

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología Humana



TESIS DOCTORAL

**Incremento de la actividad antiangiogénica y antitumoral tras la
acetilación del inhibidor del FGF 2,5-Dihidroxifenil sulfonato**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mohamad Rachid El-Youssef

Director

Pedro Cuevas Sánchez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología Humana



**INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA
Y ANTITUMORAL TRAS LA ACETILACIÓN DEL INHIBIDOR DEL FGF 2,5-
DIHIDROXIFENIL SULFONATO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
Mohamad Rachid El-Youssef

Bajo la dirección del Doctor Pedro Cuevas Sánchez

Madrid, 2015

ISBN: © Mohamad Rachid El-Youssef, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA HUMANA



**INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA
Y ANTITUMORAL TRAS LA ACETILACIÓN DEL INHIBIDOR DEL FGF 2,5-
DIHIDROXIFENIL SULFONATO**

TESIS DOCTORAL

MOHAMAD RACHID EL-YOUSSEF, 2015



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología Humana

**INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA Y ANTITUMORAL TRAS
LA ACETILACIÓN DEL INHIBIDOR DEL FGF 2,5-DIHIDROXIFENIL SULFONATO**

Tesis presentada por **MOHAMAD RACHID EL-YOUSSEF**
para optar al grado de **Doctor en Neurociencias**

DIRECTOR

Dr. Pedro Cuevas Sánchez

Jefe del Servicio de Histología del Departamento de Investigación
del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid

Madrid, 2015

-DEDICATORIA-

Madre

Soy una parte de ti y me has dado la vida después de Dios

Te deshiciste de todo para dármelo a mí, trabajaste en silencio con tesón día y noche sin descanso, pasaste las noches trabajando arropada con una manta para asegurar nuestro pan, y hasta ofreciste vender tu riñón para pagar mis estudios universitarios.

Tú que me has dado todo sin esperar nada a cambio, fuiste mi inspiración y guía para estudiar medicina y neurocirugía, tú has sido un ejemplo, madre de tantos, has sido el Ayoub (profeta de la paciencia) del siglo XX y XXI.

Por eso yo he hecho hasta el último esfuerzo y hasta he secado mi pluma, y tomando todo el tiempo y la paciencia necesarios, he tratado de buscar algunas palabras con las que agradecerte todo esto, y siento no haberlas encontrado, mamá

Te quiero

أمي

يا من كنت جزء منك

يا من وهبتني الحياة بعد الله

يا من تخليتي عن كل شيء لتمنحني اياه

يا من عملتي بسكون ليلا و نهارا و بدون كلل او ملل

يا من سهرتي الليل مغطاة ببطانية تبكي و بصمت تخيطي من اجل لقمة خبز لتطعميني

يا من عرضت كليتك للبيع لتأمين مستقبلي و تعليمي

يا من أعطاني كل ما أستطاع دون من

يا ملهمتي بعد الله في اختياري لدراسة الطب و من بعدها جراحة المخ و الاعصاب

يا من كنت مثلا في صناعة الرجال ايتها المعجزة

يا ايوب القرن العشرين و الواحد و العشرين

جف قلبي عصرت دماغي

تأنيت و صبرت طويلا لعلي اجد كلمة عرفان و شكر اوجهها لك

فلم أجد عذرا يا امي

-AGRADECIMIENTOS-

Quiero agradecer en especial a España que me ha dado esta oportunidad para poder realizar este trabajo tan importante y tan valioso

También agradezco mucho a la Universidad Complutense de Madrid, la facultad de Medicina y, especialmente, al Departamento de Fisiología donde me dieron esta oportunidad para realizar este trabajo y a sus profesores, especialmente al Dr. Zamorano por su gentileza, atención y tiempo dedicado para este trabajo y a Concha por sus delicadeza, ayuda y cooperación.

Agradezco al Hospital Universitario Ramón y Cajal, su Departamento de Investigación y el Servicio de Histología, dirigido por el Dr. Pedro Cuevas, que me acogió para realizar este trabajo y a quién agradezco toda su ayuda, dirección, apoyo científico y todo el tiempo que ha dedicado para poder culminar este trabajo; a Begoña por sus esfuerzos, trabajo y cooperación, así como el Dr. Carceller por su sacrificio y tiempo dedicado a este trabajo. Eduardo, gracias por tu gentileza y ayuda brindada al mismo. A Silvia y Rafa por vuestra ayuda. Tina, gracias por tu sonrisa y por todo lo que has hecho por mí en este trabajo. Hermano Javier es difícil escoger las palabras para poder agradecerte por todo lo que has hecho como guía, ayuda y sacrificio inmenso sin el cuál hubiera sido difícil terminar este trabajo; y a Chantal te agradezco por todas las gestiones y ayuda.

Dr. Neil Colman Universidad de McGill, Montreal, gracias por tu ayuda y el valioso tiempo dedicado a este trabajo.

Dr. Neil Colman McGill University, Montreal, thank you for your help and the precious time that you dedicated to me and to this work.

Especial agradecimiento al gran hombre y científico, aunque modesto, Dr. Guillermo Giménez Gallego, autor Intelectual de la ideas magníficas y trabajos científicos relacionados con los productos empleados, y reflexiones sobre este trabajo

Dr. Luis Outeiriño muchas gracias por tu gentileza, apoya y precioso tiempo que he dedicado tanto a mi como a mi pueblo

Quiero aprovechar la oportunidad para agradecer a todos los que han colaborado en este trabajo y no se mencionaron sus nombres.

Charito Gracias; Rachid, Fadia, y Khalid que han tomado este trabajo como suyo, gracias por toda la paciencia, cariño, cooperación y ayuda; Rachid - Nella, Fadia - Anas, gracias a vosotros y a Dios por regalarme a Nooh y Dana, los bellos niños que me han dado un impulso inmenso y una visión más abierta y clara del futuro.

Amneh Gracias por todo tu apoyo espiritual y ayuda.

Ahmed - Laila Marouf, por el calor, sacrificio, tiempo, apoyo y ayuda que me han brindado desde el inicio de la idea para realizar este trabajo. Gracias a Mohamed - Jouda Amr y Ahmed - Seham Al Asaad por el calor, cariño y ayuda; Mahmoud - Angela Alwani, Fadi – Zoila Al Zeben por su ayuda y apoyo. José Raúl - Mairé muchas gracias por el calor, cariño y apoyo que me habéis dado. Nazareth gracias por tu tiempo y ayuda.

A mis hermanos Hasan y Ali y sus familias por todas sus ayudas a todos los niveles y en todas las etapas de este trabajo que han tomado como suyo, y mi hermana Fadia por su ayuda y apoyo moral.

شكر وتقدير

اود ان اتوجه بالشكر والتقدير الى اسبانيا بشكل خاص التي منحتني هذه الفرصة للقيام بهذا البحث الهام والقيم.

اشكر جامعة كومبلوتنسي مدريد وكلية الطب وبشكل خاص الى قسم الفسيولوجيا (علم وظائف الاعضاء) لإتاحتهم هذه الفرصة لإجراء هذا البحث والى كافة الاساتذة وخص بالذكر الدكتور ثامورانو للطفه ووقته الذي منحني اياه واهتمامه والى السيدة كونشا لوقتها ومساعدتها وتعاونها.

اتوجه بالشكر ايضا الى ادارة و كادر المستشفى الجامعي رامون كاخال ودائرة البحث فيه و بالاخص قسم علوم الانسجة الذي يترأسه الدكتور بدرو كوفياس، الذي اختارني للقيام بهذا البحث واشكره ايضا على كل المساعدة والتوجيه والدعم العلمي والوقت الذي خصصه لي من اجل اتمام هذا العمل، واشكر ايضا السيدة بيغونيا للجهد المبذول والعمل والعون المقدم منها، كذلك اتقدم بالشكر الى الدكتور كارثيير بسبب وقته الثمين الذي منحني اياه به ومساعدته. والى ادواردو اقول شكرا للطفك ودعمك المتواصل . واشكر ايضا سيلفيا ورافا لدعمهم، ولا انسى تينا اقول لها شكرا لإبتسامتك الدائمة وكل ما قامت به من اجل اتمام بحثي، اخي خافيير لم اجد كلمات لاوفيك جهدك اللامحدود حيث كنت خير دليل ومساعد لي وتضحيتك بوقتك من اجل إنجاز هذا العمل، شانتيل اشكرك لكل ما قمت به من اجراءات ومساعدة.

واتوجه بالشكر الخاص الى الاستاذ الدكتور نيل كلمان جامعة ماك-غيل منتريال لمساعدته و وقته الثمين الذي خصصه لي لإنجاز بحثي هذا.

والشكر الكبير والمتواصل الى الانسان الكبير والعالم القدير المتواضع دوما الدكتور غيبرمو خيمينيث غاييغو العقل الموجه لجميع الافكار الخلاقة والجهد العلمي المتعلق بكل جوانب هذا العمل والابحاث التي اجرىتها.

دكتور لويس اوتورينيو شكرا على الوقت الثمين و على اناقتك في عطائك لي و لابناء شعبي.

شاريتو شكرا، رشيد و فاديا وخالد يا من اعتبرتم هذا العمل وكأنه بحثكم الشخصي، اشكركم على صبركم وحنانكم وتعاونكم ودعمكم، والشكر موصول ايضا الى رشيد-نيلا وفاديا-انس الشكر لكم والله سبحانه وتعالى على اهدائي نوح ودانا، هذين الطفلين الجميلين الذين ساهموا في اعطائي دفعة معنوية هامة في حياتي و بحثي ومنحوني رؤية اكثر وضوحا وانفتاحا تجاه المستقبل.

أمنه ابو عين شكرا لك على دعمك ومساندتك الروحية والمعنوية و دعمي لانهاء هذا العمل.

لا انسى ان اشكر الاصدقاء الاحبه: احمد ولبلى معروف لكل العون، الدعم والمساندة التي قدمتموها منذ البداية حيث كان هذا مجرد فكرة الى ان تم انجازه لكم جزيل الشكر، الى محمد - جودة عمرو، احمد - سهام الاسعد للدفع والحنان والمساعدة، الى محمود - انخيل علواني، وفادي - زويلا الزين، لدعمهم ومساندتهم والى خوسيه راؤول ومايري الف شكر لدعمكم، مساعدتكم و حنانكم، والى ناصريت ايضا على جهدها و وقتها.

ولا انسى التقدير العظيم والشكر اللامتناهي الى اخوتي حسن وعلي وعائلاتهم لكل المساعدة على كافة الصعد وفي كل مراحل البحث و الذين اعتبروا بحثي هذا كأنه عملهم و بحثهم، والى اختي فاديا لمساعدتها ودعمها المعنوي.

الشكر والتقدير الى كل الاشخاص الذين ساهموا في هذا البحث و سقطت اسمائهم سهوا.

-INDICE-

INDICE

| | |
|--|-----------|
| I. Abreviaturas | 17 |
| II. Resumen | 22 |
| III. Summary | 25 |
| IV. Introducción | 31 |
| 1. Introducción al estudio del glioma | 32 |
| 1.1 Clasificación e Etiología de los gliomas | 33 |
| 1.2 Defectos en el Ciclo Celular | 34 |
| 1.3 Defectos en la señalización de los factores de crecimiento | 34 |
| 1.4 Sintomatología | 36 |
| 1.5 Diagnóstico | 37 |
| 1.6 Tratamiento | 37 |
| 1.6.1 Cirugía | 37 |
| 1.6.2 Radioterapia | 38 |
| 1.6.3 Quimioterapia | 38 |
| 1.6.3.1 Temozolomida (TMZ) | 38 |
| 1.6.3.2 Nitrosoureas | 39 |
| 1.6.3.3 Compuestos de Platino | 39 |
| 1.6.4 Tratamientos por inducción de la apoptosis | 40 |
| 1.6.4.1 Tirosina quinasas (TKs) como dianas terapéuticas | 40 |
| 1.6.4.2 Familia Bcl-2 como dianas terapéuticas. | 41 |
| 1.6.4.3 Señalizadores de muerte celular como dianas terapéuticas | 41 |
| 1.6.4.4 Otras posibles dianas terapéuticas | 41 |

| | | |
|---------|--|-----------|
| 1.6.5 | Tratamientos basados en la inhibición de la angiogénesis: terapias antiangiogénicas. | 42 |
| 1.6.5.1 | Ventajas de la terapia antiangiogénica. | 42 |
| 1.6.5.2 | Utilización de inhibidores endógenos. | 44 |
| 1.6.5.3 | Moléculas de pequeño tamaño | 45 |
| 1.6.5.4 | Inhibidores de la angiogénesis basados en el ARN. | 45 |
| 1.6.6 | Inhibidores de los Factores de Crecimiento en terapia antiangiogénica | 46 |
| 1.6.7 | Nuevos conceptos en el tratamiento del glioma | 48 |
| 1.6.8 | Terapia por Transferencia Génica | 48 |
| 1.6.9 | Campos de tratamiento tumoral (Tumor Treating Fields, TTF) | 48 |
| 1.6.10 | Nanopartículas de óxido de hierro | 49 |
| 2. | Proliferación Celular en Gliomas | 50 |
| 2.1 | Introducción | 50 |
| 2.2 | Ciclo Celular | 50 |
| 2.3 | Control del Ciclo Celular | 51 |
| 2.4 | Puntos de Control | 52 |
| 2.4.1 | Punto de Restricción (Punto R) | 52 |
| 2.4.2 | Punto de Chequeo transición fases G2 a M (Punto G2-M) | 52 |
| 2.4.3 | Punto M | 52 |
| 2.5 | Protooncogenes en Gliomas | 53 |
| 3. | Angiogénesis en Gliomas | 54 |
| 3.1 | Introducción | 54 |
| 3.2 | El proceso de la angiogénesis | 55 |
| 3.2.1 | VEGF | 57 |
| 3.2.2 | Angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2 | 57 |
| 3.2.3 | Vía Notch | 58 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 3.2.4 | Receptores Ephrin | 59 |
| 3.3 | Angiogénesis e hipoxia | 59 |
| 3.3.1 | Características de la angiogénesis en gliomas. | 60 |
| 3.3.2 | Hipoxia en células cancerosas | 61 |
| 3.3.3 | Gen p53 | 62 |
| 3.3.4 | Vasos generados por un glioma | 62 |
| 4. | El Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y su importancia en Gliomas | 63 |
| 4.1 | Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF) | 63 |
| 4.1.1 | Generalidades | 63 |
| 4.1.2 | Diversidad de la señalización del FGF | 65 |
| 4.1.3 | Heparán Sulfato (HSPG) y FGFR | 66 |
| 4.1.4 | Vías de la transducción de la señal del FGF | 67 |
| 4.1.5 | Control de la señalización del FGF | 69 |
| 4.2 | Vía de señalización del FGF en el glioma | 69 |
| 4.2.1 | Generalidades | 69 |
| 4.2.2 | Participación de la señalización del FGF en las características claves del glioma | 71 |
| 4.2.3 | El FGF y las células troncales del glioma | 71 |
| 4.2.4 | FGF y quimiorresistencia | 72 |
| 4.3 | Derivados dihidroxifenil como inhibidores del FGF en el tratamiento contra el glioma | 72 |
| 4.3.1 | Compuestos sulfonados dirigidos a la heparina dominio de unión de FGF / FGFR. | 72 |
| 4.3.2 | Derivados del dihidroxifenil -2,5 - dihydroxyphenylsulfonate (2,5-DHPS) | 73 |
| 4.3.3 | Impacto del 2,5- DHPS sobre el crecimiento y la supervivencia de las células del glioma C6 | 74 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 4.3.4 | Eficacia preclínica del 2,5- DHPS en el modelo de glioma de rata | 75 |
| 4.4 | Implicaciones terapéuticas | 76 |
| 4.4.1 | Terapias anti-angiogénicas para inhibir la progresión del glioma | 76 |
| 4.4.2 | La inhibición de FGF como estrategia para superar la resistencia a las terapias anti-VEGF | 77 |
| 4.4.3 | Potencial terapéutico del 2,5- DHPS | 78 |
| 4.5 | Conclusión | 80 |
| 5. | Apoptosis en Gliomas | 81 |
| 5.1 | Introducción | 81 |
| 5.2 | Aspectos bioquímicos de la apoptosis | 81 |
| 5.3 | Vías de inducción de la apoptosis | 83 |
| 5.3.1 | Vía Intrínseca | 83 |
| 5.3.2 | Vía Extrínseca | 84 |
| 5.4 | Inhibición de la apoptosis | 85 |
| 5.4.1 | XIAP | 86 |
| 5.4.2 | Vivina | 86 |
| 5.4.3 | NF- κ B | 87 |
| 5.5 | Aspectos de la apoptosis en gliomas | 87 |
| 5.5.1 | Alteraciones en los receptores de muerte celular | 87 |
| 5.5.2 | Alteraciones en el funcionamiento de las caspasas | 88 |
| 5.5.3 | Alteraciones en los IAPs | 88 |
| 5.5.4 | Proteínas Bcl-2 en gliomas | 89 |

