24, 48 ó 72 horas de tratamiento celular, se retiró el medio de cultivo que contenía las distintas concentraciones, y se reemplazó por 200µl de MTT disuelto en medio (1mg/ml) que se dejó incubar (sin contacto con la luz) durante 4 horas a 37°C, con una humedad relativa del 90-95%, en 1 atmósfera de presión, y al 5% de CO₂. Finalmente se retiró el MTT de los pocillos y se reemplazó por 100µl de DMSO para solubilizar el formazano producido por las células viables. Se procedió entonces, previa agitación a 100 r.p.m. durante 5 minutos, a la medición de la absorbancia en el lector de placas FLUOstar Omega, empleando una longitud de onda de 570nm para la lectura, y 690 nm como longitud de onda de referencia.

3.2.5. Estudio *in vitro* del efecto del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la apoptosis

La apoptosis fue determinada mediante el test de ELISA plus (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento celular, mediante triplicados, de las concentraciones de cisplatino 8 µM y 10 µM, así como de dichas concentraciones en combinación con 100 µg/ml de enoxaparina sódica. Estas concentraciones fueron seleccionadas de entre las anteriormente analizadas mediante el test MTT, por ser las más representativas.

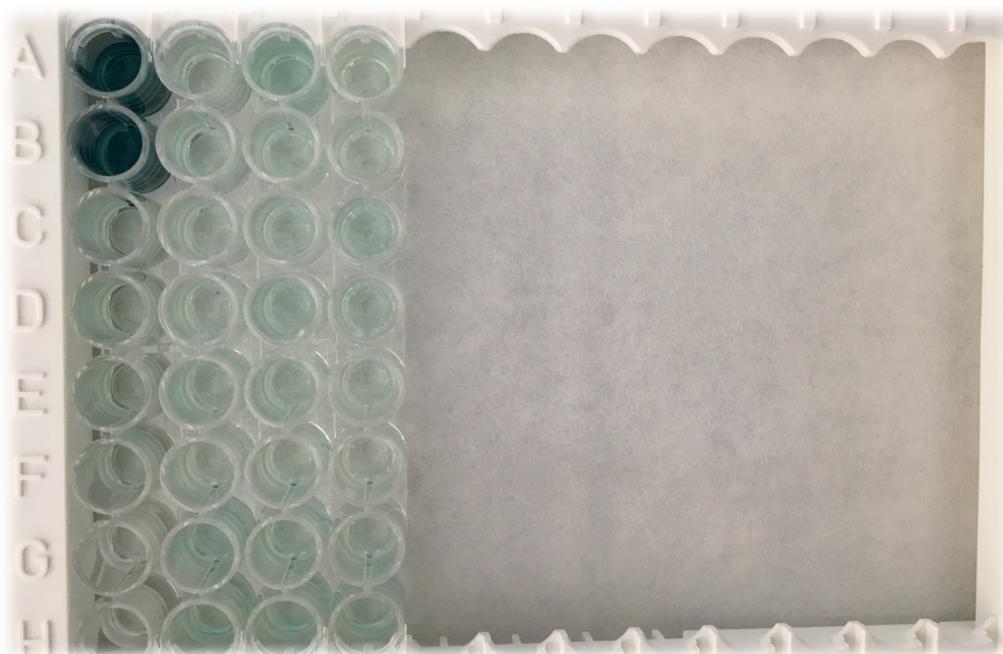
Las células fueron inicialmente cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3200 células/pocillo. Pasadas 24 horas para que se adhirieran, se añadieron los tratamientos celulares en aquellos pocillos diseñados para tal fin, obviando aquellos pocillos control que quedarían sin tratar (controles negativos y positivos de apoptosis). Transcurridas otras 24, 48 ó 72 horas, se llevó a cabo la lisis celular y posteriormente, la centrifugación de la placa con el fin de que los núcleos celulares quedasen en el fondo del pocillo y pudiésemos trabajar con la fracción citoplasmática de las células.

El siguiente paso consistió en transferir 20 µl de cada uno de los pocillos a la placa que proporcionaba el kit de ELISA plus (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania),

respetando la distribución de pocillos diseñada. Seguidamente, se añadieron 80 μ l de “Inmunoreagent” (una solución constituida por varios componentes que proporciona el kit) a cada pocillo. A continuación, se cubrió la placa con un envoltorio adhesivo y se incubó en agitación durante 2 horas a 300 r.p.m. entre 15°C y 25°C. Posteriormente, se retiró cuidadosamente la solución por succión, y se enjuagó cada pocillo tres veces con 250 μ l de “Incubation Buffer” (solución proporcionada en el kit). Finalmente, se añadieron 100 μ l de “ABTS solution” a cada pocillo y se incubó la placa mediante agitación a 250 r.p.m. durante 15 minutos, haciéndose visible un color verdoso indicativo de apoptosis celular (Figura 18).

Finalmente, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de “ABTS Stop Solution” para detener la reacción y, se procedió a la medición de la absorbancia a través de lectura de la placa mediante el FLUOstar Omega (longitud de onda de 405 nm, y longitud de onda de referencia aproximada de 490 nm).

Figura 18. Pocillos de la placa del kit ELISA preparados para su lectura tras 72 horas de tratamiento.



3.2.6. Estudio *in vitro* del efecto del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la migración celular

* Ensayo de migración celular

Inicialmente, las células fueron cultivadas a una densidad adecuada en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaron la confluencia al 100% y el crecimiento quedó inhibido. Se realizaron a continuación, 3 líneas paralelas en cada pocillo a través de una punta estéril de 300 μ l para pipeta, con el fin de ocasionar vacíos celulares y, observar la repercusión del tratamiento sobre la capacidad migración celular.

Entonces, cada pocillo de células (salvo el control) fue tratado con las concentraciones de cisplatino y enoxaparina más significativas tras el ensayo con MTT – cisplatino 8 μ M, cisplatino 10 μ M, cisplatino 8 μ M y enoxaparina 100 μ g/ml, cisplatino 10 μ M y enoxaparina 100 μ g/ml –. Se tomaron 3 imágenes (una imagen/línea) en este momento inicial (tiempo 0) mediante el microscopio óptico Nikon Eclipse TE 2000-U, también a las 18 horas y a las 24 horas después en ese mismo lugar. Estos tiempos fueron previamente seleccionados de unos ensayos control, con el fin de conocer el comportamiento migratorio de este tipo celular que resultase significativo para nuestro estudio.

* Análisis cuantitativo de la distancia de migración celular

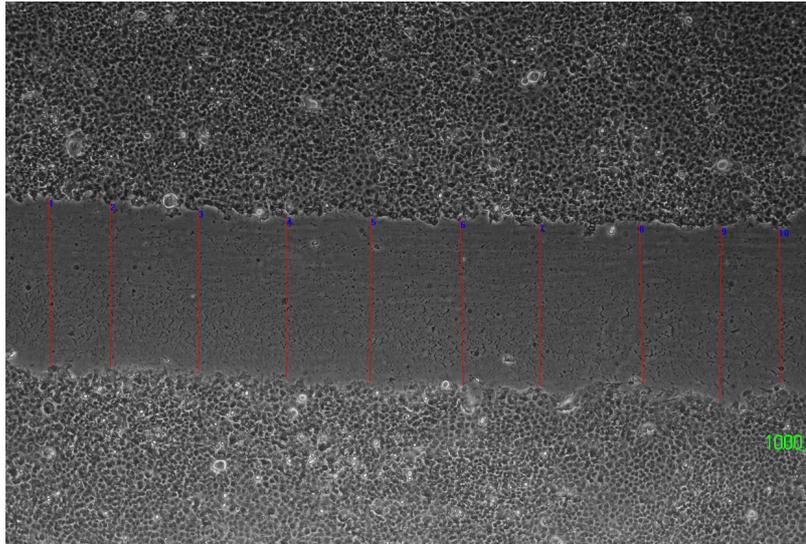
La migración celular fue determinada mediante el sistema de análisis de imagen MIP 4.5 del SAI de la Universidad de Murcia. Mediante este sistema, se tomaron 10 medidas del espacio libre de células para cada imagen para obtener un valor medio por imagen (Figura 19). Después, se determinó la distancia de migración celular comparando el ancho del espacio libre en cada momento, con respecto al ancho de esa misma zona a tiempo cero, según la siguiente fórmula:

Distancia de migración = $(A_0 / 2) - (A_t / 2)$

A₀: Ancho del espacio libre de células inicial.

A_t: Ancho del espacio libre de células a tiempo t.

Figura 19. Empleo de diez medidas para el análisis del ancho del espacio libre de células



3.2.7. Método estadístico

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 20.0) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

- **Estadística inferencial**

Para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (es decir, la existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar, cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado “*p-valor*”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05 (si esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia). Para ello, se ha realizado el contraste para el estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas mediante el test «ANOVA» de un factor: este test estadístico se utilizó para comparar tres o más

medias (de muestras independientes), cuando eran tres o más las variables a comparar.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EFECTO DEL CISPLATINO Y LA ENOXAPARINA SÓDICA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR H357

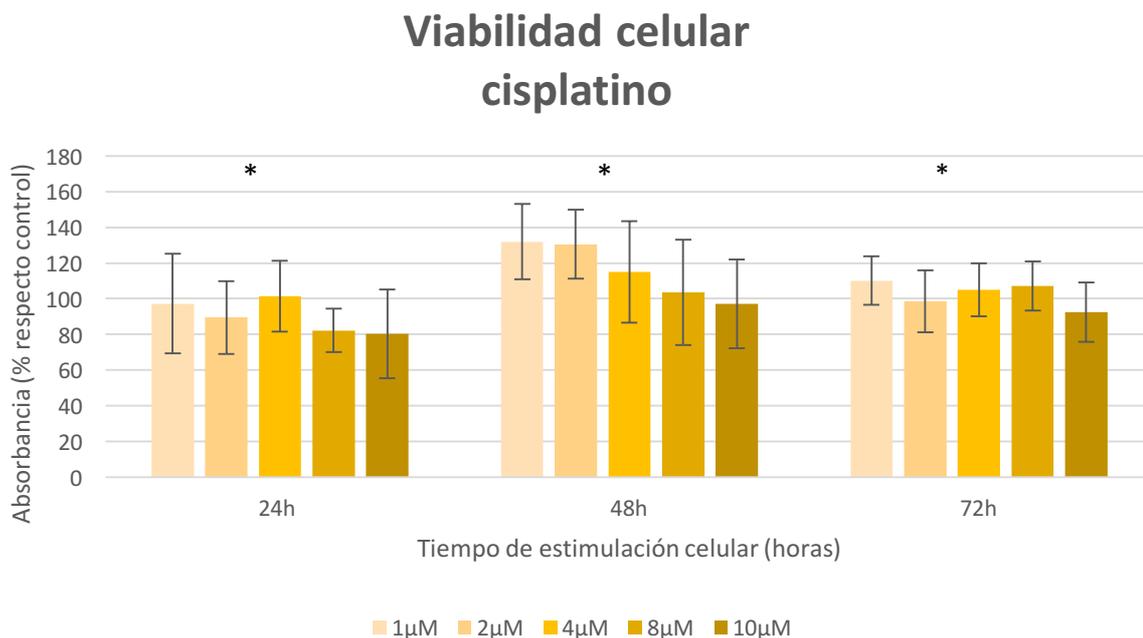
El estudio de la viabilidad celular se llevó a cabo a las 24, 48 y 72 horas de incubación de la línea celular H357 de COCE bajo tratamiento con cisplatino, enoxaparina sódica o la combinación de cisplatino y enoxaparina sódica.

4.1.1. Efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular

En todos los tiempos de incubación estudiados (24, 48 y 72 horas), observamos que a medida que aumenta la dosis de cisplatino, se producía un descenso de la viabilidad celular de las células del COCE. La concentración de cisplatino que producía un mayor descenso de la viabilidad celular fue la de 10 μM con diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ($p=0,009$), 48 horas ($p=0,001$) y 72 horas ($p=0,003$) (Tabla 7) (Figura 20).

Tabla 7. Valores de absorbancia (%) respecto al control expresados como media \pm desviación típica (DT) a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento con cisplatino (ANOVA).

