

Tesis doctoral

---

Departament de Cirurgia

Expresión de prostaciclina sintetasa  
en los carcinomas de cabeza  
y cuello y valor pronóstico  
en la respuesta a radioterapia

---

Zenaida Piñeiro Agúin

Xavier León Vintró  
Luís Vila Navarro  
Mercedes Camacho Pérez de Madrid  
Director

“E somentes preservando as nosas enerxías  
autóctonas, a nosa capacidade creadora,  
é como poderemos contribuir á civilización universal  
incorporando a ela as nosas creacións inéditas”

A.D. R. Castelao  
*Sempre en Galiza*

“Ni el más sabio conoce el final de todos los caminos”

J. R. R. Tolkien  
*El Señor de los Anillos*

## Agradecimientos

En primer lugar debo agradecer este trabajo a mis tres directores de tesis sin los cuales este trabajo nunca existiría:

A Luís Vila Navarro por confiar en mí para realizar este trabajo, por tu entusiasmo y amor a la bioquímica más allá de cualquier proyecto. Gracias por trasmitirme el tesón y la pasión por la investigación.

A Xavier León Vintró por ser mi referente en la Otorrinolaringología, por su innegable visión investigadora e inteligencia que supo compartir conmigo, no sólo en la elaboración de esta tesis, sino también a lo largo de los años de residencia.

A Mercedes Camacho Pérez de Madrid, la mujer investigadora. La clarividencia, la pragmática visión de la ciencia y tu paciencia, para ayudarme y explicarme los experimentos desde el principio, han sido cruciales en este camino.

Mis agradecimientos infinitos a Sonia Alcolea por todo su trabajo estos años, eres genial; a Laura, a Rosa, Marta y en general al Laboratorio de Angiología, Biología vascular e Inflamación del Institut de Recerca Biomèdica de Sant Pau. Gracias por vuestra paciencia, por tener siempre una sonrisa y tiempo para mí.

Al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. En especial a mis adjuntos durante la residencia. Al Profesor Quer, para mí es un honor haber aprendido a su lado. Gracias César Orús, te admiro. También gracias a mis hermanos mayores de la Otorrinolaringología: Julia de Juan y Jacinto García. Gracias Albert Pujol y Nacho Viza por vuestra amistad y apoyo todos estos años, os quiero.

Al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Espèrit Sant. Gracias Santi, Cristina y Nuria.

A mis amigos, de cerca y lejos, que siempre estáis, no sé cómo cuando me hacéis falta. Gracias Ana y Susana por vuestra amistad infinita en Compostela, Oviedo, Barcelona y donde estemos. Gracias Roberto por todo el apoyo y tus buenos consejos.

Finalmente tengo que agradecer a mi familia, en especial a mis padres y mi hermano Paio, todo su amor y apoyo incondicional, por estar ahí a todas horas y en todo lugar. Y sobre todo por enseñarme sus valores, creer en mí, animarme e incentivarme a realizar el doctorado. La familia no se elige, pero a mí me ha tocado la mejor. Gracias a mi abuelo Antonio Aguín Mascato, siento que tú no estés, siempre has estado orgulloso de mí.

## **Informe de los directores de tesis**

Barcelona, 9 de Febrero del 2015

Xavier León Vintro, consultor Sénior del Servicio de Otorrinolaringología y Patología cervicofacial del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y Profesor titular de Otorrinolaringología de la UAB, Luís Vila Navarro Investigador principal del Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau y Mercedes Camacho Pérez de Madrid Investigadora principal de Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau;

Certifican:

Que la Tesis doctoral

### **Expresión de Prostaciclina Sintetasa en los Carcinomas de Cabeza y Cuello y Valor Pronóstico en la Respuesta a Radioterapia**

presentada por Zenaida Piñeiro Aguín para optar al título de Doctor de la Universidad Autónoma de Barcelona se ha realizado bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos necesarios para ser defendida delante del Tribunal de evaluación correspondiente.

Xavier León Vintro

Luís Vila Navarro

Mercedes Camacho Pérez de Madrid

## Índice

Agradecimientos .....	5
Informe de los directores de Tesis .....	7
Abreviaturas / Apócrifos .....	10
<b>1. Introducción .....</b>	<b>11</b>
1. El Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello.....	13
2. Las Prostaglandinas y su uso en Medicina .....	14
2.1. Papel de los Prostanoides en clínica .....	15
3. Las prostaglandinas en el Cáncer de cabeza y cuello .....	17
4. La Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> ).....	20
5. Papel de la PGI <sub>2</sub> y la PGIS en el proceso de carcinogénesis .....	21
<b>2. Justificación y Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Material y Métodos.....</b>	<b>31</b>
1. Pacientes .....	33
1.1. Características y tratamiento .....	33
1.2. Obtención del secretoma de muestras de mucosa sana adyacente y muestras de tumor .....	34
2. Cultivos celulares .....	35
2.1. Cultivo de células tumorales y obtención del medio condicionado .....	35
2.2. Cultivo de células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC) .....	35
2.3. Cultivo de fibroblastos térmicos humanos .....	36
3. Análisis de expresión del RNAm .....	37
4. Análisis de la expresión proteica .....	37
4.1. Solubilización .....	37
4.2. Electroforesis y transferencia .....	37
5. Determinación de los metabolitos del ácido araquidónico .....	38
6. Determinación de los niveles de PGI <sub>2</sub> .....	38
7. Citometría de flujo .....	38
7.1. Ciclo celular .....	38
7.2. Apoptosis .....	38

8. Ensayos funcionales .....	38
8.1. Ensayo de Angiogénesis <i>in vitro</i> .....	38
8.2. Ensayo de invasión .....	39
8.3. Ensayo de proliferación celular .....	40
9. Inmunohistoquímica .....	40
10. Análisis estadístico .....	41
<b>4. Resultados .....</b>	<b>43</b>
1. La vía de biosíntesis de PGI <sub>2</sub> se encuentra disminuída en los CECC en relación a la mucosa sana .....	45
2. Los niveles de mRNA de PGIS se correlacionan con la respuesta al tratamiento con radioterapia o quimiorradioterapia en los pacientes con CECC .....	46
3. Las células tumorales cooperan con las células del parénquima tisular en la biosíntesis de PGI <sub>2</sub> .....	49
4. Efecto de la PGI <sub>2</sub> en la capacidad de migración de las células de CECC.....	53
5. La PGI <sub>2</sub> no influye en la progresión del ciclo celular en células con CECC.....	53
6. La PGI <sub>2</sub> no modifica la apoptosis celular en las líneas de CECC .....	54
7. La PGI <sub>2</sub> no modifica la radiosensibilidad <i>in vitro</i> de las células tumorales de CECC.....	55
8. La PGI <sub>2</sub> promueve <i>in vitro</i> la angiogénesis .....	56
9. La PGI <sub>2</sub> promueve la angiogénesis a través de la activación del receptor EP-4 .....	57
10. La PGI <sub>2</sub> modifica la capacidad de las células tumorales de inducir angiogénesis <i>in vitro</i> .....	58
11. La expresión de PGIS en las muestras de CECC se correlaciona con la vascularización .....	59
12. La expresión de PGIS en las muestras de CECC se correlaciona con la expresión de CXCL12 (SDF-1) y de CXCR4 ..	61
<b>5. Discusión .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>75</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>79</b>
<b>8. Anexo .....</b>	<b>89</b>

# Introducción

## Abreviaturas / Apócrifos

**AAc:** Ácido Araquidónico.

**AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos.

**$\beta$ actina:** Beta actina.

**CECC:** Carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

**COX-2:** Cicloxigenasa 2

**COX -1:** Cicloxigenasa 1

**CAL27:** Línea celular de Carcinoma escamoso de lengua.

**cPGI2:** Carbaprostaciclina – Análogo estable de la Prostaciclina.

**CXCR4:** C-X-C chemokine receptor type 4

**DMEM:** Medio de cultivo esencial mínimo modificado

**FaDu (HTB43):** Línea celular de carcinoma escamoso de hipofaringe

**Gy:** Gray- Unidad de medida de radiación.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography)

**HPV:** Virus del Papiloma Humano (Human papiloma virus)

**HUVEC:** Células endoteliales de vena umbilical humana. (Human umbilical vein endotelial cell)

**IL-8:** Interleuquina 8

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.

**PGD2:** Prostaglandina D 2.

**PGF 2 $\alpha$ :** Prostaglandina F 2 alfa.

**PGIS:** Prostaglandina I sintetasa.

**PGI2:** Prostaglandina I2 – Prostaciclina.

PGH2: Prostaglandina H2.

**PPAR:** Receptor nuclear de peroxisoma activado proliferativo.(Peroxisomal-proliferator-activated receptor)

**PPAR $\delta$ :** peroxisomal proliferator activated factor delta.

**RNA:** Ácido Ribonucleico.

**SCC-9:** Squamous cell carcinoma -9 (Línea celular de carcinoma escamoso de lengua)

**SCC-25:** Squamous cell carcinoma -25 (Línea celular de carcinoma escamoso de lengua)

**SDF-1:** Stromal derived factor-1

**TGF $\beta$ :** Transforming growth factor beta.

**TX:** Tromboxano.

**TXA2:** Tromboxano A2.

**TXAS:** Tromboxano A sintetasa.

**VEGF:** Vascular endotelial growth factor.

**vWF:** Factor de von Willebrand.

**6-oxo-PGF1 $\beta$ :** 6 oxo prostaglandina F1 alfa.

## Introducción

### 1. El carcinoma escamoso de cabeza y cuello<sup>1</sup>.

Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) son un grupo de tumores malignos localizados en senos paranasales, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe, cavidad oral, y glándulas salivares. Se excluyen de la clasificación los tumores de la piel, los cerebrales y los tiroideos. Dentro de los tumores de cabeza y cuello el tipo histológico más frecuente es el carcinoma escamoso.

Según las áreas geográficas existe una frecuencia e incidencia diversas. El estado español ocupa una de las regiones del mundo con una incidencia más elevada de carcinomas escamosos de cabeza y cuello. El año 2002 se diagnosticaron en España un total de 11.513 nuevos pacientes con CECC, de los cuales 10.154 fueron diagnosticados en hombres (88,2%), y 1.359 en mujeres (11,8%)<sup>1</sup>. De acuerdo con las previsiones del programa EUROCARE-4, la incidencia estimada para España correspondiente al año 2015 es de 16.298 nuevos casos de CECC, 14.483 en hombres, y 1.815 en mujeres<sup>2</sup>. Estos datos sitúan a los CECC como el séptimo tumor en incidencia en nuestro país, y señalan la importancia epidemiológica y de salud pública que corresponde a este tipo de tumores.

La etiología clásica de estos tumores se ha asociado con factores ambientales como el consumo de tabaco y de alcohol. Durante la última década ha cobrado interés la observación de una asociación entre los carcinomas escamosos y la infección por el virus del papiloma humano (HPV), fundamentalmente HPV 16 y HPV18, en particular en los tumores de orofaringe y cavidad oral<sup>3</sup>.

La cirugía y la radioterapia constituyen el tratamiento habitual de los CECC en estadio inicial. El tratamiento de los tumores con estadios avanzados consiste en la exéresis quirúrgica asociada a un tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia postoperatoria, o bien un tratamiento exclusivo con quimioradioterapia en aquellos pacientes que, dada la extensión de la enfermedad o el intento de preservación funcional, no se consideran candidatos a un tratamiento quirúrgico.

## 2. Las prostaglandinas y su uso en Medicina.

La historia de los eicosanoides se inició con estudios realizados a principios del siglo XX<sup>4</sup>. El descubrimiento de las prostaglandinas se realizó en los años 30 cuando dos ginecólogos americanos, Kurzrok y Lieb, observaron que tiras de tejido uterino humano se contraían cuando eran expuestas al semen humano. Unos años más tarde Goldblat y von Euler de forma independiente descubrieron que la fracción lipídica del líquido seminal provocaba la contracción del músculo liso, y al inyectarla a animales de experimentación producía un descenso de la presión sanguínea. Von Euler sugirió el nombre de prostaglandina (PG) para este material. Posteriormente, el año 1964 Bergström y Sjoval aislaron la PGE<sub>2</sub>, sintetizada a partir de ácido araquidónico marcado radioactivamente usando homogeneizados de vesículas seminales de carnero, con lo cual establecieron la relación entre este ácido graso y las PGs. El año 1973, Moncada, Piper y Vane identificaron dos endoperóxidos cíclicos estables, PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>. En 1975, fue descubierto el Tromboxano A<sub>2</sub> y en 1976 se descubrió la prostaciclina o PGI<sub>2</sub><sup>4</sup>. Gracias a estos trabajos, Vane, Bergström y Samuelson recibieron el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1982<sup>5</sup>.

El término **eicosanoide** comprende un grupo de moléculas biológicamente activas de carácter lipídico producidas por la oxigenación de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono. El conjunto de los eicosanoides está constituido por los prostanoides (prostaglandinas y tromboxanos), los leucotrienos y otros derivados oxigenados, y son producidos inicialmente por tres clases de enzimas, las ciclooxigenasas (COX1 y COX2), lipoxigenasas y citocromo P450 monooxigenasas. La importancia de este grupo de mediadores lipídicos se debe al hecho de que están implicados en un amplio rango de procesos biológicos entre los cuales ellos las reacciones inflamatorias, la proliferación celular y el cáncer<sup>6</sup>.

De entre los eicosanoides, los más estudiados y que presentan mayor actividad biológica son los derivados del ácido araquidónico. El ácido araquidónico (AA) es el ácido graso más abundante en los mamíferos. Es un ácido graso no esencial. En parte es ingerido con la dieta, pero el organismo puede sintetizarlo por desaturación y elongación del ácido graso esencial ácido linoleico<sup>6</sup>.

El AA se encuentra esterificado en los fosfolípidos de las membranas celulares. La síntesis de prostanoides se inicia por la acción de las fosfolipasas, que liberan el AA de los fosfolípidos. El AA liberado es transformado por acción de la prostaglandina endoperóxido sintetasa o ciclooxigenasa (COX) en una reacción en dos pasos. La primera etapa de la reacción en la que se añaden dos moléculas de O<sub>2</sub> molecular está catalizada por la actividad ciclooxigenasa y se forma prostaglandina G (PGG) muy inestable y de vida corta. En el segundo paso, catalizado por la actividad

peroxidasa, se rompe el grupo hidroperóxido liberando un oxígeno, formándose la PGH<sub>2</sub>, el precursor común de todos los prostanoides derivados del AA<sup>6</sup>.

Existen dos isoformas de COX, codificados por genes distintos, la COX-1 que se expresa constitutivamente y juega un importante papel en la regulación de funciones fisiológicas como la agregación plaquetaria y la función renal, y la COX-2 cuya expresión es inducida en respuesta a mitógenos, factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias o promotores tumorales, y a la que se ha atribuido un papel en procesos patológicos como la inflamación o el cáncer<sup>7</sup>.

La PGH<sub>2</sub> es metabolizada por la acción de distintas sintetetas dando lugar a todas las prostaglandinas y tromboxanos (TX). Cada tipo celular sintetizará un tipo de prostanoides mayoritario en función de la sinteteta que exprese. Por ejemplo, las plaquetas expresan la tromboxano A sinteteta (TXAS) y producen TXA<sub>2</sub>, en tanto que o las células endoteliales expresan la PGI sinteteta (PGIS) y producen PGI<sub>2</sub><sup>6</sup>.

Los prostanoides son sustancias de vida media corta, y producen sus efectos mediante la unión a receptores celulares específicos que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Además, el PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), miembro de la superfamilia de receptores nucleares, se ha identificado como receptor de prostanoides aunque no tan específico como los anteriores. La especificidad de los eicosanoides depende de la presencia y distribución de los receptores en los diferentes tipos celulares<sup>8</sup>.

La denominación de los receptores se basa en el ligando que se une al receptor: IP une la PGI, TP une el TXA, DP une la PGD, etc. Los receptores de la PGE<sub>2</sub> constituyen una familia de receptores que consta del EP1, EP2, EP3 y EP4. Todos ellos responden a la PGE<sub>2</sub> pero difieren en sus acciones y en la respuesta a los diferentes análogos de la PGE<sub>2</sub>. Además, aunque cada PG se une con mayor afinidad a su receptor, existe una considerable unión de las PGs a otros receptores de la familia<sup>6</sup>.

Con muy escasas excepciones, de las cuales la más importante es la de los eritrocitos, todas las células del organismo son capaces de producir eicosanoides. De hecho, no existen órganos que no sean afectados de una u otra forma por estos compuestos. Los eicosanoides, además de funcionar como segundos mensajeros, tienen un papel relevante en la "sintonía fina" de la transducción de señal intra e intercelular, ya sea modulando a otros segundos mensajeros o siendo diana para la acción de éstos<sup>9</sup>.

### 2.1 Papel de los prostanoides en la clínica.

El papel de los prostanoides en la clínica puede dividirse en dos grandes áreas: una en la que se obtienen efectos terapéuticos por medio de la inhibición de su



síntesis, y otra en la que las acciones son ejercidas directamente por prostanoideos o sus análogos.

En el primer caso, es interesante destacar que el miembro más antiguo del grupo de sustancias que inhiben la producción de prostanoideos es una de los fármacos más utilizado, la aspirina. Usada durante décadas como tratamiento de la artritis antes del descubrimiento de su mecanismo de acción, la aspirina ejerce su efecto por la inhibición de la COX y por lo tanto de la síntesis de prostanoideos, siendo este el principal mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Los efectos más conocidos del bloqueo de la producción de prostanoideos son el antiinflamatorio, el antipirético y el analgésico, debido a que las PGs, y especialmente la  $E_2$ , son importantes mediadores de los procesos responsables de inflamación, fiebre y dolor.

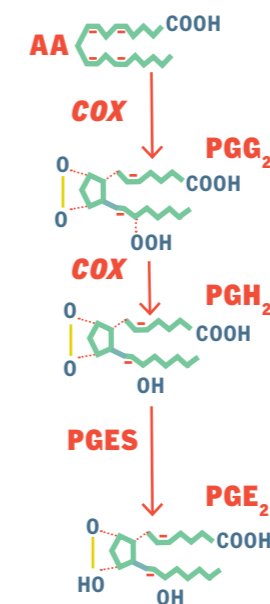
Los AINEs son utilizados para la reducción del dolor e inflamación. Sin embargo, la utilización crónica de AINEs causa serios efectos secundarios en el tracto digestivo, como la aparición de dispepsia y de úlceras gástricas, debido a que las PGs cumplen un papel fundamental en la protección de la mucosa gástrica. Con el descubrimiento de la COX2, se pensó que los efectos antiinflamatorios de los AINEs eran debidos a la inhibición de la COX-2, inducida en los sitios de inflamación, mientras que los efectos secundarios se debían a la inhibición de la COX-1 constitutiva, encargada del mantenimiento de la homeostasis y gastroprotección. Esta idea llevó a las industrias farmacéuticas a invertir un gran esfuerzo en el diseño e fármacos COX-2 selectivos, con el objetivo de lograr una similar eficacia y una mayor seguridad en comparación con los AINEs tradicionales, no selectivos.

Sin embargo, investigaciones posteriores han demostrado que la COX-2 también se expresa constitutivamente en varios territorios, como la mácula densa renal y el cerebro, e interviene en la producción de PGs con funciones fisiológicas importantes. En los vasos sanguíneos la COX-2 sería la principal responsable de la producción de  $PGI_2$  vasodilatadora y antiagregante<sup>10</sup>. La producción de  $PGI_2$  aumenta como respuesta al incremento de la síntesis plaquetaria de  $TXA_2$ , vasoconstrictor y proagregante, por acción de la COX-1 a partir de la interacción entre las plaquetas y la pared vascular. Las consecuencias clínicas de la inhibición de la síntesis de  $PGI_2$  sin una inhibición concomitante de la producción de  $TXA_2$  no están aún dilucidadas, pero constituyen una posible causa de efectos secundarios asociados a los inhibidores selectivos de la COX-2 a nivel cardiovascular. Estos compuestos se utilizan actualmente con buenos resultados en artritis reumatoide, osteoartritis y dolor agudo<sup>11</sup>.

Por otra parte, existen evidencias epidemiológicas que señalan que un uso continuado de inhibidores de COX disminuye la incidencia de aparición de tumores malignos. En estos momentos se están realizando numerosos estudios para determinar la eficacia de los inhibidores de la COX, en particular los selectivos COX-2, en la prevención y tratamiento de diversos cánceres, en particular el de colon<sup>12</sup>.

### 3. Las prostaglandinas en el cáncer de cabeza y cuello.

Se han detectado niveles elevados de PGs en carcinomas de diferentes localizaciones, incluyendo los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC)<sup>13</sup>. La  $PGE_2$  está implicada en los fenómenos de carcinogénesis y desarrollo del tumor estimulando su crecimiento a partir de la inducción de diferentes factores de crecimiento<sup>14</sup>, inhibiendo la apoptosis<sup>15</sup>, promoviendo la angiogénesis<sup>16</sup>, alterando los mecanismos inmunitarios con capacidad de contrarrestar al tumor<sup>17</sup>, o modulando la capacidad invasiva de las células tumorales y su potencialidad metastásica<sup>18</sup>.



Los enzimas que catalizan la conversión de  $PGH_2$  a  $PGE_2$  son las PGE-sintetasas (PGES). Hasta el momento se han identificado tres proteínas con actividad PGES: dos asociadas a membrana, PGES microsomal (mPGES-1 y mPGES-2); y una citosólica cPGES. Los efectos biológicos de la  $PGE_2$  se ejercen a través de una familia

## INTRODUCCIÓN

de receptores específicos designados como EP1, EP2, EP3 y EP4, que se acoplan a diferentes vías de señalización intracelular.

Existen evidencias de que el incremento de la presencia de PGE<sub>2</sub> en los CECC está asociado con la sobre-expresión de la COX-2<sup>19</sup>, y de que esta sobre-expresión es un acontecimiento precoz en el proceso de la carcinogénesis, apareciendo en las lesiones pre-neoplásicas<sup>20,21</sup>. Los niveles de sobre-expresión de la COX-2 parecen contar con una capacidad pronóstica. Ha sido descrita una asociación entre la resistencia al tratamiento con radioterapia y la sobre-expresión de la COX-2 en pacientes con carcinomas escamosos localizados en la cavidad oral<sup>22</sup>, o la laringe<sup>23</sup>. En un estudio de radiobiología, Terakado y cols<sup>22</sup> describieron la existencia de una correlación significativa entre el nivel de expresión de la COX-2 y la resistencia de líneas celulares de carcinoma a la radioterapia. Por otra parte, estudios in vitro han demostrado la capacidad de los inhibidores selectivos de la COX-2 de potenciar la actividad de la radioterapia<sup>22</sup>. Finalmente, existen evidencias en modelos experimentales de que el tratamiento con inhibidores selectivos de la COX-2 es efectivo en prevenir los fenómenos de carcinogénesis y reducir la progresión tumoral<sup>24,25</sup>.

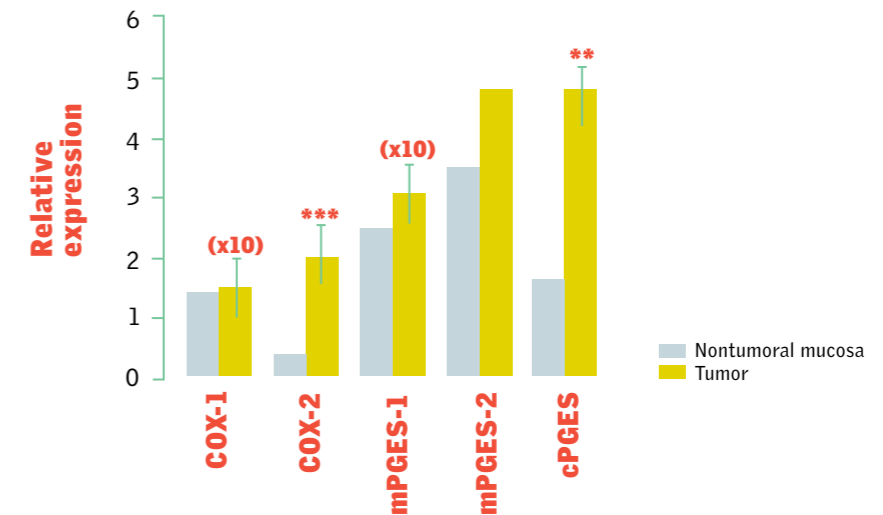
En contraposición al elevado nivel de conocimiento del que se dispone en relación con la expresión de los isoenzimas de la COX en diferentes modelos de tumor, incluyendo los CECC, existen pocos estudios que evalúen el siguiente paso enzimático en la biosíntesis de PGs que implica a las PG sintetasas específicas. Estudios in vitro con líneas celulares de adenocarcinoma de colon han demostrado que la mPGES-1, en concierto con la COX-2, se asocia con la transformación celular y la progresión tumoral<sup>26</sup>.