| | |
|---|-----------|
| V. Objetivos | 92 |
| VI. Material y Método | 95 |
| 1. Material | 96 |
| 1.1 Laboratorio de cultivos celulares | 96 |
| 1.2 Animalario / Cirugía experimental | 98 |
| 1.3 Laboratorio de histología | 100 |
| 1.4 Cultivo de células tumorales | 101 |
| 2. Método | 102 |
| 2.1 Cultivos celulares | 102 |
| 2.1.1 Congelación | 103 |
| 2.1.2 Preparación de la jeringa de inyección. Recuento directo de células | 103 |
| 2.2 Estudio IN VITRO | 104 |
| 2.3 Estudios IN VIVO | 105 |
| 2.3.1 Anestesia | 105 |
| 2.3.2 Ensayo de angiogénesis in vivo | 106 |
| 2.3.3 Implantación de células tumorales | 106 |
| 2.3.4 Tratamientos | 108 |
| 2.3.5 Administración intraperitoneal | 108 |
| 2.3.6 Administración oral | 108 |
| 2.4 Determinación de lactato deshidrogenasa | 109 |
| 2.5 Procesamiento de las muestras histología fijación e inclusión en Parafina | 109 |
| 2.6 Coloración con Hematoxilina-Eosina | 110 |
| 2.7 Cuantificación Neovascularización | 110 |

| | |
|---|------------|
| 2.7.1 Cuantificación de la neovascularización en los ensayos de angiogénesis | 110 |
| 2.7.2 Cuantificación en los gliomas subcutáneos | 111 |
| 2.8 Ensayo de la apoptosis: Método de la Transferasa terminal o túnel | 111 |
| 2.9 Análisis estadístico | 112 |
| VII. Resultados | 114 |
| 1. DAPS inhibe la proliferación de células C6 de glioma de rata in vitro. | 116 |
| 2. DAPS manifiesta una actividad antiangiogénica in vivo superior a la mostrada por DHPS. | 118 |
| 3. DAPS es más eficaz inhibiendo la progresión tumoral in vivo que el DHPS. | 122 |
| 4. DAPS es eficaz en inhibir la progresión de los gliomas subcutáneos cuando se administra de forma oral. | 126 |
| 5. La inhibición de la progresión tumoral causada por DAPS se asocia a una reducción de la vascularización, un aumento de la apoptosis y una disminución de la infiltración leucocitaria vascular en los gliomas subcutáneos. | 131 |
| VIII. Discusión | 136 |
| IX. Discussion | 150 |
| X. Conclusiones | 163 |
| XI. Conclusion | 165 |
| XII. Bibliografía | 168 |
| XIII. Anexo opcional | |

-ABREVIATURAS-

I. Abreviaturas

- 2,5-DHPS, dobesilato: 2,5-dihidroxifenil sulfonato
- 5A2NMS: el ácido 5-aminonaftaleno-2- sulfónico
- ácido gentísico: ácido 2,5-dihidroxifenillfórmico
- ADN: el ácido desoxirribonucleico
- AIF: apoptosis-inducing factor
- Ang: angiopoyetinas
- Apaf-1: Apoptotic protease activating factor 1
- ARN: Ácido ribonucleico
- Asp: ácido aspártico
- ATCC: American Typ Culture Collection
- ATCC: American Type and Cultura Collection
- BAX: member of the Bcl-2 gene family
- Bcl-2: B- cell lymphoma 2
- Bcl-XL: B-cell lymphoma-extra large
- BCNU: Carmustina
- BIR: baculoviral IAP repeats
- CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States
- CCNU: Lomustina
- DAPS: 2,5- dihidroxibenzénicos
- DcR3: Decoy Receptor 3
- DISC: death-inducing signalling complex
- DLK1: Protein delta homolog 1
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagl Medium High Glucose
- DSL: las proteínas Notch
- ECM: matriz extracelular
- EGF: epidermal growth factor
- EGF: factor de crecimiento epidérmico
- EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
- EGFR: epidermal growth factor receptor
- EGFR:Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
- eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
- ERK: extracellular signal-regulated kinases
- ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares
- FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
- FCS: suero fetal bovino
- FDA: Food and Drug Administration
- FGF: factor de crecimiento para fibroblastos
- FGF: Factor de Crecimiento para Fibroblastos

- FGFR: receptor del factor de crecimiento para fibroblastos
- FLICE: Caspase 8
- FLIP: FLICE Inhibitory Protein
- GBM: glioblastoma multiforme
- HGF: factor de crecimiento para hepatocitos
- HIF: factor de transcripción inducido por hipoxia
- HRE: elemento de respuesta a la hipoxia
- HS: heparina/heparán sulfato
- HSPG: heparán sulfato
- HSPG: heparán sulfato proteoglicanos
- i.p: Intraperitoneal
- IAPs: inhibitors of apoptosis proteins
- IAPs: los inhibidores naturales de la apoptosis
- IC50: concentración de un producto capaz de inhibir un 50% de la actividad
- IGF: factor de crecimiento de tipo insulina
- IL: interleuquina
- IL-18: interleuquina18
- IL-1 β : interleuquina 1 β
- JAK/STAT: Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
- JAK: la familia Janus quinasas
- MAPK: proteína quinasa de activación mitogénica
- MEK: quinasa MAP/ERK
- MGMT: metilguanina DNA metiltransferasa
- MGMT: O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa
- MIHS: mio-inositol hexasulfato
- MMP: matrix metalloproteinases
- MMP: metaloproteasas de la matriz
- NF- κ B: factor nuclear- κ B
- NMS: 1-naftalenomonosulfonato
- NO: óxido nítrico
- Noxa: member of the Bcl-2 protein family
- NTS: 1,3,6 – naftalenotrisulfonato
- PBS: solución tampón fosfato
- PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PDGFR: platelet derived growth factor receptor
- PHDs: prolil-hidroxilasas
- PKC: proteína quinasa C
- PKC: proteína quinasa C
- PKC: proteinquinasa C
- PLC: fosfolipasa C
- PLC γ : Phosphoinositide phospholipase C
- POC: prueba de concepto
- PUMA: member of the Bcl-2 protein family

- Ras/MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases/proteínas quinasas activadas por mitógenos.
- Ras: GTPase = hydrolase enzyme
- Rb: proteína retinoblastoma
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- SEM: error estándar de la media
- SH2: Src Homology 2 protein domain
- TC: Tomografía Computerizada o escáner
- TGF: Factor de crecimiento de transformación
- TGF α : factor de crecimiento transformante
- TGF- β /BMP: transforming growth factor beta / Bone Morphogenetic Proteins
- TMZ: temozolomida
- TNF: Factor de Necrosis Tumoral
- TNFR: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
- TNFR1: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral 1
- TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
- TTF: Tumor Treating Fields
- Tyr (Y): tirosina
- VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
- VEGF: factor de crecimiento para el endotelio vascular
- VEGFR: receptor del factor de crecimiento para el endotelio vascular
- VEH: vehículo, agua corriente
- XIAP: X-linked IAP
- XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

-RESUMEN-

II. Resumen

A pesar del uso de terapias multimodales que incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia, el glioblastoma sigue presentado muy mal pronóstico. La angiogénesis patológica, la invasión agresiva y la rápida difusión en el cerebro son características del glioblastoma. Además, tanto en éste como en otros tipos de tumores, se ha constatado el papel de la inflamación en la progresión tumoral. Las evidencias sugieren que el factor de crecimiento para fibroblastos (FGF) actúa como un promotor de la angiogénesis y progresión tumorales. Aunque los FGFs fueron inicialmente descritos como inductores de la angiogenesis, fueron rápidamente reconocidos como factores mitogénicos de amplio espectro. Es más, en la última década se ha demostrado la participación de estas proteínas en los procesos inflamatorios. El dobesilato (2,5-dihidroxifenil sulfonato, DHPS) se ha identificado recientemente como el miembro más potente de una familia de inhibidores del FGF encabezadas por el ácido gntísico, uno de los principales catabolitos de la aspirina. Recientemente, un derivado del DHPS, el 2,5-diacetoxifenil sulfonato (DAPS) ha demostrado sumar a su efecto inhibitorio sobre el FGF, su capacidad de inhibir la actividad ciclooxigenasa (COX). El objetivo principal de este trabajo es evaluar la eficacia del DAPS para inhibir la angiogénesis y la progresión tumoral *in vivo*. Empleando cultivos celulares de células C6 de glioma de rata se ha demostrado el efecto anti-proliferativo del DAPS, aunque resulta menos potente *in vitro* que la molécula parental, DHPS. Sin embargo, el DAPS presentó mayor eficacia anti-angiogénica y anti-tumoral que el DHPS en los ensayos *in vivo*. El DAPS demostró mayor actividad inhibitoria sobre la angiogénesis inducida por FGF-1 en esponjas implantadas subcutáneamente en ratas e inhibió más eficazmente la progresión de gliomas subcutáneos en ratas, reduciendo la vascularización tumoral e incrementando la apoptosis. El DAPS mostró eficacia oral para estas acciones y sus efectos se acompañaron de una reducción de la infiltración leucocitaria. Los resultados sugieren que la acetilación del dobesilato aumenta su capacidad anti-inflamatoria, anti-angiogénica y anti-tumoral, probablemente debido a que el DAPS aúna la capacidad inhibitoria sobre el FGF con un efecto inhibitorio sobre la COX. El DAPS representa una prometedora estrategia en el tratamiento de los gliomas.

-SUMMARY-

Summary

Gliomas are the most frequent and lethal intracranial tumors. Despite recent advances in its treatment by the use of multimodal therapies including surgery, radiotherapy and chemotherapy, and the significant improvements in survival, the prognosis for this disease remains devastating. The primary therapy for glioma consists in surgery followed by radio- and chemotherapy with temozolomide. Chemotherapy interferes with the growth and reproduction of tumor cells but is a nonspecific, often ineffective therapy that also affects normal cells, especially those that divide rapidly. The serious side effects that may result, together with economical and emotional costs, emphasizes the serious need to develop new therapeutic strategies for this devastating disease. Both the recent advances in the understanding of tumor pathogenesis and the appreciation of complications associated with the medications currently used to treat glioma have provided important incentive for finding new treatment alternatives.

The hallmarks that confer its elevated malignancy to glioma are uncontrolled cellular proliferation, diffuse infiltration, and high resistance to apoptosis, robust angiogenesis and large molecular heterogeneity present in malignant gliomas. Strategies targeted to inhibit or reverse these key features would logically have therapeutic relevance in the management of gliomas. Several growth factors such as epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) and its cognate receptors have been implicated in gliomagenesis. FGF and VEGF are two potent inducers of tumor angiogenesis, both representing clear targets for the treatment of glioma.

Preclinical anti-angiogenic therapeutic studies with inhibitors of VEGF produced encouraging results but efficacy in clinical trials was limited, and serious side effects have been manifested. It is generally accepted that the resistance to treatment with substances that inhibit VEGF is due to the overexpression and activation of FGF caused by the treatment itself. It is possible that inhibition of FGF instead of VEGF in the pathological angiogenesis of glioma is a more appropriate approach, given that the inhibition of FGF also suppresses the angiogenesis induced by VEGF, even as FGF induces angiogenesis dependently and independently of VEGF. For this reason, the inhibition of FGF signaling has been suggested as a strategy to overcome resistance to anti-VEGF therapy.

Another factor to consider is that, besides being a potent stimulator of angiogenesis, FGF also regulates multiple processes of the glioma cells, so that inhibition of FGF signalling negatively impacts on the glioma progression through mechanisms dependent and independent on angiogenesis. These facts suggest that the development of effective, safe and easily administered FGF inhibitors represents a reasonable therapeutic strategy for the treatment of glioma.

Dobesilate, (2,5-dihydroxyphenyl sulfonate, DHPS) has been recently identified as the most potent member of a family of FGF inhibitors, headed by gentisic acid, one of the main catabolites of aspirin. More recently, a derivative of DHPS, 2,5-diacetoxyphenyl sulfonate (DAPS), has demonstrated inhibitory effects both on FGF, and on cyclooxygenase (COX) activity.

The hypothesis of the current study is that DAPS, a modification of DHPS generated by acetyl esterification of its two hydroxyl groups, will not only replicate the inhibitory effects of DHPS on FGF but also will provide enhanced anti-inflammatory and anti-angiogenic activities resulting in a higher anti-tumor efficacy compared to its parent molecule *in vivo*.

The C6 rat glioma cell line was used for *in vitro* proliferation assays and for *in vivo* subcutaneous glioma rat model, Both DAPS and DHPS effectively inhibited *in vitro* proliferation of cultured C6 glioma cells but DHPS displayed higher potency. The negative modulation of the FGF-stimulated signaling pathways responsible for growth and survival of C6 glioma cells seems to be the key to understand the anti-proliferative capacity of DHPS and DAPS. The lower potency in inhibiting FGF by DAPS compared to DHPS is not surprising given the tight fit of DHPS in a narrow gap on the surface of FGF-1. However, DAPS has a stronger inhibitory potency than other compounds that were identified as FGF inhibitors during the development of DHPS.

In vivo angiogenesis was analyzed by implanting gelatin sponges containing FGF-1 under the dorsal skin of anesthetized rats. Surgical removal of the gelatin sponges seven days after *in vivo* implantation revealed the strong angiogenesis induced by FGF-1, manifested by the large number of functional vessels (containing erythrocytes) histologically detected in sponges from vehicle-treated rats. In contrast, oral treatment with DHPS or DAPS (300 mg/kg/day) for the 7 days period prevented angiogenesis induced by FGF-1 but DAPS was significantly more effective. Oral efficacy of DAPS in inhibiting *in vivo* angiogenesis was dose-dependent and

associated with reduced leukocyte infiltration. It does not seem likely that the strong anti-angiogenic effect following acetylation of DHPS is due to an increase in its potency as an FGF-inhibitor. It could be speculated that DAPS has acquired some additional activity in addition to its ability to inhibit FGF, already present in DHPS. In this respect, it has been recently shown that DAPS but not DHPS possesses the ability to inhibit cyclooxygenase activity (COX) of both COX-1 and COX-2 isoforms. Considering the active involvement of COX activity as well as prostaglandin synthesis in pathological angiogenic processes, the superiority of DAPS over DHPS as anti-angiogenic drug is probably due to its anti-inflammatory activity related to inhibition of COX.