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μM)	1	97,21 \pm 27,91	131,92 \pm 21,19	110,11 \pm 13,66
	2	89,45 \pm 20,53	130,52 \pm 19,24	98,65 \pm 17,26
	4	101,51 \pm 19,82	115,09 \pm 28,51	105,01 \pm 14,81
	8	82,26 \pm 12,23	103,69 \pm 29,54	107,13 \pm 13,78
	10	80,33 \pm 24,92	97,12 \pm 44,61	92,61 \pm 16,64
valor de p		0,009	0,001	0,003

Figura 20. Efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.

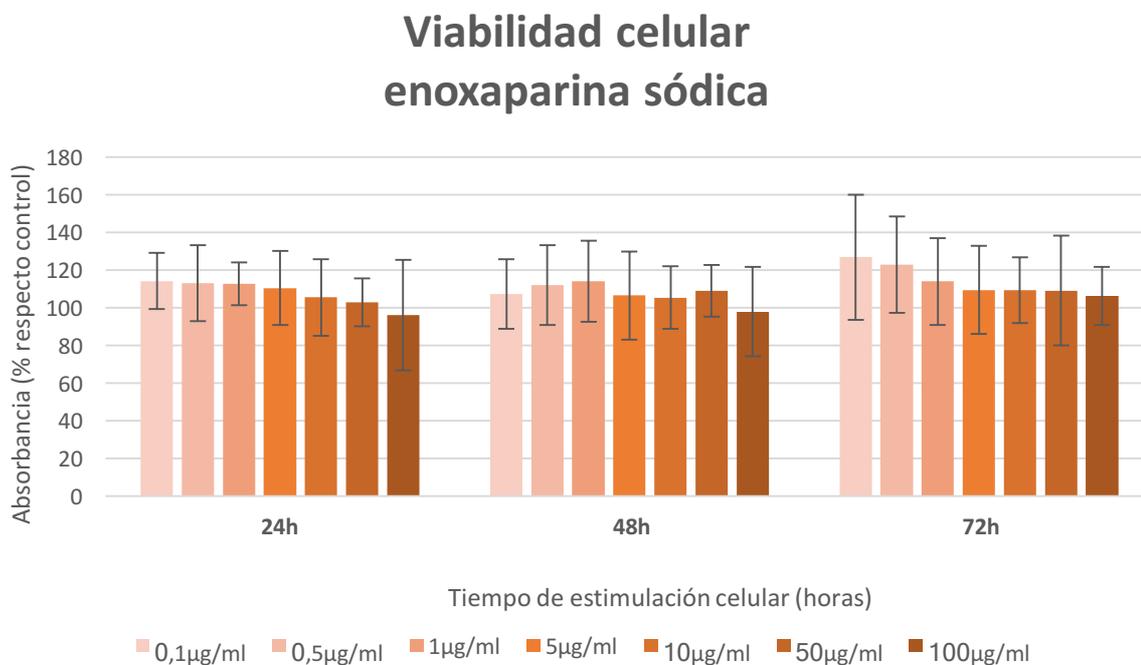
4.1.2. Efecto de la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular

Al estudiar el efecto de la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de incubación observamos que, a medida que aumentamos la dosis de la HBPM, se producía un descenso de la viabilidad celular que fue mayor a una dosis de enoxaparina sódica de 100 µg/ml, aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ($p=0,215$), 48 horas ($p=0,558$) ó 72 horas ($p=0,303$) de incubación (Tabla 8) (Figura 21).

Tabla 8. Valores de absorbancia (%) respecto al control expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento con enoxaparina sódica (ANOVA).

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de enoxaparina sódica ($\mu\text{g/ml}$)	0,1	114,08 \pm 15,01	107,21 \pm 18,36	126,71 \pm 33,14
	0,5	112,89 \pm 20,24	111,94 \pm 21,06	122,77 \pm 25,51
	1	112,57 \pm 11,37	114,04 \pm 21,57	113,84 \pm 23,14
	5	110,33 \pm 19,54	106,41 \pm 23,36	109,31 \pm 23,28
	10	105,32 \pm 20,21	105,30 \pm 16,59	109,25 \pm 17,37
	50	102,83 \pm 12,78	108,82 \pm 13,61	108,98 \pm 29,21
	100	96,07 \pm 29,31	97,76 \pm 23,72	106,18 \pm 15,51
valor de p		0,215	0,558	0,303

Figura 21. Efecto de la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



4.1.3. Efecto combinado del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular

El efecto combinado del cisplatino y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular, se estudió combinando todas las concentraciones de enoxaparina sódica (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$) con las distintas concentraciones de cisplatino (1, 2, 4, 8 y 10 μM). En cada caso, se planteó un análisis descriptivo en el que se relacionaba el valor de absorbancia obtenido con el tratamiento único a base de cisplatino, y aquél obtenido mediante el tratamiento combinado de cisplatino y enoxaparina sódica de forma simultánea, a la misma concentración de cisplatino y a un tiempo dado (transcurridas las 24, 48 ó 72 horas, según el caso).

* Efecto del cisplatino 1 μM y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular

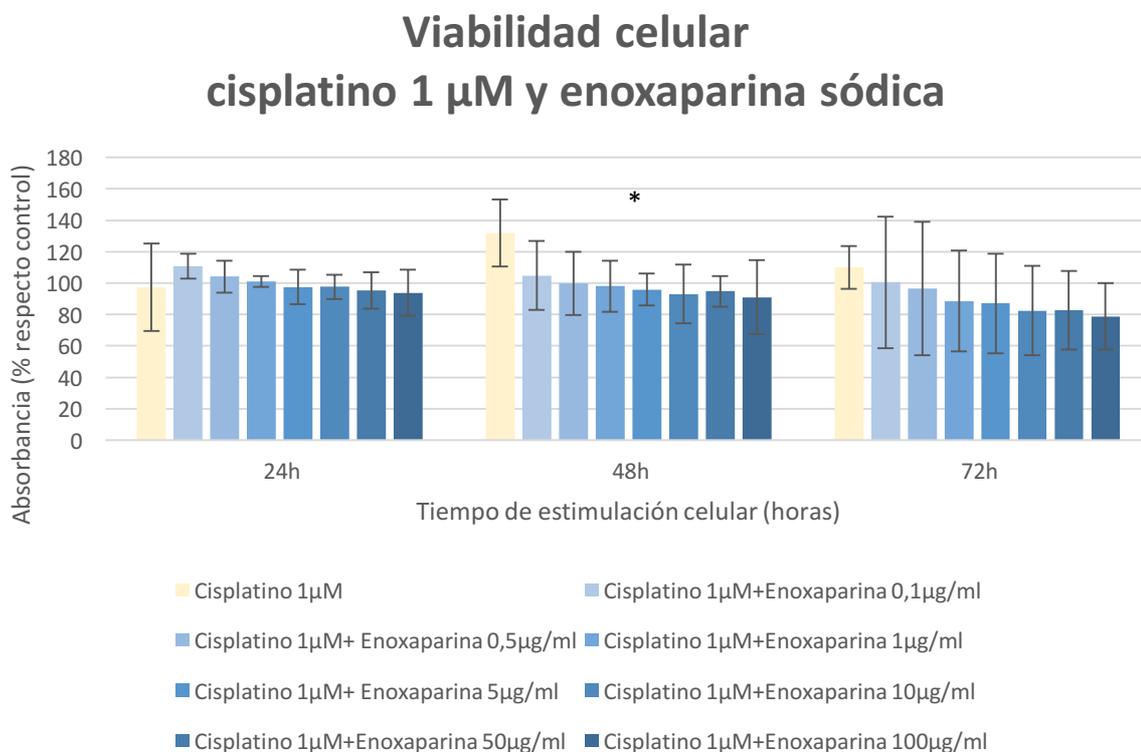
La combinación de cisplatino 1 μM con las distintas concentraciones de enoxaparina sódica utilizadas (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$) mostraron que las concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de la HBPM, fueron las que mayor reducción de la viabilidad celular produjeron, con diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas de incubación ($p < 0,001$) (Tabla 9) (Figura 22).

Tabla 9. Valores de absorbancia (%) respecto al control expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento concomitante de cisplatino 1 μM y enoxaparina sódica a distintas concentraciones (ANOVA).

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μM)	1	97,21 \pm 27,91	131,92 \pm 21,19	110,11 \pm 13,66

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de enoxaparina sódica ($\mu\text{g/ml}$) (tratamiento concomitante con cisplatino $1 \mu\text{M}$)	0,1	110,69 \pm 8,04	104,76 \pm 21,94	100,48 \pm 41,95
	0,5	104,13 \pm 10,14	99,81 \pm 19,96	96,63 \pm 42,39
	1	101,11 \pm 3,54	97,98 \pm 16,31	88,42 \pm 32,11
	5	97,42 \pm 10,99	95,84 \pm 10,28	87,08 \pm 31,63
	10	97,73 \pm 7,71	93,06 \pm 18,71	82,48 \pm 28,64
	50	95,35 \pm 11,72	94,73 \pm 9,64	82,81 \pm 25,06
	100	93,87 \pm 14,78	90,96 \pm 23,53	78,81 \pm 21,22
valor de p		0,228	<0,001	0,077

Figura 22. Efecto del cisplatino $1 \mu\text{M}$ solo o combinado con enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



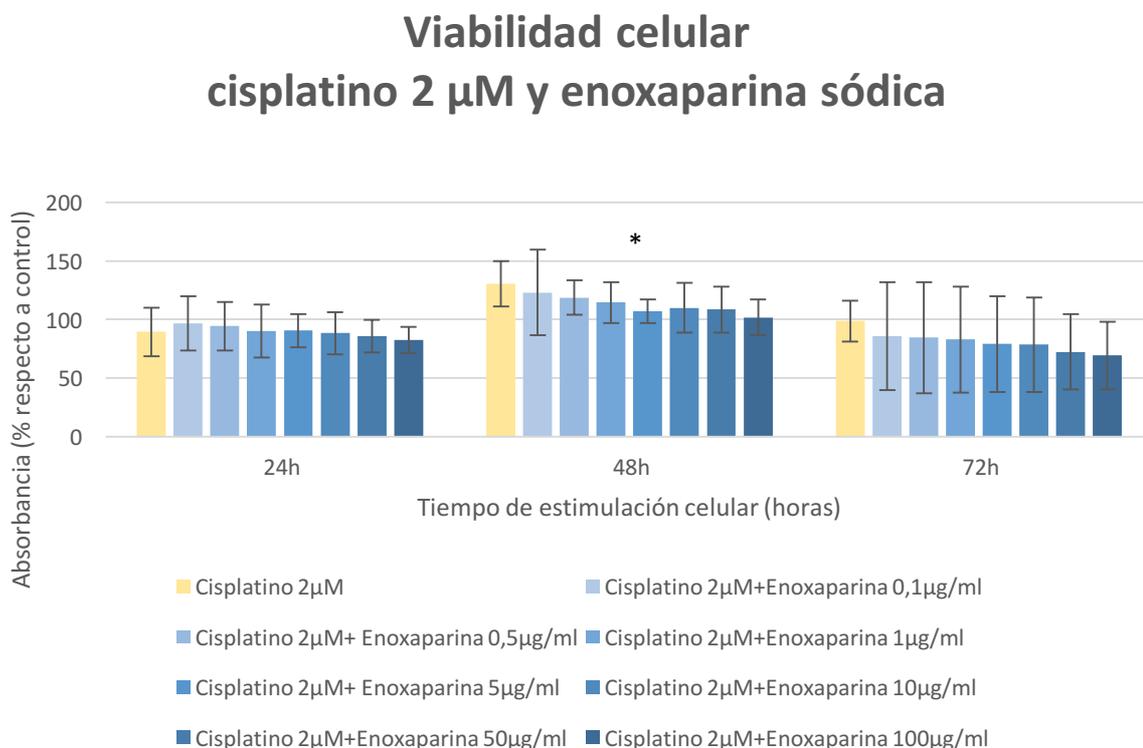
*** Efecto del cisplatino 2 μM y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular**

Al estudiar el efecto combinado del cisplatino 2 μM y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de incubación observamos que, a medida que aumentamos la dosis de la HBPM, se producía un descenso de la viabilidad celular. Éste fue mayor a las concentraciones de enoxaparina sódica de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$, con diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas de incubación ($p=0,006$) (Tabla 10) (Figura 23).