Se dispone de pocos datos en relación al posible papel de las PGESs en los CECC. En un análisis mediante “immunoblotting”, Cohen y cols<sup>27</sup> encontraron que la mPGES-1 estaba sobreexpresada en un 79% de los CECC en comparación con la mucosa adyacente no tumoral. Por inmunohistoquímica se observó que la mPGES-1 era indetectable en el tejido no tumoral, mientras que las células tumorales contaban con una tinción citoplasmática granular. Por su parte, Kawata y cols<sup>28</sup> encontraron inmunorreactividad citoplasmática mPGES-1 en el 92% de 24 muestras de carcinoma de laringe, especialmente en el área perinuclear. Estos hallazgos han llevado a postular a la mPGES-1 como una posible diana terapéutica en el tratamiento de estos tumores. Se ha descrito un incremento de la actividad de la mPGE-2 en el adenocarcinoma colorectal<sup>29</sup>, si bien en nuestro conocimiento no existen trabajos que describan la actividad de este enzima en los CECC.

En un estudio desarrollado en nuestro laboratorio, Camacho y cols<sup>30</sup> evaluaron la expresión de la totalidad de los componentes de la vía metabólica de

## INTRODUCCIÓN

la PGE<sub>2</sub> en una cohorte de muestras de CECC y de mucosa sana. Se pudo determinar un incremento significativo en las muestras de tumor de la expresión de los genes responsables de la codificación de COX-2 y de las cPGES, en tanto que no aparecieron diferencias significativas en la expresión del COX-1 o las mPGES en relación a las muestras de mucosa sana.

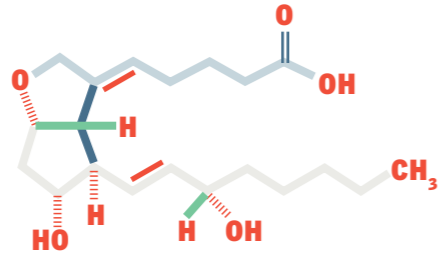


Además, mediante estudios experimentales in vitro, pudo determinarse como el origen más importante de PGE<sub>2</sub> a nivel del tumor no dependía de forma directa de las células tumorales, sino de interacción de las mismas con elementos del microambiente tumoral como son los fibroblastos activados<sup>31</sup>. El incremento en la producción de PGE<sub>2</sub> a nivel del tumor fue responsable de un incremento en la angiogénesis, la proliferación y capacidad de migración de las células tumorales, siendo todos estos efectos sensibles a la inhibición de las PG.

A diferencia del elevado conocimiento del que se dispone de la vía de la síntesis de PGE<sub>2</sub> y su efecto en los CECC, son muy escasos los datos existentes en relación al resto de vías metabólicas de las PG, incluyendo la PGI<sub>2</sub>.

#### 4. La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>).

La PGI<sub>2</sub> o prostaciclina es una PG sintetizada mayoritariamente a nivel del endotelio por la acción de una sintetasa específica, la PGIS, sobre la PGH<sub>2</sub>. Junto con la PGH<sub>2</sub> y el TXA<sub>2</sub> son los prostanoides más relevantes implicados en la biología vascular<sup>32,33</sup>.



La prostaciclina es un potente vasodilatador e inhibe la agregación plaquetar y la proliferación de las células musculares lisas. En general contrarresta los efectos del TXA<sub>2</sub>. Parece que la homeostasis a nivel vascular depende más de la relación PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>, que de la cantidad absoluta de estos mediadores. La prostaciclina es muy inestable y es rápidamente inactivada no enzimáticamente por una reacción de hidrólisis a 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>.<sup>34,35</sup>

La PGI<sub>2</sub> actúa mayoritariamente mediante la unión a un receptor de membrana acoplado a una proteína-G específica (IP), pero también puede interactuar con los receptores nucleares PPARs.

La activación del IP por la PGI<sub>2</sub> produce un incremento de AMPc vía estimulación de una adenil-ciclase. El AMPc a su vez activa la cascada de la proteína quinasa A, o la movilización de calcio vía activación de la fosfolipasa C<sup>36</sup>.

Los PPARs pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas. Consta de tres isoformas: PPARα, PPARγ, y PPARδ, los cuales se unen a secuencias específicas de ADN formando heterodímeros con el receptor X del ácido retinoico (RXR) regulando la transcripción de determinados genes. Existen trabajos que demuestran que la PGI<sub>2</sub> y agonistas estables de la PGI<sub>2</sub> inducen la unión al ADN y la activación de la transcripción vía PPARβ/δ<sup>37</sup>, pero también se ha observado que la PGI<sub>2</sub> puede activar los receptores PPARα y PPARγ<sup>38,39</sup>.

La síntesis de la PGI<sub>2</sub> depende de la actividad de su sintetasa específica, la PGIS. La PGIS es un citocromo P450 de unos 500 aminoácidos con una masa aproximada de 52 kDa. Fue purificada por primera vez a partir de la aorta bovina a finales de los 1980<sup>40,41</sup>.

La PGIS se localiza con la COX en la membrana del retículo endoplásmico y en la membrana nuclear. La expresión de este enzima es particularmente abundante a nivel de las células endoteliales, apareciendo también expresada en las células musculares lisas y en células no vasculares como las neuronas<sup>42,43</sup>.

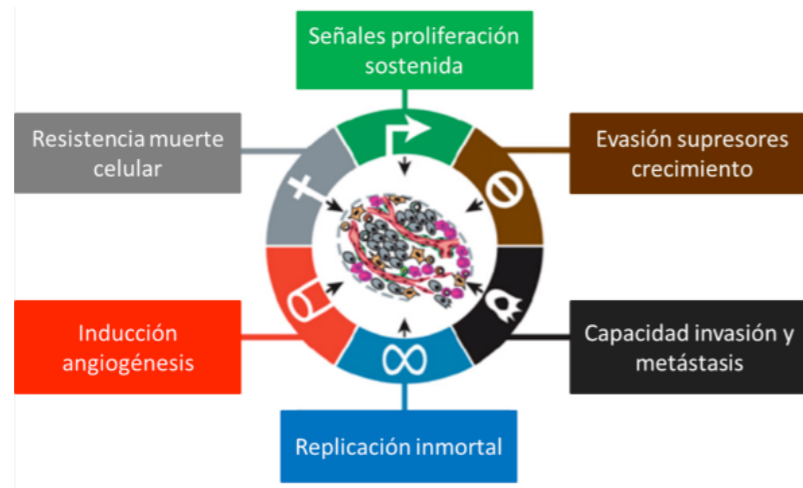


#### 5. Papel de la PGI<sub>2</sub> y la PGIS en el proceso de la carcinogénesis.

Hanahan y cols<sup>44</sup> han demostrado la existencia de una serie de capacidades biológicas adquiridas por parte de las células tumorales durante el proceso de carcinogénesis que permiten al tumor el desarrollo de su comportamiento agresivo. Estas capacidades incluyen la presencia de señales de proliferación celular sostenida, la evasión de mecanismos de supresión del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad, la inducción de angiogénesis, y la capacidad de invasión y metástasis.

Durante las últimas décadas se han añadido dos nuevas capacidades: la reprogramación metabólica y la posibilidad de evadir la acción del sistema inmune.

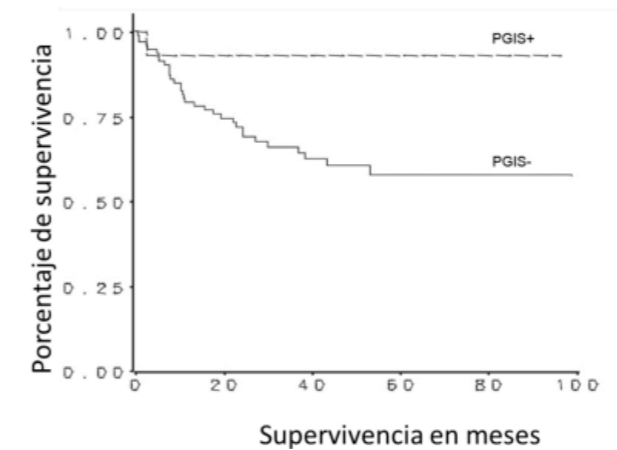
Se ha demostrado en diferentes modelos de tumor que la expresión de la PGIS y del producto de su actividad enzimática, la PGI<sub>2</sub>, intervienen en la regulación de algunas de estas capacidades que definen el proceso de malignización tumoral.<sup>45,46,47</sup> Así mismo, existen diversos trabajos que estudian el rol de PGIS en el cáncer en general<sup>47</sup> y en los tumores de pulmón de diversas estirpes en particular<sup>45,48,49,50,51</sup>. Wang y cols<sup>46</sup> incluso estudian el posible beneficio de administrar prostaciclina como suplemento a la quimioterapia convencional en el cáncer de pulmón.



Se ha descrito una disminución drástica de la expresión de la PGIS en muestras de carcinomas pulmonares no microcíticos respecto a muestras de tejido pulmonar normal<sup>52</sup>. En pacientes con carcinomas pulmonares, Stearman y cols encontraron una relación significativa entre la expresión de la PGIS y el control de la enfermedad<sup>53</sup>. Los pacientes con tumores con expresión elevada de PGIS tenían un porcentaje de supervivencia superior. La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia correspondientes a una cohorte de pacientes con adenocarcinomas pulmonares en función de la expresión inmunohistoquímica de la PGIS.

En un modelo experimental de cáncer de colon, la expresión de la PGIS y PGI<sub>2</sub> se correlacionó con una capacidad antitumoral, en tanto que la TXS y el TXA<sub>2</sub> favorecieron la proliferación de las células tumorales<sup>54</sup>.

En otro modelo experimental de carcinogénesis inducida por la exposición al tabaco se observó como la sobreexpresión de la PGIS previno el desarrollo de carcinomas pulmonares<sup>55</sup>. Además, en un ensayo clínico fase II, Keith y cols demostraron como el tratamiento con Iloprost, un análogo oral de la PGI<sub>2</sub>, conseguía una mejoría significativa en la displasia endobronquial en los pacientes exfumadores, postulándose como un posible tratamiento de quimio prevención del carcinoma pulmonar en este grupo de pacientes<sup>56</sup>.



En un modelo murino de carcinoma pulmonar, Nemenoff y cols<sup>57</sup> encontraron que la PGI<sub>2</sub> contaba con la capacidad de disminuir la incidencia de aparición de tumores, y que esta capacidad de protección frente al desarrollo tumoral no dependía de la activación de los receptores IP, sino de la activación por parte de la PGI<sub>2</sub> de los PPAR $\gamma$ .

La activación por parte de la PGI<sub>2</sub> o sus análogos de los PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$  cuenta con la capacidad de inhibir la proliferación celular en modelos in vitro de carcinomas pulmonares<sup>58,59</sup>, y la activación de PPAR $\delta$  por la PGI<sub>2</sub> induce apoptosis<sup>60</sup>.

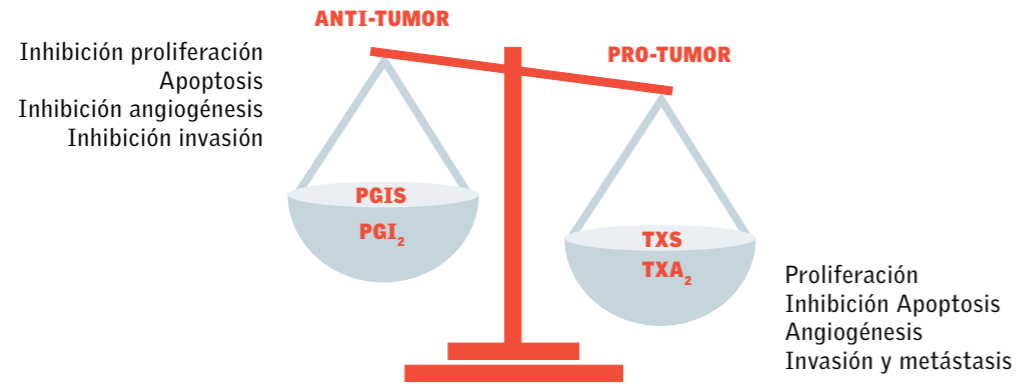
La angiogénesis es el proceso de generación de nuevos capilares a partir de los vasos pre-existentes. Se trata de un proceso imprescindible en la progresión de los tumores. En estudios realizados en células epiteliales intestinales, se ha podido comprobar como la PGI<sub>2</sub> induce la expresión del VEGF<sup>61,10</sup>, y como esta actividad pro-angiogénica se ejerce mediante la activación de los PPAR $\delta$ <sup>62,63</sup>.

Por otra parte, en estudios de diseminación realizados en modelos murinos, se ha podido establecer un papel inhibitor de la PGI<sub>2</sub> en relación a aparición de metástasis pulmonares<sup>64</sup> o el crecimiento de micrometástasis<sup>65</sup>.

En una revisión sobre la actividad PGIS y TXAS en los tumores, Cathart y cols<sup>66</sup> plantearon la hipótesis de que el desarrollo y la progresión tumorales

## INTRODUCCIÓN

pueden estar modulados por el balance de la expresión y actividad PGIS/TXS y de los prostanooides sintetizados. Se ha observado que la PGIS posee actividad anti-tumoral en una variedad de modelos tumorales, mientras que la de la TXS sería fundamentalmente pro-tumoral<sup>67,68,69</sup>.



## Justificación y objetivos

## Justificación y objetivos

### Justificación

En diferentes tipos de tumor como de pulmón o colon se ha comprobado que la PGI<sub>2</sub> contaría con un efecto antitumoral. No existen sin embargo estudios que hayan analizado el papel de la PGI<sub>2</sub> en los tumores malignos de cabeza y no existen sin embargo estudios que hayan analizado el papel de la PGI<sub>2</sub> en los tumores malignos de cabeza y cuello.

### Objetivos

El objetivo global del presente trabajo de investigación es estudiar el papel de la PGIS y de la PGI<sub>2</sub> en los tumores de cabeza y cuello.

Como objetivos concretos nos planteamos:

1. Comparar los niveles de expresión de la vía de síntesis de PGI<sub>2</sub> en tejido tumoral y mucosa sana.
2. Estudiar la relación entre la expresión a nivel translacional de la PGIS y el control de la enfermedad en pacientes con CECC tratados con radioterapia o quimioradioterapia.
3. Analizar los tipos celulares responsables de la síntesis de PGI<sub>2</sub> a nivel tumoral.
4. Evaluar la existencia de interacciones entre las células tumorales y las células del microambiente tumoral en relación a la síntesis de PGI<sub>2</sub>.
5. Valorar in vitro la capacidad de la PGI<sub>2</sub> de modificar el comportamiento celular y la sensibilidad a la radioterapia en líneas celulares de CECC.
6. Estudiar la influencia sobre la angiogénesis de la PGI<sub>2</sub> en el contexto del ambiente tumoral.
7. Valorar la relación entre los niveles de expresión de la PGIS y la densidad vascular en los CECC.

## **Material y métodos**

## Material y métodos

### 1. Pacientes.

#### 1.1. Características y tratamiento

Los datos clínicos utilizados en el presente estudio se obtuvieron de una base de datos oncológica que incluye información epidemiológica, terapéutica y de seguimiento de la totalidad de pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello diagnosticados y tratados en el Hospital de Sant Pau desde 1985<sup>70</sup>.

Las biopsias fueron obtenidas de 98 pacientes con diagnóstico CECC confirmado histológicamente. Cuando fue posible, se obtuvo una muestra de mucosa sana, biopsiada a más de 5 cm del tumor (n=72), o una muestra de mucosa adyacente al margen de resección tumoral (n=20). Todos los pacientes fueron diagnosticados y tratados en nuestro centro durante el periodo de tiempo comprendido entre los años 2004 y 2008. Los pacientes fueron valorados por un Comité Oncológico, que propuso el tratamiento de acuerdo con las guías clínicas de nuestro centro.

El tratamiento consistió en la administración de radioterapia a dosis de 70-74 Gy sobre la localización primaria del tumor y las áreas ganglionares en los casos N+, y 50 Gy sobre las áreas ganglionares en riesgo en los casos N0 (con la excepción de los pacientes con carcinomas de localización glótica T1N0, que no recibieron tratamiento electivo a nivel regional). El tratamiento fue administrado mediante radioterapia continua, 5 días a la semana a dosis de 2 Gy por sesión en el caso de los pacientes que siguieron un tratamiento con normofraccionamiento, y 1.2 Gy dos veces al día en los casos de hiperfraccionamiento. Los pacientes tratados con quimioradioterapia recibieron 3 ciclos de cisplatino 100 mg/m<sup>2</sup> los días 1, 21 y 43, o carboplatino semanal a dosis de 1.5 AUC.

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de nuestro centro, y se desarrolló de acuerdo a las normas señaladas en la Declaración de Helsinki.

La siguiente tabla muestra las características de los pacientes incluidos en el presente estudio.



Características de los pacientes incluidos en el estudio

Características	Nº (%)	
Edad media (rango)	62.4 (38.2-92.3)	
Sexo	Masculino	88 (89.8)
	Femenino	10 (10.2)
Localización Tumor	Cavidad Oral - Orofaringe	48 (49.0)
	Laringe - Hipofaringe	50 (51.0)
Categoría T	T1-2	51 (52.0)
	T3-4	47 (48.0)
Categoría N	N0	53 (54.1)
	N+	45 (45.9)
Diferenciación Tumoral	Buena	5 (5.1)
	Moderada	82 (83.7)
	Pobre	11 (12.2)
Tratamiento	Radioterapia	50 (51.0)
	Quimio-radioterapia	48 (49.0)
Protocolo Radiación	Normofraccionada	68 (79.6)
	Hiperfraccionada	20 (20.4)

### 1.2. Obtención del secretoma de muestras de mucosa sana adyacente y muestras de tumor.

Para este experimento se utilizaron 20 muestras pareadas de tejido tumoral y mucosa sana adyacente. Fragmentos de tejido de 100-200 mg se incubaron en 0.5 ml de DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) sin suero durante 48 horas en la estufa de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se almacenó a -80°C hasta el análisis de la PGI<sub>2</sub> por EIA.

## 2. Cultivos celulares

### 2.1.- Cultivo de células tumorales y obtención del medio condicionado.

En este trabajo se utilizaron 4 líneas celulares tumorales:

- FaDu (HTB43): Línea celular de células de carcinoma escamoso de faringe.
- SCC-25: Línea celular de carcinoma escamoso de lengua.
- SCC9: Línea celular de carcinoma escamoso de lengua.
- CAL-27: Línea celular de carcinoma de cavidad oral.

Estas líneas celulares se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection).

Las células fueron cultivadas para su crecimiento en DMEM 10% de suero bovino fetal (SBF) y suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Biological Industries)

Obtención de medio condicionado de FaDu<sup>71</sup>: cuando el cultivo alcanzó la confluencia se reemplazó el medio con medio fresco conteniendo un 1% de SBF. Tras 48 horas, el medio condicionado fue recogido y centrifugado, y se almacenó a -80°C hasta su uso para la estimulación de las células endoteliales.

### 2.2.- Cultivo de células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC)

Las células endoteliales se aislaron de la vena de cordón umbilical mediante digestión con colagenasa<sup>72</sup>. La vena del cordón se canuló por un extremo, se introdujo una solución de colagenasa al 0.08% (Roche) y se incubó 10-15 minutos a 37°C. Se recuperaron las células endoteliales y se procedió al cultivo primario. La suspensión celular se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos. El botón celular se suspendió en medio de crecimiento (medio base M-199 conteniendo L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, penicilina/estreptomina (100 u/100 µg)/ml, FBS 20 %, heparina a 10 U/ml y ECGF 30 µg/mL) y se sembró en frascos de cultivo previamente acondicionados con gelatina al 1%. Las células se mantuvieron rutinariamente con medio de crecimiento que se cambió cada 48 horas. Cuando el cultivo alcanzó la confluencia se incubó con tripsina-EDTA (tripsina 0.25% y EDTA al 0.025%) hasta que se desprendieron las células. Los experimentos se realizaron con células en primer pase. Las células endoteliales se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio M199 con un 20% de SBF sin heparina ni factor de crecimiento durante las 48h previas. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio por DMEM conteniendo 1% de SBF (control) o medio condicionado obtenido de las células FaDu, y se incubaron durante 24 horas. El medio y el extracto celular se congelaron a -80°C hasta su análisis.

### **2.3. Cultivo de fibroblastos dérmicos humanos**

Los fibroblastos dérmicos se aislaron y se cultivaron de acuerdo con la metodología descrita previamente<sup>31, 73</sup>. Las muestras se obtuvieron a partir de operaciones de cirugía plástica de mama y abdomen. Se cortó la piel en fragmentos de 0.5-1 cm que se incubaron a 37°C durante 1.5 horas en una solución de tripsina al 0.5%. Se separó la dermis de la epidermis con pinzas estériles y se fue depositando en un tubo con medio de cultivo. El medio se filtró por gasa estéril y los fragmentos de dermis retenidos en la gasa se recogieron y se incubaron con colagenasa a la concentración de 0.5 mg/ml preparada en medio DMEM con 10% de SBF durante 24 h en la estufa de cultivos (37°C y 5% CO<sub>2</sub>). Finalizada la incubación se filtró por gasa estéril y el medio filtrado se centrifugó a 250 x g 10 min. El botón celular se suspendió en medio DMEM con 10% de SBF y se sembró para obtener los cultivos primarios.

Células en pase 3-4 se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron en DMEM con 10% de SBF. Cuando alcanzaron la confluencia, se sustituyó el medio por DMEM 1% de SBF (control) o medio condicionado de las células tumorales, y se incubaron durante 24 horas. El medio y el extracto celular se congelaron a -80°C hasta su análisis.

### **3. Análisis de expresión del RNAM.**

Inmediatamente tras la obtención de la biopsia, una parte del tejido se estabilizó mediante inclusión en RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Los tejidos fueron homogeneizados en 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La extracción del RNA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las células en cultivo el RNA total se extrajo usando Ultraspec (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg de RNA con el kit "High-Capacity cDNA Archive Kit" con hexámeros aleatorios (Applied Biosystems, Foster City, CA). La expresión de mRNA se estudió mediante PCR a tiempo real en un ABI Prism 7900HT utilizando ensayos prediseñados validados (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) y parámetros de amplificación universales. La expresión relativa de cada transcrito se expresó como el cociente de transcrito del gen/ transcrito β-actina.

### **4. Análisis de la expresión proteica.**

La expresión de proteína se analizó mediante Western-blot

#### **4.1. Solubilización.**

Las muestras de tejido se lavaron dos veces con tampón fosfato (PBS) y se solubilizaron con tampón de solubilización (20 mM Tris-HCl a pH 7.4) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 1mM EDTA y 0,1% TritonX-100. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, se lavaron con PBS y se solubilizaron con tampón de solubilización. El solubilizado se traspasó a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12000 x g a 4°C durante 10 minutos. Del sobrenadante se valoró la cantidad de proteína por el método de Bradford, y se realizaron alícuotas de las muestras con la cantidad de proteína deseada (25 µg). Tras añadir 10 µl de tampón, las muestras se hirvieron 3 minutos y se congelaron a -80°C hasta el momento de realizar la electroforesis.