For the subcutaneous glioma model, C6 cells cultured to confluence were implanted beneath the abdominal skin of anesthetized rats. Five days after implantation the presence of a subcutaneous tumor was confirmed and the rats were then intraperitoneally treated with either vehicle, DHPS or DAPS (200 mg/kg/day) for 10 additional days. At that moment, subcutaneous glioma were excised and evaluated. Both drugs significantly inhibited glioma progression but DAPS was more effective than DHPS in reducing weight and size of subcutaneous gliomas. Furthermore, DAPS was also able to inhibit glioma progression when orally administered and the reduction in weight and size of the gliomas was accompanied by a clear inhibition of tumoral vascularization and an increase in tumoral apoptosis but also by a reduction in leukocyte infiltration and extravasation from tumoral blood vessels. The ability of DAPS to inhibit COX activity and the key participation of inflammation in tumor pathogenesis may explain the higher efficacy of DAPS compared to DHPS in inhibiting the progression of subcutaneous glioma, achieving, in some cases, the complete regression of established tumors.

Oral administration of DAPS for 10 days did not seem to cause toxic effects in animals since weight gain in DAPS-treated rats was similar to that observed in rats treated with water. In addition, the macroscopic appearance of the stomachs of the animals treated with DAPS showed no sign of gastric irritation.

In conclusion, acetylation of DHPS reduces its potency for the inhibition of C6 rat glioma cell proliferation *in vitro*, although DAPS maintains significant anti-proliferative efficacy. This is probably related to a decreased affinity to FGF caused by the introduction of the acetyl groups. The acetylation of DHPS significantly increased its anti-angiogenic activity *in vivo*. The

reduction of neovascularization caused by DAPS is dose-dependent and is accompanied by a clear decrease in leukocyte infiltration. DAPS has superior anti-tumor activity *in vivo* than the parent molecule in the inhibition of subcutaneous glioma progression in the rat. The capacity to inhibit glioma progression exhibited by DAPS is associated with a decrease in the tumor angiogenesis and an increase in apoptosis in the tumors. Moreover, this effect is again accompanied by a decrease in inflammatory responses, as indicated by the reduction in leukocyte infiltration in tumor vessels. The anti-angiogenic and the anti-tumoral efficacy of DAPS is demonstrated after oral administration of this compound and is not associated with adverse effects. The acetylated derivative of DHPS retains the anti-FGF activity of its parent compound while providing effective anti-inflammatory activity by inhibiting COX. DAPS may be useful for the treatment of gliomas, by interrupting processes that are important in the progression of these tumors. These findings suggest that DAPS represents a promising candidate for treatment of glioblastoma and other similar malignancies.

-INTRODUCCIÒN-

IV. Introducción

1. Introducción al estudio del glioma

En el año 2010, unas 700.000 personas en Estados Unidos vivían con un tumor primario cerebral diagnosticado, siendo malignos 140.000 de los mismos (*Fisher et al., 2007*). Los gliomas son los más frecuentes y letales de los tumores cerebrales primarios. El glioblastoma multiforme (GBM), la forma de glioma más peligrosa, representa alrededor de la mitad de los casos, con una incidencia anual mundial de 7 casos por cada 100.000 individuos, y supone el 15-17% de los tumores cerebrales primarios (*Furnari et al., 2007*).

Unos 18.500 nuevos casos de estos tumores fueron diagnosticados en los Estados Unidos en 2006, y se estima que unas 13.000 personas mueren cada año en ese país como consecuencia de un glioblastoma [*Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) 2005 -2006*]. La misma fuente para 2013 prevé detectar unos 70.000 nuevos casos, incluyendo 4.300 menores de veinte años, de los que 3.000 serán menores de quince años.

En España se diagnostican cada año aproximadamente 3.000 nuevos casos de tumores primarios cerebrales, de los cuales, un 60% son gliomas malignos (*Stupp et al., 2005*).

A pesar de los recientes avances en su tratamiento, los gliomas siguen teniendo un pronóstico extraordinariamente desfavorable. De cada 100.000 pacientes a los que se diagnostica esta enfermedad, sólo unos 220 sobreviven. Su tratamiento primario procura una supervivencia media de 14 meses para el glioma de grado 4, y de 36 meses para el de grado 3, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (*Stupp et al., 2005*). Los cambios en hábitos de vida no alteran el pronóstico, y el diagnóstico temprano tampoco parece alterar los resultados finales. Además, los pacientes bajo tratamiento sufren frecuentemente complicaciones clínicas, como eventos tromboembólicos, ataques epilépticos, fluctuaciones en síntomas neurológicos y reacciones adversas a corticoides y quimioterapias, todo lo cual debe ser tratado. Se ha observado una proporción inversa entre el glioma y enfermedades atópicas como asma, fiebre del heno o eczemas (*Linos et al., 2007*).

El alto grado de mortalidad y el coste económico y emocional asociados urge al desarrollo de nuevos tratamientos para esta enfermedad (*De Angelis, 2001*). La estrategia empleada por estos tratamientos es la inhibición o reversión completa de las características fundamentales de este tipo de glioma, que son las causas de las complicaciones en su curación: capacidad para la infiltración difusa, alta resistencia a la apoptosis, tendencia a la recurrencia, alta resistencia a terapias convencionales y una vigorosa angiogénesis (*Furnari et al., 2007; Giese y Westphal, 1996*). Para ello se requiere un profundo conocimiento de los mecanismos y características que rigen estos procesos.

1.1 Clasificación y Etiología de los gliomas

La clasificación de los tumores cerebrales primarios se hace según el origen filogenético del tejido, siendo llamados ‘gliomas’ los tumores que surgen a partir del neuroepitelio, a los que se clasifica en orden de menor a mayor malignidad en cuatro grados: grados I y II astrocitoma, grado III astrocitoma anaplásico y grado IV glioblastoma o glioblastoma multiforme (*Louis et al., 2007*). Esta clasificación viene dada por la WHO, por lo que es habitual referirse a los glioblastomas como WHO grado IV. Los gliomas grado uno no son infiltrantes y se pueden curar por cirugía, siendo su tratamiento comparativamente sencillo.

Más de la mitad de los gliomas son glioblastomas. Son más comunes entre 45 y 65 años de edad, aumentando con la edad y encontrándose más en hombres que en mujeres. Son altamente malignos, con crecimiento rápido y muy complicados de tratar. Aunque raras veces se propagan fuera del cerebro, sí invaden otras zonas del mismo, migrando de un punto a otro. Este comportamiento invasivo es una de las principales causas de la dificultad del tratamiento (*Biernat et al., 1997*).

Las causas de los glioblastomas son desconocidas. Se han identificado modificaciones en genes específicos que pueden desempeñar un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad, pero no se conoce la causa de estas modificaciones. Los únicos factores de riesgo conocidos son la exposición a la radiación y determinados síndromes genéticos. A pesar de la resonancia social que tuvieron, los estudios que intentaban correlacionar la aparición de cánceres cerebrales con el

uso de teléfonos móviles no dieron resultados concluyentes, sin que se apreciase relación alguna (*Hardell et al., 2013; Corle et al., 2012*).

Pueden distinguirse dos tipos de glioblastomas, los primarios (también llamados nuevos o ‘de novo’) y los secundarios. Los primarios conforman el 90% de los glioblastomas, surgen abruptamente y tienen un comportamiento muy agresivo, apareciendo a menudo en personas de más de 55 años. Los secundarios son más lentos, aparecen en personas más jóvenes y tienen un comportamiento algo menos agresivo. Suelen comenzar como astrocitomas grados I y II, para luego evolucionar a grado IV, habitualmente mediante mutaciones en el gen p53. Se estima que el 70% de los astrocitomas de grado II evolucionan a grado III o IV en menos de 5 años (*Furnari et al., 2007; Reardon y Wen, 2006; Wen y Kesari, 2008; Tysnes y Mahesparan, 2001*). Los astrocitomas anaplásicos (glioma grado III) aparecen en pacientes más jóvenes.

Los GBMs primarios se asocian a alteraciones en el receptor del factor de crecimiento de la epidermis EGFR (epidermal growth factor receptor), amplificación genética, delección de p16, pérdida de la heterozigosis del cromosoma 10q y delección de (homólogo de la fosfatasa y tensina) del cromosoma 10. Los GBMs secundarios presentan típicamente mutaciones en el cromosoma p53 y el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGFR (platelet derived growth factor receptor) (*Watanabe et al., 1996*).

Los GBMs son muy heterogéneos desde el punto de vista molecular (*Theeler et al., 20012*). Una clasificación en base a este criterio nos da cuatro clases: clásico, mesenquimal, proneural y neural (*Verhaak et al., 2010; Phillips et al., 2006*). El glioblastoma clásico sufre amplificaciones del cromosoma 7, delección del cromosoma 10, delección del sector Ink4a/ARF y mutaciones en el receptor EGFR. El mesenquimal sufre mutaciones o delecciones del NF1 y expresiones elevadas de CHI3L1, MET, y genes relacionados con los factores de necrosis tumoral y la vía de NF-κB. Los proneurales tienen alteraciones en el PDGFRA, IDH1 y TP53, con muchas similitudes con gliomas de menor grado. Por último, la clase neural se caracteriza por la expresión de marcadores neuronales. Hay que entender que se han detectado un gran número de variaciones y mutaciones, muchas de ellas muy raras, siendo esta enfermedad muy heterogénea (*Bredel et al., 2009; Yadav et al., 2009*).

1.2 Defectos en el Ciclo Celular

Las células del glioma tienen una alta inestabilidad genómica, con un ciclo celular mal regulado y con los supresores de proliferación y actividades mitogénicas modificados. Además existe una subpoblación de células madre del glioma, que podría desempeñar un papel clave en la generación, progresión y respuesta al tratamiento de los gliomas (*Reynolds y Weiss, 1992*).

Una de las características clave de los glioblastomas es la presencia de mutaciones en genes que regulan la proliferación celular. Dos reguladores, Rb (proteína retinoblastoma) y p53, que habitualmente determinan qué células pasan de la fase G1 a la S del ciclo celular, están frecuentemente alterados.

En células normales, el Rb está hipofosforilado y bloquea la activación de los factores de transcripción necesarios para la progresión a lo largo del ciclo vital. Tanto GBMs primarios como secundarios causan alteraciones en la ruta del Rb (*Schmidt et al., 1994; Ueki et al., 1996*), encontrándose mutado en el 25% de los tumores malignos (*James et al., 1988; Henson et al., 1994*). El p53, que se encuentra muy alterado en tumores (*Louis, 1994*), se activa cuando se detectan daños en el ADN, reparándolo o disparando la apoptosis, previniendo la propagación de células dañadas o con genomas inestables (*Hoh et al., 2002; Levine et al., 2006; Vousden y Lu, 2002*).

1.3 Defectos en la señalización de los factores de crecimiento

Los gliomas tienen excesivamente activas las vías de señalización de los factores de crecimiento, lo que genera una proliferación celular excesiva. Para ello presentan un conjunto de mutaciones, siendo particularmente importantes las alteraciones en los receptores tirosina quinasa como EGFR y PDGFR.

El exceso de EGFR es la alteración genética más común en los GBM primarios, con aproximadamente un 40% de frecuencia (*Liebermann et al., 1984; Ekstrand et al., 1991; Wong et al., 1992; Gan et al., 2009*). También es posible que el propio gen EGFR esté mutado, siendo lo más habitual una variante conocida como EGFRvIII, que no se observa en tejido normal pero sí

en un 30% de los GBMs (*Emrich et al., 2002; Moscatello et al., 1995; Wikstrand et al., 1995*). Este exceso de EGFR promueve la proliferación celular (*Ekstrand et al., 1992; Huang et al., 1997; Han et al., 2006*), la angiogénesis (*Wu et al., 2004*), la invasión tumoral (*Lal et al., 2002*) y la resistencia a la apoptosis (*Boise et al., 1993; Jost et al., 2001*).

De igual manera se observa un exceso en la presencia de PDGFR y sus ligandos, PDGF-A y PDGF-B (*Hermanson et al., 1992; Plate et al., 1992; Westermarck et al., 1995; Di Rocco et al., 1998*). Se ha observado que esta sustancia estimula la proliferación celular y la angiogénesis (*Kesari y Stiles, 2006; Guo et al., 2003*).

Una pieza clave de todos los procesos mencionados es la participación de factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), y, especialmente, el Factor de Crecimiento para Fibroblastos (FGF).

1.4 Sintomatología

Los dolores de cabeza aparecen en aproximadamente la mitad de los casos, siguiendo un patrón característico, que incluye severidad progresiva y localización unilateral (*Forsyth y Posner, 1993*). Dificultades cognitivas y cambios de personalidad son también síntomas comunes, siendo a menudo confundidos con enfermedades mentales o demencia, sobre todo en pacientes de cierta edad. También puede darse incontinencia. Hemiparesias, pérdida sensorial o perturbaciones visuales son indicadores claros, y revelan la localización del tumor. En ocasiones, los síntomas se presentan súbitamente, imitando un ictus. Los ataques epilépticos se encuentran en aproximadamente el 40% de los pacientes (*Glantz et al., 2000*).

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico puede hacerse por resonancia magnética (MRI) con y sin contraste. Los gliomas se resaltan con gadolinio y suelen tener áreas centrales necrosadas, además de estar rodeados de edemas de materia blanca (*Bradley et al., 1984*). A continuación se procede al análisis de tejido del tumor obtenido por cirugía, si bien en el 20 – 30% de los casos sólo será posible realizar una biopsia, por estar el tumor en áreas donde no se puede intervenir. Además de la eliminación de muchos de los síntomas del paciente, la extracción de tejido del tumor posibilita un diagnóstico mucho más seguro y completo.

1.6 Tratamiento

El tratamiento habitual para el GBM es la extirpación quirúrgica seguida de radioterapia y/o quimioterapia con temozolomida (TMZ). Debido a que este tratamiento por sí solo no está dando los resultados esperados, se han desarrollado nuevas técnicas terapéuticas. No obstante, es habitual que estas nuevas técnicas se combinen con cirugía, radioterapia y quimioterapia (*Aoki et al., 2007*).

1.6.1 Cirugía

La extracción del tejido tumoral por cirugía es necesaria en la confirmación del diagnóstico y fundamental en el tratamiento del glioma, teniendo una influencia más que comprobada en la probabilidad de supervivencia del paciente. Se ha demostrado una mejora muy significativa en el pronóstico de los pacientes que tuvieron al menos el 98% del tumor extraído, con una media de supervivencia de 13 meses contra 8.8 (*Lacroix y Abi-Said, 2001*). Debido a esto, ha habido un esfuerzo por desarrollar operaciones quirúrgicas que maximice el porcentaje de tumor extraído sin dañar el tejido sano vecino, y sin comprometer la seguridad del paciente (*Stummer et al., 2006*). Adicionalmente, la cirugía posibilita un mejor diagnóstico y análisis del tejido tumoral. No obstante, la cirugía por sí sola no es capaz de curar la enfermedad, debido a la infiltración difusa del tumor.

1.6.2 Radioterapia

La radioterapia después de la cirugía es habitual en el tratamiento del glioma, observándose un incremento muy significativo en el tiempo de supervivencia de los pacientes, que pasa de 3-4 meses a 7-12 (*Walker et al., 1980; Stupp et al., 2005*). La dosis es generalmente de 59.4 a 60 Gy durante seis o siete semanas.