Tabla 10. Valores de absorbancia (%) respecto al control expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento concomitante de cisplatino 2 μM y enoxaparina sódica a distintas concentraciones (ANOVA).

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μM)	2	89,45 \pm 20,53	130,52 \pm 19,24	98,65 \pm 17,26
Concentración de enoxaparina sódica ($\mu\text{g/ml}$) (tratamiento concomitante con cisplatino 2 μM)	0,1	96,71 \pm 23,08	123,11 \pm 36,39	85,81 \pm 45,96
	0,5	94,28 \pm 20,77	118,68 \pm 14,67	84,55 \pm 47,33
	1	90,36 \pm 22,54	114,45 \pm 17,39	82,99 \pm 45,23
	5	90,53 \pm 14,04	106,88 \pm 10,05	79,04 \pm 40,83
	10	88,33 \pm 17,81	110,05 \pm 21,36	78,47 \pm 40,58
	50	85,76 \pm 13,69	108,44 \pm 19,84	72,45 \pm 32,18
	100	82,55 \pm 11,11	101,85 \pm 15,21	69,31 \pm 28,76
valor de p		0,729	0,006	0,502

Figura 23. Efecto del cisplatino 2 μ M solo o combinado con enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



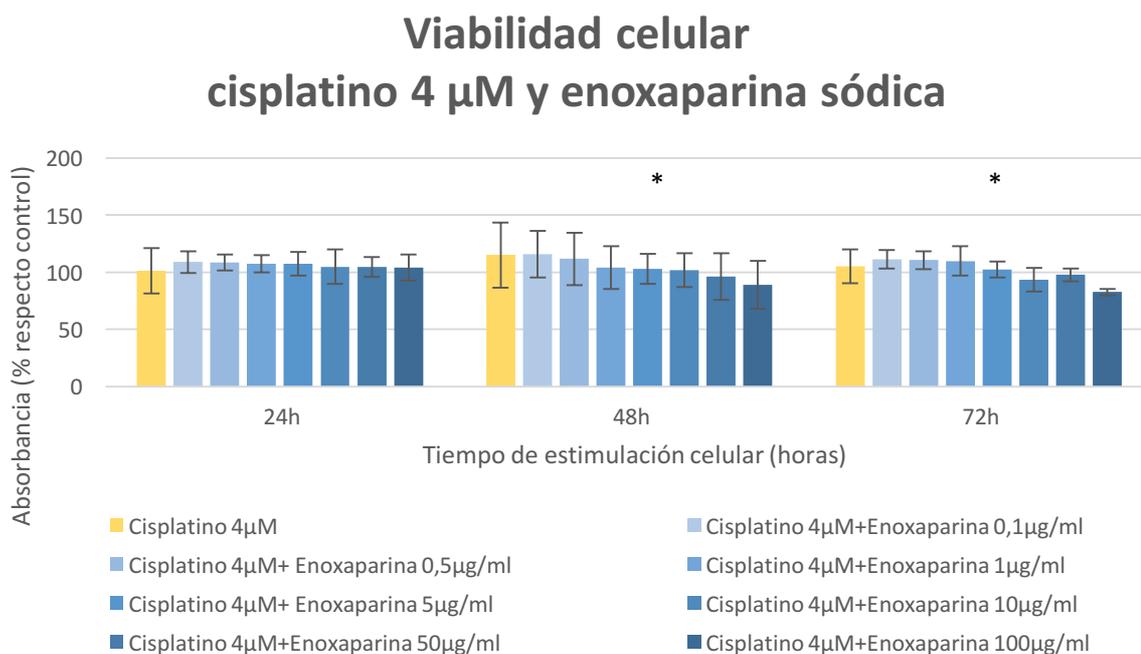
*** Efecto del cisplatino 4 μ M y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular**

En todos los tiempos de incubación estudiados (24, 48 y 72 horas) en el tratamiento combinado de cisplatino 4 μ M y enoxaparina sódica, observamos que a medida que aumentaba la concentración de la HBPM, se producía un descenso de la viabilidad celular de las células del COCE. La concentración de enoxaparina sódica que producía un mayor descenso de la viabilidad celular fue la de 100 μ g/ml con diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas ($p=0,03$) y 72 horas ($p<0,001$) de tratamiento (Tabla 11) (Figura 24).

Tabla 11. Valores de absorbancia (%) respecto al control expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento concomitante de cisplatino 4 μ M y enoxaparina sódica a distintas concentraciones (ANOVA).

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μM)	4	101,51 \pm 19,82	115,09 \pm 28,51	105,01 \pm 14,81
Concentración de enoxaparina sódica (μg/ml) (tratamiento concomitante con cisplatino 4 μM)	0,1	108,92 \pm 9,61	115,95 \pm 20,48	111,23 \pm 7,96
	0,5	108,53 \pm 6,74	111,68 \pm 23,01	110,53 \pm 7,97
	1	107,52 \pm 7,63	103,93 \pm 18,84	109,86 \pm 13,07
	5	107,40 \pm 10,35	102,78 \pm 13,09	102,31 \pm 7,13
	10	104,78 \pm 15,08	101,77 \pm 14,62	93,57 \pm 10,28
	50	104,66 \pm 8,62	96,33 \pm 20,54	97,88 \pm 5,57
	100	104,07 \pm 11,33	89,14 \pm 21,03	82,55 \pm 3,04
valor de p		0,774	0,03	<0,001

Figura 24. Efecto del cisplatino 4 μ M solo o combinado con enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



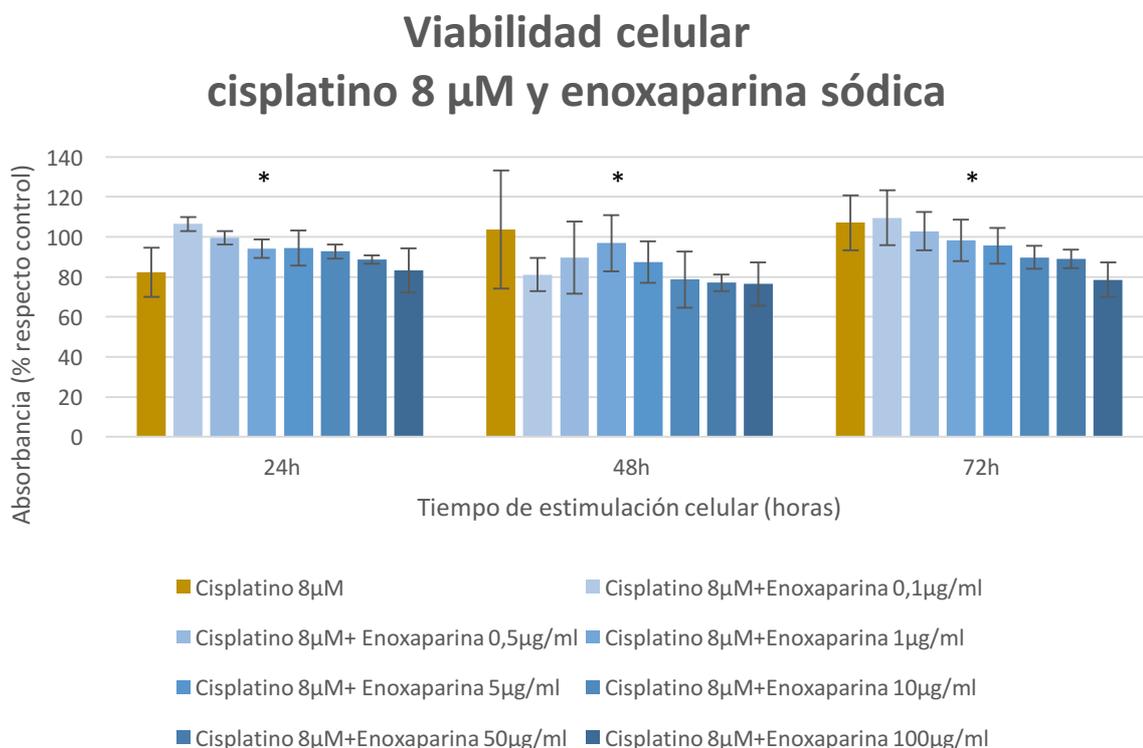
* **Efecto del cisplatino 8 μ M y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular**

El tratamiento combinado de cisplatino 8 μ M y la enoxaparina sódica produjo una mayor reducción de la viabilidad celular conforme la concentración de enoxaparina sódica era también mayor. El mayor descenso de la viabilidad celular fue alcanzado a la concentración de 100 μ g/ml de enoxaparina sódica, con diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ($p < 0,001$), 48 horas ($p < 0,001$) y 72 horas ($p < 0,001$) de incubación (Tabla 12) (Figura 25).

Tabla 12. Valores de absorbancia (%) respecto al control expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento concomitante de cisplatino 8 μ M y enoxaparina sódica a distintas concentraciones (ANOVA).

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μ M)	8	82,26 \pm 12,23	103,69 \pm 29,54	107,13 \pm 13,78
Concentración de enoxaparina sódica (μ g/ml) (tratamiento concomitante con cisplatino 8 μ M)	0,1	106,42 \pm 3,59	81,13 \pm 8,39	109,57 \pm 13,82
	0,5	99,48 \pm 3,32	89,60 \pm 18,11	102,78 \pm 9,52
	1	94,04 \pm 4,54	96,82 \pm 14,07	98,25 \pm 10,45
	5	94,37 \pm 8,69	87,29 \pm 10,33	95,54 \pm 8,92
	10	92,73 \pm 3,57	78,65 \pm 13,95	89,68 \pm 5,71
	50	88,61 \pm 2,16	77,07 \pm 4,09	89,08 \pm 4,61
	100	83,26 \pm 10,92	76,39 \pm 10,78	78,61 \pm 8,62
valor de p		<0,001	<0,001	<0,001

Figura 25. Efecto del cisplatino 8 μM solo o combinado con enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



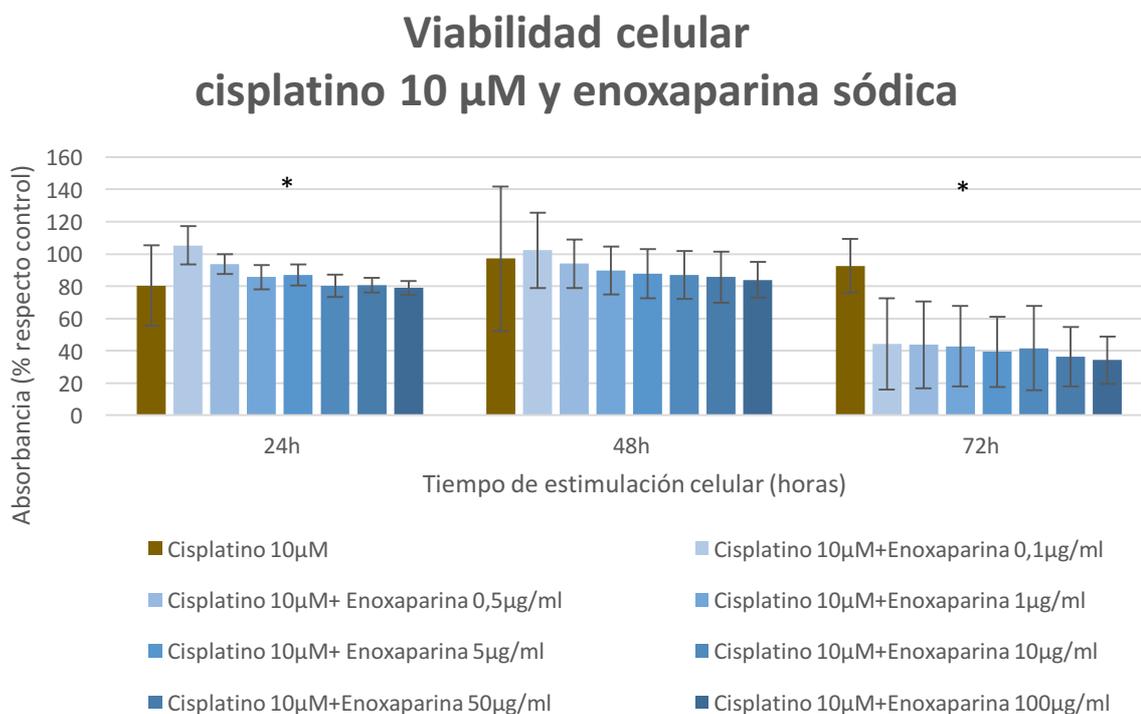
*** Efecto del cisplatino 10 μM y la enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular**

En todos los tiempos de incubación estudiados (24, 48 y 72 horas) en el tratamiento combinado de cisplatino 10 μM y enoxaparina sódica, observamos que a medida que aumentaba la concentración de la HBPM, se producía un descenso de la viabilidad celular de las células del COCE. La concentración de enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mostró un mayor descenso de la viabilidad celular, con diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ($p < 0,001$) y 72 horas ($p < 0,001$) de tratamiento (Tabla 13) (Figura 26).