#### **4.2.- Electroforesis y transferencia.**

La electroforesis se realizó utilizando el aparato Mini Protean II (Bio-Rad) en geles de SDS-poliacrilamida según el método de Laemmli. Tras la migración se realizó la transferencia de las proteínas a un papel de difluorido de polivinilideno PVDF (Immobilon-P; Milipore Iberica, Spain) utilizando un aparato de transferencia electroforética semiseca (Bio-Rad). Una vez realizada la transferencia se bloquearon los sitios de unión libres del papel incubándolo durante una hora y media en una solución de leche en polvo al 5%. A continuación el papel se incubó a 4°C durante la noche con el anticuerpo específico, diluido en TBS conteniendo 1% de leche en polvo. Tras lavar con TBS conteniendo el 0.1% de Tween-20, se incubó durante 1.5 horas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Se reveló utilizando el sistema de revelado quimioluminiscente ECL de Amersham siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes de los westerns se captaron con un Kodak Image Station 4000MM Pro y se analizaron con el programa Kodak Molecular Imaging Software, v 4.5. Los resultados se normalizaron utilizando como control la β-actina (Sigma)

## 5. Determinación del perfil de los metabolitos del ácido araquidónico.

Las células endoteliales, los fibroblastos y las diferentes líneas celulares tumorales (FaDu, Cal-27, SCC-9 y SCC-25) sembradas en placas de 6 pocillos, fueron incubadas con [14C]-AAc a la concentración final de 25  $\mu$ M durante 10 minutos. La reacción se paró añadiendo MeOH frío<sup>74</sup>. Posteriormente se analizaron los diferentes prostanoides derivados del ácido araquidónico con HPLC en fase inversa<sup>73</sup>.

## 6. Determinación de los niveles de PGI<sub>2</sub>

La 6-oxo-PGF1 $\alpha$ , metabolito estable de la PGI<sub>2</sub> se analizó mediante un inmuno-ensayo enzimático específico (EIA, Cayman) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 7. Citometría de flujo

### 7.1. Ciclo celular

La distribución del ciclo celular se analizó por citometría de flujo. Después del tratamiento, las células se fijaron en etanol frío al 70% y se almacenaron a -20°C durante 18 horas. Las células se tiñeron con ioduro de propidio (propidium iodide/ Rnase staining buffer, BD Biosciences, San Diego, CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se procesaron con un citómetro de flujo FACS Calibur (Beckton Dickinson) y se analizaron con el software Cell Quest Pro.

### 7.2.- Apoptosis

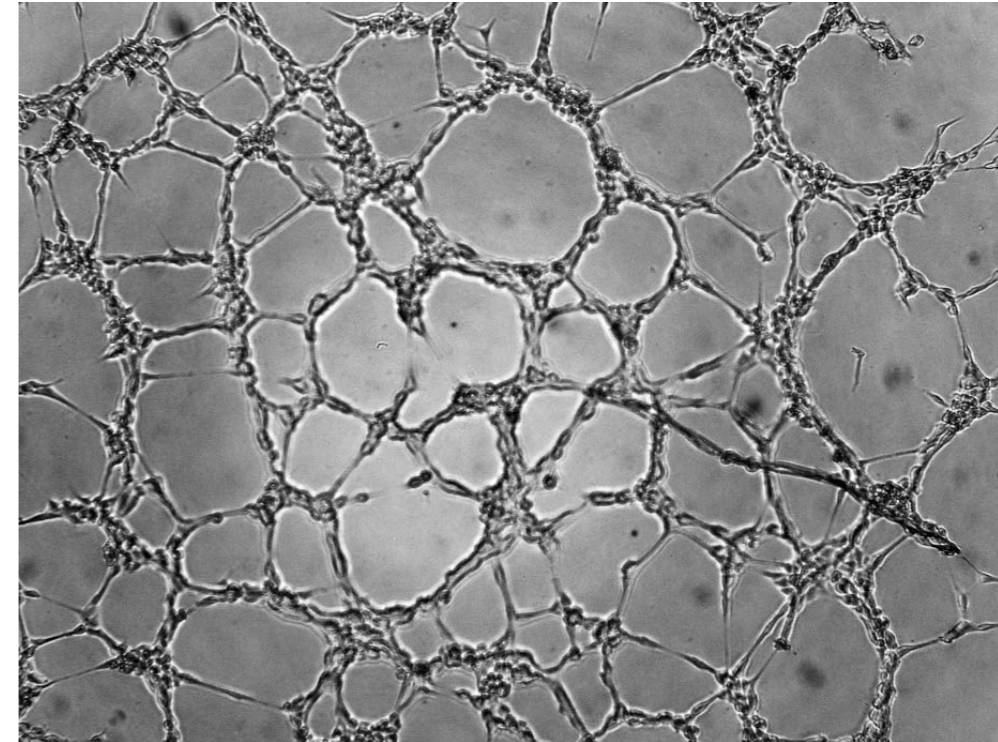
Después del tratamiento, se recuperaron las células, se lavaron con PBS frío y la apoptosis se determinó con el kit "Annexin V-FITC apoptosis detection kit" (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

## 8. Ensayos funcionales

### 8.1. Ensayo de Angiogénesis *in vitro*

Las células endoteliales se sembraron en placas de 96 pocillos que contenían 35  $\mu$ l de Matrigel en 50  $\mu$ l de medio a las diferentes condiciones experimentales y se incubaron durante 4 horas. Tras el tiempo de incubación, se fotografiaron con una cámara digital Olympus C5050 acoplada al microscopio invertido de contraste

de fases Olympus BX50. Las imágenes se cuantificaron contando el número de polígonos cerrados en la malla endotelial.



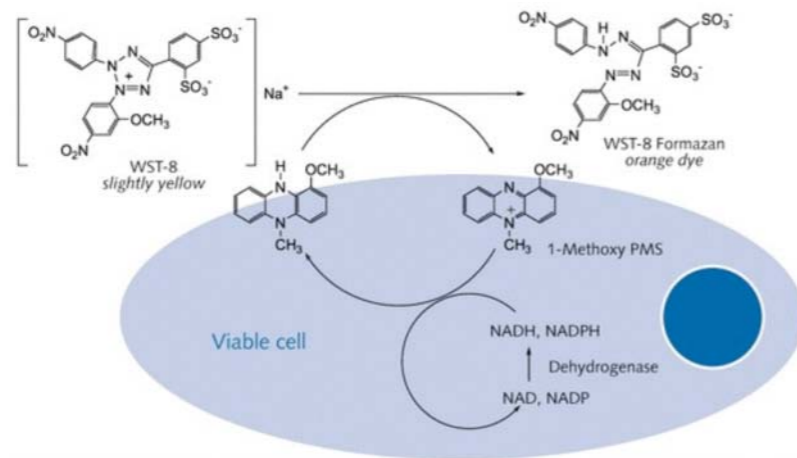
### 8.2.- Ensayo de Invasión.

Para este ensayo se utilizó el kit de migración celular Radius <sup>TM</sup>96-Well Cell Migration Assay Kit (Cell Biolabs, INC, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en medio conteniendo al 1% SBF (control) o las diferentes condiciones experimentales y se incubaron durante un periodo de tiempo que dependió de la línea celular. Tras el tiempo de incubación, se fotografiaron con una cámara digital Olympus C5050 acoplada al microscopio invertido de contraste de fases Olympus BX50. Las fotografías se imprimieron y el área no invadida se recortó. El porcentaje de área no invadida respecto del área inicial libre de células se determinó por gravimetría.

### 8.3. Ensayo de proliferación celular.

Las células tumorales FaDu se cultivaron en placas de 60 mm y se sometieron a las diferentes condiciones experimentales durante 24 horas. Después del tratamiento, las placas fueron irradiadas a temperatura ambiente utilizando un acelerador médico de partículas a 6MV de rayos X (Varian, Palo Alto, Ca. USA) siendo la dosis de radiación aplicada de 6 Gy por minuto.

Inmediatamente después de la irradiación se recogieron las células mediante tripsinización, y se sembraron en placas de 96 pocillos con un inóculo de  $2.5 \times 10^3$  células/pocillo en medio que contenía 10% SBF. La proliferación celular tras la irradiación se determinó con el kit (Cell Proliferation Kit II-XTT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), ensayo espectrofotométrico basado en la metabolización del tetrazolio, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizaron determinaciones a diferentes tiempos de incubación y se graficaron las absorbancias.



### 9. Inmunohistoquímica.

La densidad vascular tumoral fue determinada por microscopía óptica mediante inmunohistoquímica. Se dispuso del bloque de parafina de 8 pacientes con CECC, cuatro de los cuales pertenecían al grupo de pacientes con nivel de expresión de la PGIS alto y 4 al grupo de nivel de expresión bajo. De cada uno de los bloques se realizaron 4 cortes no consecutivos de 3 micras.

La vascularización tumoral se determinó mediante la detección del factor von Willebrand, marcador endotelial, por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal (vWF, ref M0616, Dako, diluido 1:35). Las secciones se tiñeron en un Dako Autostainer Link 48 utilizando el Kit Dako EnVision Flex y diaminobencidina como cromógeno. El conteo de los vasos sanguíneos se realizó sobre fotografías de cuatro campos de cada preparación tomadas a 200X. Se consideró como microvaso cualquier grupo de células endoteliales claramente separada de microvasos adyacente, células tumorales u otro elemento del tejido conectivo. No se consideró necesaria la presencia de luz para definir una estructura como microvaso. Se promedió el conteo de las 16 fotografías de cada paciente.

### 10. Análisis estadístico.

El estudio estadístico se realizó utilizando el software SPSS 17.0 o el Sigma-Plot.

Cuando los datos seguían una distribución normal, la comparación entre dos o más de dos variables cuantitativas se llevó a cabo con el test t-Student o el test de ANOVA, respectivamente. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney en la comparación de dos grupos, o el test Kruskal-Wallis en la comparación de más de dos grupos.

Para determinar la asociación entre variables, se realizó una transformación logarítmica en base 10 con la finalidad de normalizar la distribución de las variables. Así una vez normalizados los datos, se utilizó el test de correlación de Pearson.

Se consideró como significativo un valor de "p" menor de 0.05.

El valor continuo de los niveles de expresión de PGIS fue analizado utilizando un árbol de regresión y clasificación para el análisis de datos (CART), considerando como variable dependiente el control local del tumor después del tratamiento. El método CART clasifica los valores incluidos como variables independientes en el modelo de forma homogénea de acuerdo con el valor correspondiente a la variable dependiente.

La supervivencia actuarial se calculó mediante las curvas de Kaplan-Meier. Para comparar las diferentes funciones de supervivencia se utilizó el test Log-rank.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

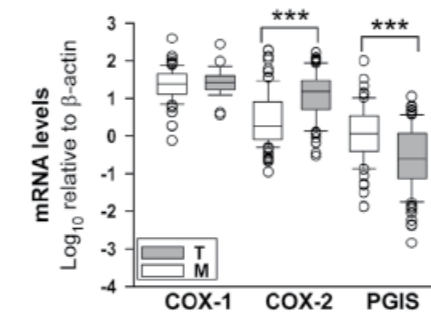
Se llevó a cabo un análisis multivariante utilizando el modelo de regresión de Cox, considerando como variable dependiente la supervivencia específica, y como variables independientes la localización del tumor primario, su extensión loco-regional, el tipo de tratamiento realizado, y la categoría de expresión de la PGIS tal como quedó definida previamente mediante el método CART.

## **Resultados**

## Resultados

### 1. La vía de biosíntesis de PGI<sub>2</sub> se encuentra disminuida en los CECC en relación a las mucosa sana.

Analizamos los niveles de expresión de las enzimas de la vía de la PGI<sub>2</sub> en 98 muestras de tumor y 72 muestras de mucosa no tumoral mediante RT-PCR. La siguiente figura muestra los niveles de expresión correspondientes a los genes responsables de la síntesis de la PGI<sub>2</sub>.

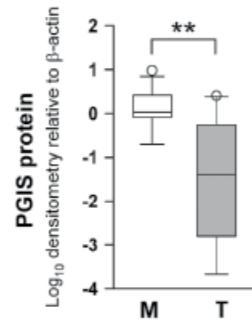


La distribución de las variables no siguió una distribución normal. No observamos diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión de la COX-1 entre las muestras de tumor y de mucosa sana. Por el contrario, los niveles de expresión de la COX-2 de las muestras de tumor estaban incrementados significativamente, siendo el valor de la mediana unas 8.5 veces superior respecto de las muestras de mucosa sana.

Por el contrario, la expresión de la PGIS apareció disminuida de forma significativa en las muestras tumorales, con un valor unas 4.5 veces inferior al correspondiente a las muestras de mucosa sana.

**RESULTADOS**

Para comprobar que la disminución en la expresión del gen que codifica la PGIS en las muestras de tumor comportaba una disminución en la cantidad de proteína, se analizó la expresión de la proteína PGIS mediante Western-blot en 20 parejas de tumor y mucosa sana. Los resultados, que aparecen en la siguiente figura, muestran también que la cantidad de PGIS presente en la muestras de tumor eran significativamente inferiores a las obtenidas en la mucosa sana.

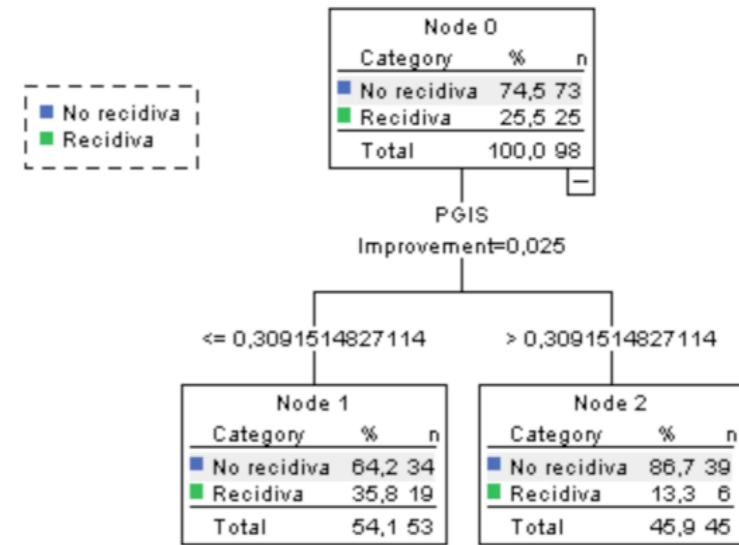


**2. Los niveles de mRNA de PGIS se correlacionan con la respuesta al tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia en los pacientes con CECC.**

No aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión del mRNA de la PGIS en función de la localización primaria del tumor, su categoría de extensión local o regional, o el grado histológico (P>0.05).

Por el contrario, sí que apareció una relación entre el grado de expresión de la del mRNA de la PGIS y la respuesta al tratamiento. Durante el periodo de seguimiento, un total de 25 pacientes (25.5%) contaron con una recidiva del tumor a nivel local después del tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia. Considerando el control local de la enfermedad tras el tratamiento como variable dependiente, el método CART clasificó a los pacientes en dos categorías en función del grado de expresión del mRNA de la PGIS. Los pacientes con unos niveles de expresión del mRNA de la PGIS elevados (n=45, 45.9%) contaron con un riesgo de recidiva local del tumor significativamente inferior al correspondiente a los pacientes con unos niveles de expresión del mRNA de la PGIS bajos (n=53, 54.1%). La siguiente figura muestra el árbol de clasificación obtenido mediante el método de partición recursiva considerando el control local de la enfermedad como la variable dependiente y el nivel de expresión del mRNA de la PGIS como la variable independiente.

**RESULTADOS**

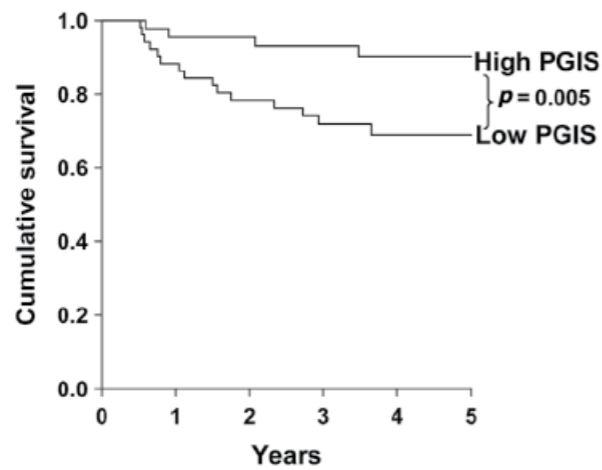


Los pacientes con unos niveles de expresión elevada del mRNA de la PGIS contaron con una supervivencia libre de enfermedad a nivel local, regional y a distancia superiores a los correspondientes a los pacientes con unos niveles bajos. La siguiente tabla muestra los valores de supervivencia actuarial libre de enfermedad local, regional y a distancia a los 5 años en función de la categoría de expresión del mRNA de la PGIS. Las diferencias alcanzaron la significación estadística en el caso de las supervivencias libres de enfermedad local y a distancia.

Recidiva	Niveles PGIS	Supervivencia 5 años	IC 95%	P
rT	Bajos	61.8%	48.3-75.3%	0.014
	Altos	86.4%	76.3-96.5%	
rN	Bajos	76.5%	61.4-91.6%	0.180
	Altos	90.5%	81.7-99.3%	
rM	Bajos	74.9%	58.1-91.7%	0.018
	Altos	97.8%	93.5-100%	

## RESULTADOS

Existieron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función de la categoría de expresión de la del mRNA de la PGIS. La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes con unos niveles de expresión elevados del mRNA de la PGIS fue del 90.2% (IC 95%: 81.0-99.4%), y para los pacientes con unos niveles de expresión bajos del 60.5% (IC 95%:44.4-76.6%) (p=0.005). La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia ajustada en función de los niveles de expresión de la PGIS.



De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante en el que se consideró la supervivencia ajustada como la variable dependiente, la categoría de expresión del mRNA de la PGIS apareció como la única variable que se relacionó de forma significativa con la supervivencia. Considerando los pacientes con unos niveles de expresión elevados del mRNA de la PGIS como la categoría de referencia, los pacientes con unos niveles de expresión bajos contaron con un riesgo 3.90 veces superior de morir como consecuencia de la evolución del CECC (IC 95%: 1.26-12.03). Una vez incluida la categoría de expresión mRNA PGIS en el modelo multivariante, ni la localización del tumor primario, ni la extensión local o regional de la enfermedad, ni el tipo de tratamiento realizado fueron variables que se relacionaron de forma independiente con la supervivencia de los pacientes.

## RESULTADOS

		HR	CI 95% HR	P
Localización	Laringe-hipofaringe (n=50)	1		0.995
	Cavidad Oral-Orofaringe (n=48)	1.00	0.37-2.66	
Extensión Local	T1-T2 (n=51)	1		0.581
	T3-T4 (n=47)	1.28	0.53-3.10	
Extensión Regional	NO (n=53)	1		0.234
	N+ (n=45)	2.01	0.63-6.40	
Tratamiento	Radioterapia (n=50)	1		0.903
	Quimio-radioterapia (n=48)	1.07	0.33-3.47	
Expresión PGIS	Alta (n=45)	1		0.018
	Baja (n=53)	3.90	1.26-12.03	

Al considerar de forma específica a los pacientes con carcinomas de orofaringe (n=43), se dispuso de información del estatus HPV para 42 de los pacientes. El porcentaje de pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos (n=7) fue del 16.7%. Los pacientes con tumores HPV positivos mostraron un tendencia a contar con unos niveles de expresión de la PGIS superiores a los pacientes con tumores HPV negativos (valor de expresión de RT-PCT 1.1 versus 0.3), si bien dado el número limitado de pacientes evaluados las diferencias no alcanzaron la significación estadística (P=0.2). Hasta el momento del cierre del estudio, ninguno de los pacientes HPV positivos (n=7) había fallecido como consecuencia de la evolución de la enfermedad, en tanto que la supervivencia cáncer-específica a los 5 años para los pacientes HPV negativos fue del 58.1% (P=0.095).

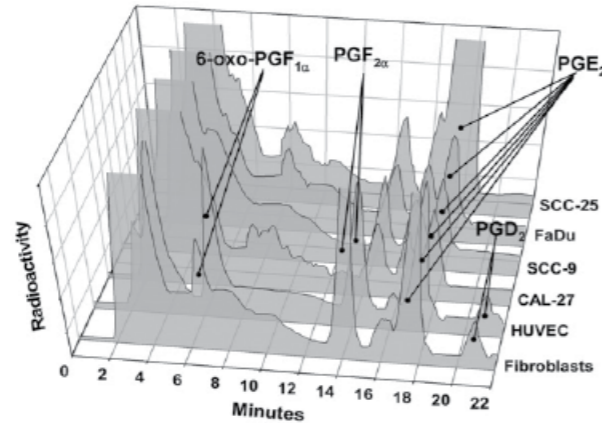
### 3. Las células tumorales cooperan con las células del parénquima tisular en la biosíntesis de PGI<sub>2</sub>

Para determinar el mecanismo de producción de la PGI<sub>2</sub> a nivel del tumor, se incubaron cuatro líneas celulares de CECC, y células del estroma (fibroblastos y células endoteliales), con [14C]-AA. Su metabolismo se analizó por cromatografía de alta resolución (HPLC). Observamos que las células tumorales fueron incapaces de sintetizar PGI<sub>2</sub> (analizado como de 6-oxo-PGF1 $\alpha$ , producto estable de la hidrólisis de la PGI<sub>2</sub>). Además, no detectamos expresión PGIS ni a nivel de mRNA ni de proteína en ninguna de las líneas tumorales estudiadas. Por el contrario, tanto los fibroblastos y como las células endoteliales produjeron PGI<sub>2</sub>, siendo superior la producción de prostaciclina en las HUVEC.

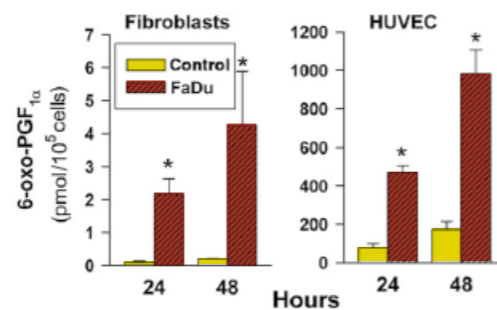


## RESULTADOS

La siguiente figura muestra los perfiles de prostanoideos de los distintos tipos de celulares obtenidos a partir de la incubación con [14C]-AA y analizados mediante cromatografía HPLC.



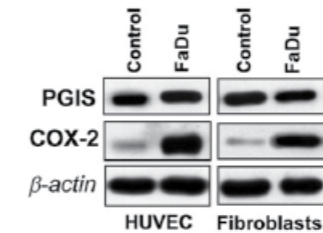
A continuación exploramos la posibilidad de que las células tumorales influyeran en la síntesis de PGI<sub>2</sub> por parte de los fibroblastos o las células endoteliales. Para ello se procedió a incubar a fibroblastos y HUVEC con medio condicionado obtenido de la línea celular tumoral FaDu durante un periodo de 24 o 48 horas. Observamos que el tratamiento con el medio condicionado de la línea tumoral FaDu incrementó enormemente la biosíntesis de PGI<sub>2</sub> tanto en los fibroblastos como, sobre todo, en las células endoteliales. La siguiente figura muestra la cantidad 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> liberada al medio y analizada por EIA por fibroblastos y HUVEC incubadas a diferentes tiempos en presencia de medio condicionado de FaDu (las columnas representan el promedio obtenido a partir de 3 estudios realizados).



## RESULTADOS

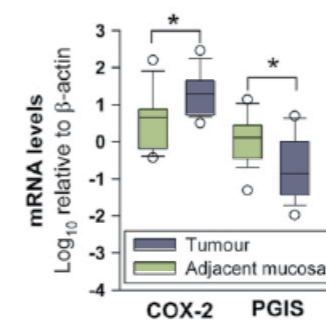
Las diferencias en los niveles de PGI<sub>2</sub> liberada al medio fueron significativas (P<0.05) tanto a las 24 como a las 48 horas entre las células incubadas en presencia del medio condicionado de FaDu, y los controles, especialmente en el caso de las células HUVEC. Si observamos la escala de las gráficas, las células endoteliales producen 250 veces más PGI<sub>2</sub> que los fibroblastos.