1.6.3 Quimioterapia

1.6.3.1 Temozolomida (TMZ)

La Temozolomida es un agente alquilante de la serie de imidazotetracinas que ha demostrado notable actividad antitumoral en pacientes con glioma de alto grado. Es un derivado de la decarbazina que requiere una conversión previa a PH moderado, originando un compuesto denominado MITC. El metabolito activo opera formando un catión de metildiazonio que metila el ADN en las posiciones N7 guanina, N3 adenina y O6 guanina, interfiriendo con la duplicación del ADN. Su eficiencia baja con la presencia de metilguanina DNA metiltransferasa (MGMT). Además, las vías para la reparación del ADN deben de estar operativas. En 2005, se realizó un estudio que demostró la mejoría significativa de la esperanza de vida media de aquellos pacientes que, tras la cirugía, combinaban radioterapia con quimioterapia por TMZ, aunque la mejoría era muy pequeña (*Stupp et al., 2005*). Se descubrió que la MGMT causaba resistencia a la TMZ, y su inhibición mejoraba el resultado del tratamiento (*Hegi et al., 2005*), por lo que comenzaron estudios para maximizar la eficacia del tratamiento con TMZ (*Quinn et al., 2009*). Paralelamente, se realizaron numerosos estudios en busca de medicamentos que funcionasen mejor que la TMZ. Se han propuesto sustancias como las nitrosoureas o los compuestos de platino. Poseen importantes efectos secundarios, que incluyen neutropenia o linfopenia (grado 3-4), trombocitopenia (grado 3-4), anorexia, cefalea, vómitos, náuseas, estreñimiento y fatiga (*Cahill et al., 2007*).

1.6.3.2 Nitrosoureas

Son agentes alquilantes que interfieren con la molécula de ADN, alterando su estructura o función, de tal manera que no puede dividirse, lo cual evita que la célula se multiplique (<http://consumidores.msd.com.mx/manual-merck/015-cancer/166-tratamiento-del-cancer/quimioterapia.xhtml>). Varias nitrosoureas han sido estudiadas, pero las dos sustancias más importantes en el tratamiento del glioma son la BCNU (Carmustina) y la CCNU (Lomustina). La Carmustina es la 1, 3-bis 2-dicloroetil-1-nitrosourea, y ha sido usada para quimioterapia hasta la llegada de TMZ. Se administra por inyección intravenosa, y sus resultados a la hora de mejorar el pronóstico médico de los pacientes son modestos, teniendo además importantes efectos secundarios indeseados, como fibrosis pulmonar, mielodepresión tardía, fiebre, convulsiones, hemiplegia, confusión, cicatrización anormal, náuseas, nefrotoxicidad, toxicidad hepática reversible y vómitos. La combinación de esta sustancia con otras como talidomida o teniposida no han mejorado significativamente sus resultados (*Mack et al., 2014*).

La Lomustina puede administrarse por vía oral, siendo a menudo usada en combinación con Procarbazina y Vincristina, en el llamado régimen PCV. Su eficacia es similar a la de la Carmustina, y fue otro tratamiento ampliamente usado hasta la llegada de TMZ. Su uso sí es eficaz contra gliomas de bajo grado. Posee efectos secundarios como insuficiencia hepática y/o renal y mielodepresión (causados por la Lomustina), náuseas, vómitos, mielosupresión tardía y neurotoxicidad (causados por la Procarbazina), leucopenia y neurotoxicidad (causados por la Vincristina) (*Kaloshi et al., 2014*).

1.6.3.3 Compuestos de Platino

El más usado es el Carboplatino, un agente alquilante estudiado por sus similitudes con el Cisplatino, cuyos efectos secundarios hacían desaconsejable su uso. Se inyecta por vía intravenosa. Se observaron mejorías aproximadamente en el 50% de los pacientes tratados. El principal efecto adverso del carboplatino es la mielosupresión. En esta situación, las células sanguíneas y las plaquetas producidas por la médula ósea disminuyen dramáticamente, en ocasiones por debajo del 10% de los niveles normales (*Murray et al., 2011*).

1.6.4 Tratamientos por inducción de la apoptosis

Es enormemente difícil eliminar las células del glioma, por su alta resistencia a la radioterapia y la quimioterapia. Varios estudios han demostrado que la capacidad de evitar la apoptosis es el principal factor que condiciona esta resistencia (*Krakstad y Chekenya, 2010; Johnstone et al., 2002; Hersey y Zhang, 2003; Kaufmann y Vaux, 2003*), por lo que existe un alto interés en eliminar esta resistencia y provocar el proceso apoptótico de manera controlada (*Hengartner, 2000; Evan y Vousden, 2001*). Con este fin, algunas de las sustancias críticas en el proceso apoptótico han sido elegidas como dianas terapéuticas concretas, buscando la inducción de la apoptosis.

1.6.4.1 Tirosina quinasas (TKs) como dianas terapéuticas

El papel de las TKs en la supervivencia celular las hace un objetivo claro para la terapia antitumoral. Mínimas diferencias en los puntos de anclaje TK posibilitan una inhibición selectiva, y se han encontrado moléculas que anulan más de una TK, pudiendo bloquear varias vías simultáneamente (*Mellinghoff y Sawyers, 2002*).

Imatinib es una pequeña molécula que inhibe la autofosforilación del BCR-Abl, una sustancia característica de ciertas formas de leucemia, teniendo buenos resultados en ensayos clínicos en fase 2 contra esta enfermedad (*Johnson et al., 2003b*). Varias formas de cáncer, sin embargo, no responden a esta terapia (*Johnson et al., 2003a*).

Gefitinib inhibe la autofosforilación del EGFR, y estudios *in vitro* mostraron pronto que los tumores que contenían exceso de EGFR detenían su crecimiento con esta sustancia. Sin embargo, no se han observado mejoras significativas en la supervivencia de los pacientes con gliomas de alto grado al añadir Gefitinib a la quimioterapia (*Anderson et al., 2001*).

Otros agentes similares son el GSK572016 (Lapatinib) y el CI-1033 (Canertinib), ambos inhibidores del Erb-B y efectivos contra diferentes tipos de cánceres. No se observó mejora significativa en los pacientes con gliomas de alto grado tratados con Lapatinib (*Thiessen et al.,*

2010), aunque se sigue estudiando en combinación con otras sustancias. Sí se ha verificado *in vitro* la eficacia del Canertinib, por lo que se ha propuesto su estudio *in vivo* (van Vuurden *et al.*, 2013).

1.6.4.2 Familia Bcl-2 como dianas terapéuticas.

Esta familia de sustancias contiene miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos, siendo Bcl-2 y Bcl-XL los miembros anti-apoptóticos mejor identificados y más a menudo elegidos como blanco por los tratamientos. Oblimersen es un oligonucleótido antisentido cuyo blanco son los codones 1-6 del mRNA del Bcl-2 (Klasa *et al.*, 2002). Tras resultados esperanzadores en los primeros ensayos, no se observaron mejoras significativas en la esperanza de vida en estudios mayores y la sustancia no fue autorizada por la FDA (Frantz, 2004).

1.6.4.3 Señalizadores de muerte celular como dianas terapéuticas.

La inclusión directa del señalizador de muerte CD95 produce la apoptosis en las células cancerosas, pero con el coste de una toxicidad muy elevada que hace inviable esta estrategia (Walczak y Krammer, 2000). Dado que TRAIL provoca la destrucción selectiva de células cancerosas, su toxicidad es mucho menor que la de CD95 (Lawrence *et al.*, 2001). Sin embargo, determinadas preparaciones y combinaciones de terapias pueden aumentar esta toxicidad (Jo *et al.*, 2000; Nitsch *et al.*, 2000) habiéndose incluso observado un aumento de la proliferación celular y metástasis en determinados tumores, incluyendo gliomas (Rhon *et al.*, 2001; Nagane *et al.*, 2000; Gliniak *et al.*, 1999; Keane *et al.*, 2000; Belka *et al.*, 2001; Chinnaiyan *et al.*, 2000).

1.6.4.4 Otras posibles dianas terapéuticas

La utilización de inhibidores metabólicos de FLIP como la Actinomicina D disminuyeron la resistencia a la apoptosis del tejido canceroso, haciéndolo receptivo a una terapia con TRAIL (Kim *et al.*, 2002; Sayers *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2004).

Otra estrategia se basa en considerar que las células tienen una tendencia natural a la apoptosis, que no se traduce en la muerte celular por la presencia de las IAPs. Esto explicaría las altas cantidades de caspasas-3 y -8 que aparecen en células tumorales, inhibidas por IAPs (*Yang et al., 2003*). Diferentes tratamientos se han diseñado con la inhibición de las IAPs en mente, orientados sobre todo a la survivina, con buenos resultados *in vivo* e *in vitro* (*Williams et al., 2003; Altieri, 2003; Grossman et al., 2001*). La eliminación de IAPs usando péptidos Smac/DIABLO, un inhibidor endógeno de XIAP y otros IAPs se ha probado eficaz en modelos *in vivo* de glioblastomas, con una completa erradicación del tumor sin causar apenas daños a las células sanas. Se han revelado útiles para el estudio del proceso apoptótico, y hay varios miméticos de Smac en ensayo clínico (*Wang, 2011; Brown et al., 2013*).

Otra sustancia orientada a la inhibición de XIAP es un oligonucleótido antisentido de segunda generación denominado AEG35156. Las moléculas antisentido de segunda generación son menos tóxicas, menos inmunogénicas y, en general, tienen mejores propiedades farmacológicas (*Biven et al., 2003; Rosie et al., 2013*). Hay sustancias de este tipo en ensayos clínicos de fase II y III para el tratamiento del glioma (*Cumming et al., 2004*).

1.6.5 Tratamientos basados en la inhibición de la angiogénesis: terapias antiangiogénicas.

Este apartado está dedicado a las terapias orientadas a detener el proceso angiogénico en el glioma, que no incluirán, de momento, aquellas terapias orientadas a la inhibición de los factores de crecimiento, que por su especial importancia recibirán una sección aparte.

1.6.5.1 Ventajas de la terapia antiangiogénica.

La angiogénesis es una de las características fundamentales del cáncer, ya que las células cancerosas requieren la angiogénesis para procurarse nutrientes y alimento, y para eliminar residuos. En el caso de los gliomas esto es particularmente cierto, siendo uno de los tumores más vascularizados que se conocen, y siendo la proliferación endotelial uno de los factores críticos del diagnóstico y desarrollo del glioblastoma.

Mientras que las terapias tradicionales se basan en el ataque a la célula tumoral, las terapias por inhibición de la angiogénesis se fundamentan en atacar a un objetivo más débil: la célula endotelial recién formada que constituye el vaso sanguíneo. El objetivo es así localizar y destruir un tipo específico de células para acabar así con el “ecosistema” en su conjunto, que es el tumor, al encontrarse éste privado de los nutrientes necesarios y de los necesarios mecanismos de eliminación de sustancias de desecho. En vez de centrarse en la célula tumoral, muy resistente, el tratamiento se centra en su entorno.

Las células endoteliales han sido habitualmente consideradas más estables genéticamente que las células cancerosas, y es precisamente esta estabilidad la que las convierte en un buen objetivo para el tratamiento. Un ataque directo a las células tumorales con quimioterapia pronto encuentra problemas al producirse mutaciones en las células cancerosas y desarrollar resistencia. Terapias tradicionales, como la terapia de radiación, pueden operar bien atacando la genómicamente estable célula endotelial, en vez de la genómicamente inestable célula tumoral. Mientras que las células del glioma desarrollan resistencia rápidamente gracias a un muy rápido tiempo de generación (días) y una muy alta variabilidad genética, las células endoteliales son un buen objetivo al tener un largo tiempo de generación (meses) y poca variabilidad.

Además, existe una amplia variedad de sustancias que inhiben la angiogénesis. De este modo, la creación de nuevos vasos sanguíneos por parte del tumor en crecimiento es un proceso relativamente frágil que es susceptible de ser interferido a diferentes niveles (*Wong y Brem 2008; Caffo et al., 2013*).

Algunas ventajas adicionales, al menos en teoría, de los tratamientos por inhibición de la angiogénesis contra los tradicionales son:

- Su espectro de aplicación puede ser muy amplio, al no depender del tipo de tumor ni de su fase del ciclo celular.
- Los fármacos acceden fácilmente a las células endoteliales del tumor, en oposición a los fármacos citostáticos, que tienen que penetrar en grandes masas tumorales.
- No son tan tóxicos como la quimioterapia estándar, al no producir citopenias ni toxicidad medular o gastrointestinal.

Existen sin embargo dos grandes problemas con estas estrategias.

- Se ha demostrado que las células endoteliales dentro de un tumor son estructural y funcionalmente anormales, y pueden adquirir alteraciones citogenéticas mientras se encuentran en el tumor, por lo que tienen un potencial de adquirir resistencia a los tratamientos (*Dvorak y Rons-Whipple, 2003*).
- Los inhibidores de la angiogénesis actualmente usados en ensayos clínicos están principalmente enfocados al control de un único factor pro-angiogénico, lo que puede explicar la dificultad en controlar el crecimiento tumoral, al existir numerosos factores que se compensan entre sí.

1.6.5.2 Utilización de inhibidores endógenos.

Las terapias contra tumores basadas en la inhibición de la angiogénesis se fundamentaron inicialmente en el estudio de inhibidores naturales o sintéticos que se originaban como fragmentos de proteínas estructurales (*Folkman, 2004*). Entre ellas tenemos:

- La Angiostatina: un inhibidor endógeno de la angiogénesis que se encuentra en varias especies animales, incluyendo humanos, que se sintetiza como un fragmento del plasminógeno por acción de proteasas. Fue el primer agente antiangiogénico descubierto (*Moser et al., 1999*).
- La Endostatina: una sustancia natural, fragmento del colágeno tipo XVIII aislada a partir de un hemangioendotelioma murino. Contiene un elevado número de argininas que resultan críticas para la unión a heparina y al heparan-sulfato de diversos proteoglicanos de la superficie celular, que actúan como receptores para la endostatina. Es así un inhibidor de un amplio espectro de factores de crecimiento, incluyendo bFGF y VEGF (*abdollahi et al., 2005*).
- La Tumstatina: un fragmento de colágeno tipo IV de estructura muy similar a la Endostatina.

El funcionamiento de estas sustancias no está bien entendido, y los ensayos con ellas presentan curvas bifásicas (*Celik et al., 2005*).

1.6.5.3 Moléculas de pequeño tamaño

Se han desarrollado moléculas pequeñas que inhiben la transducción de las señales proangiogénicas de la célula endotelial, como el SU6668, el SU11248 (malato de sunitinib) o el Bay 43-9006 (sorafenib). El Sorafenib se usa en el tratamiento del cáncer renal y hepático, y se ha comprobado que inhibe la proliferación celular en gliomas (*Jane et al., 2006*). Sin embargo, un estudio más amplio de su administración junto a TMZ no produjo mejoras significativas en el tratamiento del glioma (*Reardon et al., 2011*).