Tabla 13. Valores de absorbancia (%) respecto al control expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento concomitante de cisplatino 10 μ M y enoxaparina sódica a distintas concentraciones (ANOVA).

		Absorbancia (% respecto al control)		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μM)	10	80,33 \pm 24,92	97,12 \pm 44,61	92,61 \pm 16,64
Concentración de enoxaparina sódica (μg/ml) (tratamiento concomitante con cisplatino 10 μM)	0,1	105,32 \pm 11,96	102,21 \pm 23,52	44,22 \pm 28,11
	0,5	93,59 \pm 6,11	93,97 \pm 14,99	43,71 \pm 26,87
	1	85,58 \pm 7,36	89,82 \pm 14,93	42,83 \pm 24,83
	5	86,88 \pm 6,57	87,65 \pm 15,31	39,31 \pm 21,81
	10	80,21 \pm 6,81	86,92 \pm 14,91	41,64 \pm 26,09
	50	80,58 \pm 4,65	85,71 \pm 15,85	36,36 \pm 18,53
	100	78,92 \pm 4,41	83,91 \pm 10,98	34,23 \pm 14,57
valor de p		<0,001	0,616	<0,001

Figura 26. Efecto del cisplatino 10 μ M solo o combinado con enoxaparina sódica sobre la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



4.2. EFECTO DEL CISPLATINO Y LA ENOXAPARINA SÓDICA SOBRE LA APOPTOSIS CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR H357

Se llevó a cabo el estudio de apoptosis celular con el fin de contrastar la existencia de diferencias significativas entre el tratamiento con cisplatino solo (8 μM y 10 μM) y en simultaneidad con enoxaparina sódica a 100 $\mu\text{g/ml}$. La selección de estos valores de concentración, estuvo basada en la gran eficacia sinérgica mostrada por estos compuestos en los resultados de viabilidad celular.

4.2.1. Efecto del cisplatino 8 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la apoptosis celular

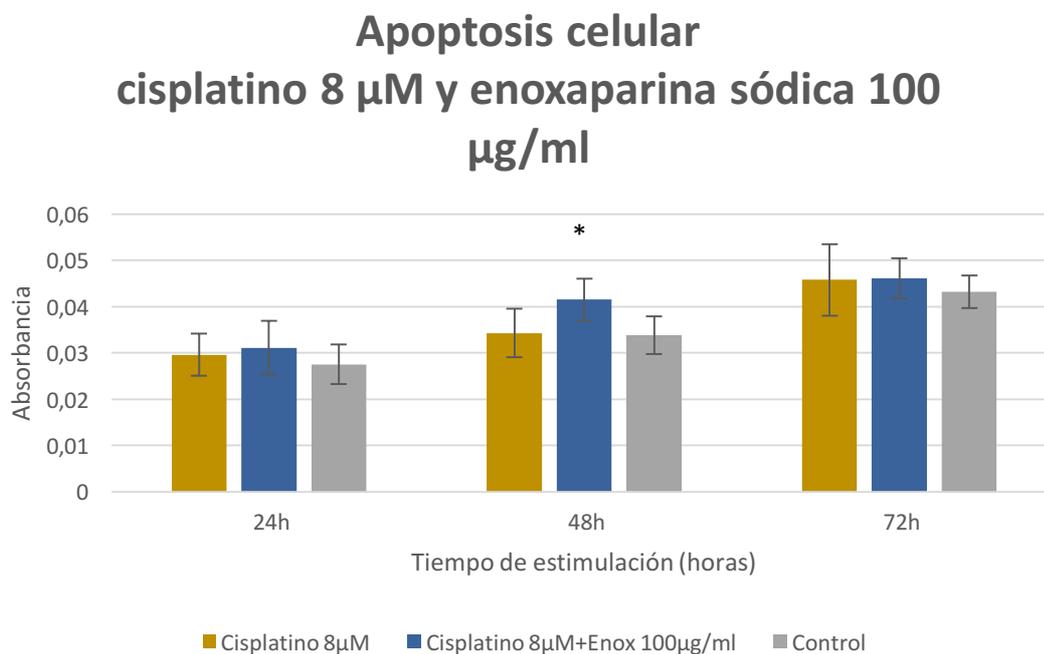
En el ensayo de apoptosis celular se observó que tanto a las 24, 48 y 72 horas, se producía una mayor tasa de apoptosis cuando el tratamiento empleado era la combinación del cisplatino 8 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas sólo a las 48 horas de tratamiento ($p=0,008$). No obstante, la mayor tasa de apoptosis evidenciada en este experimento se observó tras las 72 horas ($0,0461\pm 0,0043$) (Tabla 14) (Figura 27).

Tabla 14. Valores de absorbancia expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento concomitante de cisplatino 8 μM y enoxaparina sódica a 100 $\mu\text{g/ml}$ (ANOVA).

		Absorbancia		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μM)	8	0,0296 \pm 0,0046	0,0343 \pm 0,0053	0,0458 \pm 0,0077

		Absorbancia		
		24h	48h	72h
Concentración de enoxaparina sódica ($\mu\text{g/ml}$) (tratamiento concomitante con cisplatino $8 \mu\text{M}$)	100	$0,0311 \pm 0,0058$	$0,0415 \pm 0,0045$	$0,0461 \pm 0,0043$
Control		$0,0275 \pm 0,0043$	$0,0338 \pm 0,0041$	$0,0432 \pm 0,0035$
valor de p		0,582	0,008	0,716

Figura 27. Efecto del cisplatino $8 \mu\text{M}$ solo o combinado con enoxaparina sódica sobre la apoptosis celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



4.2.2. Efecto del cisplatino 10 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la apoptosis celular

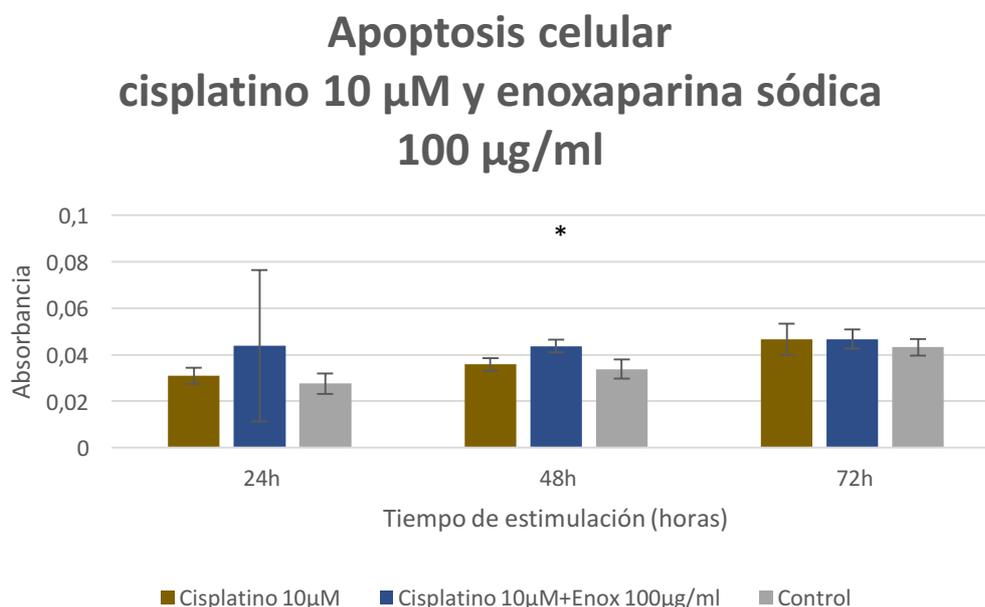
En el ensayo de apoptosis celular, se observó una mayor tasa de apoptosis con el tratamiento concomitante (cisplatino 10 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$) tanto a las 24, 48 y 72, con diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas ($p=0,009$).

Pasadas 72 horas, aunque no se observaron diferencias tan marcadas entre el tratamiento con cisplatino solo o en combinación con enoxaparina sódica como pasadas 24 ó 48 horas, se produjo el resultado más alto de apoptosis celular ($0,0467\pm 0,0041$) (Tabla 15) (Figura 28).

Tabla 15. Valores de absorbancia expresados como media \pm DT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento concomitante de cisplatino 10 μM y enoxaparina sódica a 100 $\mu\text{g/ml}$ (ANOVA).

		Absorbancia		
		24h	48h	72h
Concentración de cisplatino (μM)	10	0,0310 \pm 0,0035	0,0358 \pm 0,0027	0,0466 \pm 0,0067
Concentración de enoxaparina sódica ($\mu\text{g/ml}$) (tratamiento concomitante con cisplatino 10 μM)	100	0,0438 \pm 0,0325	0,0437 \pm 0,0027	0,0467 \pm 0,0041
Control		0,0275 \pm 0,0043	0,0338 \pm 0,0041	0,0432 \pm 0,0035
valor de p		0,413	0,009	0,592

Figura 28. Efecto del cisplatino 10 μM solo o combinado con enoxaparina sódica sobre la apoptosis celular a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento.



4.3. EFECTO DEL CISPLATINO Y LA ENOXAPARINA SÓDICA SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR H357

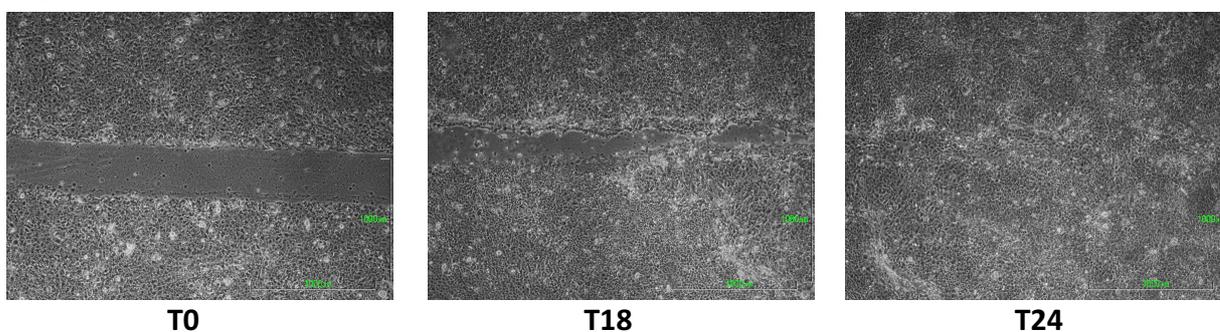
El estudio de la migración celular se empleó con el propósito de conocer si se producía también un efecto sinérgico sobre la capacidad de migración celular, al igual que el alcanzado en la viabilidad celular, donde ésta presentó la mayor de disminución de la viabilidad celular con el cisplatino a 8 μM ó 10 μM y la enoxaparina sódica a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Es por ello que, se estudia a continuación la distancia de migración celular a estas dosis.