Analizamos la expresión de PGIS y COX-2 mediante inmunoblotting. La siguiente figura muestra los Western-blots correspondientes a la expresión de COX-2 y PGIS en fibroblastos y HUVEC tratados o no con medio condicionado de FaDu.



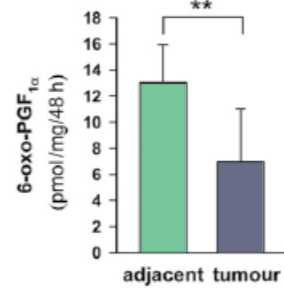
Mientras que el medio condicionado de FaDu claramente indujo la expresión de COX-2, no modificó la expresión de la PGIS ni en los fibroblastos ni en las células endoteliales.

Asumiendo la hipótesis de que las células tumorales podrían producir prostanoideos diferentes a la PGI<sub>2</sub> vía actividad COX-2, y que éstos podrían influir en la biosíntesis de PGI<sub>2</sub> por parte de las células del estroma adyacente, procedimos a analizar la expresión del mRNA de la PGIS y la producción de PGI<sub>2</sub> ex vivo en muestras apareadas de tumor y mucosa no tumoral adyacente (muestras de mucosa a menos de un cm de distancia del margen del tumor). Los resultados, obtenidos mostraron que la expresión de COX-2 fue significativamente superior en las muestras de tumor, mientras que la de PGIS apareció significativamente disminuida.



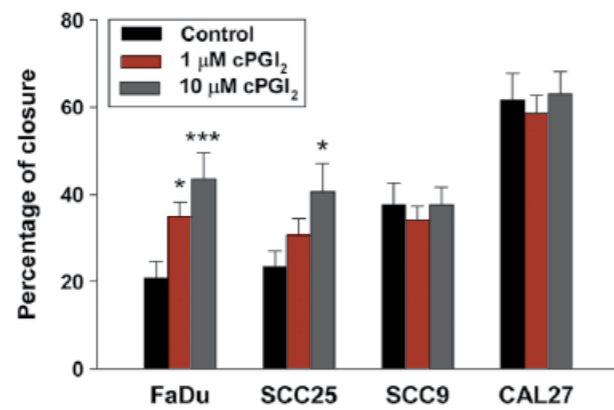
**RESULTADOS**

Sin embargo, aunque los niveles de COX-2 en las muestras de tumor estaban incrementados, la liberación de PGI<sub>2</sub> al medio por el tejido tumoral fue significativamente inferior al de las mucosas sanas, tal como aparece en la siguiente figura.



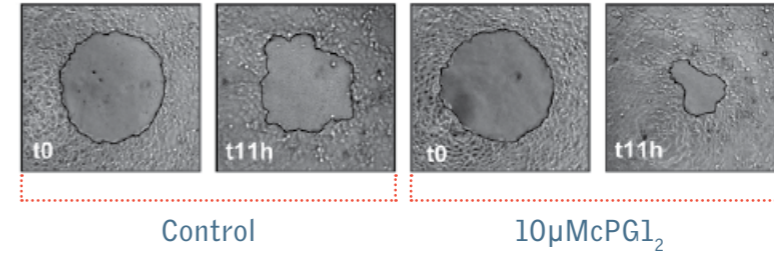
**4. Efecto de la PGI<sub>2</sub> en la capacidad de migración de las células de CECC**

Se exploró el efecto de la PGI<sub>2</sub> sobre la capacidad de migración de las células tumorales *in vitro*. Las cuatro líneas de células tumorales de CECC se incubaron en presencia de carbaprostaciclina (cPGI<sub>2</sub>), un análogo estable de la PGI<sub>2</sub>. Se utilizaron dos concentraciones de cPGI<sub>2</sub>, 1 μM y 10 μM. Los resultados obtenidos mostraron que la cPGI<sub>2</sub> sólo reguló la capacidad de migración de las células de la línea celular FaDu y en menor cantidad las de la línea SCC25. El efecto de la cPGI<sub>2</sub> fue incrementar la capacidad de migración de las células tumorales.



**RESULTADOS**

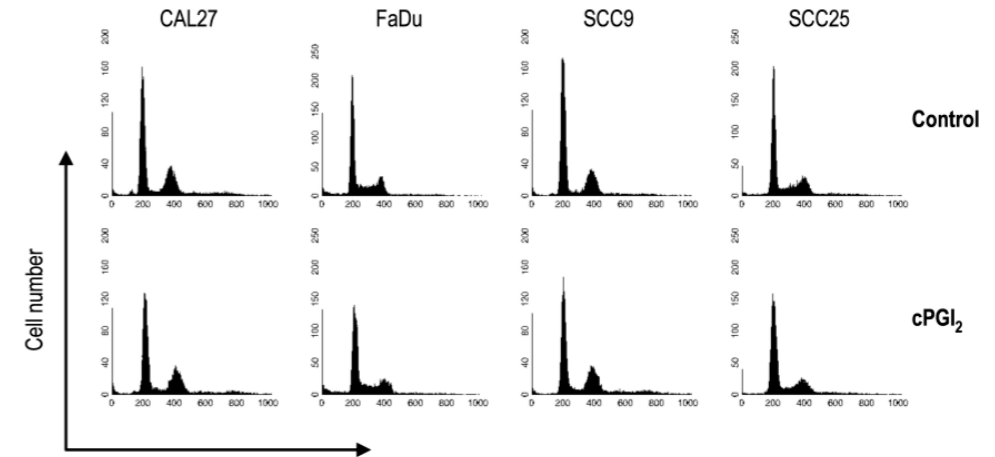
La siguiente figura muestra los resultados del ensayo de migración (media de 6-9 experimentos, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 en comparación con los controles).



En la siguiente figura se muestran imágenes ilustrativas de este estudio de migración correspondientes a las células la línea celular FaDu.

**5. La PGI<sub>2</sub> no influye en la progresión del ciclo celular en células de CECC**

Se analizó el efecto sobre la distribución del ciclo celular de la cPGI<sub>2</sub> en las cuatro líneas de CECC por citometría de flujo. No se apreciaron diferencias significativas en la distribución del ciclo celular entre las células tratadas con 10 μM cPGI<sub>2</sub> durante 48 horas y las células control en ninguna de las líneas estudiadas.



**RESULTADOS**

La siguiente figura muestra los resultados de citometría obtenidos.

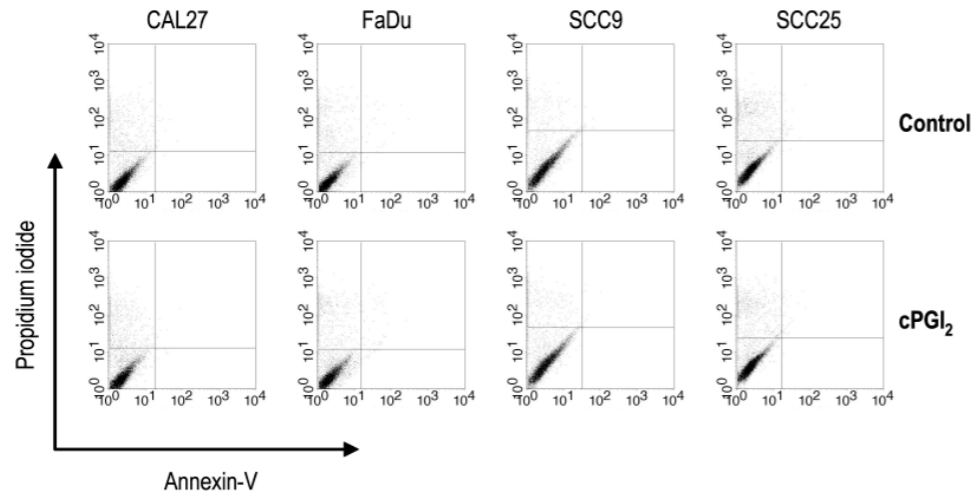
La **tabla** muestra el porcentaje de distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular en función del tratamiento con cPGI<sub>2</sub> (n=4, media ± desviación estándar).

	G0-G1		S		G2-M	
	C	cPGI <sub>2</sub>	C	cPGI <sub>2</sub>	C	cPGI <sub>2</sub>
<b>CAL27</b>	69.97 ± 1.78	67.34 ± 5.33	10.11 ± 1.57	6.38 ± 1.50	19.92 ± 0.21	26.29 ± 6.83
<b>FaDu</b>	61.94 ± 1.81	62.27 ± 2.97	13.66 ± 1.22	17.43 ± 6.00	24.41 ± 2.41	20.31 ± 7.32
<b>SSC9</b>	65.59 ± 3.13	61.83 ± 0.18	8.38 ± 4.60	7.89 ± 2.94	26.03 ± 2.02	30.28 ± 2.77
<b>SCC25</b>	64.61 ± 1.03	67.81 ± 1.88	11.25 ± 2.12	9.93 ± 2.03	24.34 ± 1.28	22.64 ± 1.19

**6. La PGI<sub>2</sub> no modifica la apoptosis celular en líneas de CECC**

Estudiamos si la cPGI<sub>2</sub> inducía apoptosis sobre las células tumorales. Para ello las células de las cuatro líneas tumorales se trataron con cPGI<sub>2</sub> durante 48 h y transcurrido este periodo de tiempo se tiñeron con annexina V y PI y se analizaron por citometría de flujo. El tratamiento con cPGI<sub>2</sub> no influyó de forma significativa en la muerte celular programada en las células tumorales de CECC.

La siguiente figura muestra unos histogramas representativos de los resultados obtenidos en las diferentes líneas tratadas con cPGI<sub>2</sub> comparándolos con los controles.



**RESULTADOS**

La **tabla** muestra el porcentaje de células vivas, apoptóticas y necróticas obtenidos por la citometría (n=4, media ± desviación estándar). No hubo diferencias significativas cuando se compararon las células tratadas con las del grupo control.

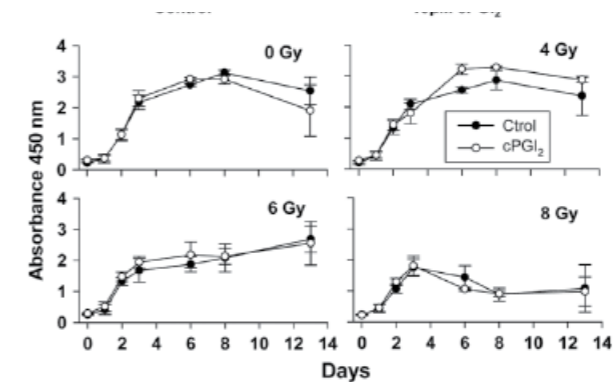
	Vivas		Apoptóticas		Necróticas	
	C	cPGI <sub>2</sub>	C	cPGI <sub>2</sub>	C	cPGI <sub>2</sub>
<b>CAL27</b>	90.30 ± 0.84	91.56 ± 1.56	0.53 ± 0.06	0.31 ± 0.07	9.18 ± 0.79	8.15 ± 1.48
<b>FaDu</b>	91.18 ± 0.64	89.51 ± 0.51	0.90 ± 0.35	1.44 ± 0.65	7.92 ± 0.44	9.06 ± 0.34
<b>SSC9</b>	89.30 ± 1.46	89.14 ± 1.10	0.52 ± 0.18	0.60 ± 0.23	10.18 ± 1.36	10.27 ± 1.01
<b>SCC25</b>	82.43 ± 3.71	87.39 ± 1.49	0.99 ± 0.32	0.82 ± 0.22	16.59 ± 3.43	11.79 ± 1.32

**7. La PGI<sub>2</sub> no modifica la radiosensibilidad *in vitro* de las células tumorales de CECC**

El estudio clínico sugiere la existencia de una relación entre la respuesta al tratamiento con radioterapia en los pacientes con CECC y la expresión de la PGIS. Se procedió a realizar un estudio de radiobiología para evaluar la existencia de una relación entre los niveles de expresión de la PGIS, y por tanto la acción de la PGI<sub>2</sub>, y la respuesta al tratamiento con radioterapia en líneas celulares de CECC.

El estudio consistió en valorar si el tratamiento con cPGI<sub>2</sub> modificaba la capacidad de proliferación de una de las líneas celulares estudiadas, la línea FaDu, tras la administración de diferentes dosis de radioterapia. Para ello las células se incubaron durante las 24 horas previas a la irradiación con 10 μM de cPGI<sub>2</sub>.

La figura muestra como la exposición de las células FaDu a cPGI<sub>2</sub> no afectó de forma significativa a la capacidad de proliferación de las células tumorales al ser expuestas a diferentes dosis de radioterapia.

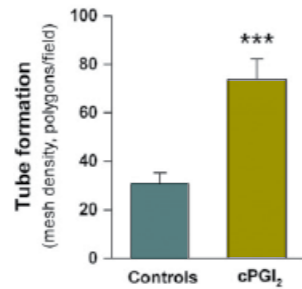


### 8. La PGI<sub>2</sub> promueve *in vitro* la angiogénesis

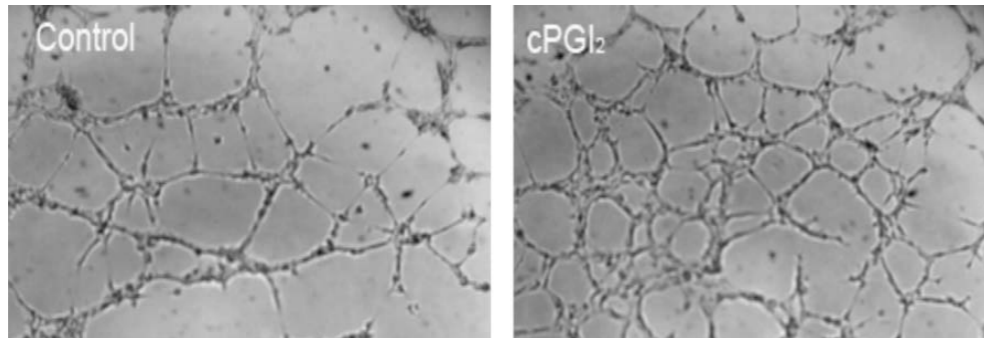
Para investigar si la PGI<sub>2</sub> influye en la capacidad angiogénica de las células endoteliales, realizamos un ensayo *in vitro* y evaluamos la formación de neovasos por HUVEC en matrigel.

Los resultados obtenidos mostraron como el tratamiento de las HUVEC con cPGI<sub>2</sub> indujo un incremento significativo de la formación de neovasos en relación con los controles.

La siguiente figura muestra los resultados obtenidos del estudio de angiogénesis. El valor de las barras representa la media de un total de 27 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias observadas entre las células tratadas con cPGI<sub>2</sub> y los controles fueron estadísticamente significativas (P<0.001).



La siguiente figura muestra dos imágenes representativas de la trama vascular formada en matrigel por células HUVEC incubadas en presencia o no de cPGI<sub>2</sub>.

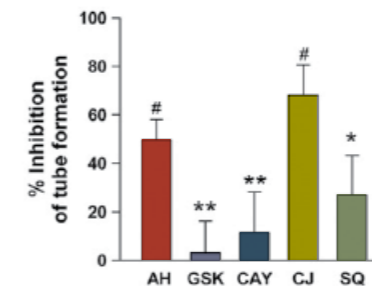


### 9. La PGI<sub>2</sub> promueve la angiogénesis a través de la activación del receptor EP-4

Una vez observamos que la cPGI<sub>2</sub> inducía angiogénesis *in vitro*, investigamos el mecanismo a través del cual ejercía este efecto. Dado que la PGI<sub>2</sub> puede actuar mediante la unión a su receptor IP pero también a los receptores nucleares PPAR, analizamos si bloqueando los receptores IP y PPARδ con antagonistas específicos (CAY10441 y GSK0660, respectivamente) se inhibía la angiogénesis inducida por cPGI<sub>2</sub>. Ninguno de los antagonistas ensayados modificó la angiogénesis inducida por cPGI<sub>2</sub>, lo que indica que ni la activación de IP ni la de PPARδ están implicadas en el mecanismo de inducción de la angiogénesis producido por la cPGI<sub>2</sub>.

En estudios previos nuestro grupo ha demostrado que la PGE<sub>2</sub> induce angiogénesis mediante la activación del receptor EP4 en las células endoteliales<sup>58</sup>. Además, aparte de a su receptor específico, las PGs pueden unirse con menor afinidad a otros receptores de la familia. Teniendo en cuenta estos hechos, estudiamos si la inducción de la angiogénesis por parte de la cPGI<sub>2</sub> estaba mediada por la activación de otros receptores. Se analizó el efecto de diferentes antagonistas de los receptores sobre la acción de la cPGI<sub>2</sub>: AH23848 (antagonista del EP4/TP), CJ42794 (antagonista del EP4) y SQ29548 (antagonista del TP). Los resultados obtenidos indicaron que mientras que el AH23848 y el CJ42794 inhibieron de forma significativa la angiogénesis inducida por PGI<sub>2</sub>, ésta no se vio modificada por SQ29548, indicando que la cPGI<sub>2</sub> actuaba activando el receptor EP4 y no el TP.

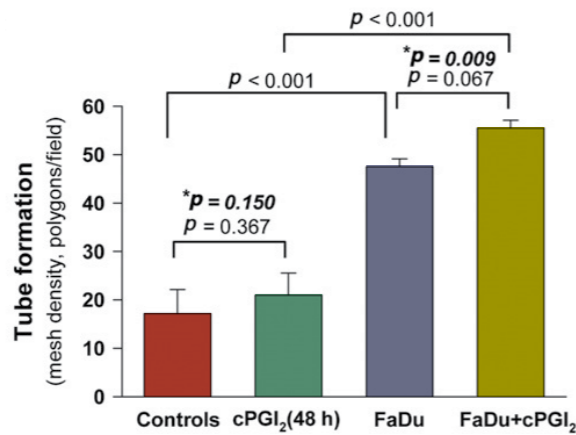
La siguiente figura muestra los porcentajes de inhibición de la inducción por PGI<sub>2</sub> de la formación de vasos por los diferentes antagonistas. Las HUVEC fueron expuestas a 10 μmol/L de cPGI<sub>2</sub> en presencia o ausencia de 200 μmol/L AH23848 (AH, EP4 antagonista), 1 μmoles/L GSK0660 (GSK, PPARδ antagonista), 1 μmoles/L CAY10441 (CAY, IP antagonista), o 10 μmoles/L CJ42794 (CJ, EP-4 antagonista). Las barras indican los resultados de la media y desviación estándar. Cada antagonista se analizó en cinco experimentos diferentes, realizados por triplicado, \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001, # p<0.05.



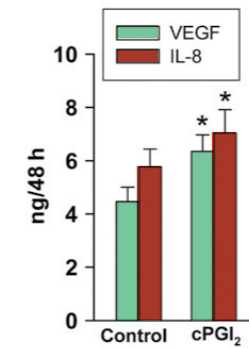
**10. La PGI<sub>2</sub> modifica la capacidad de las células tumorales de inducir angiogénesis *in vitro***

Para analizar si el tratamiento con cPGI<sub>2</sub> modifica la capacidad de las células tumorales para inducir angiogénesis *in vitro* se realizó un estudio en el cual durante los ensayos de angiogénesis las HUVEC se incubaron en presencia del medio condicionado de FaDu y medio condicionado de FaDu tratadas con cPGI<sub>2</sub> durante 48 h. Los resultados obtenidos mostraron que el medio de FaDu promovió la formación *in vitro* de vasos, y que la inducción fue significativamente superior en presencia del medio condicionado de las FaDu tratadas con cPGI<sub>2</sub>.

La siguiente figura muestra el efecto del medio condicionado de las FaDu sobre la angiogénesis *in vitro*. Las FaDu fueron cultivadas en medio de cultivo (FaDu) o en medio de cultivo con 10 µmol/L of cPGI<sub>2</sub> (FaDu+cPGI<sub>2</sub>) durante 48 h. Posteriormente el medio fue añadido a las HUVEC, sembradas en matrigel y se contó la formación de vasos a las 4 h. Los controles de las HUVEC expuestas a medio condicionado de FaDu se realizaron con medio fresco (Controls), y los controles de las HUVEC expuestas a medio de FaDu+cPGI<sub>2</sub> fueron realizados con medio conteniendo 10 µmol/L de cPGI<sub>2</sub> incubado durante 48h en la cámara de cultivo sin células (cPGI<sub>2</sub>(48h)), previo a la adición de las HUVEC. P indica la probabilidad del test de ANOVA para los cuatro grupos; y \*P la probabilidad utilizando el t-test para la comparación de dos grupos.

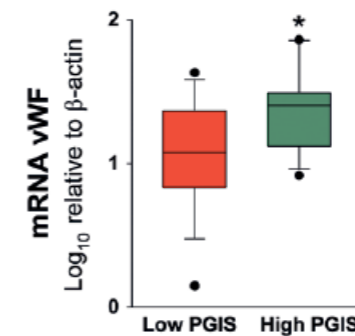


De forma consistente con la mayor inducción de angiogénesis producida por el medio condicionado de FaDu tratadas con PGI<sub>2</sub>, la concentración de dos factores pro-angiogénicos como son VEGF y IL-8 fueron significativamente más elevados en los medios condicionados de las FaDu tratadas con PGI<sub>2</sub> que en las controles, tal como aparece en la siguiente figura (media ± desviación estándar; n=6; \*, p<0.05 vs controles).

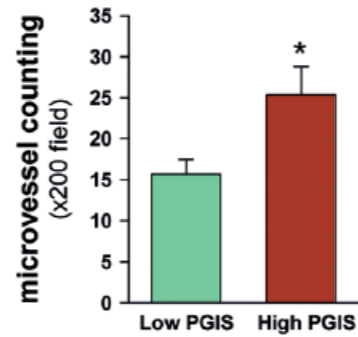


**11. La expresión de PGIS en las muestras de CECC se correlaciona con la vascularización**

Una vez determinado la PGI<sub>2</sub> inducía angiogénesis *in vitro*, investigamos si existía correlación entre los niveles de expresión de la PGIS en el tumor y la densidad capilar. En primer lugar analizamos los niveles transcripcionales del factor von Willebrand (vWF) como un indicador indirecto de la cantidad de endotelio presente a nivel de la muestra tumoral. Comprobamos que los pacientes con unos niveles elevados de PGIS mostraron también unos niveles elevados de expresión de vWF, como muestra la siguiente figura (\*, P<0.05).

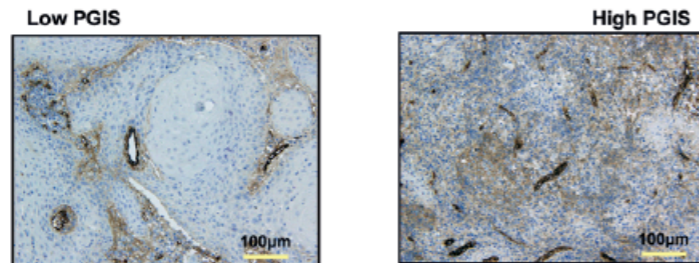


## RESULTADOS



A continuación realizamos un análisis de la densidad vascular en muestras histológicas de cuatro pacientes con niveles de expresión elevados de PGIS y cuatro con niveles reducidos. Los vasos fueron identificados por la tinción inmunohistoquímica del factor de vWF y la densidad capilar cuantificada como se expone en los métodos. De forma consistente a los resultados obtenidos en el análisis de RNA, la densidad capilar de los tumores con niveles de expresión elevados de PGIS fue superior a la correspondiente a los tumores con niveles de expresión reducida (\*,  $P < 0.05$ ).

La siguiente figura muestra un ejemplo representativo de las tinciones obtenidas, pudiéndose observar un mayor número de estructuras vasculares en los tumores que contaban con una expresión elevada de PGIS.