1.6.5.4 Inhibidores de la angiogénesis basados en el ARN

Los llamados pequeños ARN de Interferencia (small interfering RNA, siRNA), o ARN de silenciamiento, son sustancias usadas para impedir que se exprese un gen específico. La idea es así “silenciar” la síntesis de las proteínas implicadas en la angiogénesis. Numerosos estudios apoyan la eficacia de este mecanismo, usando siRNAs para silenciar factores determinantes de la angiogénesis lo que resulta en la detención del crecimiento tumoral (*Shen et al., 2006; Tabernero et al., 2013*). Sin embargo, la aplicación de siRNAs en animales y seres humanos no ha dado los resultados esperados, mostrando muy diferente eficacia en diferentes tipos de células. El mejor resultado se obtuvo en un ensayo clínico fase 1 sobre 41 personas con cáncer de hígado, con varios pacientes mostrando clara mejoría, y el cáncer controlado o en regresión a los seis meses. Pruebas por biopsia demostraron que las moléculas habían alcanzado sus objetivos (*Tabernero et al., 2013*). No hemos encontrado ensayo fase 2. A pesar de este resultado, parece que el uso de siRNAs necesita ser complementado por otros mecanismos antiangiogénicos. Una posibilidad es usar un cóctel de múltiples siRNAs, cada uno tomando como diana un gen diferente, aunque esto podría aumentar la generación de efectos indeseados al anular múltiples genes. Este problema podría solucionarse con la aparición de una nueva familia de sustancias llamadas micro ARNs (miRNAs), capaces de silenciar múltiples mensajes proteicos al mismo tiempo, posibilitando así ataques más globales a la angiogénesis en gliomas. Estas sustancias se caracterizan por que la complementariedad entre sus nucleótidos y los de sus objetivos no es completa, por lo que un único miRNA puede silenciar cientos de diferentes mRNAs (*Eulalio et al., 2008; Turner et al., 2010; Pang et al., 2009; Malzkorn et al., 2010*). En este sentido, numerosos miRNAs se están estudiando actualmente, como el miR-296 (angiomirs), el miR-15b, el miR-152, o especialmente

el miR-126 (*Fish et al., 2008; Wang et al., 2008*) y el miR-124 (*Hunt et al., 2011; Zheng et al., 2012; Xia et al., 2012*).

1.6.6 Inhibidores de los Factores de Crecimiento en terapia anti-angiogénica.

La formación de los vasos sanguíneos en la angiogénesis requiere del efecto combinado del FGF y del VEGF, siendo quizá estos factores los únicos que promueven directamente la proliferación de las células endoteliales (*Hanahan y Weinberg, 2000*). El aumento de expresión de FGF y VEGF se observó en muchos tumores vascularizados en comparación con sus homólogos en tejidos normales, por lo que la inhibición de la actividad de estos factores parece una diana potencial para el desarrollo de terapias antiangiogénicas. Muchos esfuerzos se han centrado en terapias dirigidas a la inhibición de la actividad del VEGF.

La talidomida es un potente agente teratógeno y sedativo que inhibe la angiogénesis provocada por bFGF y VEGF. Se administra oralmente y se ha comprobado su efectividad en ensayos preliminares contra el glioma, particularmente en combinación con carboplatino. Sin embargo presenta efectos secundarios como polineuropatía, fatiga y trombosis venosa que pueden dar lugar a infartos (*Eleutherakis-Papaiakovou et al., 2004; Haas et al., 2008; Bennett et al., 2006*). Estudios más recientes en ensayos clínicos en fase II no han confirmado su efectividad (*Ruiz et al., 2012; Brian et al., 2013*).

Se conoce la efectividad del uso de interferones en la regulación de factores de crecimiento como bFGF y VEGF, y recientemente se ha comprobado la estimulación de la apoptosis y la mejora del pronóstico al combinar TMZ e interferón beta en pacientes con glioblastomas (*Okazaki et al., 2012; Motomura et al., 2011*).

De particular importancia en la lucha contra el glioma fue el desarrollo de numerosos anticuerpos específicos para el VEGF, dada su importancia en la angiogénesis. El Pegaptinib o el Ranibizumab son algunos de ellos (*Ferrara et al., 2005*). En 2004 la versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra el VEGF-A (el más abundante), el bevacizumab (Avastin®, Genentech, South San Francisco, CA), se convirtió en el primer medicamento antiangiogénico

aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos. El anticuerpo reconoce todas las isoformas de VEGF-A, inhibiendo la unión de esta sustancia a los receptores Flt 1 (VEGFR-1) y KDR (VEGFR-2), Neutralizando el VEGF se reduce la vascularización de los tumores y con ello, se detiene el crecimiento del tumor (*Desjardins et al., 2008; Nghiemphu et al., 2009; Thompson et al., 2011; Hurwitz et al., 2004; de Groot et al., 2010*). Tiene una vida media en circulación de hasta 21 días después de su infusión intravenosa. Fue aprobado como agente de tratamiento de primera línea para el cáncer colorrectal metastásico, en combinación con 5 - fluorouracilo, y posteriormente fue aprobado para el tratamiento de cáncer de pulmón recurrente o metastásico de células no escamosas, el cáncer de mama y el glioblastoma. Bevacizumab resultó ser un éxito dentro del tratamiento de numerosos tipos de cáncer, pero no es una sustancia carente de problemas. Sus efectos secundarios incluyen hipertensión, retraso en la curación de heridas, hemorragias intracerebrales, tromboembolismo, perforación gastrointestinal, síndrome colinérgico, leucoencefalopatía, proteinuria y otros (*Gordon y Cunningham, 2005; Khasraw et al., 2012*). Además, se han detectado altos riesgos de complicaciones en pacientes que sufrieron una intervención de neurocirugía mientras tomaban esta sustancia (*Roelz et al., 2014*).

El objetivo de las terapias dirigidas a la inhibición de la actividad del VEGF es conseguir la regresión de los tumores al privarles de los nutrientes y oxígeno aportados por la vascularización. Sin embargo, los vasos tumorales son estructuralmente y funcionalmente anormales, lo que impide la distribución eficaz de los agentes terapéuticos a todas las regiones de los tumores y crea un microambiente edematoso anormal en el que la hipoxia reduce la eficacia de la terapia. Aunque la terapia anti-VEGF normaliza la vasculatura del tumor y alivia el edema vasogénico en pacientes con glioblastoma, su eficacia clínica no está clara. La fase II del estudio aleatorizado BRAIN en glioblastoma mostró que la tasa de supervivencia media después del tratamiento con Avastin ® es sólo 2-3 meses superior a la de otros tratamientos (*Junck, 2011*). Además hay evidencias clínicas y experimentales que sugieren que la terapia anti - VEGF podría estar asociada con la recurrencia del tumor, e incluso acelerar la formación de metástasis (*Ebos et al., 2009a; Ebos et al., 2009b; Paez-Ribes et al., 2009*).

Recientemente, la atención se ha volcado en la inhibición de otro factor de crecimiento, el FGF. Se han encontrado varias sustancias basadas en esta estrategia más efectivas que las orientadas a la inhibición de VEGF y con menos efectos secundarios. Debido a su importancia, trataremos este tema aparte.

Otros aspectos importantes se encuentran en la parte discusión de este trabajo de forma mas ampliada.

1.6.7 Nuevos conceptos en el tratamiento del glioma

La importancia de la búsqueda de un tratamiento de efectividad aceptable para el glioma ha provocado la aparición de técnicas revolucionarias, con orientaciones completamente diferentes a lo anteriormente visto. Acabamos con un repaso a estas nuevas ideas.

1.6.8 Terapia por Transferencia Génica

Consiste en la introducción de genes mediante el uso de un retrovirus. La terapia introduce un gen capaz de convertir la normalmente inofensiva 5-fluorocitosina en 5-fluoroacilo, un potente agente usado en quimioterapia (*Ostertag et al., 2012*). Se están realizando ensayos para evaluar la eficacia y seguridad de este tratamiento (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01156584> NLM Identifier: NCT01156584). El vector sólo infecta células que se están dividiendo, lo que evita que ataque a las células sanas (*Perez et al., 2012*). Aunque efectivo en laboratorio, la enorme variedad de células que pueden ser afectadas por el glioblastoma multiforme hace complicado desarrollar un método efectivo para que este retrovirus llegue a su objetivo.

1.6.9 Campos de tratamiento tumoral (Tumor Treating Fields, TTF)

Otra terapia novedosa consiste en aplicar campos eléctricos para perturbar las capacidades del glioma, evitando su proliferación y destruyendo las células en división (*Pless y Weinberg, 2011*). El campo eléctrico impide el desarrollo de la mitosis y provoca la apoptosis de la célula que trata de dividirse (*Kirson et al., 2004*). La terapia TTF implica la conexión de un electrodo a la piel y está diseñado para su uso continuo a una dosis fija. La terapia TTF ha obtenido resultados

similares a la quimioterapia tradicional, pero con una mejora significativa de la calidad de vida (*Stupp et al., 2012*). Sin embargo, la necesidad de su uso continuado impide una vida activa del paciente, y sólo afecta a tumores cerca de la superficie.

1.6.10 Nanopartículas de óxido de hierro.

Estas nanopartículas se recubren de un anticuerpo del EGFR (epidermal growth factor receptor), un receptor con elevada expresión en células tumorales. Una vez estas partículas han interactuado con el glioma, se realiza una necrosis selectiva de las células a las que se han unido por irradiación láser (*Hadjipanayis et al., 2010*). Adicionalmente, estas partículas pueden ser usadas para la visualización del tumor por MRI. El mayor problema de esta terapia es que las partículas permanecen dentro del cuerpo durante varios meses. Aunque no parecen tóxicas, se requieren más estudios. Además, sólo la tercera parte de los GBM presentan exceso de EGFR, lo que limita la aplicabilidad de esta técnica.

2. Proliferación Celular en Gliomas

2.1 Introducción

Se llama proliferación celular al incremento del número de células que se produce por división de las mismas. Es fundamental para la embriogénesis y el desarrollo de un organismo, así como para la regeneración de tejidos dañados o senescentes. La pérdida de la capacidad de proliferación celular se asocia al proceso de envejecimiento. En un organismo sano, la proliferación celular está regulada, existiendo un equilibrio entre las células que mueren (por apoptosis o necrosis) y las que se generan. Por el contrario, el cáncer puede asociarse a células que poseen capacidad para la proliferación celular ilimitada e incontrolada debido a modificaciones en su perfil genético. El origen clónico (una única célula madre originando la neoplasia) es considerado por muchos científicos una condición necesaria, aunque no suficiente, para caracterizar una proliferación celular como cancerosa (*Lee et al., 1995*).

2.2 Ciclo Celular

El conjunto de procesos por los que una célula se divide en dos células hijas se denomina ciclo celular. Dura más o menos un día, aunque factores ambientales como las alteraciones en la temperatura y el pH, o una caída en los niveles de nutrientes, llevan a la disminución de la velocidad de división celular. Se considera que el proceso está dividido en cuatro fases.

La **fase G1**, o Gap 1, es previa a la síntesis o replicación del DNA. La célula dobla su tamaño y masa expresando los genes que codifican las proteínas de su fenotipo. Existen células que pueden detener su progresión en este punto durante meses o años, en lo que se llama fase G0. En la fase G1 tenemos un punto de control, el llamado punto de restricción R. La siguiente es la **fase S**, donde se realiza la síntesis del ADN. En esta fase se replica el ADN, cada cromosoma pasando a tener dos cromátidas, es decir dos moléculas de ADN de cadena doble, copia una de la otra. El período de tres o cuatro horas posterior es la **fase G2** o Gap2, durante la cual la célula se prepara para la escisión. En esta fase tenemos otro punto de control, el G2-M. Por último, la célula entra en mitosis (**fase M**). Existe otro punto de control aquí, el punto M, entre metafase y anafase (*Alberts et al., 2008*).

2.3 Control del Ciclo Celular

Los puntos de control permiten que el proceso sólo tenga lugar tras la realización de una comprobación de que se dan las condiciones necesarias para empezar una nueva fase. Además sirven de freno en el ciclo, impidiendo que una fase empiece antes de que termine la anterior (*Morgan, 1992*). Este proceso está controlado por determinados grupos de genes. Los genes que promueven el Ciclo Celular se denominan protooncogenes. Estos genes sintetizan proteínas que pueden fosforilar a otras proteínas, lo que altera su actividad o su capacidad para poder formar parte de una estructura. Estas proteínas, llamadas CDKs (quinasas dependientes de ciclina) (Cyclin-Dependent Kinases), reciben este nombre porque su actividad es regulada por asociaciones reversibles con otras proteínas: las ciclinas. Durante cada fase del ciclo se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y CDKs, lo que produce el avance del ciclo celular (*Kumar et al., 2004*). Hay dos clases principales de ciclinas: las ciclinas G1 (D y E) se unen a las CDKs durante la fase G1 y son necesarias para el inicio de la fase S, y las ciclinas mitóticas (A y B) se unen a los CDKs durante la fase G2, y son necesarias para la entrada en mitosis.

De igual manera que tenemos genes que estimulan la proliferación, tenemos genes que regulan negativamente el ciclo, llamados antioncogenes o genes de verificación. Cuando se detecta un fallo en la integridad del genoma, se activan estos genes, los cuales pueden inhibir las CDKs o desencadenar la apoptosis. Las alteraciones pueden venir de daños generados por causa externa en el ADN o en el sistema de microtúbulos necesario para la mitosis, o bien de causas internas como los procesos de reordenamiento genético natural, o los procesos de muerte celular programada (apoptosis). También puede ocurrir que las células tengan un ADN degradado por acción de nucleasas, o que se hayan vuelto inestables debido al acortamiento de los extremos de los cromosomas de las células (telómeros) debido a su envejecimiento.

2.4 Puntos de Control

2.4.1 Punto de restricción (Punto R)

Ubicado al acabar la fase G1, al pasar por este punto de control la célula decide si se ha generado suficiente masa como para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN. Se realizan además comprobaciones sobre las condiciones ambientales: presencia de nutrientes y sales, temperatura adecuadas, y presencia de factores de crecimiento en concentraciones adecuadas. Muchas células se detienen aquí y pasan a la fase G0. Si se detecta daño celular, se activa el gen p53, reparando el ADN o deteniendo el ciclo mediante la transcripción de p21, un inhibidor de las CDKs. Si todo falla, se provoca la apoptosis de la célula.

2.4.2 Punto de chequeo de transición de fases G2 a M (Punto G2-M)

Este punto está ubicado al final de la fase G2 y es responsable de iniciar la fase M (mitosis). La célula verifica si tiene suficiente masa, revisa que no haya habido daños en el ADN y si la fase S ocurrió sin errores. Si todo es correcto, la célula inicia la mitosis. En este punto intervienen complejos formados por los dos tipos de ciclinas B (B1 y B2) y la quinasa Cdc2, (también llamada CDK1, p34, o MPF). Los complejos ciclina B1–Cdc2/CDK1 se acumulan en el citoplasma durante la interfase y son rápidamente activados y translocados al núcleo al comienzo de la mitosis. Se asocian al huso acromático en la metafase. La ciclina B se degrada en la transición metafase–anafase, causando la inactivación de Cdc2/CDK1 (*Goodarzi et al., 2003*).

2.4.3 Punto M

El punto M es un punto de control que aparece en la transición de metafase a anafase, y que se asegura de que se realice un reparto igualitario de cromosomas entre las dos células hijas, evitando errores en la creación del huso acromático y en el alineamiento y anclaje de los cromosomas en la placa ecuatorial (*Burke y Stukenberg, 2008*). Por su parte, las células cancerosas presentan frecuentemente inestabilidad de cromosomas que conduce a aneuploidias (números anormales de cromosomas), por lo que la regulación de este punto de control no está funcionando.

2.5 Protooncogenes en gliomas

Como es de esperar, en las células cancerosas los controles están relajados o incluso faltan totalmente, perdiéndose la integridad genética y pudiendo aparecer aberraciones cromosómicas importantes. Si un protooncogén está mutado o se expresa incorrectamente puede generar cáncer, pasando a llamarse oncogén. Es habitual que el oncogén genere un exceso de factores de crecimiento, siendo el PDGF (platelet derived growth factor) y el EGF (epidermal growth factor) los más característicos dentro de los gliomas (*Liebermann et al., 1984*).