4.3.1. Efecto del cisplatino 8 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la migración celular

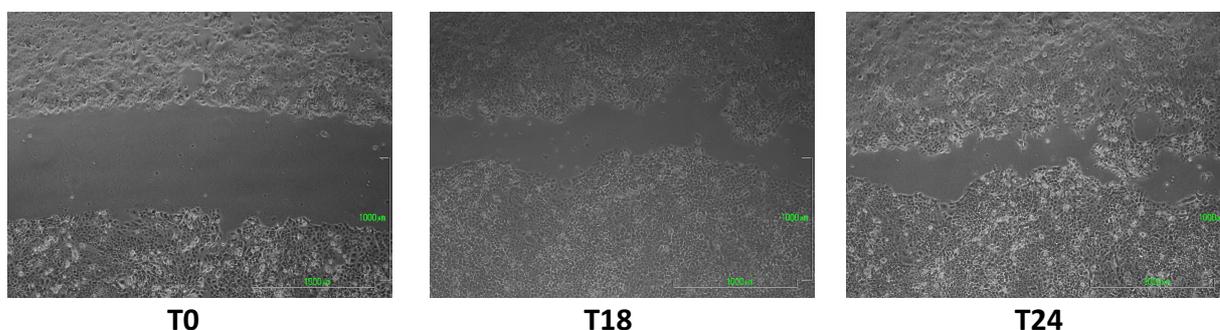
Al combinar cisplatino 8 μM con enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$, se produjo una mayor reducción de la migración celular, con diferencias estadísticamente significativas tanto a las 18 horas ($p=0,003$) como a las 24 horas ($p=0,004$).

Figura 29. Imágenes comparativas del estudio de la migración celular con cisplatino 8 μM (solo o combinado con enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$) a tiempo inicial (T0), pasadas 18 horas (T18) y pasadas 24 horas (T24).

Control



Cisplatino 8 μM



Cisplatino 8 μM + Enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$

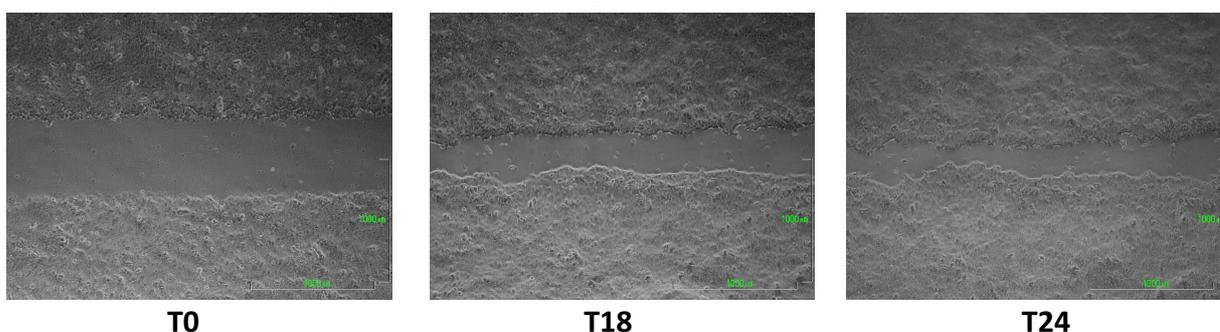
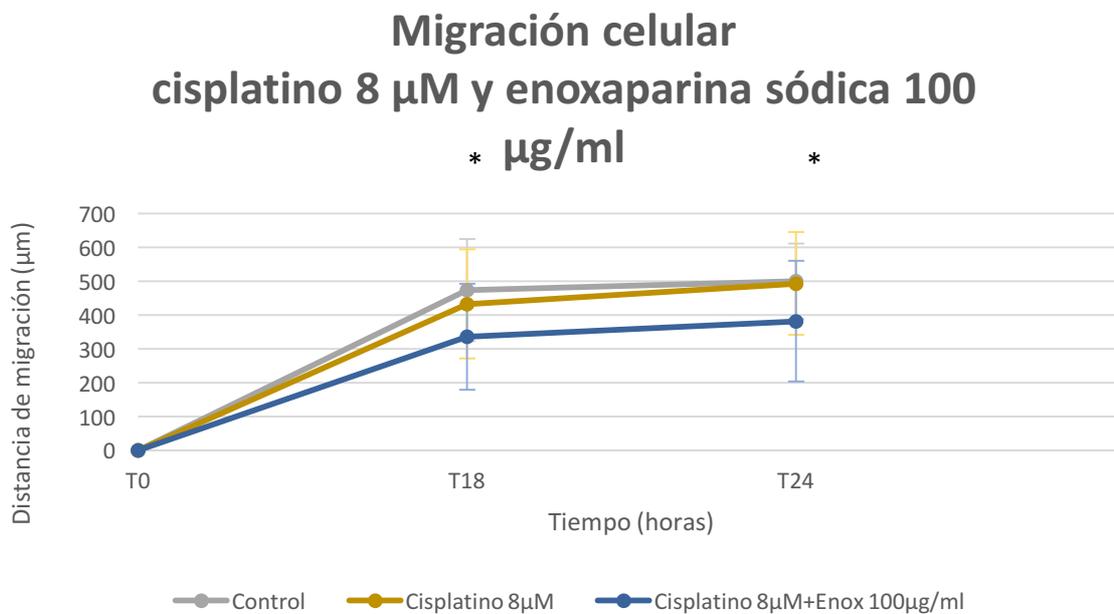


Tabla 16. Valores de la distancia de migración celular (en μm) tras 18 y 24 horas de tratamiento con cisplatino $8\mu\text{M}$ solo o combinado con la enoxaparina sódica $100\mu\text{g/ml}$ (ANOVA).

		Absorbancia (μm)	
		T 18	T 24
Concentración de cisplatino (μM)	8	432,8845 \pm 161,8224	493,3943 \pm 151,9157
Concentración de enoxaparina sódica ($\mu\text{g/ml}$) (tratamiento concomitante con cisplatino $8\mu\text{M}$)	100	336,4226 \pm 156,7214	381,7874 \pm 178,3241
Control		473,7236 \pm 150,8182	500,0302 \pm 111,1531
valor de p		0,003	0,004

Figura 30. Efecto del cisplatino $8\mu\text{M}$ solo o combinado con enoxaparina sódica $100\mu\text{g/ml}$ sobre la migración celular a las 18 y 24 horas de tratamiento.

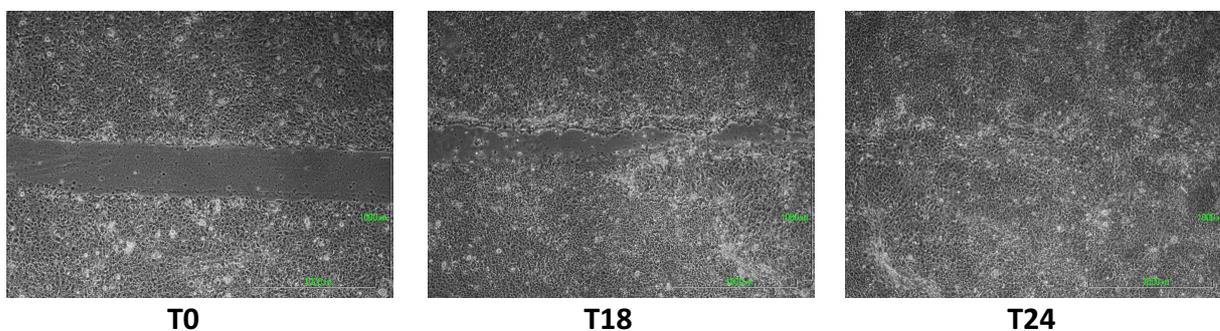


4.3.2. Efecto del cisplatino 10 μM y la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre la migración celular

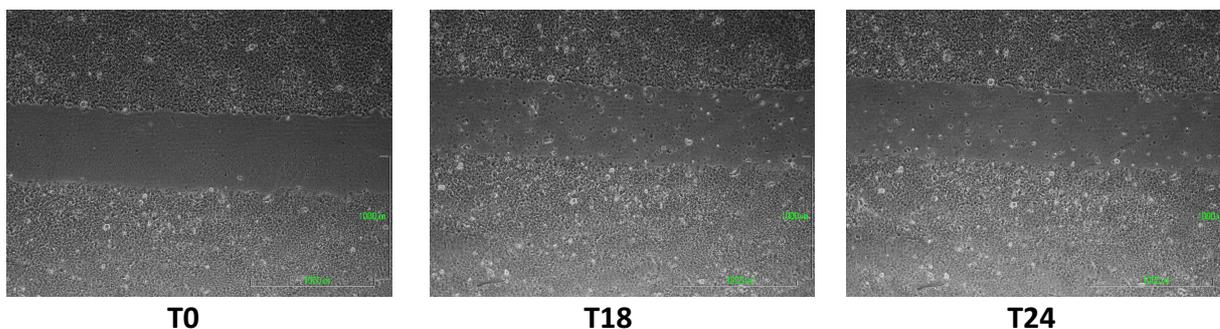
Al combinar cisplatino 10 μM con enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$, se produjo una mayor reducción de la migración celular, aunque sin diferencias estadísticamente significativas a las 18 horas ($p=0,116$) ni a las 24 horas ($p=0,133$).

Figura 31. Imágenes comparativas del estudio de la migración celular con cisplatino 10 μM (solo o combinado con enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$) a tiempo inicial (T0), pasadas 18 horas (T18) y pasadas 24 horas (T24).

Control



Cisplatino 10 μM



Cisplatino 10 μM + Enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$

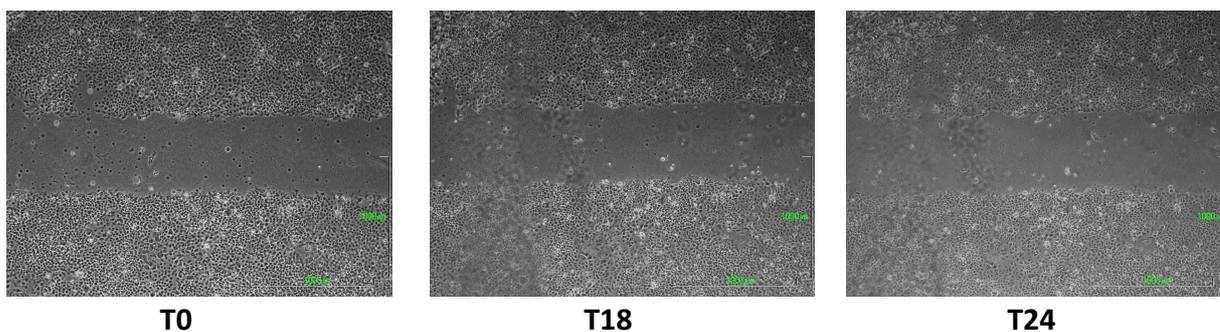
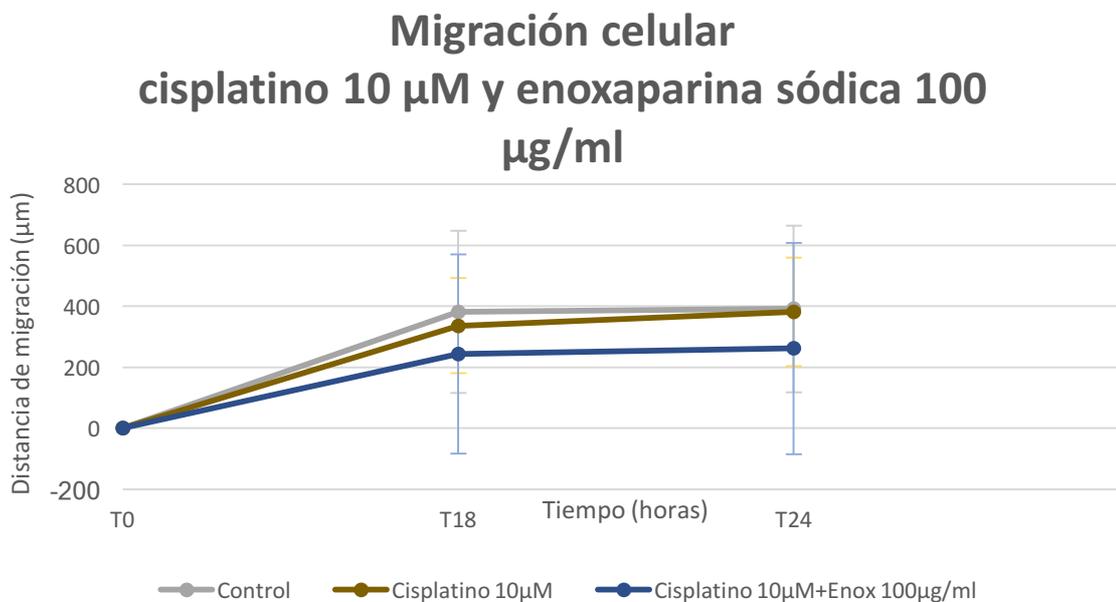


Tabla 17. Valores de la distancia de migración celular (en μm) tras 18 y 24 horas de tratamiento con cisplatino $10\mu\text{M}$ solo o combinado con la enoxaparina sódica $100\mu\text{g/ml}$ (ANOVA).