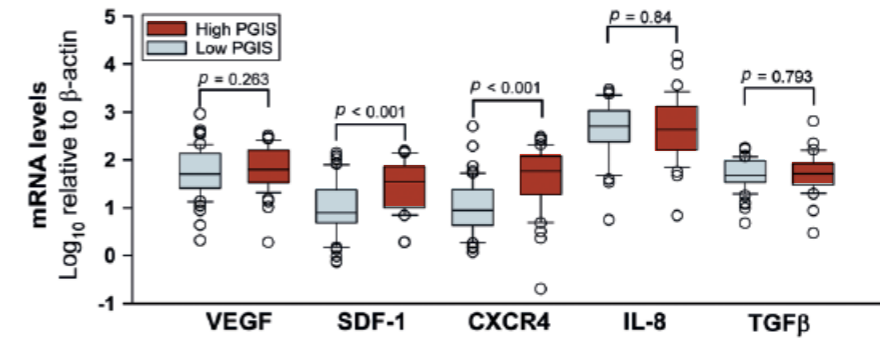


## RESULTADOS

### 12. La expresión de PGIS en las muestras de CECC se correlaciona con la expresión de CXCL12 (SDF-1) y de CXCR4

Finalmente, estudiamos si existía relación entre los niveles de expresión de la PGIS y los niveles de expresión de genes relacionados con los mecanismos de neovascularización, como son VEGF, IL-8, TGF- $\beta$ , SDF-1 y su receptor CXCR4.

De los genes analizados sólo se encontró una relación significativa entre la expresión de PGIS con SDF-1 y CXCR4. Los tumores con unos niveles de expresión de PGIS elevados mostraron también unos niveles de expresión elevados de SDF-1 y de CXCR4, tal como aparece en la siguiente figura.



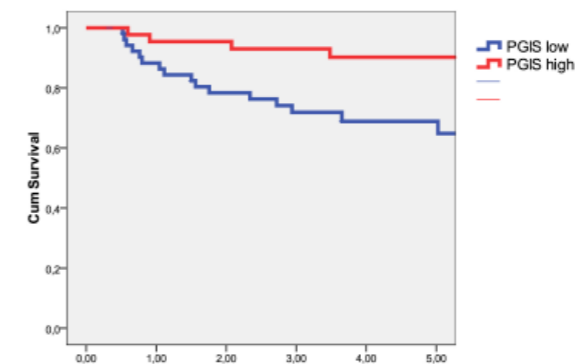
## Discusión

## Discusión

En este trabajo realizado con una amplia cohorte de muestras de tejido de pacientes con CECC, hemos demostrado como los niveles de PGIS se encontraban reducidos de forma significativa en el tejido tumoral en relación con la mucosa sana, tanto considerando el nivel de expresión transcripcional en términos de mRNA como en la cantidad de proteína. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores a nivel de los carcinomas pulmonares, en los cuales se ha observado una expresión menor de la PGIS en el tejido tumoral que en el tejido sano<sup>52,75</sup>.

También, coincidiendo con los hallazgos realizados por otros autores que encontraron que existía una relación entre la expresión de la PGIS en tumores pulmonares y una mejoría de la supervivencia, nuestros resultados obtenidos al analizar una serie de pacientes con CECC tratados con radioterapia indican que existe una relación significativa entre la expresión de la PGIS y el control de la enfermedad y, de forma subsidiaria, con la supervivencia<sup>53</sup>. A nivel experimental, numerosas evidencias obtenidas de modelos de carcinoma de pulmón<sup>55</sup> o de colon<sup>54</sup> señalan que la expresión de la PGIS y de su prostanóide específico, la PGI2 contaría con una capacidad antitumoral, y que la administración de análogos de la PGI2 podría contar con un papel terapéutico<sup>76</sup>.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia ajustada de los pacientes incluidos en nuestro estudio en función de los niveles de expresión de la PGIS.





## DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos de un análisis multivariante realizado con nuestra cohorte de pacientes, la probabilidad de muerte relacionada con el CECC de los pacientes con tumores con expresión baja a nivel transcripcional de la PGIS fue 3.9 veces superior que la de los pacientes con tumores con unos niveles de expresión elevados. Este hallazgo nos hace considerar el nivel de expresión de la PGIS como un posible biomarcador para definir la respuesta al tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia. Sin embargo, antes de considerar la utilidad clínica de nuestro hallazgo, deben tenerse en cuenta las principales limitaciones de nuestro estudio: su diseño retrospectivo, y que analiza un grupo heterogéneo de pacientes, incluyendo tumores de diferentes estadios y localizaciones.

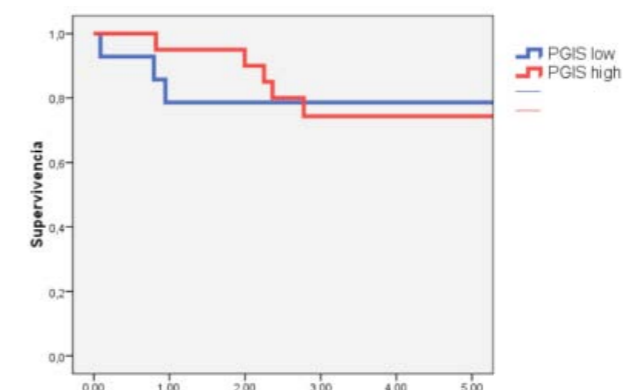
Comprobamos si esta capacidad pronóstica era aplicable a pacientes no tratados con radioterapia o quimioradioterapia. Para ello, analizamos la supervivencia en un grupo de 36 pacientes con CECC tratados con cirugía durante el mismo periodo en que se realizó el estudio con los pacientes de radioterapia.

La siguiente **tabla** detalla las características clínicas de este grupo de pacientes tratados con cirugía:

Características	Nº de pacientes (%)	
<b>Edad</b>	<b>Media (rango) 63.9 años (40.3-85.9)</b>	
<b>Sexo</b>	Hombre	31 (86.1%)
	Mujer	5(13.9%)
<b>Localización Tumor</b>	Cavidad oral- orofaringe	16 (44.4%)
	Laringe-hipofaringe	20 (55.6%)
<b>Categoría T</b>	T1-2	18 (50.0%)
	T3-4	18 (58.0%)
<b>Categoría N</b>	N0	28 (77.8%)
	N+	8 (22.2%)
<b>Grado de diferenciación</b>	Bien diferenciado	2 (5.6%)
	Moderado	29 (70.5%)
	Pobre	5 (13.9%)
<b>Tratamiento</b>	Cirugía	23 (63.9%)
	Cirugía + Radioterapia	13 (36.1%)

## DISCUSIÓN

Al clasificar a los pacientes en función del grado de expresión de la PGIS utilizando como puntos de corte los obtenidos mediante el método de partición recursiva, se definieron dos grupos de pacientes: pacientes con unos niveles de expresión bajo (n=14, 38.9%) y pacientes con nivel de expresión alto (n=22, 61.1%) de PGIS. No se apreciaron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función de los niveles de expresión de la PGIS para los pacientes tratados de forma quirúrgica (P=0.956), tal como puede apreciarse en la siguiente figura.



Por lo tanto, el nivel de expresión de la PGIS no predice supervivencia en los pacientes tratados con cirugía.

A diferencia de lo que suceden en otras zonas geográficas, el porcentaje de pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos en nuestro país es limitado<sup>77,78</sup>. Sólo un 16.7% de nuestros pacientes con tumores de orofaringe mostraron una positividad frente al HPV. Sin embargo, los pacientes HPV positivos contaron con una tendencia a mostrar unos niveles de expresión de PGIS más elevados que los pacientes con tumores HPV negativos. En caso de confirmarse esta tendencia en series más amplias de pacientes, el incremento en los niveles de expresión de la PGES podría ser, entre otros, uno de los mecanismos que justificase el mejor pronóstico correspondiente a los pacientes con carcinomas HPV positivos.

A continuación, analizamos el tipo celular responsable de la producción de PGI<sub>2</sub> a nivel tumoral. Para ello utilizamos una serie de líneas celulares de CECC. Pudimos comprobar que ninguna de las líneas celulares expresaba la PGIS a nivel transcripcional ni, en consecuencia, producía PGI<sub>2</sub>. Pudimos constatar como la producción de PGI<sub>2</sub> dependía de tipos celulares del estroma tumoral como los

fibroblastos y, especialmente, las células endoteliales. Debemos destacar que el nivel de síntesis de PGI<sub>2</sub> a nivel de las células endoteliales fue unas 250 veces superior al correspondiente a los fibroblastos. La PGIS se encuentra ampliamente expresada en las células endoteliales, y es generalmente aceptado que estas células son la fuente principal en la síntesis de la PGI<sub>2</sub><sup>79</sup>.

La exposición de fibroblastos y células endoteliales al medio condicionado de FaDu produjo un incremento significativo en la producción de PGI<sub>2</sub>. Cuando analizamos el mecanismo por el cual se producía este incremento, observamos que el medio condicionado de FaDu indujo de forma significativa la expresión de la COX-2, en tanto que no modificó la expresión de la PGIS. Estos resultados sugieren que el incremento en la producción de PGI<sub>2</sub> por parte de los fibroblastos y las células endoteliales fue una consecuencia del incremento en la expresión de la COX-2, que actuaría como paso limitante en la síntesis de prostaglandinas a nivel del microambiente tumoral. Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan que la interacción entre las células tumorales y las células no tumorales del estroma, especialmente las células endoteliales, favorecería la producción de PGI<sub>2</sub> a nivel tumoral.

Nuestros resultados sugieren también que el nivel de expresión de la PGIS más bajo observado en las muestras de tumor en relación con las de mucosa sana no depende de una regulación a la baja de la expresión de la PGIS inducida por las células tumorales en fibroblastos, células endoteliales o en las propias células tumorales, debiendo ser otro el mecanismo que justifique esta disminución.

Se analizó a través de qué mecanismos el incremento en la expresión de la PGIS mejoraba el control local de la enfermedad en los pacientes tratados con radioterapia o quimioradioterapia.

A partir de un estudio de radiobiología realizado con la línea FaDu observamos que la adición de PGI<sub>2</sub> no modificaba de forma significativa la sensibilidad al tratamiento con radioterapia. Igualmente, la adición de PGI<sub>2</sub> a las diferentes líneas celulares de CECC no modificó la distribución del ciclo celular ni indujo apoptosis. Concluimos que la actividad de la PGIS no modifica de forma directa la sensibilidad de las células tumorales ni su capacidad de proliferación o respuesta al tratamiento, debiendo existir un mecanismo indirecto que justificase el diferente pronóstico de los tumores en función del grado de expresión de la PGIS.

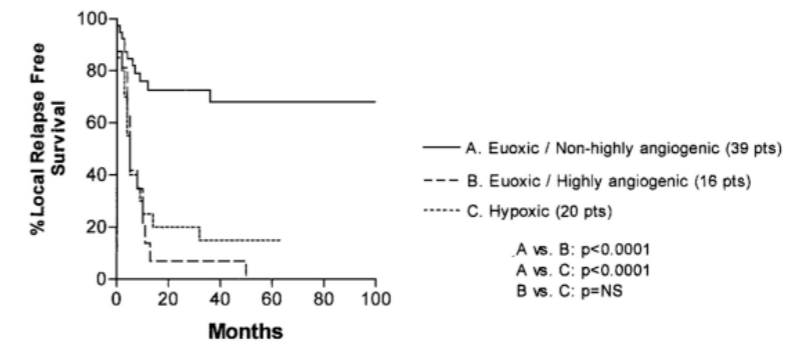
Pudimos observar como la PGI<sub>2</sub> indujo angiogénesis in vitro. El medio condicionado obtenido de células tumorales de la línea FaDu indujo la formación de vasos. Cuando las FaDu fueron tratadas previamente con cPGI<sub>2</sub>, esta inducción se incrementaba de significativamente. De acuerdo con nuestros resultados, la

PGI<sub>2</sub> cuenta con la capacidad de inducir la formación de vasos, favoreciendo en consecuencia la vascularización a nivel local.

El estudio por inmunohistoquímica realizado en muestras de tumor de pacientes con niveles de expresión de PGIS altos y bajos mostró que la densidad capilar de los tumores con niveles de expresión de PGIS elevados fue superior a la de los tumores con unos niveles de expresión bajos. De acuerdo con estos hallazgos, los niveles elevados de PGIS en los pacientes con mejor pronóstico tras el tratamiento con radioterapia se correlacionarían con una mayor vascularización, y sería posible que esta mayor vascularización fuese el elemento responsable del incremento en la respuesta al tratamiento con radioterapia.

En la literatura, la relación existente entre la vascularización tumoral y la respuesta a la radioterapia en los pacientes con CECC es ambigua, con estudios que no encuentran una relación significativa entre la densidad capilar y el control de la enfermedad en pacientes tratados con radioterapia<sup>80,81,82,83</sup>, y autores que señalan que los tumores mal vascularizados cuentan con una peor respuesta tras el tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia<sup>84,85</sup>.

En un estudio en el que se evaluó la hipoxia tumoral determinando la expresión de la Anhidrasa Carbónica 9 (CA9) y se midió la densidad microvascular en pacientes con CECC tratados con quimioradioterapia, Koukourakis y cols<sup>84</sup> identificaron tres grupos de tumores en los pacientes: tumores hipóxicos, tumores euóxicos altamente angiogénicos y tumores euóxicos poco angiogénicos. Los grupos contaron con diferente respuesta al tratamiento con radioterapia, tal como aparece en la siguiente figura.



Los pacientes con tumores euóxicos poco angiogénicos fueron los que contaron con un mejor pronóstico. Los autores concluyeron que la expresión de CA9 por las células tumorales ocurre mayoritariamente en tumores poco vascularizados,

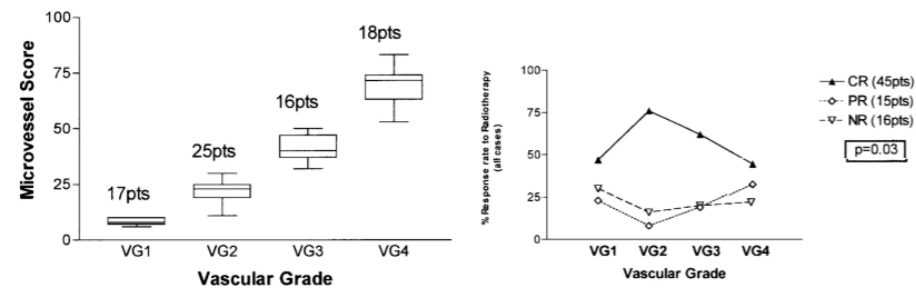
## DISCUSIÓN

y aparece asociada con la resistencia a la radioterapia. El agrupar a los pacientes sometidos a radioterapia de acuerdo con la expresión de CA9 (marcador de hipoxia) y densidad microvascular (angiogenicidad tumoral), podría tener una alta capacidad predictiva de la respuesta.

La presencia de vasos malformados e inmaduros a nivel local condiciona que no exista una relación directa entre la densidad microvascular y la oxigenación de los tejidos, introduciendo el concepto de normalización vascular<sup>86</sup>.

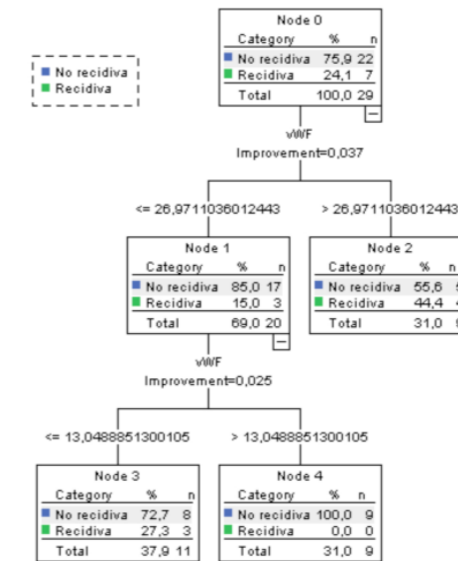
A partir de un estudio inmunohistoquímico realizado en pacientes con CECC tratados con radioterapia, Giatromanolaki y cols<sup>87</sup> observaron como la asociación entre la densidad vascular y la eficacia de la radioterapia contaba con una forma de U, de manera que los tumores con una densidad muy elevada o muy baja fueron los que tuvieron una menor respuesta al tratamiento.

En un estudio inmunohistoquímico en que se valoró la densidad vascular con la tinción de CD31, marcador pan-endotelial, Koukourakis y cols<sup>88</sup> coincidieron con estos resultados. Observaron que los pacientes con unas densidades vasculares intermedias eran los que presentaron un control mejor de la enfermedad tras el tratamiento con radioterapia.

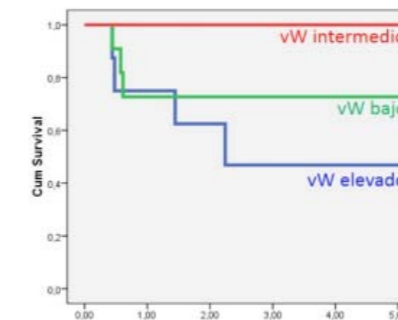


En nuestro estudio hemos determinado los niveles de expresión del RNA del factor vW como marcador endotelial en 29 de las muestras de tumor de los pacientes. Mediante el estudio de partición recursiva de los valores del factor vW obtenidos con estos pacientes, obtuvimos unos resultados compatibles con los obtenidos por estos autores, en el sentido de que los tumores con valores de expresión extremos contaron con un control de la enfermedad reducido en relación con los tumores con valores intermedios, tal como se aprecia en el siguiente árbol de clasificación.

## DISCUSIÓN



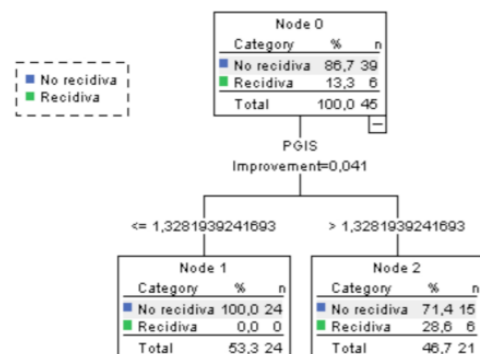
La figura muestra las curvas de supervivencia libres de enfermedad local tras el tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia en función de la expresión del vWF.



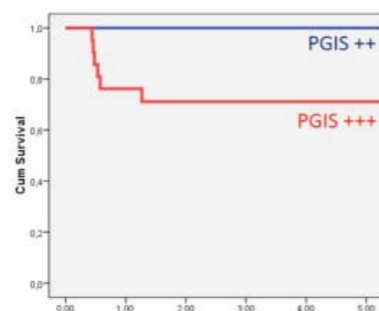
Si bien no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.064$ ), los pacientes con unos niveles intermedios de expresión del vWF contaron con una supervivencia libre de recidiva local superior a la obtenida en pacientes con valores altos o bajos.

## DISCUSIÓN

Por otra parte, analizamos de forma aislada a los pacientes incluidos en el grupo de expresión elevada de PGIS mediante un análisis de partición recursiva, y pudimos apreciar la existencia de un subgrupo de 45 pacientes con unos valores extremos de expresión en los que se concentraba el fracaso local de la enfermedad tras el tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia, tal como muestra el siguiente árbol de clasificación.



La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva local de la enfermedad de los pacientes incluidos en el grupo de expresión de PGIS elevado (n=45) en función de esta nueva clasificación (P=0.006).



Uno de los objetivos a desarrollar en el futuro será aumentar el número de pacientes a los que se analiza la expresión del vWF y verificar la existencia de las tendencias en relación con el control local de la enfermedad que se insinúan a partir de los datos preliminares aquí expuestos.

## DISCUSIÓN

Otro elemento a investigar, a raíz de los resultados obtenidos, es dilucidar si la actividad inducida por la PGI<sub>2</sub> a nivel del tumor juega un papel relevante en la respuesta al tratamiento con radioterapia, o bien si los niveles de expresión de PGIS y la cantidad de PGI<sub>2</sub> sólo son unos marcadores subrogados de la densidad vascular a nivel local, dependiendo la sensibilidad al tratamiento de forma directa del grado y calidad de la vascularización local.

En este estudio, hemos demostrado que la cPGI<sub>2</sub> posee la capacidad de inducir *in vitro* la formación de elementos vasculares e investigamos la vía a través de la cual ejerce esta función pro-angiogénica. La vía de señalización canónica de la actividad de la PGI<sub>2</sub> se ejerce a partir de la activación de su receptor de membrana IP. Estudios realizados en ratones deficientes en IP han demostrado como la vía PGI<sub>2</sub>/IP es importante en la prevención de la trombosis, y que se encuentra implicada en la respuesta inflamatoria<sup>89</sup>.

En nuestro estudio hemos demostramos que la formación de vasos *in vitro* por HUVEC no depende de la activación de los receptores IP, descartando un papel de esta vía de señalización en la actividad pro-angiogénica de la PGI<sub>2</sub>.

Varios estudios han mostrado que los PPARs, especialmente el PPAR $\delta$ , utilizan la PGI<sub>2</sub> como ligando para modificar la actividad celular<sup>63,90</sup>. En este contexto, se ha demostrado como la activación del PPAR $\delta$  mediante un agonista de la PGI<sub>2</sub> tiene la capacidad de inducir angiogénesis a través de mecanismos mediados por el VEGF<sup>91</sup>. Nosotros evaluamos el efecto de antagonistas de los receptores PPAR sobre la actividad proangiogénica de la PGI<sub>2</sub>. No observamos ningún efecto del antagonista del PPAR $\delta$  (GSK0660) sobre la formación de vasos inducida por la cPGI<sub>2</sub>, lo que indica que la contribución de la activación del PPAR $\delta$  por la cPGI<sub>2</sub> al proceso, de producirse, sería negligible.

Otros autores han señalado que la PGI<sub>2</sub> puede inducir su actividad biológica a través de la activación del receptor EP4 de la PGE2<sup>92,93</sup>, y también mediante la unión al receptor del TXA<sub>2</sub>, TP<sup>94</sup>. De hecho, se ha involucrado al receptor TP en la regularización de la neovascularización durante el proceso de oncogénesis<sup>95</sup>. Además, en estudios previos, hemos descrito que la capacidad de la PGE2 de inducir angiogénesis *in vitro* dependía básicamente de la activación de los receptores EP4 en las células endoteliales<sup>96</sup>.

Por lo tanto, exploramos la habilidad del AH23848 (antagonista dual EP-4/TP) y del SQ29548 (antagonista TP) de inhibir la formación *in vitro* de vasos inducida por la cPGI<sub>2</sub>. Comprobamos que únicamente el H23848 inhibió de forma significativa la angiogénesis inducida por cPGI<sub>2</sub>, sugiriendo en consecuencia que era el EP4 y no el TP el receptor implicado en esta respuesta. Esta suposición quedó reforzada por

## DISCUSIÓN

la acción de CJ42794, un antagonista más específico de EP-4, que también inhibió la angiogénesis inducida por cPGI<sub>2</sub>.

No descartamos la posibilidad de que otros receptores de prostanooides puedan encontrarse también involucrados, ya que no tenemos la evidencia directa de la unión de PGI<sub>2</sub> a EP4. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el principal receptor implicado en la inducción in vitro de angiogénesis por parte de la cPGI<sub>2</sub> es EP4.

Finalmente, evaluamos los niveles de expresión de genes responsables de la codificación de una serie de citoquinas relacionadas con el mecanismo de angiogénesis, y analizamos si existía correlación con los niveles de expresión de la PGIS. Los genes que analizamos fueron: el VEGF, SDF-1, IL-8 y el TGF-β. Además también analizamos la expresión del receptor del SDF-1, el CXCR4. Sólo encontramos una relación significativa entre los valores de expresión de la PGIS y los del SDF-1 y de su receptor el CXCR4. EL eje SDF-1/CXCR4 se ha asociado con la progresión tumoral y la diseminación metastásica<sup>97,98</sup>. El SDF-1 cuenta con la capacidad de atraer las células endoteliales y células progenitoras de las células endoteliales, las cuales expresan CXCR4<sup>99,100</sup>. Además, existen evidencias que señalan que la interacción entre las células tumorales y las células del estroma influye en la progresión del tumor<sup>101,102</sup>. Por lo tanto, podemos concluir que el incremento de la actividad del eje SDF-1/CXCR4 en el grupo de pacientes con una expresión elevada de la PGIS es consistente con el hecho de que este grupo de pacientes presente un nivel de vascularización más elevado.