Alteraciones genéticas que provocan un exceso del receptor del EGF (el EGFR) suelen provocar glioblastomas multiformes, con una variante denominada EGFR VIII observada frecuentemente (*Carlsson et al., 2006; Nakamura, 2007*). Por su parte, el PDGF es una glicoproteína dimérica de la que se conocen cinco isoformas que activan la respuesta celular a través de dos receptores, el PDGFRA y el PDGFRB (*Cao et al., 2008*). La generación de PDGFRA parece crucial en el desarrollo del glioma (*Hermanson et al., 1992*). Hay estudios que demuestran que el PDGFRA aparece en altas concentraciones en el 30% de los gliomas humanos (*Dunn et al., 2012*), y que parece necesario en los modelos de glioma para ratones (*Holland, 2001*). En concreto, la generación autocrina de PDGFRA parece ser determinante para la iniciación y progresión del glioma (*Dai et al., 2001*). En ratones, la adición de PDGFB, genera gliomas, que contienen PDGFRA (*Assanah et al., 2006*). La inhibición de la señal PDGFRA redujo el grado del tumor (*Shih et al., 2004*). Hay evidencia de que los gliomas humanos con altos niveles de PDGFRA presentan un aumento de EGFR. Estos gliomas presentan menor edad de diagnóstico y mejor tasa de supervivencia comparados con gliomas con menores niveles de PDGFRA, pero mayores de EGFR (*Chen et al., 2013; Verhaak et al., 2010*). Esto puede indicar que los gliomas con altos niveles de PDGFRA y los de altos niveles de EGFR podrían tener un origen genético distinto (*Le Mercier et al., 2012*).

3. Angiogénesis en Gliomas

3.1 Introducción

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos por extensión de vasos preexistentes, a diferencia de la vasculogénesis, donde se forman nuevos vasos a partir de células endoteliales progenitoras (angioblastos). En sí misma, la angiogénesis es un proceso natural en organismos sanos que resulta fundamental para el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y la formación de tejido granular para la cicatrización de heridas, y que, además, desempeña un papel importante en el ciclo reproductor femenino. Por otro lado, la angiogénesis está implicada en numerosos procesos patológicos, incluyendo enfermedades cardiovasculares, procesos tumorales, artritis reumatoide, retinopatía diabética y psoriasis entre otras, siendo un proceso crítico además en el crecimiento de tumores (*Ferrara, 2002*). En 1994, la Angiogenesis Foundation (www.angio.org) definió la angiogénesis como el “común denominador” de las enfermedades más importantes que afectan al ser humano.

Para que las células de un organismo vivan, es necesario que estén localizadas a una distancia de un vaso sanguíneo inferior al límite de difusión del oxígeno (entre 100 y 200 μm) (*Fang et al., 2000*). Para crecer más allá de este límite, el glioma necesita provocar una angiogénesis patológica. A través de este proceso se crea una compleja red de microcapilares que irriga al tumor, aportándole oxígeno y nutrientes y formando una ruta para el drenaje eficiente de metabolitos. Aunque no participa directamente en la carcinogénesis, la angiogénesis es determinante en el crecimiento tumoral y en la metástasis (*Carmeliet, 2005*), al generar un aporte sanguíneo indispensable. Sin este proceso, el glioma no puede crecer más allá de un cierto tamaño, diciéndose que permanece dormido o latente (*Demuth y Berens, 2004*). La relación entre la malignidad de los tumores y la angiogénesis queda de manifiesto al poder usarse la densidad microvascular, una medida del grado de angiogénesis, como buen indicador de las probabilidades de supervivencia en muchos tipos de tumores (*Ribatti et al., 2000*). Además, muchos factores angiogénicos se han identificado en elevadas cantidades en tumores.

La necesidad por parte del tumor de crear estos nuevos vasos sanguíneos ha generado un gran interés en el desarrollo de tratamientos orientados a inhibir el proceso (*Ferrara et al., 2005*), con dos objetivos claros: cortar el suministro de oxígeno y nutrientes a las células cancerosas y limitar las posibles rutas de migración de las mismas.

3.2 El proceso de la angiogénesis

Se han propuesto dos modelos para explicar la formación de los nuevos vasos sanguíneos: el sprouting, con formación de brotes y el non-sprouting (*Carmeliet y Jain, 2000*), donde se inserta tejido intersticial en la luz del vaso preexistente. Es también habitual que las precursoras de las células hematopoyéticas se trasladen desde la médula ósea y formen parte del vaso recién formado (*Fischer et al., 2005*). Suele considerarse que el proceso está dividido en cuatro fases (*Folkman, 1972*).

- a. En una fase inicial, la activación de la señalización angiogénica provoca la dilatación de los vasos preexistentes, aumentando su permeabilidad y reduciendo sus uniones intercelulares. El tejido canceroso libera factores de crecimiento como el VEGF y el FGF, que se unen a receptores específicos en las células endoteliales para activar este proceso.
- b. En una segunda etapa, las células endoteliales ya activadas segregan un conjunto de proteasas, destacándose la familia denominada metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP, matrix metalloproteinases), las cuales provocan la degradación de la membrana basal de los vasos preexistentes y de la matriz extracelular del tejido en el cual el tumor se está desarrollando, creándose pequeños orificios en dicha membrana y permitiendo así la extravasación hacia la matriz de proteínas plasmáticas como fibrinógeno y protrombina, así como de las células endoteliales que comienzan a dividirse y migrar.
- c. A continuación, se produce la migración, reclutamiento y proliferación de células endoteliales, apareciendo brotes de estas células. Estos brotes sueltos se conectan entre sí y con la corriente sanguínea, formándose redes vasculares.

- d. Por último, estos nuevos capilares formados se estabilizan a través del reclutamiento de células de soporte y de la formación de una membrana basal, reclutándose células perivasculares para lograr la estabilización (*Risau, 1997; Carmeliet y Jain, 2000*).

El movimiento y agrupación de las células endoteliales es regulado por las interacciones de las integrinas con la matriz extracelular (ECM), la cual está involucrada en la angiogénesis patológica. Estas integrinas incluyen la $\alpha\beta3$, que es estimulada en la superficie de las células endoteliales por los factores de crecimiento liberados en la primera fase. La contribución de la matriz extracelular no acaba ahí, con macrófagos y pericitos de la ECM interviniendo activamente en el proceso angiogénico, y monocitos y plaquetas llevando factores de crecimiento y adhiriéndose a los vasos recién formados (*Bingle et al., 2002; Schlingemann et al., 1996; Tucker, 2002; Reijerkerk et al., 2000; Lwaleed et al., 2001; Verheul et al., 1997*).

La regulación de la angiogénesis fisiológica se lleva a cabo manteniendo un delicado equilibrio entre factores estimulantes (proangiogénicos) e inhibidores (antiangiogénicos), dependiendo del tipo de tejido y de las necesidades específicas (*Folkman, 1999*). En la angiogénesis patológica, el glioma estimula la angiogénesis usando una variedad de proteínas señalizadoras, siendo la capacidad de generar estas sustancias determinantes para la consideración de un tumor como maligno (*Semenza, 2003a*).

Esta colección de sustancias puede dividirse en factores específicos, que se unen exclusivamente a los receptores de las células endoteliales, incluyendo las angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por Vascular Endothelial Growth Factor), y los llamados factores inespecíficos, que además de unirse a las células endoteliales lo pueden hacer a otras células del tumor, entre los que encontramos los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante (TGF α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la angiogenina, y otros.

Algunas de las claves del proceso de la angiogénesis son los factores de crecimiento. Por su especial relevancia, aquí hablaremos de VEGF, las angiopoyetinas, y la vía de señalización Notch. El FGF será motivo de un apartado específico del presente trabajo.

3.2.1 VEGF

Esta familia de sustancias induce la migración de células precursoras endoteliales a partir de la médula ósea, y estimula la proliferación y diferenciación de estas células en los lugares donde se produce la angiogénesis.

Funciona activando dos receptores de membrana tirosin-kinasa relacionados estructuralmente, el VEGFR-1 y el VEGFR-2, que son expresados por las células endoteliales de la pared vascular. La unión del VEGF a estos receptores inicia una cascada de señales que estimula el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de las células del endotelio vascular, iniciando la gemación de nuevos capilares.

Se considera que esta sustancia es clave en la angiogénesis patológica ya que parece contribuir a evitar la apoptosis de las células del endotelio, que en ausencia de factores de crecimiento estarían sujetas a una muerte celular programada. Además, estimula la permeabilidad de los vasos sanguíneos, causando la filtración de proteínas plasmáticas y la formación de un gel extravascular de fibrina (*Shibuya, 2001; Ferrara, 2005*).

3.2.2 Angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2

Se ha asociado a Ang-1 tanto con el crecimiento de los vasos en algunos tumores (*Shim et al., 2002*) como en la supresión de la angiogénesis en otros (*Visconti et al., 2002; Ahmad et al., 2001*), teniendo una función dual según factores externos no completamente dilucidados. Respecto a Ang-2 se ha relacionado con el crecimiento de tumores inmaduros al degradar la matriz extracelular (*Ahmad et al., 2001; Gale et al., 2002*), pero, de nuevo, el efecto de esta sustancia parece depender de otros factores. Por ejemplo, se han identificado sinergias entre Ang-2 y el VEGF en la estimulación de la angiogénesis en el corazón (*Visconti et al., 2002*), pero se ha encontrado que, cuando no hay suficientes agentes pro-angiogénicos, especialmente VEGF, Ang-2 causa la regresión de los vasos formados (*Maisonpierre et al., 1997; Hackett et al., 2002*).

3.2.3 VIA Notch

Las proteínas Notch (DSL) son una familia de proteínas transmembrana que poseen dominios extracelulares EGF y dominios DSL (dominios Notch), implicadas en la inhibición lateral en la embriogénesis. Incluye cuatro receptores diferentes, Notch1 a Notch4. La señalización Notch parece ser un importante factor en la proliferación y migración de células endoteliales (*Zachary y Glikli, 2001*).

Se observan cantidades menores de VEGF en células con la vía Notch activada, actuando esta sustancia como un modulador negativo de VEGF (*Williams et al., 2006*). Las células endoteliales usan la vía de señalización de Notch para coordinar la creación de nuevos brotes durante la angiogénesis (*Hellstrom et al., 2007; Leslie et al., 2007*). Cuando un conjunto de células endoteliales se ven expuestas a VEGF, no todas comienzan la angiogénesis. Las primeras células afectadas por VEGF generan DLL4, el cual activa la vía Notch, inhibiendo la acción de VEGF y controlando así el proceso angiogénico (*Siekmann y Lawson, 2007*)

Recientes estudios resaltan la importancia de Notch en la angiogénesis. Se ha verificado la inducción de angiogénesis en ausencia de VEGF a través de Notch (*Benedito et al., 2012*), y la inhibición de la angiogénesis por esta vía usando Activin receptor-like kinase, un miembro de la familia de receptores TGF- β /BMP (transforming growth factor beta / Bone Morphogenetic Proteins) (*Larrivéé et al., 2012*). En los últimos años se ha comprobado además la efectividad como inhibidor de la angiogénesis de un ligando de Notch, Protein delta homolog 1 (*Al Haj y Maddedu, 2012; Rodríguez et al., 2012*).

3.2.4 Receptores Ephrin

La familia de receptores Ephrin está formada por receptores tirosina quinasa que regulan un amplio abanico de efectos biológicos, habiéndose demostrado además un papel crítico en la angiogénesis (*Kuijper et al., 2007*). Un miembro de esta familia, Ephrin-B2, aparece asociado a la inducción de la angiogénesis (*Wang et al., 2010*) y a la regulación de VEGFR2 (*Sawamiphak et al., 2005*).

3.3 Angiogénesis e hipoxia

La hipoxia tisular es el disparador de activación angiogénica mejor conocido, siendo posible activar la angiogénesis en adultos provocando hipoxia. La respuesta celular a la hipoxia es liberar una serie de sustancias entre las que destaca el factor inducible por hipoxia (HIF-1) que provoca la transcripción de más de 200 genes que provocan numerosas alteraciones orientadas a la proliferación y supervivencia celular, incluyendo la inducción del gen de la eritropoyetina, una hormona glicoproteica fundamental para la formación de glóbulos rojos. HIF-1 altera los mecanismos que intervienen en el metabolismo del hierro (*Fraga et al., 2009*), y activa vías para el metabolismo de la glucosa independientes de la presencia de oxígeno (*Chen et al., 2001a*).

Respecto a la angiogénesis propiamente dicha, el HIF-1 activa el gen que codifica el VEGF, el más potente inductor angiogénico conocido (*Brahimi-Horn et al., 2001; Wenger, 2002*). También activa otros genes implicados en la angiogénesis como el factor derivado del estroma celular (SDF-1), el factor de crecimiento placentario (PLGF), el PDGF y las angiopoyetinas 1 y 2 (*Semenza, 2009*).

El HIF-1 es un heterodímero con dos subunidades. La subunidad alfa tiene una estabilidad, localización y actividad que va a depender de los niveles de oxígeno mientras que la subunidad β no parece estar regulada por el oxígeno. Si la concentración de oxígeno es normal, HIF-1 α se degrada por hidroxilación en los residuos de prolina 402 y/o 564 por proli-hidroxilasas (PHDs) que usan oxígeno, hierro y 2-oxoglutarato como cofactores. Esta hidroxilación provoca que HIF-1 α sea reconocido por la proteína de Von Hippel-Lindau que forma parte del complejo E3 ubiquitin ligasa, lo que causa su posterior degradación. En condiciones de hipoxia estas reacciones de hidroxilación están inhibidas al no poder actuar las PHDs en ausencia de oxígeno (*Li et al., 1996*).

Existen no obstante mecanismos de regulación de HIF-1 α que no dependen de la disponibilidad de oxígeno, sino de otras condiciones como la presencia de factores de crecimiento (*Yee Koh et al., 2008*). Muchas citocinas y factores de crecimiento pueden estabilizar el HIF-1 α bajo

condiciones de normoxia, como la insulina, el IGF-2, la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral β (TNF- β) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El mecanismo de acumulación de HIF-1 α , en este caso, viene asociado a un aumento en su síntesis, en contraposición al mecanismo de acumulación durante hipoxia, que implica una reducción de su degradación (*Chen et al., 2001b*).

α Se han descrito tres isoformas de la subunidad. HIF-1 α es la más frecuente. HIF- 2 α , aunque también está ampliamente expresada, es predominante sólo en algunos tipos celulares como células endoteliales vasculares, hepatocitos, fibroblastos de riñón, células gliales, células intersticiales del páncreas o neumocitos tipo II. HIF-3 α es el menos conocido y parece tener un papel inhibitor (*Rocha, 2007*). Respecto a la subunidad beta, HIF-1 β , se suele considerar que se expresa de forma constitutiva y que se encuentra siempre presente en exceso en la célula, aunque investigaciones recientes parecen indicar una mayor complejidad en la participación de esta subunidad (*Mandl et al., 2013*).

3.3.1 Características de la angiogénesis en gliomas

En 1971 Judah Folkman planteó la hipótesis de que el crecimiento tumoral dependía del proceso angiogénico. Desde entonces, las publicaciones y estudios sobre la angiogénesis han aumentado continuamente, y ya en el año 2000 se estaban realizando ensayos clínicos de 24 medicamentos basados en su inhibición (*Kerbel, 2000*). Fue en ese mismo año cuando Hanahan y Weinberg definieron los principales procesos característicos de un cáncer, nombrando la angiogénesis sostenida como uno de ellos (*Hanahan y Weinberg, 2000*).