		Absorbancia (μm)	
		T 18	T 24
Concentración de cisplatino (μM)	10	336,4226 \pm 156,7214	381,7874 \pm 178,3241
Concentración de enoxaparina sódica ($\mu\text{g/ml}$) (tratamiento concomitante con cisplatino $8\mu\text{M}$)	100	243,8583 \pm 326,1738	261,6249 \pm 347,2235
Control		381,9336 \pm 266,3872	391,3375 \pm 274,1567
valor de p		0,116	0,133

Figura 32. Efecto del cisplatino $10\mu\text{M}$ solo o combinado con enoxaparina sódica $100\mu\text{g/ml}$ sobre la migración celular a las 18 y 24 horas de tratamiento.



5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La mayoría de tumores de la cavidad oral, faringe y laringe (>90%) son COCEs. Este tipo de cáncer representa el 6% de todas las neoplasias malignas y, constituye el octavo cáncer por incidencia a nivel mundial (Chi y cols., 2015). La mortalidad asociada al COCE sigue siendo alta a nivel mundial, debido a que la mayoría son diagnosticados en estadíos avanzados, y también debido a los fracasos de los tratamientos, ya sea por recurrencias loco-regionales (15-50%) o por metástasis a distancia (Hyakusoku y cols., 2016; Sakamoto y cols., 2016; Chang y cols., En prensa).

Dependiendo del estado general del paciente, de la etiopatogenia y del estadío de su enfermedad, se valoran diversas opciones de tratamiento. Se contemplan desde la cirugía (con o sin tratamientos coadyuvantes previos o posteriores), la radioterapia, la quimiorradioterapia o las TMD combinadas con otros tratamientos anti-cancerígenos (como por ejemplo, el cetuximab y la radioterapia). De entre todos ellos, la quimiorradioterapia es actualmente el tratamiento de elección para el tratamiento local y/o regional del COCE de cabeza y cuello avanzado (estadíos III-IV) tanto en las guías de prácticas clínicas europeas como estadounidenses, después de la cirugía o cuando no se plantea una solución quirúrgica (Marcu, 2013; Ahn y cols., 2016; Strojan y cols., 2016).

La tasa de supervivencia a los 5 años es de más del 80% de entre los cánceres de cabeza y cuello tratados en estadío precoz. En cambio, cuando la enfermedad se ha diseminado a los ganglios cervicales, este porcentaje se ve reducido al 40%; llegando incluso a menos del 20% de supervivencia a 5 años en las metástasis (Kalavrezos y Bhandari, 2010; Yadav y cols., En prensa). El riesgo de desarrollar una ETV en pacientes con cáncer es de aproximadamente entre 4 hasta 6,5 veces mayor que en pacientes sin enfermedad tumoral. Y, los porcentajes de supervivencia son significativamente menores y con peor pronóstico en aquéllos pacientes que presentan una ETV y la enfermedad de cáncer (Ay y cols., 2017).

La activación de las plaquetas y de los factores de la coagulación en pacientes con cáncer no sólo puede desencadenar complicaciones tromboembólicas, también

puede favorecer el crecimiento del tumor y promover su diseminación (metástasis), debido a que los factores relacionados con el sistema hemostático, regulan también la angiogénesis tumoral (Mousa y cols., 2006). Aunque los mecanismos moleculares relacionados con estas acciones están todavía siendo estudiados, las evidencias actuales indican que las HBPMs son capaces de bloquear receptores de adhesión, inhibir la acción enzimática de la heparanasa (Hostettler y cols., 2007; Ramani y cols., 2013), reducir la actividad de los factores de crecimiento y la angiogénesis (Dogan y cols., 2011; Battinelli y cols., 2014; Djaafar y cols., 2016), y hasta incluso, revertir la resistencia a quimioterápicos (Pfankuchen y cols., 2015). Es muy importante evaluar sus efectos en los diferentes tipos de cáncer, utilizando distintos tipos de HBPMs y, administrarlas a diferentes dosis e intervalos de tratamiento (Zhang y cols., 2016).

En nuestra investigación, se estudió el efecto de una de las HBPMs comúnmente empleadas en la práctica clínica, la **enoxaparina sódica**. Ésta produjo un efecto dosis-dependiente, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes dosis utilizadas. Es más, otros autores como Niu y cols. (Niu y cols., 2012), ni siquiera encontraron un efecto estadísticamente significativo entre el control y el grupo bajo tratamiento con una HBPM sobre una subpoblación de células madre derivadas del adenocarcinoma de pulmón resistente a cisplatino.

Si comparamos los resultados obtenidos en nuestro ensayo de viabilidad celular tras el tratamiento con **cisplatino solo** con los resultados obtenidos por otros autores como Arias y cols. , Ghosh y cols., y Tsai y cols. (Arias y cols., 2010; Tsai y cols., 2012; Ghosh y cols., 2016) sobre otras líneas celulares de COCE, se observa que transcurridas unas 24 horas aproximadamente, y a la concentración de 10 μ M de cisplatino, la reducción de la viabilidad celular se encontraba alrededor del 80-100% respecto al control, al igual que ocurría en nuestro estudio ($80,33\pm 24,92$).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron una tendencia a la disminución de la viabilidad celular de forma concentración-dependiente. Es decir, la tendencia a la disminución de la viabilidad celular era mayor cuanto mayor era también la concentración de cisplatino empleada. Este hecho coincide con lo que revelan otros estudios realizados en otras líneas celulares de COCE. Ghosh y cols. (Ghosh y cols.,

2016) encontraron una disminución de la viabilidad celular que aumentaba con el aumento de la concentración de cisplatino (de 1 a 20 μM). Asimismo, Tsai y cols. (Tsai y cols., 2012) también observaron una disminución concentración-dependiente al cabo de 24 horas de tratamiento con el quimioterápico.

En nuestro estudio, el tratamiento concomitante con **cisplatino y enoxaparina** sódica, ha mostrado un efecto sinérgico de reducción de la viabilidad celular, en la línea celular H357 de COCE estudiada. Dicho efecto se pone de manifiesto tanto en la medición de la viabilidad celular, en la apoptosis, así como en el estudio de la migración celular.

La mayor reducción de la viabilidad celular, se obtuvo a las concentraciones de 8 μM y 10 μM de cisplatino. La viabilidad celular disminuía conforme la concentración de enoxaparina sódica aumentaba (en tratamiento con cisplatino a dosis fija). De este modo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto a las 24, 48 (sólo en el caso del cisplatino 8 μM y enoxaparina sódica) y 72 horas entre el tratamiento combinado y el tratamiento único con cisplatino ($p < 0,001$). De entre todas ellas, el empleo de cisplatino 8 μM ó 10 μM con 100 $\mu\text{g/ml}$ de enoxaparina sódica, mostró los resultados más prometedores en el tratamiento del COCE, alcanzándose la menor viabilidad celular ($34,23 \pm 14,57$) con la concentración de cisplatino (10 μM) y enoxaparina sódica (100 $\mu\text{g/ml}$) más elevadas.

Djaafar y cols. (Djaafar y cols., 2016) observaron que la enoxaparina sódica (200 $\mu\text{g/ml}$) reducía la expresión de un proto-oncogen regulador del ciclo celular, la ciclina D1. Ésta está relacionada con la progresión de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular. Su expresión, generalmente aumentada en la mayoría de tumores, se ve disminuída por acción de la enoxaparina. La viabilidad celular de las células de cáncer de colon empleadas en ese estudio (MCA38) se vio reducida tras la disminución de la expresión de la ciclina D1.

Son diversos los estudios conocidos que subrayan que el cisplatino induce la muerte celular a través del proceso de **apoptosis** (Kelland, 2007; Marcu, 2013; Dasari y Tchounwou, 2014). En nuestro ensayo de apoptosis celular, se produjo mayor

apoptosis con 10 μM que con 8 μM de cisplatino. En esta misma línea, Arias y cols. estudiaron las actividades celulares inducidas por el cisplatino (5, 10, 15, 20, 25 μM), entre ellas, la apoptosis celular sobre la línea celular CAL27 de COCE. Sus resultados indicaron que bajas concentraciones de cisplatino requerían mayor tiempo para inducir apoptosis, produciéndose más rápidamente el proceso cuanto mayor era la concentración (Arias y cols., 2010). Es por tanto evidente que, el tiempo requerido para inducir apoptosis está relacionado de forma significativa, con la concentración de cisplatino empleada. En el estudio de Arias y cols. (Arias y cols., 2010), la apoptosis inducida por 10 μM de cisplatino podía ser detectada tras 20 horas de tratamiento. En nuestro estudio, tras 24 horas de tratamiento con 10 μM de cisplatino, también se podía detectar un mayor índice apoptótico con respecto al control, aunque sin diferencias significativas ($p=0,413$).

Del mismo modo, cuando en nuestro estudio se empleó el cisplatino (8 μM ó 10 μM) y la enoxaparina sódica (100 $\mu\text{g/ml}$), se obtuvo una mayor tasa apoptótica que con el tratamiento con cisplatino solo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas tras 48 horas de tratamiento. Niu y cols. (Niu y cols., 2012) también observaron que la tasa apoptótica en una subpoblación de células madre aisladas del adenocarcinoma de pulmón resistente al cisplatino A549/DDP, era significativamente mayor cuando se trataron con cisplatino y heparina de bajo peso molecular (versus tratamiento con cisplatino solo o células control). Las células madre tumorales, tras su descubrimiento por primera vez en las leucemias, también han sido aisladas en tumores sólidos como el de mama, cerebro, pulmón, hígado, próstata, colon, páncreas y cabeza y cuello (Niu y cols., 2012).

Tonigold y cols. (Tonigold y cols., 2014) entre otros autores, indicaron que células madre de los tumores de cabeza y cuello (además de para otros tipos de cáncer) expresaban altos transportadores de tipo ABC, en concreto el conocido como ABCG2. La presencia de células madre en la línea celular H357 empleada en nuestro estudio es alta (Harper y cols., 2010), lo que inclina a presuponer una alta expresión de transportadores ABCG2 en su membrana. Niu y cols. (Niu y cols., 2012) observaron que tras la incubación de la subpoblación de células madre de A549/DDP resistentes al cisplatino, durante 36 horas con heparina de bajo peso molecular, la expresión de

ABCG2 se veía reducida significativamente. Todo ello indicó que la HBPM, induce la degradación de dicho marcador (sin afectar a nivel del ácido ribonucleico mensajero, ARNm) y es capaz de revertir la resistencia al quimioterápico. Por consiguiente, si la enoxaparina, HBPM empleada en nuestro estudio, sigue estas directrices, la expresión de ABCG2 se vería disminuida. Asimismo, se reducirá el flujo del cisplatino hacia el exterior celular y, por tanto, aumentará la eficacia del quimioterápico (cisplatino), lo cual entraría en concordancia con las mayores tasas de apoptosis obtenidas con nuestros resultados. No obstante, serían necesarios estudios en células no resistentes al cisplatino (como en nuestro caso) que confirmen los resultados obtenidos.

También Pfankuchen y cols. (Pfankuchen y cols., 2015) empleó una heparina de bajo peso molecular, la tinzaparina (25 ó 50 $\mu\text{g/ml}$) previamente al tratamiento con cisplatino (2 μM) sobre la línea celular A2780cis, de cáncer de ovario resistente al cisplatino. La tinzaparina revertía la resistencia al cisplatino, permitiendo su acción. Sin embargo, ésta no presentó ningún efecto sobre la expresión de los marcadores tipo ABC como en el estudio de Niu y cols. (Niu y cols., 2012). En este caso, se determinó que la acción de la tinzaparina estaba mediada por su interacción con las cadenas de PGHS. Además, inhibía la expresión de un gran número de genes relacionados con el cáncer y, elevaba los genes supresores del tumor. Este estudio, aunque no aportaron datos, también fue realizado con la enoxaparina (50 $\mu\text{g/ml}$) donde su eficacia, aunque ligeramente menor por un menor peso molecular, también consiguió sensibilizar a las células a la citotoxicidad inducida por cisplatino.