Todos estos hallazgos, junto con la observación de que los pacientes con unos niveles de expresión de PGIS altos contaron con una mejor respuesta al tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia, indican la existencia de una relación entre el nivel de vascularización y la respuesta al tratamiento con radioterapia en los pacientes con CECC.

La actividad pro-angiogénica de la PGIS podría contar con una papel terapéutico al incrementar la capacidad de respuesta al tratamiento con radioterapia. En este sentido, fármacos que incrementasen la actividad PGIS podrían jugar un papel relevante en el tratamiento de los pacientes con CECC tratados con radioterapia. Se ha demostrado que los retinoides tienen la capacidad de modular el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis, y han sido propuestos como agentes con potencial terapéutico en diferentes modelos tumorales<sup>103,104</sup>. Además se ha demostrado que tienen actividad pro-angiogénica<sup>105,106</sup> y que inducen la expresión de la PGIS en las células endoteliales<sup>107</sup>. Nuestros resultados sugieren que los retinoides podrían tener un cierto interés como elemento coadyuvante en los pacientes con CECC candidatos a un tratamiento con radioterapia.

## Conclusiones

## Conclusiones

1. Los niveles de expresión de la PGIS y la producción de PGI<sub>2</sub> ex vivo de las muestras de tejido tumoral fueron significativamente inferiores a los correspondientes al tejido sano.
2. Los pacientes con CECC tratados con radioterapia o quimiorradioterapia con niveles de expresión de PGIS elevados tuvieron mejor control local, regional y a distancia de la enfermedad. La supervivencia ajustada a los 5 años de estos pacientes fue del 90.2%, reduciéndose al 60.5% en el caso de los pacientes con niveles de expresión bajos.
3. Las células tumorales no expresan la PGIS ni, en consecuencia, sintetizan PGI<sub>2</sub>. La fuente principal de la PGI<sub>2</sub> a nivel del microambiente tumoral son los fibroblastos y, sobre todo, las células endoteliales.
4. Las células tumorales producen un incremento de la síntesis de PGI<sub>2</sub> en los fibroblastos y células endoteliales mediante la inducción de la expresión de la COX-2, sin modificar los niveles de expresión de la PGIS.
5. La incubación en presencia de carbaprostaciclina, un análogo de la PGI<sub>2</sub>, (cPG2) no modificó la proliferación celular, la supervivencia, ni la sensibilidad a la radioterapia de líneas celulares de CECC.
6. La PGI<sub>2</sub> induce angiogénesis *in vitro* a través de la activación del receptor EP4.
7. Los niveles de expresión de la PGIS se correlacionan con la densidad vascular en los CECC. Dado que los pacientes con niveles altos de PGIS presentan una mejor respuesta a la radioterapia, deducimos que la vascularización juega un papel importante favoreciendo la respuesta al tratamiento con radioterapia en los pacientes con CECC.

## **Bibliografía**

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Esti-mates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-2917.
- 2.- Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R, EURO CARE Working Group. EURO CARE-4. Sur-vival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*. 2009;45:931-991.
- 3.- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:24-35.
- 4.- von Euler US. History and development of prostaglandins. *Gen Pharmacol*. 1983;14:3-6.
- 5.- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976 Oct 21;263(5579):663-5.
- 6.- Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal* 1989;259(2):315-324.
- 7.- Bunn PA Jr, Keith RL. The future of cyclooxygenase-2 inhibitors and other inhibitors of the eicosanoid signal pathway in the prevention and therapy of lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2002 May;3(4):271-7
- 8.- K. Fukumoto, Y. Yano, N. Virgona, H. Hagiwara, H. Sato, H. Senba, K. Suzuki, R. Asano, K. Yamada, T. Yano, Peroxisome proliferator-activated receptor delta as a molecular target to regulate lung cancer cell growth, *FEBS Lett*. 579 (2005) 3829-3836.
- 9.- Nyla Dil, Abhijit G Banerjee. Knockdown of aberrantly expressed nuclear localized decorin attenuates tumour angiogenesis related mediators in oral cancer progression model in vitro. *Head Neck Oncol*. 2012; 4: 11.
- 10.- Wang J, Ikeda R, Che XF, Ooyama A, Yamamoto M, Furukawa T, Hasui K, Zheng CL, Tajitsu Y, Oka T, Tabata S, Nishizawa Y, Eizuru Y, Akiyama S. VEGF expression is augmented by hypoxia-induced PGIS in human fibroblasts. *Int J Oncol*. 2013 Sep;43(3):746-54.
- 11.- Brunton Laurence L. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition. Section IV. Inflamación, inmunomodulación y hematopoyesis. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2011. ISBN 978-0-07-162442-8
- 12.- Peek RM Jr. Prevention of colorectal cancer through the use of COX-2 selective inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;54 Suppl 1:S50-6.
- 13.- Jung, TTK, Berlinger NT, Juhn SK. Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study. *Laryngoscope* 1985;95:307-12.
- 14.- Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002;8:289-293.
- 15.- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276:18563-18569.
- 16.- Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61.
- 17.- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity.



## BIBLIOGRAFÍA

- Trends Immunol. 2002;23:144-150.
- 18.- Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem*. 2002;277:50828-50833.
- 19.- Chan G, Boyle JO, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59:991-994.
- 20.- Sudbø J, Ristimäki A, Sondresen JE, Kildal W, Boysen M, Koppang HS, Reith A, Risberg B, Nesland JM, Bryne M. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions. *Oral Oncol* 2003;39:497-505.
- 21.- Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoike K, Ito H. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol* 2005;41:304-312.
- 22.- Terakado N, Shintani S, Yano J, Chunnan L, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:383-389.
- 23.- Cho EI, Kowalski DP, Sasaki CT, Haffty BG. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of COX-2 expression for local relapse in T1-2N0 larynx cancer treated with primary radiation therapy. *Laryngoscope* 2004;114:2001-2008.
- 24.- Li N, Sood S, Wang S, Fang M, Wang P, Sun Z, Yang CS, Chan X. Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of Zileuton and celecoxib. *Clin Cancer Res* 2005;11:2089-2096.
- 25.- Feng L, Wang Z. Chemopreventive effect of celecoxib in oral precancers and cancers. *Laryngoscope* 2006;116:1842-1845.
- 26.- Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem* 2003;278:19396-19405.
- 27.- Cohen EG, Almahmeed T, Du B, Golijanin D, Boyle JO, Soslow RA, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:3425-3430.
- 28.- Kawata R, Hyo S, Maeda T, Urade Y, Takenaka H. Simultaneous expresión of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase in squamous cell carcinoma of the larynx. *Acta Otolaryngol* 2006;126:627-632.
- 29.- Murakami M, Nakashima K, Kamei D, et al. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 2003; 278:37937-37947.
- 30.- Camacho M, León X, Fernández-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2008 Sep;30:1175-1181.
- 31.- Alcolea S, Anton R, CamachoM, et al. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE2. *J Lipid Res* 2012; 54:630-642.
- 32.- Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective upregulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol*.2001 Sep 1;167(5):2831-8.
- 33.- Wade ML, Fitzpatrick FA. Nitric oxide modulates the activity of the hemoproteins

## BIBLIOGRAFÍA

- prostaglandin I2 synthase and thromboxane A2 synthase. *Arch Biochem Biophys*. 1997 Nov 15;347(2):174-80.
- 34.- Tanabe T, Miyata A, Nanayama T, Tone Y, Ihara H, Toh H, Takahashi E, Ullrich V. Human genes for prostaglandin endoperoxide synthase-2, thromboxane synthase and prostacyclin synthase. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*.1995;23:133-5.
- 35.- Nüsing R, Goerig M, Habenicht AJ, Ullrich V. Selective eicosanoid formation during HL-60 macrophage differentiation. Regulation of thromboxane synthase. *Eur J Biochem*. 1993 Mar 1;212(2):371-6.
- 36.- Reka AK, Goswami MT, Krishnapuram R, Standiford TJ, Keshamouni VG. Molecular cross-regulation between PPAR- $\gamma$  and other signaling pathways: mplications for lung cancer therapy. *Lung Cancer*. 2011 May;72(2):154-9. Epub 2011 Feb 26. Review.
- 37.- Hatae T, Wada M, Yokoyama C, et al. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR $\delta$ . *J Biol Chem* 2001;276:46260-46267.
- 38.- Hsu YH, Chen CH, Hou CC, et al. Prostacyclin protects renal tubular cells from gentamicin-induced apoptosis via a PPAR $\alpha$ -dependent pathway. *Kidney Int* 2008;73:578-587.
- 39.- Nemenoff R, Meyer AM, Hudish TM, et al.. Prostacyclin prevents murine lung cancer independent of the membrane receptor by activation of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Prev Res* 2008;1:349-356.
- 40.- Hara S, Miyata A, Yokoyama C, et al. Isolation and molecular cloning of prostacyclin synthase from bovine endothelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:19897-19903.
- 41.- Miyata A, Hara S, Yokoyama C, et al. Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:1728-1734.
- 42.- W.L. Smith, D.L. DeWitt, M.L. Allen, Bimodal distribution of the prostaglandin I2 synthase antigen in smooth muscle cells, *J. Biol. Chem*. 258 (1983) 5922-5926.
- 43.-Siegler, T. Klein, M.H. Zou, P. Fritz, M. Komhoff, Distribution and cellular localization of prostacyclin synthase in human brain, *J. Histochem. Cytochem*. 48 (2000) 631-641.
- 44.- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- 45.- Cathcart MC, Gray SG, Baird AM, Boyle E, Gately K, Kay E, Cummins R, Pidgeon GP, O'Byrne KJ. Prostacyclin synthase expression and epigenetic regulation in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011 Nov 15;117(22):5121-32.
- 46.- Wang J, Zhang J, Sun J, Han J, Xi Y, Wu G, Duan KX, Zhang M, Zhou S, Liu Q. Prostacyclin administration as a beneficial supplement to the conventional cancer chemotherapy. *Med Hypotheses*. 2011 May;76(5):695-6.
- 47.- Cathcart MC, Reynolds JV, O'Byrne KJ, Pidgeon GP. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr;1805(2):153-66.
- 48.- Keith RL, Karoor V, Mozer AB, Hudish TM, Le M, Miller YE. Chemoprevention of murine lung cancer by gefitinib in combination with prostacyclin synthase overexpression. *Lung Cancer*. 2010 Oct;70(1):37-42.
- 49.- Nemenoff R, Meyer AM, Hudish TM, Mozer AB, Snee A, Narumiya S, Stearman RS, Winn RA, Weiser-Evans M, Geraci MW, Keith RL. Prostacyclin prevents murine lung cancer independent of the membrane receptor by activation of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008 Oct;1(5):349-56.

## BIBLIOGRAFÍA

- 50.- Keith RL, Geraci MW. Prostacyclin in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006 Jul;1(6):503-5. Review. PubMed PMID: 17409908.
- 51.- Stearman RS, Grady MC, Nana-Sinkam P, Varella-Garcia M, Geraci MW. Genetic and epigenetic regulation of the human prostacyclin synthase promoter in lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res.* 2007 Mar;5(3):295-308.
- 52.- P. Nana-Sinkam, H. Golpon, R.L. Keith, R.J. Oyer, S. Sotto-Santiago, M.D. Moore, W. Franklin, R.A. Nemenoff, M.W. Geraci, Prostacyclin in human non-small cell lung cancers, *Chest* 125 (2004) 141S.
- 53.- R.S. Stearman, L. Dwyer-Nield, L. Zerbe, S.A. Blaine, Z. Chan, P.A. Bunn Jr., G.L. Johnson, F.R. Hirsch, D.T. Merrick, W.A. Franklin, A.E. Baron, R.L. Keith, R.A. Nemenoff, A.M. Malkinson, M.W. Geraci. Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen induced murine model., *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 1763-1775.
- 54.- P. Pradono, R. Tazawa, M. Maemondo, M. Tanaka, K. Usui, Y. Saijo, K. Hagiwara, T. Nukiwa, Gene transfer of thromboxane A(2) synthase and prostaglandin I(2) synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth, *Cancer Res.* 62 (2002) 63-66.
- 55.- R.L. Keith, Y.E. Miller, T.M. Hudish, C.E. Girod, S. Sotto-Santiago, W.A. Franklin, R.A. Nemenoff, T.H. March, S.P. Nana-Sinkam, M.W. Geraci, Pulmonary prostacyclin synthase overexpression chemoprevents tobacco smoke lung carcinogenesis in mice, *Cancer Res.* 64 (2004) 5897-5904.
- 56.- Keith RL, Blatchford PJ, Kittelson J, Minna JD, Kelly K, Massion PP, Franklin WA, Mao J, Wilson DO, Merrick DT, Hirsch FR, Kennedy TC, Bunn PA Jr, Geraci MW, Miller YE. Oral iloprost improves endobronchial dysplasia in former smokers. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4:793-802.
- 57.- Nemenoff R, Meyer AM, Hudish TM, Mozer AB, Snee A, Narumiya S, Stearman RS, Winn RA, Weiser-Evans M, Geraci MW, Keith RL. Prostacyclin prevents murine lung cancer independent of the membrane receptor by activation of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008;1:349-356.
- 58.- K. Fukumoto, Y. Yano, N. Virgona, H. Hagiwara, H. Sato, H. Senba, K. Suzuki, R. Asano, K. Yamada, T. Yano, Peroxisome proliferator-activated receptor delta as a molecular target to regulate lung cancer cell growth, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3829-3836.
- 59.- V.G. Keshamouni, R.C. Reddy, D.A. Arenberg, B. Joel, V.J. Thannickal, G.P. Kalemkerian, T.J. Standiford, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer, *Oncogene* 23 (2004) 100-108.
- 60.- Hatae T, Wada M, Yokoyama C, Shimonishi M, Tanabe T. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem.* 2001; 276:46260-46267.
- 61.- F.G. Buchanan, W. Chang, H. Sheng, J. Shao, J.D. Morrow, R.N. DuBois, Upregulation of the enzymes involved in prostacyclin synthesis via Ras induces vascular endothelial growth factor, *Gastroenterology* 127 (2004) 1391-1400.
- 62.- D. Bishop-Bailey, Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system, *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000) 823-834.
- 63.- R.A. Gupta, J. Tan, W.F. Krause, M. Geraci, T.M. Willson, S.K. Dey, Prostacyclin mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 13275-13280.
- 64.- K.C. Cuneo, A. Fu, K.L. Osusky, L. Geng, Effects of vascular endothelial growth factor receptor inhibitor SU5416 and prostacyclin on murine

## BIBLIOGRAFÍA

- lung metastasis, *Anticancer Drugs* 18 (2007) 349-355.
- 65.- M. Schirner, M.R. Schneider, Inhibition of metastasis by cicaprost in rats with established SMT2A mammary carcinoma growth, *Cancer Detect. Prev.* 21 (1997) 44-50.
- 66.- Cathcart MC, Reynolds JV, O'Byrne KJ, Pidgeon GP. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1805:153-166.
- 67.- Ermert L, Dierkes C, Ermert M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors. *Clin Cancer Res.* 2003 May;9(5):1604-10.
- 68.- DuBois RN. Evaluation of the whole prostaglandin biosynthetic pathway in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 May;9(5):1577-8.
- 69.- Keith RL, Miller YE, Hoshikawa Y, Moore MD, Gesell TL, Gao B, Malkinson AM, Golpon HA, Nemenoff RA, Geraci MW. Manipulation of pulmonary prostacyclin synthase expression prevents murine lung cancer. *Cancer Res.* 2002 Feb 1;62(3):734-40.
- 70.- León X, Orús C, Quer M. Diseño, mantenimiento, y explotación de una base de datos oncológica para pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2002;53:185-90
- 71.- Brú A, Souto JC, Alcolea S, et al. Tumour cell lines HT-29 and FaDu produce proinflammatory cytokines and activate neutrophils in vitro. Possible applications for neutrophil-based anti-tumour treatment. *Mediat Inflamm* 2009; 2009:817498.
- 72.- Camacho M, Godessart N, Antón R, et al. Interleukin-1 enhances the ability of cultured umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J Biol Chem* 1995; 270:17279-17286.
- 73.- Godessart N, Camacho M, López-Belmonte J, et al. Prostaglandin H-synthase-2 is the main enzyme involved in the biosynthesis of octadecanoids from linoleic acid in human dermal fibroblasts stimulated with IL-1. *J Invest Dermatol* 1996; 107:726-732.
- 74.- Camacho M, López-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and PGI-synthase activity. *Circ Res* 1998; 83:353-365.
- 75.- Kreutzer M, Fauti T, Kaddatz K, et al. Specific components of prostanoid-signaling pathways are present in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2007; 18:497-501.
- 76.- Tennis MA1, Van Scoyk M, Heasley LE, Vandervest K, Weiser-Evans M, Freeman S, Keith RL, Simpson P, Nemenoff RA, Winn RA. Prostacyclin inhibits non-small cell lung cancer growth by a frizzled 9-dependent pathway that is blocked by secreted frizzled-related protein 1. *Neoplasia.* 2010 Mar;12(3):244-53
- 77.- Cerezo L, López C, de la Torre A, Suárez D, Hervás A, Ruiz A, et al. Incidence of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer and outcomes after chemoradiation in a population of heavy smokers. *Head Neck* 2014;36:782-786.
- 78.- Rodrigo JP, Heideman DA, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Díaz Molina JP, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer.* 2014;134:487-92.
- 79.- Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, et al. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* 2005; 69:107-127.
- 80.- Dunphy F, Stack BC Jr, Boyd JH, Dunleavy TL, Kim HJ, Dunphy CH. Microvessel density in advanced head and neck squamous cell

## BIBLIOGRAFÍA

- carcinoma before and after chemotherapy. *Anticancer Res.* 2002 May;22(3):1755-8.
- 81.- Calvin DP, Hammond ME, Pajak TF, Trotti AM, Meredith RF, Rotman M, Jones CU, Byhardt RW, Demas WF, Ang KK, Fu KK; Radiation Therapy Oncology Group 90-03 Trial. Microvessel density  $\geq 60$  does not predict for outcome after radiation treatment for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: results of a correlative study from the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 90-03 Trial. *Am J Clin Oncol.* 2007 Aug;30(4):406-19.
- 82.- Lövey J, Lukits J, Remenár E, Koroncay K, Kásler M, Németh G, Tímár J. Antiangiogenic effects of radiotherapy but not initial microvessel density predict survival in inoperable oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol.* 2006 Mar;182(3):149-56.
- 83.- Shintani S, Kiyota A, Mihara M, Nakahara Y, Terakado N, Ueyama Y, Matsumura T. Association of preoperative radiation effect with tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Oct;91(10):1051-7.
- 84.- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Nov;7(11):3399-403.
- 85.- Takagi S, Inenaga R, Oya R, Nakamura S, Ikemura K. Blood vessel density correlates with the effects of targeted intra-arterial carboplatin infusion with concurrent radiotherapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Br J Cancer.* 2006 Jun 5;94(11):1580-5.
- 86.- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med.* 2004 Feb;10(2):145-7. Epub 2004 Jan 25.
- 87.- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL, Fountzilias G. Angiogenesis vs. response after combined chemoradiotherapy of squamous cell head and neck cancer. *Int J Cancer.* 1999 Mar 15;80(6):810-7.
- 88.- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL. High DLL4 expression in tumour-associated vessels predicts for favorable radiotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer (HNSCC). *Angiogenesis.* 2013 Apr;16(2):343-51.
- 89.- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; 79:1193-1226.
- 90.- Hatae T, Wada M, Yokoyama C, et al. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR. *J Biol Chem* 2001; 276:46260-46267.
- 91.- Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, et al. Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:63-69.
- 92.- Jones RL, Chan K. Distinction between relaxations induced via prostanoid EP(4) and IP(1) receptors in pig and rabbit blood vessels. *Br J Pharmacol* 2001; 134:313-324.
- 93.- Rehal S, Blanckaert P, Roizes S, et al. Characterization of biosynthesis and modes of action of prostaglandin E2 and prostacyclin in guinea pig mesenteric lymphatic vessels. *Br J Pharmacol* 2009; 158:1961-1970.
- 94.- Eskildsen MP, Hansen PB, Stubbe J, et al. Prostaglandin I2 and prostaglandin E2 modulate human intrarenal artery contractility through

## BIBLIOGRAFÍA

- prostaglandin E2-EP4, prostacyclin-IP, and thromboxane A2-TP receptors. *Hypertension* 2014; 64: 551-556.
- 95.- Ekambaram P, Lambiv W, Cazzolli R, et al. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emergent paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30:397-408.
- 96.- Camacho M, Dilme J, Sola-Villa D, et al. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J Lipid Res* 2013; 54:3506-3515.
- 97.- Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:2927-2931.
- 98.- Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, et al. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Onco Targets Ther* 2013; 6:1347-1361.
- 99.- Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* 1999; 154:1125-1135.
- 100.- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107:1322-1328.
- 101.- Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15:97-101.
- 102.- Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18:27-34.
- 103.- Dragnev KH, Petty WJ, Dmitrovsky E. Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: S150-S156.
- 104.- Montrone M, Martorelli D, Rosato A, et al. Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009; 9:113-131.
- 105.- Maeno T, Tanaka T, Sando Y, et al. Stimulation of vascular endothelial growth factor gene transcription by all trans retinoic acid through Sp1 and Sp3 sites in human bronchioloalveolar carcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:246-253.
- 106.- Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, et al. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development* 2003; 130:6465-6474.
- 107.- Camacho M, Rodríguez C, Salazar J, et al. Retinoic acid induces PGI-synthase expression in human endothelial cells. *J Lipid Res* 2008; 49:1707-1714.

# **Prostacyclin-synthase expression in head and neck carcinoma patients and its prognostic value in the response to radiotherapy**

Mercedes Camacho,<sup>1\*</sup> Zenaida Piñeiro,<sup>1,2</sup> Sonia Alcolea,<sup>1</sup>  
Jacinto García,<sup>2</sup> Josep Balart,<sup>3</sup> Ximena Terra,<sup>4</sup>  
Francesc-Xavier Avilés-Jurado,<sup>4</sup> Marta Soler,<sup>5</sup> Miquel Quer,<sup>2</sup>  
Xavier León<sup>2,†\*</sup> and Luis Vila<sup>1†</sup>

Journal of Pathology  
J Pathol 2015; 235: 125–135

## Prostacyclin-synthase expression in head and neck carcinoma patients and its prognostic value in the response to radiotherapy

Mercedes Camacho,<sup>1\*</sup> Zenaida Piñeiro,<sup>1,2</sup> Sonia Alcolea,<sup>1</sup> Jacinto García,<sup>2</sup> Josep Balart,<sup>3</sup> Ximena Terra,<sup>4</sup> Francesc-Xavier Avilés-Jurado,<sup>4</sup> Marta Soler,<sup>5</sup> Miquel Quer,<sup>2</sup> Xavier León,<sup>2,†\*</sup> and Luis Vila<sup>†</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Angiology, Vascular Biology and Inflammation, Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau) and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Otorhinolaryngology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Radiation Oncology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Otorhinolaryngology Department, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, ISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

<sup>5</sup> Scientific and Technical Services Platform of the Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

\*Correspondence to: Dr Mercedes Camacho, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, S. Antonio M<sup>o</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. e-mail: mcamacho@santpau.cat; Dr Xavier León, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, S. Antonio M<sup>o</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. e-mail: xleon@santpau.cat

†These authors contributed equally to this work.