La observación directa de los tumores prueba que existen dos fases de crecimiento bien diferenciadas. En una primera fase, cuando el tumor es pequeño, la proliferación de células cancerosas se equilibra con la muerte de las células adyacentes (apoptosis) por falta de riego sanguíneo. Si el tumor se activa, pasa a una fase marcada por el crecimiento exponencial del tumor, siempre acompañado de la formación de nuevos vasos sanguíneos y de metástasis (*Folkman, 1990*).

No está claro qué es lo que causa la activación del fenotipo angiogénico (angiogenic switch), considerándose que este comportamiento se activa cuando los promotores de la angiogénesis predominan sobre los inhibidores de la angiogénesis. Diversos factores pueden generar esta situación, como la bajada del pH en el medio (acidosis), deficiencia de hierro, una baja presión de oxígeno (hipoxia), el estrés mecánico o una respuesta inflamatoria. También pueden intervenir eventos genéticos, con mutaciones que activen protooncogenes como el *bcl2*, *K-ras* o *H-ras*, o inhibiciones de genes como el *p53* (Folkman et al., 2001). La aparición de factores de crecimiento también dispara esta activación.

3.3.2 Hypoxia en células cancerosas

En los tumores es habitual encontrar áreas de hipoxia, debido a la alta proliferación celular y a la ineficiencia de los vasos sanguíneos. Alrededor de la mitad de los tumores sólidos tienen una oxigenación menor de 10 mm de Hg y aquellos con menos de 7 mm de Hg presentan mutaciones genómicas, aberraciones cromosómicas, amplificación de genes y poliploidía, teniendo mucho peor pronóstico, y estando asociados a mayor invasión, angiogénesis tumoral, metástasis y resistencia a la quimioterapia (Semenza, 2003b). Para las células tumorales es necesario la adaptación a condiciones de hipoxia, habitualmente mediante la inducción de HIF-1, lo que convierte la inhibición del HIF-1 en una estrategia a estudiar para futuros tratamientos (Du et al., 2008).

3.3.3 Gen *p53*

El *p53* es el gen que más a menudo aparece mutado en cánceres en seres humanos, llegando a aparecer en aproximadamente la mitad de ellos (González-Moles et al., 2001; Kozomora et al., 2005). Se ha observado que bloquea la angiogénesis [61]. La mutación de *p53* activa factores proangiogénicos como el VEGF, FGF-2 y HIF-1. También se altera la generación de proteínas tipo trombospondina como TSP-1 (Dameron et al., 1994) y se potencia la proteinquinasa C (PKC), otro regulador del ciclo celular determinante en la inducción de factores de crecimiento vasculares (Kieser et al., 1994).

3.3.4 Vasos generados por un glioma

Las células de los gliomas modifican el ARNm de las células endoteliales, habiéndose observado claras diferencias en los niveles de proteínas específicas entre células sanas y modificadas (*Karcher et al., 2006*). Los vasos sanguíneos que se forman son así muy diferentes de los de los tejidos sanos, presentando desprendimiento perivascular, dilataciones y formas irregulares, con diámetros desiguales. Además su recubrimiento por las células endoteliales no es perfecto, presentando múltiples aberturas y siendo muy propensos a fugas y hemorragias, aspecto acentuado por ser dichas células más permeables de lo normal (*Miebach et al., 2006*). No siempre están conectados entre ellos, y no se organizan en vénulas, arteriolas y capilares, sino que los vasos que se forman combinan características de todos los tipos (*Dvorak y Rons-Whipple, 2003*). También se ha encontrado un bajo nivel de oxígeno en los tejidos cancerosos (hipoxia), y una alta presión intersticial (*Jain, 1994*).

Así, su estructura interna no está suficientemente ordenada como para suministrar nutrientes y oxígeno adecuadamente al tejido, siendo la circulación muy lenta e irregular, e incluso pudiendo dejar de funcionar. Los vasos linfáticos funcionales suelen estar ausentes en el interior de un tumor y agrandados en su periferia, con los vasos de la periferia posibilitando la metástasis linfática. Hay además evidencia de que las células cancerosas se incorporan y participan activamente en estos vasos sanguíneos, formando un mosaico que revela una compleja interacción entre ambos tipos de células (*Fischer et al., 2005*).

4. El Factor de Crecimiento para Fibroblastos (FGF) y su importancia en gliomas

4.1 Factores de Crecimiento para Fibroblastos (FGF)

4.1.1 Generalidades

Los Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) conforman una familia de factores de crecimiento de 22 miembros, aunque algunos autores elevan el número a 28 (Gospodarowicz et al., 1974), significativamente distintos tanto en secuencia como en tamaño (17-20 kDa), pero todos ellos con una región central homóloga de unos 120-140 residuos. Todos ellos se unen a la heparina con alta afinidad (una Kd de 1-2 nM), excepto los miembros de la subfamilia de FGF-19 (FGF -15, -19, -21 y -23), los cuales presentan poca afinidad con los glicosaminoglicanos (Asada et al., 2009). Los miembros mejor caracterizados de la familia son el FGF-1, conocido también como FGF ácido o aFGF, y el FGF-2, conocido como FGF básico o bFGF.

Estas sustancias tienen una importancia clave en la supervivencia celular, la apoptosis, la proliferación, la diferenciación, la composición de la matriz extracelular, la quimiotaxis, la adhesión y la migración celular. Adicionalmente, juegan un papel esencial en prácticamente todos los procesos embrionarios, incluyendo el desarrollo del mesodermo y neuroectodermo, el control de los movimientos morfogenéticos, la modelización anteroposterior, la somitogénesis y el desarrollo de numerosos órganos (Bottcher y Niehrs, 2005). Para desempeñar tan diferentes roles, la modulación de su señalización es enormemente compleja, siendo determinante la presencia o ausencia de otras sustancias. Tipos diferentes de células, o incluso la misma célula en situaciones distintas, pueden mostrar respuestas diferentes o incluso directamente opuestas tras la exposición a los FGFs, dependiendo de su estado bioquímico, de su estado de diferenciación o del medio físico y químico en el que se encuentra la célula (Szebenyi y Fallon, 1999).

Todos los FGFs, con la excepción de los FGFs intracelulares (iFGFs, FGF -11 -12 - 13 y -14), señalizan a través de una familia de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, los receptores de FGF (FGFRs). En vertebrados, la familia FGFR tiene cuatro genes, denominados

FGFR1 al.4, que contienen diferencias en su dominio extracelular para generar una vasta variedad de receptores con diferentes afinidades (*Szebenyi y Fallon, 1999; Olsen et al., 2003; Itoh y Ornitz, 2004*). Se ha identificado un quinto receptor, FGFR -5 (*Sleeman et al., 2001; Wiedemann y Trueb, 2000*). Este receptor carece de un dominio kinasa, y su función es desconocida (*Sleeman et al., 2001*).

Los FGFs se aislaron por primera vez en la década de 1980 a partir de extractos de cerebro bovino, habiendo despertado el interés por sus actividades mitogénicas y angiogénicas (*Gimenez-Gallego et al., 1985*). Tras el descubrimiento de su alta afinidad a la heparina, se desarrollaron protocolos estandarizados de purificación usando cromatografía para facilitar su estudio (*Harper et al., 1986; Maciag et al. 1984*). Se han encontrado miembros de la familia FGF en todo tipo de organismos multicelulares, desde nemátodos a ratones, y al ser humano, sin que se haya encontrado evidencia de su presencia en organismos unicelulares como la *Escherichia coli* (*Itoh y Ornitz, 2004*). Se observa igualmente que el número de miembros de las familias FGF y FGFR aumenta a lo largo del proceso evolutivo (*Itoh y Ornitz, 2004; Ornitz y Itoh, 2001*), y la dispersión de estos genes por el genoma indica que la familia fue generada tanto por duplicación cromosómica como por translocación (*Ornitz y Itoh, 2001; Thisse y Thisse, 2005*).

Normalmente los FGFs se encuentran atrapados en la matriz extracelular, de la que son liberados en el momento adecuado por heparanasas u otras proteínas especializadas (*Cuevas et al., 1994; Cuevas et al., 1996a; Cuevas et al., 1996c; Abuharbeid et al., 2006; Finetti et al., 2008*). La alteración de este sistema de señalización o los fallos en su sistema de control puede causar graves perturbaciones fisiológicas.

Aunque la afinidad de los FGFs por la heparina fue reconocida al poco de su descubrimiento (*Klagsbrun y Shing, 1985*), el sustrato fisiológico para los FGFs en condiciones normales es el heparán sulfato (HSPG), un proteoglicano cuyo grupo funcional glucósido es un glucosaminoglicano parecido a la heparina. Se encontró más tarde que el HSPG también participa en la señalización de los FGFs (*Szebenyi y Fallon, 1999; Burgess et al., 1990; Lozano et al., 2001*). Los ligandos FGF se unen al dominio extracelular de los FGFRs en combinación

con el HSPG para formar un triple dímero 2:2:2 FGF: FGFR: HSPG. Esto dispara la activación de vías de transducción de señales citoplasmáticas como la vía Ras/ERK, asociada con la proliferación y diferenciación, la vía Akt, asociada a la supervivencia celular, o la vía de la proteína quinasa C (PKC), asociada a la morfología celular y a la migración (*Dailey et al., 2005; Mohammadi et al., 2005; Schlessinger, 2000*).

4.1.2 Diversidad de la señalización del FGF

La enorme variedad de funciones del FGF se traduce en una inmensa variedad en su señalización. Estructuralmente esto se traduce en numerosos puntos maduración alternativa, que dan lugar a receptores isomorfos con diferentes propiedades de enlace (*Johnson y Williams, 1993*). Por ejemplo, el FGF-2 interactúa con los receptores FGFR-1 a FGFR-4, mientras que el FGF-7 interactúa en exclusiva con una variante del FGFR-2 denominada KGFR (*Ornitz y Itoh, 2001; Murono et al., 1993*).

Los FGFR poseen hasta tres dominios de tipo inmunoglobulina (dominios IgI, IgII, IgIII), un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular dividido en dos secciones. Estos tres dominios se diferencian desde el mismo transcrito primario de mRNA mediante maduración alternativa, dando las variantes FGFR-1, - 2 y -3 (*Ornitz et al., 1996; Cancilla et al., 2001; Bottcher y Niehrs, 2005*). Entre IgI y IgII hay un conjunto de aminoácidos conocido como la ‘caja ácida’, con funciones de auto-inhibición, interactuando con HSPG para impedir la activación del receptor en ausencia de FGF (*Chaudhuri et al., 1993*). El primer FGFR-1 clonado contenía tres dominios Ig, refiriéndose a él como la forma larga (*Lee et al., 1989*). Una segunda forma, la forma corta, donde el primer dominio Ig se perdía, fue clonada posteriormente (*Reid et al., 1990; Johnson et al., 1990; Mansukhani et al., 1990*). Aunque el FGF interactúa con los FGFRs a través de los dominios IgII e IgIII, hay evidencia de que el dominio uno afecta de algún modo la afinidad de dicha unión (*Shi et al., 1993*).

La región asociada a la especificidad del ligando es la mitad C-terminal del dominio IgIII. Esta región puede generarse en los FGFR-1, -2 y -3 de dos exones diferentes, diferenciándose así entre las formas IIIb (generada por el exón 8) y IIIc (exón 9) (*Johnson et al., 1991; Werner et*

al., 1992; Avivi et al., 1993; Chellaiah et al., 1994). Esto no ocurre en el FGFR-4, cuyo dominio IgIII es siempre el mismo, y muy similar al IgIIIc (*Vainikka et al., 1992*). Las formas alternativas IIIb y IIIc tienen comportamientos diferentes. Por ejemplo, el FGFR-2 IIIb se une al FGF-7 pero no al FGF-2, algo que sí hace el FGFR-2 IIIc (*Ornitz et al., 1996*). Esta diferenciación parece depender del tejido específico en el que va a intervenir la sustancia, y afecta enormemente a la especificidad del ligando (*Powers et al., 2000; Thisse y Thisse, 2005*). Por ejemplo, la isoforma FGFR-2 IIIb sólo se observa en células epiteliales, y la FGFR-2 IIIc es específica del tejido mesenquimal (*Eswarakumar et al., 2005*). Además de homodimerizar, los FGFRs también son capaces de heterodimerizar, lo que añade otro punto de complejidad a las posibles respuestas a los FGFs (*Shi et al., 1993; Bellot et al., 1991*).

Otra característica de los FGFRs es la existencia de un dominio de unión a la heparina y de una cadena transmembrana que conecta la parte extracelular con la región yuxtamembrana (JM) intracelular (*Gillespie et al., 1995*), siendo el dominio JM considerablemente mayor que en otros receptores (*Klint y Claesson-Welsh, 1999*). También encontramos un dominio tirosina quinasa intracelular (*Nagendra et al., 2001*). Esta región quinasa está dividida en dos secciones separadas por un bloque de 15 aminoácidos, y contiene dos residuos de tirosina fosforilables en el FGFR-1 y -2, uno en el FGFR-3 y ninguno en el FGFR-4 (*Szebenyi y Fallon, 1999*). El potencial mitogénico del FGFR-4 parece menor que el del resto de receptores, lo que puede ser debido, en parte, a la carencia de dichos residuos de autofosforilación (*Szebenyi y Fallon, 1999; Feng et al., 1997*).

4.1.3 Heparán sulfato y FGFR

Un importante aspecto de la biología del FGF es la interacción con el heparán sulfato proteoglicano (HSPG), estando reguladas las interacciones entre el FGF y FGFR por la presencia de esta sustancia (*Thisse y Thisse, 2005; Lin, 2004*). Se ha establecido que la heparina es necesaria para que el FGF active de modo efectivo el FGFR en células con problemas a la hora de sintetizar HSPG, o en células que han sido tratadas con enzimas que degradan el HSPG o a las que se han añadido inhibidores de la sulfatación (*Ornitz et al., 1992*). De igual modo, estudios bioquímicos han revelado la importancia del HSPG en la señalización del FGF, que

parece ser requerido para la correcta interacción entre el FGF-1 y el FGFR-2 y entre el FGF-2 y el FGFR-2 (*Thisse y Thisse, 2005; Schlessinger et al., 2000; Pellegrini, 2001; Pellegrini et al., 2000*). En ausencia de esta sustancia, el FGF puede activar sus receptores, pero sólo a altas concentraciones, y en estas condiciones no se ha observado que induzca proliferación celular (*Ostrovsky et al., 2002*). También se ha observado que el FGFR-1 contiene una secuencia para unión con heparina de 13 aminoácidos, por lo que se piensa que el HSPG interactúa directamente con el FGFR a la vez que con el FGF, formando un complejo ternario antes de que comience la transducción de la señal (*Kan et al., 1993*).

Diferentes estudios parecen indicar la implicación de la familia de proteoglicanos transmembrana llamados sindecanos como co-receptores de los FGF, habiéndose identificado sindecano-1 al -4 junto a miembros de la familia del FGF en etapas específicas del desarrollo (*Thesleff et al., 1988; Wilkinson et al., 1989*), dependiendo del tejido implicado. Sindecano-1 se observa en tejidos epiteliales y mesenquimales, sindecano-2 en tejidos mesenquimales, en células neuronales y epiteliales, sindecano-3 en tejidos neuronales, músculos y hueso, y el sindecano-4 se encuentra en todo tipo de células (*Couchman, 2003; Tkachenko et al, 2005*). Se considera probable que sindecanos, FGFs y FGFRs interactúen entre ellos formando estructuras ternarias que facilitan la transducción de la señal del FGFR (*Elenius y Jalkanen., 1994*).