Con respecto al proceso de **migración celular** en la línea celular H357, nuestros resultados han mostrado que tanto el cisplatino solo (8 μM ó 10 μM), pero sobre todo, combinado con la enoxaparina sódica 100 $\mu\text{g/ml}$, ejerce un potente efecto inhibitor de dicha capacidad de migración celular, significativa a la concentración de 8 μM de cisplatino. La interacción de la enoxaparina con la heparanasa en el comienzo del proceso de metástasis tumoral, parece estar muy relacionado con este fenómeno de disminución de la migración celular. En este paso, las células cancerígenas degradarían la MEC y la membrana basal (incluyendo sus principales componentes, los PGHS) a través de la **heparanasa** y, subsecuentemente, se liberarían citoquinas,

quimioquinas y los factores de crecimiento angiogénicos (VEGF, bFGF), que favorecerían así la angiogénesis, el crecimiento y las metástasis tumorales. Sin embargo, la disminución de la expresión de la heparanasa (sobre-expresada en la mayoría de tumores humanos) por la enoxaparina, reduciría este mecanismo de migración celular. En el estudio de Djaafar y cols. (Djaafar y cols., 2016), el tratamiento de la línea de cáncer de colon MCA38 con 200 µg/ml de enoxaparina, y pasadas 24 horas, redujo significativamente (hasta un 50%) la expresión de la heparanasa (tanto a nivel del ARN como de las proteínas). Este modo de actuación de la enoxaparina sódica a nivel de la MEC, ralentizaría el proceso de invasión del cáncer (relacionado con la acción de la heparanasa) y podría explicar el por qué de los resultados encontrados en nuestro estudio.

En definitiva, el cisplatino y la enoxaparina sódica presentaron un **efecto sinérgico** sobre la viabilidad celular, la apoptosis y la migración celular. Éste se hace más evidente conforme mayor es la concentración de enoxaparina sódica. No obstante, son necesarios más ensayos *in vitro* con el fin de examinar las limitaciones encontradas. Por ello, sería óptimo emplear otras concentraciones de tratamiento, estadios de COCE más avanzados, otras líneas celulares de COCE, o hasta incluso, una línea celular de COCE resistente al cisplatino para conocer si la enoxaparina sódica es realmente capaz de revertir el mecanismo de resistencia tumoral.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El cisplatino y la enoxaparina sódica (de forma independiente) redujeron de forma dosis-dependiente la viabilidad celular en la línea celular H357 de COCE, a las 24, 48 y 72 horas de incubación. La combinación de las concentraciones de enoxaparina sódica de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con cualquiera de las dosis de cisplatino estudiadas (1; 2; 4; 8 y 10 μM) mostraron un efecto sinérgico a las 24, 48 y 72 horas sobre la viabilidad celular del COCE, que fue mayor cuando la concentración de enoxaparina sódica era la máxima (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El mayor descenso de la viabilidad celular fue alcanzado con la concentración de 10 μM de cisplatino junto con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enoxaparina sódica.
2. La combinación de enoxaparina sódica a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostró un efecto sinérgico sobre la apoptosis en la línea celular H357 de COCE al combinarlo con cisplatino, tanto a dosis de 8 como de 10 μM , en todos los tiempos de incubación estudiados (24, 48 y 72 horas).
3. Al combinar una concentración de enoxaparina sódica de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 8 o 10 μM de cisplatino, se observó un efecto reductor de la migración celular en la línea H357 de COCE, tanto a las 18 como a las 24 horas de incubación.

6. CONCLUSIONS

1. Cisplatin and sodium enoxaparin decrease H357 cell line viability in a dose-dependent manner when incubated at 24, 48 and 72 hours. Upon the treatment with increasing concentrations of sodium enoxaparin 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ with any cisplatin (1; 2; 4; 8 y 10 μM) concentrations, it resulted a synergetic effect over cell viability at 24, 48 or 72 hours. The highest synergic effect was exhibited at the maximum sodium enoxaparin concentration (100 $\mu\text{g/mL}$). The least cell viability was reached at higher cisplatin (10 μM) and sodium enoxaparin (100 $\mu\text{g/mL}$) concentrations.
2. Cisplatin-induced apoptosis at 8 μM and 10 μM was strengthened with the 100 $\mu\text{g/mL}$ sodium enoxaparin at the treatment times studied (24, 48 y 72 hours) in the H357 cell line.
3. The H357 cell line migration was reduced by 100 $\mu\text{g/mL}$ sodium enoxaparin and cisplatin (8 or 10 μM) after 18 and 24 hours of incubation time.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Agnelli G, Gussoni G, Bianchini C, Verso M, Mandalà M, Cavanna L, et al. Nadroparin for the prevention of thromboembolic events in ambulatory patients with metastatic or locally advanced solid cancer receiving chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Lancet Oncol* 2009; 10:943-9.

Ahmad S, Ansari AA. Therapeutic roles of heparin anticoagulants in cancer and related disorders. *Med Chem* 2011; 7:504-17.

Ahn MJ, D´Cruz A, Vermorken JB, Chen JP, Chitapanarux I, Dang HQ, et al. Clinical recommendations for defining platinum unsuitable head and neck cancer patient populations on chemoradiotherapy: A literature review. *Oral Oncol* 2016; 53:10-6.

Altinbas M, Coskun HS, Er O, Ozkan M, Eser B, Unal A, et al. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J Thromb Haemost* 2004; 2:1266-71.

Arias LR, Perry CA, Yang L. Real-time electrical impedance detection of cellular activities of oral cancer cells. *Biosens Bioelectron* 2010; 25:2225-31.

Ay C, Ingrid P, Cohen AT. Cancer-associated venous thromboembolism: Burden, mechanisms, and management. *Thromb Haemost* 2017; 117:219-230.

Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer* 2015; 112:580-93.

Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11:1473-91.

Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE Jr. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood* 2014; 123:101-12.

Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol* 2012; 2012:676731.

Brana I, Siu LL. Locally advanced head and neck squamous cell cancer: treatment choice based on risk factors and optimizing drug prescription. *Ann Oncol* 2012; 23:x178-x185.

Chang JH, Wu CC, Yuan KS, Wu ATH, Wu SY. Locoregionally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: incidence, survival, prognostic factors, and treatment outcomes. *Oncotarget* (In press).

Chen WC, Lai CH, Fang CC, Yang YH, Chen PC, Lee CP, et al. Identification of high-risk subgroups of patients with oral cavity cancer in need of postoperative adjuvant radiotherapy or chemo-radiotherapy. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95:e3770.

Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin* 2015; 65:401-21.

Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, et al. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000; 60:6196-200.

Connor J. Alcohol consumption as a cause of cancer. *Addiction* 2016; 112:222-8.

Contaldo M, Di Napoli A, Pannone G, Franco R, Ionna F, Feola A, et al. Prognostic implications of node metastatic features in OSCC: a retrospective study on 121 neck dissections. *Oncol Rep* 2013; 30:2697-704.

D' Mello S, Bavle RM, Paremala K, Makarla S, Sudhakara M, Bhatt M. The synergy of tobacco and alcohol and glutathione S-transferase θ 1 gene deletion and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 2016; 20:348-53.

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740:364-78.

Descamps G, Karaca Y, Lechien JR, Kindt N, Decaestecker C, Remmelink M, et al. Classical risk factors, but not HPV status, predict survival after chemoradiotherapy in advanced head and neck cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142:2185-96.

Djaafar S, Dunand-Sautier I, Gonelle-Gispert C, Lacotte S, De Agostini A, Petro M, et al. Enoxaparin attenuates mouse colon cancer liver metastases by inhibiting heparanase and interferon- γ -inducible chemokines. *Anticancer Res* 2016; 36:4019-32.

Dogan OT, Polat ZA, Karahan O, Epozturk K, Altun A, Akkurt I, et al. Antiangiogenic activities of bemiparin sodium, enoxaparin sodium, nadroparin calcium and tinzaparin sodium. *Thromb Res* 2011; 128:e29-32.

Faden DL, Arron ST, Heaton CM, DeRisi J, South AP, Wang SJ. Targeted next-generation sequencing of TP53 in oral tongue carcinoma from non-smokers. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2016; 45:47.

Falanga A, Vignoli A, Diani E, Marchetti M. Comparative assessment of low-molecular-weight heparins in cancer from the perspective of patient outcomes and survival. *Patient Relat Outcome Meas* 2011; 2:175-88.

Fareed J, Hoppensteadt D, Schultz C, Ma Q, Kujawski MF, Neville B, et al. Biochemical and pharmacologic heterogeneity in low molecular weight heparins. Impact on the therapeutic profile. *Curr Pharm Des* 2004; 10:983-99.

Feinstein AJ, Shay SG, Chang E, Lewis MS, Wang MB. Treatment outcomes in veterans with HPV-positive head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 2017; 38:188-92.

Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001; 63:202-7.

Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol* 2014; 171:5507-3.

Friedl P, Wolf K, Lammerding J. Nuclear mechanism during cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23:55-64.

Friemel J, Foraita R, Günther K, Heibeck M, Günther F, Pflueger M, et al. Pretreatment oral hygiene habits and survival of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients. *BMC Oral Health* 2016; 16:33.

Fritzsche J, Simonis D, Bendas G. Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches. *Thromb Haemost* 2008; 100:1166-75.

Gao H, Prasad GL, Zacharias W. Differential cell-specific cytotoxic responses of oral cavity cells to tobacco preparations. *Toxicol In Vitro* 2013; 27:282-91.

Ghosh RD, Ghuwalewala S, Das P, Mandloi S, Alam SK, Chakraborty J, et al. MicroRNA profiling of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines enriched with cancer-stem-cell-like and epithelial-mesenchymal transition-type features. *Sci Rep* 2016; 6:23932.

Gong W, Xiao Y, Wei Z, Yuan Y, Qiu M, Sun C, et al. Toward the use of precision medicine for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8:2141-2152.

Gout S, Tremblay PL, Hout J. Selectins and selectin ligands in extravasion of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:335-44.

Grègoire V, Lefebvre JL, Licitra L, Felip E, EHNS-ESMO-ESTRO Guidelines Working Group. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21:v184-6.

Guidry JT, Scott RS. The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus Res* 2017; 231:139-147.

Harper LJ, Costea DE, Gammon L, Fazil B, Biddle A, Mackenzie IC. Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance. *BMC Cancer* 2010; 10:166.

Hasegawa T, Yanamoto S, Otsuru M, Yamada SI, Minamikawa T, Shigeta T, et al. Retrospective study of treatment outcomes after postoperative chemoradiotherapy in Japanese oral squamous cell carcinoma patients with risk factors of recurrence. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2017; 123:524-30.

Hettiarachchi RJ, Smorenburg SM, Ginsberg J, Levine M, Prins MH, Büller HR. Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread. *Thromb Haemost* 1999; 82:947-52.

Heyman B, Yang Y. Mechanism of heparanase inhibitors in cancer therapy. *Exp Hematol* 2016; 44:1002-12.

Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Tojyo I, Matsumoto T, Kiga N, et al. EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Pathol Oncol Res* 2008; 14:39-43.

Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 2001; 119:64S-94S.

Holohand C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:714-26.

Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodaysky I, et al. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J* 2007; 21:3562-72.

Huang M, Shen A, Ding J, Geng M. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35:41-50.

Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:e233-40.

Hyakusoku H, Sano D, Takahashi H, Hatano T, Isono Y, Shimada S, Ito Y, Myers JN, Oridate N. JunB promotes cell invasion, migration and distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35:6.

Icli F, Akbulut H, Utkan G, Yalcin B, Dincol D, Isikdogan A, et al. Low molecular weight heparin (LMWH) increases the efficacy of cisplatin plus gemcitabine combination in advanced pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 2007; 95:507-12.

Jiang WG, Sanders AJ, Kato M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol* 2015; 35:S244-75.

Kakkar A, Hedges R, Williamson R, Kakkar V. Perioperative heparin-therapy inhibits late death from metastatic cancer. *Int J Oncol* 1995; 6:885-8.

Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, Lemoine NR, Low V, Patel HK, et al. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol* 2004; 22:1944-8.

Kalavrezos N, Bhandari R. Current trends and future perspectives in the surgical management of oral cancer. *Oral Oncol* 2010; 46:429-32.