### Abstract

Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) plays a role in cancer progression but the mechanism is currently poorly understood. Additionally, no data are available about the prognostic value of the PGI<sub>2</sub> pathway in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) therapy. We evaluated the expression of the PGI<sub>2</sub> pathway in HNSCC patients. PGI<sub>2</sub> production and PGI synthase (PGIS) expression, in terms of mRNA (RT-PCR) and protein (immunoblotting), were lower in tumour samples than in non-tumoural mucosa, whereas, as expected, COX-2 expression was increased in HNSCC tumour samples. Using local control of the tumour after radiotherapy or chemoradiotherapy as a dependent variable, patients were classified into two categories of PGIS transcript levels. The high-PGIS group had a significantly lower frequency of local and distant failure than the low-PGIS group, and the 5-year cancer-specific survival was higher [90.2% (95% CI 81.0–99.4%) versus 60.5% (95% CI 44.4–76.6%)]. None of the four HNSCC cell lines analysed expressed PGIS and therefore they did not produce PGI<sub>2</sub>. However, HNSCC-conditioned media enhanced PGI<sub>2</sub> production in endothelial cells (ECs). The stable analogue of PGI<sub>2</sub>, carbaprostacyclin (cPGI<sub>2</sub>), exerted little effect on HNSCC cell line migration, and no effect on cell cycle distribution or proliferation rate after radiation injury was observed. Nevertheless, cPGI<sub>2</sub> promoted EP-4-dependent *in vitro* angiogenesis. Von Willebrand factor expression (EC marker) and capillary density were significantly higher in the group of patients with high expression of PGIS. Our results indicate that PGIS expression was associated with radiotherapy efficiency. Although we do not provide direct evidence of a relationship between tumour vascularization and radiotherapy efficiency, our results suggest that the effect of PGI<sub>2</sub> is related to its ability to promote vascularization. These results also support the concept that co-adjuvant therapy with PGIS enhancers, such as retinoids, could have therapeutic value for HNSCC treatment.

Copyright © 2014 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** head and neck cancer; prostacyclin synthase; PGI<sub>2</sub>; endothelial cells; radiotherapy

Received 3 June 2014; Revised 4 September 2014; Accepted 23 September 2014

No conflicts of interest were declared.

### Introduction

The increasing interest in the role of prostanoids in tumour progression stems from the large epidemiological trials studying aspirin users and non-users. Findings from these trials indicate that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), all of which are COX inhibitors, could be beneficial against the development and growth of malignancies [1].

COX-1 and COX-2 catalyse the initial step in the formation of prostaglandins (PGs) and thromboxanes

(Tx<sub>s</sub>), collectively referred to as prostanoids. Biosynthesis of the 2-series prostanoids initiates with the COX-catalysed formation of PGH<sub>2</sub> from arachidonic acid (AAc). PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, and TXA<sub>2</sub> are formed from PGH<sub>2</sub> in reactions catalysed by specific synthases [2]. These COX-downstream synthases confer a cell-specific prostanoid profile. COX-2 is currently the focus of much attention. Unlike COX-1, which is widely expressed in non-pathological settings, expression of COX-2 is restricted to a few cell types and tissues. However, in inflamed tissues and tumours, including head

and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs), COX-2 is overexpressed in a wide range of cell types [3,4]. Pro-inflammatory cytokines, growth factors, hormones, and tumour promoters are able to transiently and selectively induce COX-2 [2].

PGE<sub>2</sub> is the prostanoid that has received most attention to date because high levels of this compound have been found in many tumours, including HNSCC [5]. PGI<sub>2</sub> has been less studied in the field of cancer, particularly in HNSCC. It has been reported to have anti-tumoural activity in lung cancer in animal and *in vitro* models [6–8]. PGI synthase (PGIS) expression has been found to have statistically significant prognostic value for patient survival in lung cancer [9]. Expression of PGIS and its prognostic capacity have not been evaluated in HNSCC patients. The aim of the present study was to assess PGIS expression in pretreatment biopsy samples of HNSCC patients and to evaluate the prognostic capacity of PGIS expression in patients treated with radiotherapy or chemoradiotherapy.

## Materials and methods

### Patients and treatment

The biopsies used in the study were obtained from 98 consecutive patients before treatment for a pathologically confirmed HNSCC. All patients were diagnosed at our centre between 2004 and 2008 and treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. Whenever possible, in addition to the tumour biopsy ( $n = 98$ ), we obtained a sample of non-tumoural distal mucosa, more than 5 cm away from the tumour ( $n = 72$ ), and a sample of adjacent mucosa from the proximal (<1 cm) tumour resection margin outside the tumour area ( $n = 20$ ). Table 1 shows the patients' clinical characteristics.

Radiotherapy consisted of a total dose of 70–74 Gy to the primary site and metastatic neck nodes, and 50 Gy to the neck in N0 patients (except patients with a T1N0 glottic carcinoma). Treatment was administered by continuous-course radiotherapy 5 days a week, 2 Gy per session, and 1.2 Gy twice daily in normofractionated and hyperfractionated treatments, respectively. Patients treated with chemoradiotherapy received three cycles of 100 mg/m<sup>2</sup> cisplatin on days 1, 21, and 43 of radiotherapy or carboplatin 1.5 AUC every week. The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from each patient. All procedures were reviewed by the Institutional Review Board at HSCSP. The investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

### Analysis of mRNA levels

Tissue specimens of all patients included in the study were immediately stabilized by inclusion in RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) after biopsy and stored at –80 °C until processing. Total RNA

Table 1. Characteristics of the patients included in the study

Characteristic	No (%)
Age	– 62.4 (38.2–92.3)*
Sex	Male 88 (89.8) Female 10 (10.2)
Tumour location	Oral cavity–oropharynx 48 (49.0) Larynx–hypopharynx 50 (51.0)
T category	T1–2 51 (52.0) T3–4 47 (48.0)
N category	N0 53 (54.1) N+ 45 (45.9)
Tumour differentiation	Good 5 (5.1) Moderate 82 (83.7) Poor 11 (11.2)
Treatment	Radiotherapy 50 (51.0) Chemoradiotherapy 48 (49.0)
Radiation schedule	Once daily 68 (79.6) Twice daily 20 (20.4)

\*Median (range) in years.

was extracted and RT-PCR performed as described previously [10]. Relative expression was expressed as transcript/ $\beta$ -actin ratios.

### Analysis of PGIS and COX-2 protein in patients' tissue samples

COX-2 and PGIS protein expression was analysed in 20 paired non-tumoural and HNSCC samples. Tissues were homogenized and protein extracts were analysed by western blot as previously described [11]. Briefly, tissue samples were washed twice with PBS and homogenized in a 1.5 ml polypropylene microtube with a Kontes motor-driven pellet pestle in lysis buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.4) containing protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 1 mM EDTA, and 0.1% Triton X-100. Protein concentration was determined by the Bradford method. Total protein equivalents were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred onto PVDF membranes (Immobilon-P; Millipore, Millipore Ibérica, Spain). Membranes were incubated with antibodies against human PGIS or COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Bound antibody was detected using the appropriate horseradish peroxidase-conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark) and a chemiluminescent detection system (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Results were normalized by  $\beta$ -actin (Sigma) used as a loading control.

### Determination of PGI<sub>2</sub> released by non-tumoural adjacent mucosa and HNSCC tumour samples

PGI<sub>2</sub> production was measured in 20 paired non-tumoural adjacent mucosa and HNSCC samples. 100–200 mg tissue fragments were incubated in 0.5 ml of DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) for 48 h in a cell incubator. Culture medium was then recovered and kept at –80 °C until PGI<sub>2</sub> analysis.

### Tumour cell culture and obtention of the conditioned medium

FaDu (HTB-43, pharynx squamous cell carcinoma cell line), SCC-25 (CRL-1628, tongue carcinoma), SCC-9 (CRL-1629, tongue carcinoma), and CAL-27 (CRL-2095 tongue carcinoma) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured as recommended by the supplier. FaDu-conditioned medium was obtained as described elsewhere [12]. Briefly, FaDu cells were cultured and when the cells reached early confluence, the medium was replaced with fresh medium containing 1% SBF. The conditioned medium was collected 48 h later. It was then centrifuged and stored at –80 °C until use for endothelial cell (EC) stimulation.

### Culture and treatment of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and fibroblasts

ECs were isolated from human umbilical cord veins and cultured as previously described [13]. Cells in the first passage were seeded in six-well plates and cultured in M199 medium containing 20% FBS without heparin and ECGS for 48 h prior to the addition of the stimuli. Stimulation of confluent HUVECs was performed by replacing the medium for DMEM containing 1% FBS (control) or conditioned medium from FaDu cells for the indicated period of time. Cells were recovered for PGIS and COX-2 expression analysis. Human dermal fibroblasts were isolated and cultured as previously described [14,15]. Cells in passage 3–4 were cultured in six-well plates with DMEM containing 10% FBS. When cells reached confluence, the medium was replaced by DMEM containing 1% FBS (control) or conditioned medium from FaDu cells. After the indicated period of time, medium and cells were recovered for 6-oxo-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  and enzyme expression analysis.

### Analysis of PGIS and COX-2 protein expression in HUVECs and fibroblasts

Cell protein extracts were analysed by western blot as previously described [15]. Western blots were performed as described above.

### Characterization of prostanoid biosynthesis by cultured cells

Cells were incubated with 25  $\mu$ mol/l [<sup>14</sup>C]AAc (55–58 mCi/mmol; GE Healthcare) for 10 min as previously described [16]. Prostanoids were analysed by HPLC as previously described [14].

Analysis of PGI<sub>2</sub> concentration in the culture media 6-Oxo-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (stable hydrolysis product of PGI<sub>2</sub>) was analysed by specific enzyme immunoassay (EIA; Cayman Chemical) following the manufacturer's instructions.

### Cell cycle and apoptosis studies

To determine cell cycle distribution, cells were treated with 10  $\mu$ M carbaprostacyclin (cPGI<sub>2</sub>; Cayman Chemical) for 48 h. After treatment, cell cycle and apoptosis were analysed as previously described [15].

### *In vitro* angiogenesis assay

*In vitro* angiogenesis assays were performed as previously described [15]. Briefly, 96-well culture plates were coated with Matrigel (BD Bioscience, San José, CA, USA). HUVECs were then seeded onto the coated plates at 1.75  $\times$  10<sup>4</sup> cells per well in the assay medium and incubated for 4 h. Tube formation images were captured and the level of tube formation was quantified by counting the number of closed polygons in the endothelial mesh.

### Invasion assay

Cell invasion assay was performed using the Radius™ 96-Well Cell Migration Assay Kit (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The measurements were performed as previously described [15]. The detailed experimental procedure can be found in the Supplementary materials and methods.

### Proliferation assay after irradiation

FaDu cells cultured in 60 mm dishes were incubated in the presence or absence of 10  $\mu$ M cPGI<sub>2</sub> in medium containing 1% SBF for 24 h. Cultures were then irradiated at room temperature using 6 MV X-rays from a medical accelerator (Varian, Palo Alto, CA, USA). Radiation was delivered at a dose rate of 6 Gy/min. Single doses of 0, 4, 6, and 8 Gy were administered. Immediately after irradiation, cells were collected by trypsinization, plated in 96-well culture plates at a density of 2.5  $\times$  10<sup>3</sup> cells per well, and cultured in medium containing 10% SBF. After different times of incubation, proliferation was assessed using the XTT colorimetric dye reduction method [Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche Diagnostics] according to the manufacturer's protocol.

### Immunohistochemistry and vessel counting

Four non-consecutive 3- $\mu$ m sections were cut from each patient sample. Paraffin-embedded tissue samples were processed for immunostaining of blood vessels using a monoclonal antibody directed against the EC marker vWF (ref M0616, Dako, diluted 1 : 35). Sections were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex Kit. Diaminobenzidine was used as a chromogen. Vessel count was performed in four photographs  $\times$  200 fields acquired from each section. The vessel counting was averaged for every patient. Any brown-staining EC or EC cluster, clearly separate from adjacent microvessels, tumour cells, and other connective-tissue elements, was considered a single,

countable microvessel. Vessel lumens were not necessary for a structure to be defined as a microvessel.

#### Statistical analysis

SPSS or Sigma-Plot software was used for statistical analysis. When data fitted a normal distribution, statistical significance between more than two groups was assessed using one-way ANOVA and the Student–Newman–Keuls test; the Student *t*-test was used to compare two groups. When normality failed, we used the Mann–Whitney rank sum test to compare two groups and Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks for multiple comparisons (Dunn's method). To determine association between variables, data were  $\log_{10}$  transformed in order to normalize their distribution and the Pearson product moment correlation method was then used. A *p* value below 0.05 was considered significant.

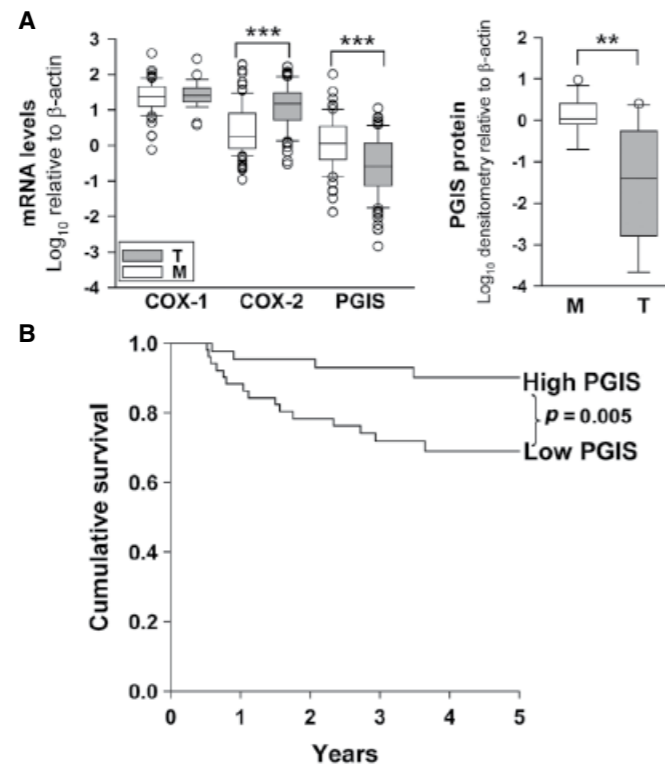
The continuous value of the PGIS expression level was analysed using a classification and regression tree (CART) analysis, considering the local control of the tumour after treatment as a dependent variable. CART

analysis splits the continuous data into segments that are as homogeneous as possible according to the dependent variable. Actuarial survival was estimated according to the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used to compare survival functions. A multivariate analysis was made using a Cox's proportional hazard regression model. The dependent variable was the cancer-specific survival, and the independent variables were the location of the primary tumour, local and regional extension, type of treatment, and category of PGIS expression as defined by CART.

#### Results

##### PGI<sub>2</sub>-biosynthetic machinery is diminished in human HNSCC tumour samples

We examined the expression of PGI<sub>2</sub>-pathway enzymes in 98 tumoural and 72 non-tumoural distal mucosa samples from HNSCC patients by quantitative RT-PCR (Figure 1A). Data distribution did not fit normality.



**Figure 1.** (A) Left: box plot graph of cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2), and prostacyclin synthase (PGIS) transcript levels relative to  $\beta$ -actin ( $\times 1000$ ) in non-tumoural mucosa ( $n = 72$ ) and HNSCC samples ( $n = 98$ ). Right: PGIS protein expression in paired non-tumoural mucosa (M) and tumour (T) samples ( $n = 20$ ).  $^{***}p < 0.01$ ;  $^{**}p < 0.001$ . (B) Cancer-specific survival according to the PGIS expression category; high PGIS,  $n = 45$  and low PGIS,  $n = 53$ .

Expression of COX-1 was similar in both groups of samples, whereas COX-2 increased about 8.5-fold in tumour samples in terms of the median. PGIS transcript levels were 4.5-fold lower in tumour samples. To test whether the reduction of PGIS transcript levels in HNSCC samples led to lower PGIS expression in terms of protein, we analysed paired samples of non-tumoural mucosa and HNSCC samples for PGIS protein by immunoblotting. The results depicted in Figure 1A show that tumours also had lower PGIS protein expression.

##### PGIS mRNA levels correlate with the response of patients to radiotherapy or chemoradiotherapy

We found no significant differences in PGIS mRNA expression levels related to primary location of the tumour, loco-regional extension or histological grade (data not shown,  $p > 0.05$ ). Using local control of the tumour after radiotherapy or chemoradiotherapy as a dependent variable, the CART method classified patients into two categories, high ( $n = 45$ , 45.9%) and low ( $n = 53$ , 54.1%) expression level of PGIS. Table 2 shows the 5-year actuarial survival free of local, regional, and distant failure according to the category of expression of PGIS. Patients with high PGIS showed a significantly lower frequency of local and distant failure than patients with low PGIS. Although the regional control failure of the disease was lower in high-PGIS patients, differences failed to achieve statistical significance (Table 2). There were significant differences in the cancer-specific survival as a function of the mRNA expression level of PGIS. Figure 1B shows cancer-specific survival curves according to the category of PGIS expression. The 5-year cancer-specific survival was 90.2% (95% CI 81.0–99.4%) for patients with a high expression level of PGIS and 60.5% (95% CI 44.4–76.6%) for patients with a low expression level ( $p = 0.005$ ). Table 2 also shows the results of

the multivariate study. PGIS expression was the only variable significantly related to the cancer-specific survival. Considering patients with high-level expression of PGIS as the reference category, patients with low expression of PGIS had a 3.90 higher risk of death as a consequence of the HNSCC (95% CI 1.26–12.03).

##### HNSCC tumour cells and stromal cells cooperate in PGI<sub>2</sub> biosynthesis

To ascertain whether tumour cells were able to produce PGI<sub>2</sub>, four HNSCC cell lines, fibroblasts, and ECs were incubated with labelled AAc. Media were analysed by HPLC. The results in Figure 2A show that tumour cells were unable to produce PGI<sub>2</sub> in terms of 6-oxo-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (stable hydrolysis product of PGI<sub>2</sub>). Moreover, we did not find PGIS in terms of mRNA or protein in any of the tumour cell lines (not shown). In contrast, 6-oxo-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  was found in fibroblasts and EC supernates.

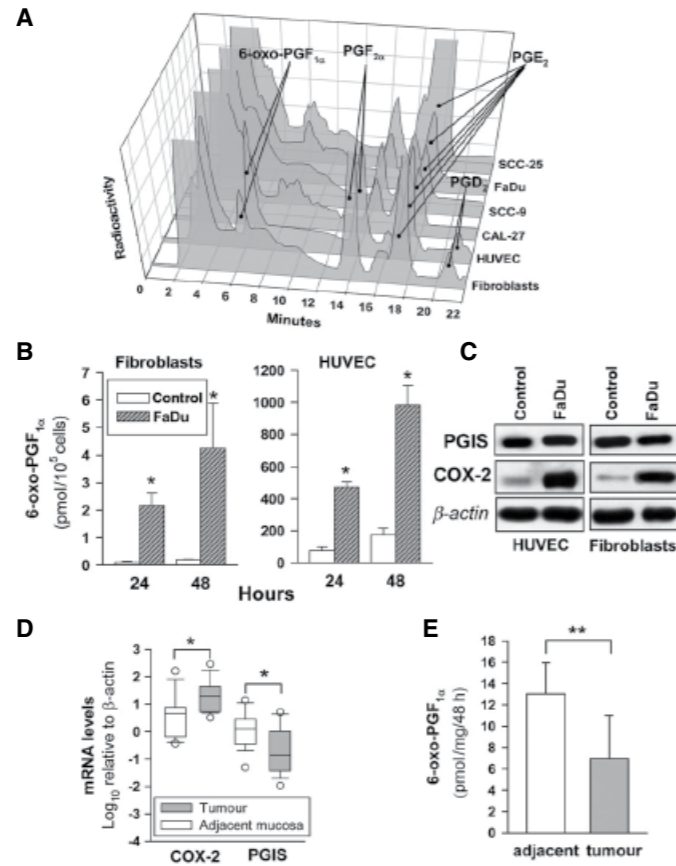
We explored whether HNSCC tumour cells influenced the PGI<sub>2</sub> synthesis pathway in the stromal cell types. Fibroblasts and HUVECs were treated for 24 and 48 h with conditioned medium from the cell line FaDu. In both cell types, PGI<sub>2</sub> production was dramatically increased by FaDu-conditioned media (Figure 2B). The expression of PGIS and COX-2 was then evaluated by immunoblotting. The western blots depicted in Figure 2C clearly show that whereas FaDu-conditioned medium increased COX-2 expression, it did not modify PGIS expression in either fibroblasts or ECs. It is noteworthy that production of PGI<sub>2</sub> by ECs was about 250-fold higher than production by fibroblasts (Figure 2B). PGIS is highly expressed in ECs and it is generally accepted that these cells are the main source of PGI<sub>2</sub> [17].

Assuming the hypothesis that tumour cells produce prostanoids other than PGI<sub>2</sub> via COX-2 and influence neighbouring stroma cells to produce PGI<sub>2</sub>, we analysed

**Table 2.** Five-year survival free of local, regional, and distant recurrence according to the PGIS expression category and results of the multivariate analysis considering the cancer-specific survival as the dependent variable

Five-year survival free of recurrence				
Failure	PGIS	(%)	95% CI	<i>p</i>
Local recurrence	Low	61.8	48.3–75.3	0.014
	High	86.4	76.3–96.5	
Regional recurrence	Low	76.5	61.4–91.6	0.180
	High	90.5	81.7–99.3	
Distant recurrence	Low	74.9	58.1–91.7	0.018
	High	97.8	93.5–100	
Multivariate analysis				
Characteristic		HR	95% CI	<i>p</i>
Location	Larynx–hypopharynx ( $n = 50$ )	1		0.995
	Oral cavity–oropharynx ( $n = 48$ )	1.00	0.37–2.66	
Local extension	T1–T2 ( $n = 51$ )	1		0.581
	T3–T4 ( $n = 47$ )	1.28	0.53–3.10	
Regional extension	N0 ( $n = 53$ )	1		0.234
	N+ ( $n = 45$ )	2.01	0.63–6.40	
Treatment	Radiotherapy ( $n = 50$ )	1		0.903
	Chemoradiotherapy ( $n = 48$ )	1.07	0.33–3.47	
PGIS expression	High ( $n = 45$ )	1		0.018
	Low ( $n = 53$ )	3.90	1.26–12.03	

HR = hazard ratio.



**Figure 2.** (A) Illustrative HPLC chromatograms of the AAc profile of four HNSCC cell lines, fibroblasts, and HUVECs after incubation with  $^{14}\text{C}$ -labelled AAc. Cells were incubated with  $25\ \mu\text{mol/l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]AAc for 10 min and prostanooids were analysed by HPLC. (B) Effect of FaDu-conditioned media on the release of  $\text{PGI}_2$  by fibroblasts and HUVECs. Fibroblasts or HUVECs were incubated with FaDu-conditioned (FaDu) or fresh medium (control) for the indicated period of time. Thereafter, 6-oxo- $\text{PGF}_{1\alpha}$  (stable metabolite of  $\text{PGI}_2$ ) in the media was analysed by EIA, as indicated in the Materials and methods section.  $n = 3$ ; mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  compared with controls. (C) COX-2 and PGIS protein expression in fibroblasts and HUVECs treated with FaDu-conditioned medium for 24 h. Representative immunoblots from three independent experiments with identical results are shown. (D) Box plot graph of the transcript levels of COX-2 and PGIS relative to  $\beta$ -actin ( $\times 1000$ ) in non-tumoural adjacent mucosa and HNSCC samples ( $n = 19$ ). \* $p < 0.05$ . (E) Release of  $\text{PGI}_2$  by HNSCC samples (tumour) and non-tumoural adjacent mucosa (adjacent). Tissue fragments were incubated for 48 h in a cell incubator. Thereafter, 6-oxo- $\text{PGF}_{1\alpha}$  in the media was analysed.  $n = 5$ ; mean  $\pm$  SEM; \*\* $p < 0.01$ .