Kang MH, Kang JH, Song H-N, Jeong BK, Chai GY, Kang K, et al. Concurrent Chemoradiation with Low-Dose Weekly Cisplatin in Locally Advanced Stage IV Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res Treat* 2015; 47:441-7.

Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478:23-43.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:573-84.

Khawar IA, Kim JH, Kuh H-J. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *J Control Release* 2015; 201:78-89.

Khorana AA, Carrier M, Garcia DA, Lee AY. Guidance of the prevention and treatment of cancer-associated venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2016; 41:81-91.

Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Fisher RI, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism in hospitalized neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:484-90.

Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Lyman GH. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* 2005; 104:2822-9.

Klerk CP, Smorenburg SM, Otten HM, Lensing AW, Prins MH, Piovella F, et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* 2005; 23:2130-5.

Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönross L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol* 2007; 43:181-6.

Lachenmeier DW, Gumbel-Mako S, Sohnius EV, Keck-Wilhelm A, Kratz E, Mildau G. Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: a risk factor for oral cancer. *Int J Cancer* 2009; 125:730-5.

Langevin SM, McClean MD, Michaud DS, Eliot M, Nelson HH, Kelsey KT. Occupational dust exposure and head and neck squamous cell carcinoma risk in a population-based case-control study conducted in the greater Boston area. *Cancer Med* 2013; 2:978-86.

Läubli H, Stevenson JL, Varki A, Varki NM, Borsig L. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res* 2006; 66:1536-42.

Lazo-Langner A, Goss GD, Spaans JN, Rodger MA. The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost* 2007; 5:729-37.

Lebeau B, Chastang C, Brechot JM, Capron F, Dautzenberg B, Delaisements c, et al. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules" Group. *Cancer* 1994; 74:38-45.

Lecumberri R, López Vivanco G, Font A, González Billalabeitia E, Gúrpide A, Gómez Codina J, et al. Adjuvant therapy with bemiparin in patients with limited-stage small cell lung cancer: results from the ABEL study. *Thromb Res* 2013; 132:666-70.

Lee DY, Kim SK, Kim YS, Son DY, Nam JH, Kim IS. Suppression of angiogenesis and tumor growth by orally active deoxycholic acid-heparin conjugate. *J Control Release* 2007; 118:310-7.

Li ZH, Zheng R, Chen JT, Jia J, Qiu M. The role of copper transporter ATP7A in platinum-resistance of esophageal squamous cell cancer (ESCC). *J Cancer* 2016; 7:2085-92.

Luryi AL, Chen MM, Mehra S, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Treatment Factors Associated With Survival in Early-Stage Oral Cavity Cancer: Analysis of 6830 Cases From the National Cancer Data Base. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 141:593-8.

López-Lázaro M. A local mechanism by which alcohol consumption causes cancer. *Oral Oncol* 2016; 62:149-52.

Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor. *J Pathol* 2006; 208:327-39.

Ma J, Liu Y, Huang XL, Zhang ZY, Myers JN, Neskey DM, et al. Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis. *Oral Oncol* 2012; 48:1076-84.

- Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, Pienkowski P, Pazdrowski J, Luczewski L, et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol* 2014; 48:1-10.
- Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int* 2013; 2013:319489.
- Mandalà M, Falanga A, Roila F. Management of venous thromboembolism (VTE) in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2011; 22:vi85-92.
- Marcu LG. Improving therapeutic ratio in head and neck cancer with adjuvant and cisplatin-based treatments. *Biomed Res Int* 2013; 2013:817279.
- Martens-de Kemp SR, Dalm SU, Wijnolts FM, Brink A, Honeywell RJ, Peters GJ, et al. DNA-bound platinum is the major determinant of cisplatin sensitivity in head and neck squamous carcinoma cells. *PLoS One* 2013; 8:e61555.
- Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2016; 91:386-96.
- Mitrovska S, Jovanova S. Low-molecular weight heparin enoxaparin in the treatment of acute coronary syndromes without ST segment elevation. *Bratisl Lek Listy* 2009; 110:45-8.
- Montiel M, Urso L, Pérez de la Blanca E, Marsigliante S, Jiménez E. Cisplatin reduces endothelial cell migration via regulation of type 2-matrix metalloproteinase activity. *Cell Physiol Biochem* 2009; 23:441-8.
- Mousa SA, Linhardt R, Francis JL, Amirkhosravi A. Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. *Thromb Haemost* 2006; 96:816-21.
- Nadir Y, Brenner B. Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb Res* 2014; 133:s90-4.

Ng JH, Gopalakrishna Iyer N, Tan M-H, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck* 2017; 39:297-304.

Niu Q, Wang W, Li Y, Ruden DM, Wang F, Li Y, et al. Low molecular weight heparin ablates lung cancer cisplatin-resistance by inducing proteasome-mediated ABCG2 protein degradation. *PLoS One* 2012; 7:e41035.

Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, Da Silva VH, Hossaka TA, Oshima CT, et al. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics* 2012; 9:329-35.

Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2014; 19:423-30.

Osman N, Elamin YY, Rafee S, O'Brien C, Stassen LF, Timon C, et al. Weekly cisplatin concurrently with radiotherapy in head and neck squamous cell cancer: a retrospective analysis of a tertiary institute experience. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014; 271:2253-9.

Park K, Lee GY, Kim Y-S, Yu M, Park R-W, Kim I-S, et al. Heparin-deoxycholic acid chemical conjugate as an anticancer drug carrier and its antitumor activity. *J Control Release* 2006; 114:300-6.

Park K, Lee GY, Park RW, Kim IS, Kim SY, Byun Y. Combination therapy of heparin-deoxycholic acid conjugate and doxorubicin against squamous cell carcinoma and B16F10 melanoma. *Pharm Res* 2008; 25:268-76.

Pelzer U, Optiz B, Deutschinoff G, Stauch M, Reitzig PC, Hanhfeld S, et al. Efficacy of prophylactic low-molecular weight heparin for ambulatory patients with advanced pancreatic cancer: outcomes from the CONKO-004 trial. *J Clin Oncol* 2015; 33:2028-34.

Petrelli F, Coinu A, Riboldi V, Borgonovo K, Ghilardi M, Cabiddu M, et al. Concomitant platinum-based chemotherapy or cetuximab with radiotherapy for locally advanced

head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of published studies. *Oral Oncol* 2014; 50:1041-8.

Pfankuchen DB, Stölting DP, Schlesinger M, Royer H-D, Bendas G. Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2015; 97:147-57.

Posch F, Königsbrügge O, Zielinski C, Pabinger I, Ay C. Treatment of venous thromboembolism in patients with cancer: A network meta-analysis comparing efficacy and safety of anticoagulants. *Thromb Res* 2015; 136:582–89.

Price PM, Yu F, Kaldis P, Aleem E, Nowak G, Safirstein RL, et al. Dependence of cisplatin-induced cell death in vitro and in vivo on cyclin-dependent kinase 2. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:2434-42.

Ramani VC, Purushothaman A, Stewart MD, Thompson CA, Vlodaysky I, Au JL, et al. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *FEBS J* 2013; 280:2294-306.

Ravikumar R, Lim CS, Davies AH. The role of new anticoagulants (NOACs) in cancer patients. *Adv Exp Med Biol* 2017; 906:137-48.

Reidy J, McHugh E, Stassen LFA. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon* 2011; 9:278-83.

Rickles FR, Levine M, Edwards RL. Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:237-48.

Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett* 2014; 8:7-11.

Sakamoto Y, Matsushita Y, Yamada S, Yanamoto S, Shiraishi T, Asahina I, et al. Risk factors of distant metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016; 121:474-80.

Sano D, Oridate N. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2016; 21:819-26.

Scocciati C, Cecchini M, Anderson AS, Berrino F, Boutron-Ruault M-C, Espina C, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Alcohol drinking and cancer. *Cancer Epidemiol* 2016; 45:181-188.

Scocciati C, Straif K, Romieu I. Recent evidence on alcohol and cancer epidemiology. *Future Oncol* 2013; 9:1315-22.

Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin* 2017; 67:51-64.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22:7265-79.

Sinha DN, Abdulkader RS, Gupta PC. Smokeless tobacco-associated cancers: A systematic review and meta-analysis of Indian studies. *Int J Cancer* 2015; 138:1368-79.

Soria JM, López S. The genetics of thrombosis in cancer. *Med Clin (Barc)* 2015; 1:26-30.

Spiotto MT, Jefferson G, Wenig B, Markiewicz M, Weichselbaum RR, Koshy M. Differences in Survival With Surgery and Postoperative Radiotherapy Compared With Definitive Chemoradiotherapy for Oral Cavity Cancer: A National Cancer Database Analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* (In press).

Strojan P, Vermorken JB, Beitler J, Saba NF, Haigentz M Jr, Bossi P, et al. Cumulative cisplatin dose in concurrent chemoradiotherapy for head and neck cancer: A systematic review. *Head Neck* 2016; 38:E2151-8.

Solbin LH, Hermanek P, Hutter RV. TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new (1987) and the old editions. *Cancer* 1988; 61:2310-4.

Sun S, Cai J, Yang Q, Zhao S, Wang Z. The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: a meta-analysis of literatures and datasets. *Oncotarget* 2017; 8:16036-51.

Sun CC, Qu XJ, Gao ZH. Integrins: players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2014; 25:1107-21.

Tangthongkum M, Kirtsreesakul V, Supanimitjaroenporn P, Leelasawatsuk P. Treatment outcome of advance staged oral cavity cancer: concurrent chemoradiotherapy compared with primary surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (In Press).

Tonigold M, Rossmann A, Meinold M, Bette M, Märken M, Henkenius K, et al. A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53(mut) exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; 140:1689-704.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65:87-108.

Tsai L-L, Yu C-C, Lo J-F, Sung W-W, Lee H, Chen S-L, et al. Enhanced cisplatin resistance in oral-cancer stem-like cells is correlated with upregulation of excision-repair cross-complementation group 1. *Journal of Dental Sciences* 2012; 7:111-7.

Tsan DL, Lin CY, Kang CJ, Huang SF, Fan KH, Liao CT, et al. The comparison between weekly and three-weekly cisplatin delivered concurrently with radiotherapy for patients with postoperative high-risk squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Radiat Oncol* 2012; 7:215.

Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147:275-92.

Villain P, Gonzalez P, Almonte M, Franceschi S, Dillner J, Anttila A, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Infections and Cancer. *Cancer Epidemiol* 2015; 39:S120-38.

Vlodavsky I, Singh P, Boyango I, Gutter-Kapon L, Elkin M, Sanderson RD, et al. Heparanase: From basic research to therapeutic applications in cancer and inflammation. *Drug Resist Updat* 2016; 29: 54-75.

Walsh JE, Lathers DM, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MR. Mechanism of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2007; 8:227-38.

Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol* 2005; 41:244-60.

Weaver A, Fleming SM, Smith DB. Mouthwash and oral cancer: carcinogen or coincidence? *J Oral Surg* 1979; 37:250-3.

Whitmore SE, Lamont RJ. Oral bacteria and cancer. *Plos Pathog* 2014:e1003933.

Xu J, Huang H, Pan C, Zhang B, Liu X, Zhang L. Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36:739-44.

Yadav A, Kumar B, Teknos TN, Kumar P. Bazedoxifene enhances the anti-tumor effects of cisplatin and radiation treatment by blocking IL-6 signaling in head and neck cancer. *Oncotarget* (In Press).

Yu V, Rahimy M, Korrapati A, Xuan Y, Zou AE, Krishnan AR, et al. Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines. *Oral Oncol* 2016; 52:58-65.

Zhang N, Lou W, Ji F, Qiu L, Tsang BK, Di W. Low molecular weight heparin and cancer survival: clinical trials and experimental mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142:1807-16.

Zhang Y, Wang R, Miao L, Zhu L, Jiang H, Yuan H. Different levels in alcohol and tobacco consumption in head and neck cancer patients from 1957 to 2013. PLoS One 2015; 10:e0124045.

Zhong LP, Zhang CP, Ren GX, Guo W, William WN Jr, Hong CS, et al. Long-term results of a randomized phase III trial of TPF induction chemotherapy followed by surgery and radiation in locally advanced oral squamous cell carcinoma. Oncotarget 2015; 6:18707-14.