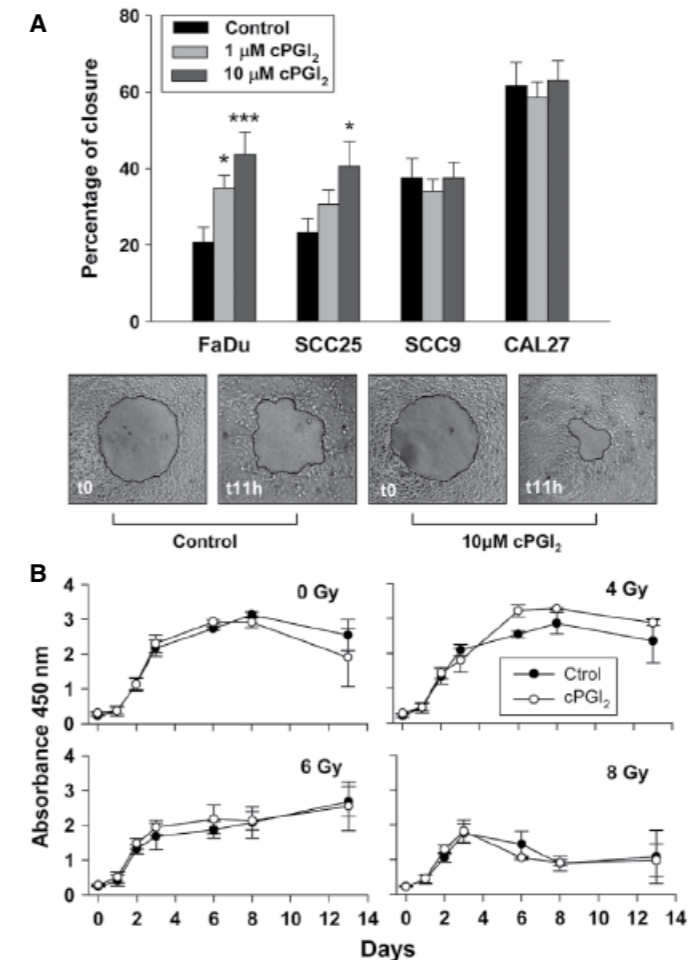
$\text{PGI}_2$  production *ex vivo* and PGIS mRNA expression in paired samples of tumour and adjacent non-tumoural mucosa. The results in Figures 2D and 2E clearly show that although COX-2 expression was higher in tumour samples, production of  $\text{PGI}_2$  was significantly lower.

$\text{PGI}_2$  does not influence cell cycle progression or response to radiation in HNSCC cell lines

We investigated the effect of  $\text{PGI}_2$  on HNSCC tumoural cell lines. First, we explored the effect of c $\text{PGI}_2$  on the invasive capacity of HNSCC cells. An *in vitro* invasion assay in the presence of two concentrations of c $\text{PGI}_2$  was performed with four HNSCC cell lines. The results

depicted in Figure 3A show that only FaDu, and to a lesser extent SCC25, was sensitive to c $\text{PGI}_2$  exposure, increasing the migration ability of the tumour cells.

We also analysed the effect of exposure to c $\text{PGI}_2$  on cell cycle progression by flow cytometry. No differences were found in the cell cycle distribution between c $\text{PGI}_2$ -treated cells and controls in any cell line (Supplementary Figure 1). The annexin V-FITC apoptosis study also showed that c $\text{PGI}_2$  did not influence the percentage of apoptotic or necrotic cells (Supplementary Figure 2). The study in HNSCC patients suggested that PGIS expression was related to the efficiency of radiotherapy. We then compared the effect of radiation on



**Figure 3.** (A) Effect of c $\text{PGI}_2$  on the migration of HNSCC cell lines. Cells were seeded in the assay plate and subjected to treatment: 1% FBS (controls) or 1% FBS plus the indicated concentration of c $\text{PGI}_2$  for a fixed period of time, depending on the cell line. Standard size photographs were printed and the percentage of initial cell-free area invaded was determined as explained in the Supplementary materials and methods. Bars are the mean  $\pm$  SEM;  $n = 6-9$ ; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with controls. Illustrative photographs of FaDu are also shown. (B) Effect of irradiation on FaDu cell proliferation. Cells were incubated in the presence or absence of  $10\ \mu\text{M}$  carbaprostacyclin (c $\text{PGI}_2$ ) for 24 h and then irradiated at different doses. The rate of cell proliferation was assessed by the XTT proliferation assay method.  $n = 5$ ; mean  $\pm$  SEM.

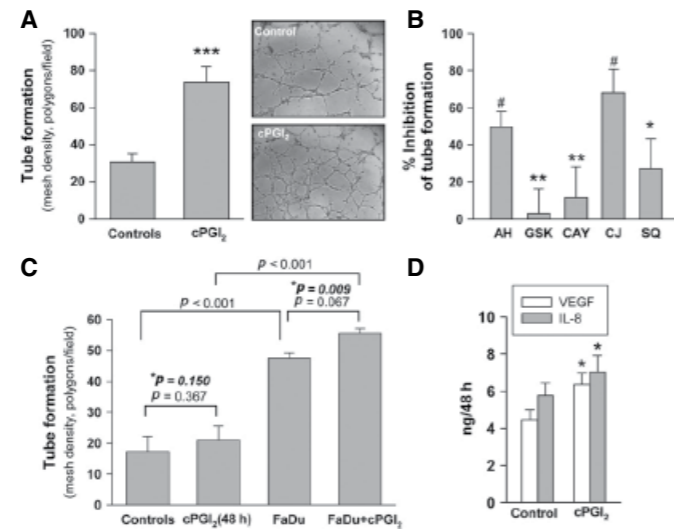
the proliferation rate of c $\text{PGI}_2$ -treated FaDu with that on c $\text{PGI}_2$ -untreated cells. The results in Figure 3 show that exposure of FaDu to c $\text{PGI}_2$  had no significant effect on the proliferation rate of the tumour cell line when exposed to different doses of radiation.

$\text{PGI}_2$  promotes *in vitro* angiogenesis mainly through EP-4 activation

As PGIS in tumours appears to be mainly associated with ECs, to investigate whether  $\text{PGI}_2$  could affect the angiogenic properties of ECs we carried out an assay

of *in vitro* tube formation by HUVECs in Matrigel. The results in the Figure 4A show that treatment with c $\text{PGI}_2$  induced a significant increase of tube formation compared with untreated controls.  $\text{PGI}_2$  may exert its biological effects not only by binding to its canonical receptor IP but also by binding to PPARs [18,19]. Furthermore, it has been reported that activation of PPAR $\delta$  induces angiogenesis [20]. Therefore we investigated the effect of CAY10441 (IP antagonist) and GSK0660 (PPAR $\delta$  antagonist) on c $\text{PGI}_2$ -induced angiogenesis. None of these antagonists modified the effect of c $\text{PGI}_2$  on *in vitro* angiogenesis (Figure 4B),





**Figure 4.** (A) Effect of cPGI<sub>2</sub> on *in vitro* angiogenesis. HUVECs were seeded onto Matrigel in 96-well plates and cells were then exposed to fresh culture medium (controls) or medium containing a final concentration of 10 µmol/l cPGI<sub>2</sub> (cPGI<sub>2</sub>). After 4 h of treatment, photographs were taken and the number of closed polygons in the EC mesh was counted. Bars are the mean ± SEM; *N* = 27 independent experiments performed in triplicate. \**p* < 0.001 versus controls. Representative photographs are also shown (right panels). (B) Percentage of inhibition of cPGI<sub>2</sub>-induced tube formation by the receptor antagonists. Cells were exposed to 10 µmol/l cPGI<sub>2</sub> in the absence or presence of 200 nmol/l AH23848 (AH, EP4/TP antagonist), 1 µmol/l GSK0660 (GSK, PPARδ antagonist), 1 µmol/l CAY10441 (CAY, IP antagonist), 10 µmol/l CJ42794 (CJ, EP-4 antagonist) or 10 µmol/l SQ29548 (SQ, TP antagonist). Angiogenesis was evaluated as described in A. Bars are the mean ± SEM. Every antagonist was assayed in five independent experiments performed in triplicate. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 versus their controls; #*p* < 0.05 versus EC-treated cPGI<sub>2</sub> in the absence of antagonist. (C) Effect of conditioned medium of FaDu on *in vitro* angiogenesis. FaDu cells were cultured in fresh culture medium (FaDu) or in medium containing 10 µmol/l cPGI<sub>2</sub> (FaDu + cPGI<sub>2</sub>) for 48 h. Thereafter, media were added to HUVECs seeded in the Matrigel and tube formation was measured after 4 h. Controls for HUVECs exposed to FaDu-conditioned media were performed with fresh media (Controls) and controls for HUVECs exposed to FaDu + cPGI<sub>2</sub> media were performed with media containing 10 µmol/l cPGI<sub>2</sub> incubated for 48 h in the culture chamber without cells [cPGI<sub>2</sub>(48 h)], prior to the addition to HUVEC. *p*'s are probabilities after ANOVA analysis of the four groups; \**p*'s are probabilities using the *t*-test to pair of groups. (D) Effect of cPGI<sub>2</sub> on the release of pro-angiogenic cytokines by FaDu. Mean ± SEM; *n* = 6; \**p* > 0.05 versus controls.

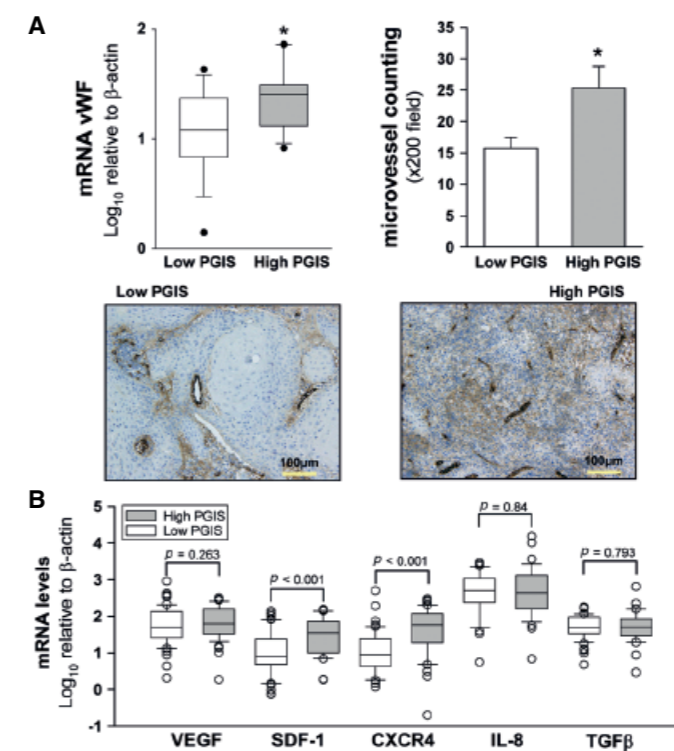
indicating that neither IP nor PPARδ mediated the effect of cPGI<sub>2</sub> in HUVEC tube formation. We have previously reported that PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis *in vitro* was mainly dependent on the EP-4 receptor in ECs [10]. Other authors have also reported that PGI<sub>2</sub> produces biological activities through EP-4 activation [21,22]. To determine whether the activity of cPGI<sub>2</sub> was mediated by EP-4, we studied the effect of AH23848 [EP-4/ thromboxane receptor (TP) antagonist] on the angiogenesis induced by cPGI<sub>2</sub> in HUVECs. The results in Figure 4B show that AH23848 significantly reduced cPGI<sub>2</sub>-induced angiogenesis, whereas SQ29548 (a TP antagonist) did not significantly modify the action of cPGI<sub>2</sub>. The more specific EP-4 antagonist CJ42794 also significantly inhibited tube formation induced by cPGI<sub>2</sub> (Figure 4B).

To analyse whether treatment with cPGI<sub>2</sub> modifies the ability of tumour cells to induce angiogenesis *in vitro*, we performed tube formation assays with conditioned medium obtained from FaDu and from FaDu treated with cPGI<sub>2</sub> for 48 h. The results in Figure 4C show that media from FaDu cultures also promoted tube formation *in vitro*, and induction was significantly higher in ECs

exposed to conditioned medium of FaDu treated with cPGI<sub>2</sub>. Consistently, the concentration of two typically tumour cell-derived pro-angiogenic factors, VEGF and IL-8, was significantly higher in conditioned media of cPGI<sub>2</sub>-treated FaDu than in untreated cells (Figure 4D).

High expression of PGIS in HNSCC tumour samples correlates with high vascularization and elevated CXCL12 (SDF-1) and CXCR4 mRNA levels

To investigate whether differences in tumour PGIS expression were associated with differences in vascularization, we evaluated the capillary density by immunohistochemistry. First, we analysed the transcript levels of vWF as an indicator of tumour endothelium. Figure 5A shows that the group of patients with high PGIS levels displayed significantly higher levels of vWF transcript than the group with low PGIS levels. Tumour blood vessels were identified by vWF immunostaining of tumour sections and consistently with the data of the vWF transcript analysis, capillary density was significantly higher in the group of patients with high PGIS transcript levels (Figure 5A).



**Figure 5.** (A) Left: box plot graph of vWF mRNA levels relative to β-actin (×1000) in low- and high-PGIS expression groups of patients. Right: microvessel density in samples of tumour from four patients with low and high levels of PGIS. \**p* < 0.05 versus low PGIS. Examples of vWF-immunostained samples are also shown. (B) Box plot of mRNA transcript levels of several pro-angiogenic cytokines in tumour samples stratified according to the PGIS expression category. High PGIS, *n* = 45 and low PGIS, *n* = 53.

In both groups of patients, we also evaluated the transcript expression of several factors that influence neovascularization. Interestingly, only SDF-1 and its receptor CXCR4 were very significantly enhanced in the high-PGIS group of patients (Figure 5B).

## Discussion

In a large cohort of HNSCC patients, we showed that PGIS levels were significantly reduced in terms of mRNA and protein in HNSCC tumours compared with normal matched mucosa. These results are consistent with previous studies carried out in human lung tumours [23,24].

Also consistent with a previous report regarding PGIS expression and survival in lung cancer patients [9], we provide evidence of a significant relationship between PGIS expression levels and survival rates for HNSCC patients treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. High levels of PGIS were associated with a lower mortality rate at 5 years and also with a decreased local failure. Nevertheless, some limitations of the study

should be considered: the retrospective design; its heterogeneous nature, which included oral, pharyngeal, and laryngeal cancer patients; and the single-institution setting.

We examined PGIS expression in four HNSCC cell lines and found that none of them expressed PGIS or produced PGI<sub>2</sub>. FaDu-conditioned culture medium increased PGI<sub>2</sub> production and COX-2 expression in fibroblasts and ECs, but it did not modify PGIS expression in these cells. These findings suggest that the low levels of PGIS observed in HNSCC samples compared with normal mucosa were not due to down-regulation of PGIS expression caused by tumour cells on stromal cells or in the tumour cells themselves. They also suggest that the increase in PGI<sub>2</sub> production by fibroblasts and HUVECs induced by the FaDu-conditioned culture medium was due to COX-2 induction. These results are consistent with our previously published work showing that the interaction between HNSCC and stromal cells in the production of PGE<sub>2</sub> was due to the COX-2 induction mediated by IL-1R activation [15,25]. Our current results indicate that the interaction between tumour cells and ECs seems to favour PGI<sub>2</sub> production by ECs.

We showed that cPGI<sub>2</sub> induced tube formation *in vitro*. PGI<sub>2</sub> may act as an autocrine and paracrine effector to regulate the functions of different cell types through two main signalling pathways. The 'classical' signalling pathway uses a specific G protein-coupled membrane receptor termed IP. The second pathway binds at the nuclear membrane via PPARs. Studies using IP-deficient mice have shown that PGI<sub>2</sub>/IP signalling is important in preventing thrombosis and that it is involved in inflammatory responses [26]. Nevertheless, our experiments regarding tube formation in HUVEC cultures in the presence of an IP antagonist dismiss the role of IP in the pro-angiogenic activity of PGI<sub>2</sub>. Several studies have shown that PPARs, particularly PPAR $\delta$ , use PGI<sub>2</sub> as an endogenous ligand to modulate cell functions [18,19]. In this context, it has been reported that PPAR $\delta$  activation with the synthetic PPAR $\delta$  agonist GW501516 induces angiogenesis through a VEGF-dependent mechanism [20]. Nevertheless, we did not observe any effect of the PPAR $\delta$  antagonist GSK0660 on EC tube formation induced by cPGI<sub>2</sub>, indicating that the contribution of PPAR $\delta$  activation by cPGI<sub>2</sub>, if any, was negligible. Other authors have also reported that PGI<sub>2</sub> produces biological activities through EP-4 [21,22] and TP [27] activation. TP has indeed been found to be involved in the regulation of neovascularization during oncogenesis [28]. We then explored the ability of AH23848 (dual EP-4/TP antagonist) and SQ29548 (TP antagonist) to inhibit cPGI<sub>2</sub>-induced tube formation by HUVECs. Only AH23848 significantly inhibited the action of cPGI<sub>2</sub>, strongly suggesting that EP-4, rather than TP, was the prostanoid receptor involved in this response. This was also supported by the action of the more specific EP-4 antagonist CJ42794, which significantly inhibited cPGI<sub>2</sub>-induced *in vitro* angiogenesis. We have previously reported that PGE<sub>2</sub>-induced *in vitro* angiogenesis was mainly dependent on the EP-4 receptor in ECs [10]. Our results do not rule out the possibility that other prostanoid receptors could also be involved and we have no direct evidence of PGI<sub>2</sub> binding to EP-4. Nevertheless, our data strongly suggest that EP-4 was the main receptor involved in cPGI<sub>2</sub>-induced *in vitro* EC tube formation.

Our data regarding PGIS levels in patients' samples, in addition to its predominant expression in ECs, agree with the fact that vWF transcript levels and capillary density were higher in the group of patients with high expression of PGIS. The SDF-1/CXCR4 axis has been widely associated with tumour promotion and metastasis because many tumour cells express CXCR4 [29,30]. The chemokine SDF-1 is a well-known attractant for ECs and EC-progenitor cells that express its unique receptor CXCR4 [31,32]. Evidence indicates that interactions between tumour cells and stromal cells influence tumour progression [33,34]. The increase in SDF-1/CXCR4 in the high-PGIS group is consistent with the higher tumour vascularization in these patients.

These findings, together with the observation that high PGIS levels were related to a better response to radiotherapy, could indicate an association between the level

of vascularization and the response to radiotherapy of HNSCC. However, more research is needed to confirm this hypothesis. Retinoids are potent modulators of cell growth, differentiation, and apoptosis in various tissues and have been proposed as therapeutic agents in several cancers [35,36]. Besides their pro-angiogenic activity [37,38], retinoids up-regulate PGIS expression in ECs [39]. Our findings suggest that compounds that up-regulate PGIS such as retinoids could be of interest in cancer therapy, particularly in HNSCC.

### Acknowledgment

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS 2011-02380, SAF2010/21392, and RD12/0042/0051).

### Author contribution statement

The authors contributed in the following way: MC, XL, and LV: conception and design, analysis and interpretation of data, writing, and study supervision; ZP, SA, JG, and MS: acquisition of data and development of methodology; JB: acquisition of data and revision of the manuscript; XT and F-XA-J: acquisition of data; MQ: interpretation of data and revision of the manuscript

### References

- Marnett LJ. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 1992; **52**: 5575-5589.
- Vila L. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med Res Rev* 2004; **24**:399-424.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 145-182.
- Camacho M, León X, Fernández-Figueras MT, et al. Prostaglandin E2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Head Neck* 2008; **30**:1175-1181.
- Jung TT, Berlinger NT, Juhn SK. Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study. *Laryngoscope* 1985; **95**:307-312.
- Keith RL, Miller YE, Hoshikawa Y, et al. Manipulation of pulmonary prostacyclin synthase expression prevents murine lung cancer. *Cancer Res* 2002; **62**:734-740.
- Nemenoff R, Meyer AM, Hudish TM, et al. Prostacyclin prevents murine lung cancer independent of the membrane receptor by activation of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Prev Res* 2008; **1**:349-356.
- Tennis MA, Van Scoyk M, Heasley LE, et al. Prostacyclin inhibits non-small cell lung cancer growth by a frizzled 9-dependent pathway that is blocked by secreted frizzled-related protein 1. *Neoplasia* 2010; **12**:244-253.
- Stearman RS, Dwyer-Nield L, Zerbe L, et al. Analysis of orthologous gene expression between human pulmonary adenocarcinoma and a carcinogen-induced murine model. *Am J Pathol* 2005; **167**:1763-1775.
- Camacho M, Dilme J, Sola-Villa D, et al. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J Lipid Res* 2013; **54**:3506-3515.

- Camacho M, Gerbolés E, Escudero JR, et al. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE2 biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemost* 2007; **5**:1411-1419.
- Brú A, Souto JC, Alcolea S, et al. Tumour cell lines HT-29 and FaDu produce proinflammatory cytokines and activate neutrophils *in vitro*. Possible applications for neutrophil-based anti-tumour treatment. *Mediat Inflamm* 2009; **2009**:817498.
- Camacho M, Godessart N, Antón R, et al. Interleukin-1 enhances the ability of cultured umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J Biol Chem* 1995; **270**:17279-17286.
- Godessart N, Camacho M, López-Belmonte J, et al. Prostaglandin H-synthase-2 is the main enzyme involved in the biosynthesis of octadecanoids from linoleic acid in human dermal fibroblasts stimulated with IL-1 $\beta$ . *J Invest Dermatol* 1996; **107**:726-732.
- Alcolea S, Anton R, Camacho M, et al. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub>. *J Lipid Res* 2012; **54**:630-642.
- Camacho M, López-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and PGI-synthase activity. *Circ Res* 1998; **83**:353-365.
- Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, et al. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res* 2005; **69**:107-127.
- Gupta RA, Tan J, Krause WF, et al. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:13275-13280.
- Hatae T, Wada M, Yokoyama C, et al. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR $\delta$ . *J Biol Chem* 2001; **276**:46260-46267.
- Piguera L, Reynolds AR, Hodiola-Dilke KM, et al. Activation of PPARbeta/delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**:63-69.
- Jones RL, Chan K. Distinction between relaxations induced via prostanoid EP(4) and IP(1) receptors in pig and rabbit blood vessels. *Br J Pharmacol* 2001; **134**:313-324.
- Rehal S, Blanckaert P, Roizes S, et al. Characterization of biosynthesis and modes of action of prostaglandin E2 and prostacyclin in guinea pig mesenteric lymphatic vessels. *Br J Pharmacol* 2009; **158**:1961-1970.
- Kreutzer M, Fauti T, Kaddatz K, et al. Specific components of prostanoid-signaling pathways are present in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2007; **18**:497-501.
- Nana-Sinkam P, Golpon H, Keith RL, et al. Prostacyclin in human non-small cell lung cancers. *Chest* 2004; **125**:141S.
- Casós K, Siguero L, Fernández-Figueras MT, et al. Tumour cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular

- endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. *Microvasc Res* 2011; **81**:261-268.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; **79**:1193-1226.
- Eskildsen MP, Hansen PB, Stubbe J, et al. Prostaglandin I<sub>2</sub> and prostaglandin E2 modulate human intrarenal artery contractility through prostaglandin E<sub>2</sub>-EP4, prostacyclin-IP, and thromboxane A<sub>2</sub>-TP receptors. *Hypertension* 2014; **64**: 551-556.
- Ekambaram P, Lambiv W, Cazzolli R, et al. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2011; **30**:397-408.
- Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010; **16**:2927-2931.
- Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, et al. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *Oncol Targets Ther* 2013; **6**:1347-1361.
- Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: *in vivo* neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* 1999; **154**:1125-1135.
- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; **107**:1322-1328.
- Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**:97-101.
- Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev* 2008; **18**:27-34.
- Dragnev KH, Petty WJ, Dmitrovsky E. Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention. *Cancer Biol Ther* 2003; **2**: S150-S156.
- Montrone M, Martorelli D, Rosato A, et al. Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009; **9**:113-131.
- Maeno T, Tanaka T, Sando Y, et al. Stimulation of vascular endothelial growth factor gene transcription by all *trans* retinoic acid through Sp1 and Sp3 sites in human bronchioloalveolar carcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; **26**:246-253.
- Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, et al. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development* 2003; **130**:6465-6474.
- Camacho M, Rodríguez C, Salazar J, et al. Retinoic acid induces PGI-synthase expression in human endothelial cells. *J Lipid Res* 2008; **49**:1707-1714.

### SUPPORTING INFORMATION ON THE INTERNET

The following supporting information may be found in the online version of this article:

#### Supplementary materials and methods.

**Figure S1.** Effects of carbaprostacyclin on cell cycle.

**Figure S2.** Effects of carbaprostacyclin on apoptosis of tumour cells.