4.1.4 Vías de la transducción de la señal del FGF

La señalización del FGFR está mediada por reclutamiento directo de proteínas de señalización que se unen a los lugares de autofosforilación de tirosina en el receptor activado, o por reclutamiento indirecto de proteínas que han fosforilado su tirosina en respuesta a la activación con FGF (*Eswarakumar et al., 2005; Ong et al., 2000*). La formación del complejo FGF-sindecano/heparán-FGFR genera la fosforilación del receptor y la activación de diferentes vías de señalización intracelulares, siendo las tres más importantes la vía Ras/MAPK, la vía PI3K/Akt y la vía JAK/STAT (*Bottcher y Niehrs, 2005; Eswarakumar et al., 2005; Lamothe et al., 2004; Mohammadi et al., 1991*). En cada caso concreto, se activará una u otra vía.

La vía Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, proteínas quinasas activadas por mitógenos) regula la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Una de las proteínas más importantes de esta vía, Raf, se encuentra mutada en más del 70% de melanomas, lo que la ha convertido en un objetivo para muchos tratamientos (*Iozzo y Sanders, 2011; Reck, 2010; Allain et al., 2004*). Adicionalmente, esta vía estimula la generación miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (*Sanderson, 2001; Plum et al., 2004*).

Respecto a la vía PI3K/Akt, se ha observado que esta vía estimula la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B), un factor de transcripción implicado en la resistencia de la célula a la apoptosis, capaz de generar miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 e inhibidores de la apoptosis (IAPs) (*Angulo et al., 2011; Vlodaysky et al., 1990; Vlodaysky et al., 2000*). Además, NF- κ B es clave en el desencadenamiento de respuesta inflamatoria (*Orlowski y Baldwin, 2002; Nakshatri y Goulet 2002; Hayashi et al., 2003*). Además, NF- κ B es clave en el desencadenamiento de respuesta inflamatoria (*Widera et al., 2008*).

La vía JAK/STAT utiliza miembros de la familia Janus quinasas (JAK) para la transmisión de señales desde los receptores tirosina quinasa a la familia STAT (signal transducer and activator of transcription; transductor de señalización y activador de la transcripción) de factores transcripcionales, incluyendo STAT3 y STAT5. STAT3 se ha demostrado que suprime la apoptosis aumentando las cantidades de Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) (*Daniel y Korsmeyer, 2004; Taylor et al., 2008a*), y se están estudiando diferentes inhibidores moleculares de esta sustancia (*Cory y Adams, 2002*).

Una vía adicional es la vía fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ)/Ca²⁺, o ruta de la proteína quinasa C (PKC), que se activa cuando la autofosforilación de un residuo de tirosina en el extremo C-terminal del FGFR genera un punto de unión específico para el dominio SH2 (Src Homology 2 protein domain) de la PLC γ (Phosphoinositide phospholipase C) (*Mohammadi et al., 1991*). Los últimos componentes activados en las tres vías fosforilan factores de transcripción específicos de la familia Ets, que a su vez activan la expresión de los genes diana del FGF.

4.1.5. Control de la señalización del FGF

El amplio rango de efectos biológicos de los FGFs y la variedad de vías de señalización activadas por esta familia implica que la señalización del FGF debe de estar fuertemente regulado en lo que se refiere al momento, duración y fuerza de la señal (*Thisse y Thisse, 2005*). Se conoce un gran número de proteínas, en continuo crecimiento, que se sabe regulan la actividad del FGF, siendo denominadas grupo de syn-expresión del FGF. Estas proteínas son a su vez reguladas por la señalización del FGF e inhiben las señales del FGF estableciendo bucles de retroalimentación negativos [78] (*Furthauer et al., 2002; Tsang et al., 2002; Tsang y Dawid, 2004; Niehrs y Meinhardt, 2002*).

El primer regulador de este tipo del FGF identificado fue Sprouty (Spry). Se ha demostrado que esta sustancia interfiere la señalización del FGF (*Thisse y Thisse, 2005; Furthauer et al., 2001; Minowada et al., 1999; Furthauer et al., 2004; Nutt et al., 2001; Mailleux et al., 2001*). No es el único, habiéndose encontrado muchos otros (*Gawantka et al., 1998; Kudoh et al., 2001*). Entre ellos tenemos el gen XFLRT3, que codifica una proteína transmembrana que se caracteriza por un conjunto de repeticiones ricas en leucina y un dominio de tipo III de fibronectina dentro del dominio extracelular. La expresión de este gen se induce tras de la activación del FGF, y provoca la fosforilación de ERK (extracellular signal-regulated kinases), mientras que es bloqueado por la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) fosfatasa 1 (*Bottcher et al., 2004*).

4.2 Vía de señalización del FGF en el glioma

4.2.1 Generalidades

Hay un gran número de evidencias que apuntan a la contribución de la señalización del FGF en la tumorigénesis y progresión del glioma. Para empezar, los gliomas muestran una regulación positiva de la señalización de FGF/FGFR. Ya a principios de los 90, se observó consistentemente en los gliomas humanos una elevada expresión del FGF-1 y el FGF-2 (*Paulus*

et al., 1990; Stefanik et al., 1991), demostrándose la producción de FGF-2 por las células tumorales (*Takahashi et al., 1990*), y asociándose este dato con la malignidad de los gliomas (*Paulus et al., 1990; Takahashi et al., 1992*). Se detectaron además receptores de FGF tanto en las células tumorales como en el propio tejido normal (*Takahashi et al., 1991*). Posteriormente, la evaluación de diferentes tipos de FGFR ha demostrado que mientras que el FGFR-2 se expresa igualmente en los gliomas humanos y en la sustancia blanca sana, el FGFR-1 sólo está presente en los gliomas de alto grado de malignidad (*Morrison et al., 1994; Yamaguchi et al., 1994; Ueba et al., 1994*). Otro receptor, el FGFR-4, ha sido asociado a la progresión del glioma, estando presente sólo en alguno de los astrocitomas de grado III y en casi todos los de grado IV, habiéndose observado un claro descenso de la esperanza de vida en pacientes con tumores con presencia de FGFR-4 (*Yamada et al., 2002*). También se observa una sobreexpresión del glipicano-1, un HSPG de la superficie celular, como era de esperar por la influencia antes mencionada del HSPG en la vía de señalización FGF/FGFR (*Su et al., 2006*).

Aunque casi todos los estudios se centran en el FGF-1 y FGF-2, existen evidencias puntuales de la posible implicación de otros FGF en la tumorigénesis y la progresión del glioma. En este sentido, el FGF-9 parece estimular el crecimiento de células de glioma y ha sido identificado en gliomas humanos y otros tumores cerebrales, aunque también se detecta inmunorreactividad para este factor en las neuronas de la corteza cerebral humana normal (*Todo et al., 1998*). Además de regular la proliferación, el FGF-9 también parece estimular la producción de metaloproteinasas y de la proteína glial ácida fibrilar en las células del glioma (*Miyagi et al., 1999; Miyagi et al., 1998*). Por otro lado, el FGF-5, que aparece en tejidos embrionarios, se encuentra sobreexpresado en los gliomas humanos, y parece estimular la proliferación, migración y supervivencia de las células de glioma (*Allerstorfer et al., 2008*).

La relevancia de los FGF y FGFRs en la patogénesis del glioma está apoyada por el constante hallazgo de miembros de la familia FGF en cultivos de células de glioma (*Morrison et al., 1993*). Además, la alteración de la señalización FGF/FGFR provoca una inhibición de la proliferación celular (*Takahashi et al., 1991; Loilome et al., 2009*), mostrando claramente el importante papel del FGF en el crecimiento del glioma.

4.2.2 Participación de la señalización del FGF en las características claves del glioma

Se ha observado la señalización del FGF en los principales procesos celulares con un fenotipo favorable a la formación y crecimiento de los gliomas. Por ejemplo, el FGF-1 se libera por los astrocitos ante condiciones de estrés como la privación de suero, favoreciendo la supervivencia celular (*Matsunaga y Ueda, 2006*). Se cree por ello que la señalización de FGF ayuda a las células tumorales a evitar la apoptosis, y de hecho la inhibición del FGF endógeno provoca la activación de la apoptosis a través de la vía de la caspasa-9 (*Fukushima et al., 2008*), mientras que la actividad autocrina de FGF inhibe la apoptosis y promueve la supervivencia de las células de glioma mediante la activación de las vías Ras y fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K)/Akt (*Sakata et al., 2002*). Otro factor determinante para la malignidad del proceso canceroso, la capacidad para la migración de las células tumorales, se ha relacionado igualmente a la señalización de FGF [113] (*Lund-Johansen et al., 1992; Brockmann et al., 2003; Fukai et al., 2008*).

La angiogénesis es otro proceso esencial no sólo para el crecimiento del tumor mediante el suministro de nutrientes, sino también para la propagación de células tumorales y para la metástasis. El papel de los FGFs como estimulador de la angiogénesis es conocido desde hace tiempo, siendo de hecho los FGF-1 y FGF-2 los dos primeros polipéptidos puros que se demostraron que promovían la angiogénesis (*Thomas et al., 1985; Esch et al., 1985*). En concreto, se demostró que la señalización del FGF promueve la proliferación y migración de las células endoteliales y la degradación de la matriz extracelular, todos ellos procesos implicados en la neo-vascularización (*Presta et al., 2005*), por lo que no se duda de la correlación entre la presencia de FGF/FGFR y la angiogénesis en los gliomas humanos (*Takahashi et al., 1992; Bian et al., 2000*).

4.2.3 El FGF y las células troncales del glioma

Uno de los conceptos clave para la comprensión de la tumorigénesis que ha cobrado importancia recientemente es el de las denominadas células madre tumoral, que son aquellas células de entre la heterogénea población del tumor capaz de generar un tumor por sí mismas. Son estas células

las que podrían ser responsables de la tumorigénesis, la metástasis y la recurrencia, e incluso parecen contribuir a la resistencia del glioma a la quimioterapia, todas ellas características fundamentales en el grado de malignidad del tumor (*Binello y Germano, 2011*). Se cree que el FGF podría ser un factor determinante para el mantenimiento de la plenipotencialidad de las células madre, incluyendo las neurales. Se sabe que el FGF promueve la formación de neuroesferas por las células madre neurales, aumentando su capacidad de auto-renovación (*Lee et al., 2009*), efecto que se observa también en las células madre del glioma (*Hsu et al., 2010*). Además el FGF parece contribuir a la capacidad de las células madre del glioma de escapar de la terapia de radiación (*Firat et al., 2011*).

4.2.4 FGF y quimiorresistencia

Se ha propuesto el FGF como un posible causante de la quimiorresistencia en el cáncer (*Song et al., 2000*). Hay estudios que demuestran que la activación de la señalización del FGF induce la quimiorresistencia in vitro en células de leucemia (*Karajannis et al., 2006*), y se ha correlacionado la expresión de FGF-2 con la resistencia al paclitaxel en diferentes cánceres humanos (*Gan et al., 2006*).

Todas estas evidencias demuestran que la vía de señalización de FGF / FGFR es crucial para los principales procesos relacionados con el crecimiento, la progresión y la malignidad de los gliomas. Es por ello que la inhibición de la señalización de FGF es una estrategia atractiva para el desarrollo de nuevos tratamientos para el glioma.

4.3 Derivados dihidroxifenólicos como inhibidores del FGF en el tratamiento contra el glioma

4.3.1 Compuestos sulfonados dirigidos al dominio de unión a heparina de FGF/FGFR

La heparina y otros glicosaminoglicanos sulfatados fueron concebidos inicialmente como una trampa química para el FGF, y también como protectores, pero más tarde se demostró que participaban en la unión al FGFR y su activación (*Ornitz et al., 1995*). Este último efecto puede ser imitado por pequeñas moléculas polisulfonadas como la mio-inositol hexasulfato (MIHS) (*Pineda-Lucena et al., 1996*).

Con glicosaminoglicanos sulfatados, FGF y FGFR forman un complejo ternario que se requiere para la transducción de señales (*Jastrebova et al., 2006*). A partir de esta evidencia, el grupo dirigido por los profesores Pedro Cuevas y Guillermo Giménez Gallego enfocó sus esfuerzos a encontrar sustancias que tuviesen la capacidad de impedir la formación de este complejo ternario. La suramina, una urea binaftilo polisulfonada que se utiliza como fármaco antiparasitario, resultó tener efectos inhibidores sobre la señalización del FGF y mostró efecto anti-tumoral (*Pesenti et al., 1992*). Más adelante, se determinó que una parte de la estructura de la molécula por sí misma, el 1, 3, 6 - naftalenotrisulfonato (NTS), era capaz de impedir la formación del complejo FGF/FGFR/MIHS (*Lozano et al., 1998*). El NTS también inhibe la estimulación de la angiogénesis inducida por FGF (*Cuevas P. et al., 1999a*). Esta actividad inhibitoria sobre el FGF provoca la inducción de la apoptosis en las células C6 de glioma de rata (*Cuevas P. et al., 1999b*), e impide el crecimiento de glioma y la angiogénesis tras la implantación de células C6 en la córnea de un conejo (*Cuevas P. et al., 1999c*). También se demostró que una versión simplificada del NTS, el 1-naftalenomonosulfonato (NMS), era claramente mejor inhibidor de la actividad mitogénica del FGF. En la evaluación de la progresión de un glioma ortotópico en modelo de rata, la imagen por RMN (resonancia magnética nuclear) mostró una reducción del volumen del tumor inducido por células C6 en el núcleo caudado derecho de ratas Sprague-Dawley tras un tratamiento con administración continua de NMS en el lugar de la implantación, a partir de 6 horas después de la misma (*Cuevas et al., 2001*). La reducción del crecimiento del glioma por NMS se asoció con una reducción en la vascularización del tumor junto con un incremento de la apoptosis (*Cuevas et al., 2001*). Además, se identificó un análogo del NTS, el ácido 5-aminonaftaleno-2- sulfónico (5A2NMS), que mostró una IC50 (concentración capaz de inhibir un 50% de la actividad) 30 veces menor que la del NTS (*Fernandez-Tornero et al., 2003*).

4.3.2 Derivados del 2,5-dihidroxifenil sulfonato (2,5- DHPS)

El análisis de la estructura tridimensional del 5A2NMS permitió la formulación de una serie de reglas para identificar posibles candidatos adicionales para la inhibición del FGF mediante la búsqueda en bibliotecas de productos naturales.

El ácido gentísico (ácido 2,5- dihidroxifenilfórmico), un metabolito secundario de plantas con amplia distribución, implicado en la defensa contra las plagas y, además, un catabolito de la aspirina, definió un nuevo grupo de inhibidores de FGF, que incluye al ácido homogentísico, el agente tóxico de la alcaptonuria, demostrándose que estos compuestos inhiben las actividades más relevantes del FGF, al menos de los dos miembros más importantes de la familia, el FGF-1 y el FGF-2 (*Fernandez et al., 2010*). La conformación para- del grupo dihidroxifenil y la funcionalización del anillo aromático por un grupo ácido son las limitaciones químicas que definen la eficiencia de estos derivados aromáticos en la inhibición del FGF. Estos compuestos reconocen tanto los factores de crecimiento como sus receptores, desplazando a la heparina de su sitio de unión, cambiando la estructura tridimensional del factor de crecimiento en su dominio de unión al receptor, y siendo así capaces de disociar el complejo de señalización.

Sin embargo, entre la serie de compuestos dihidroxifenil ensayados en estos estudios, el candidato más prometedor fue un compuesto sintético que tiene un grupo sulfonato, el 2,5-dihidroxifenil sulfonato (2,5-DHPS) (*Fernandez et al., 2010*). El 2,5-DHPS muestra una IC50 3.000 veces menor que el NTS en ensayos in vitro, e inhibe la proliferación y la migración inducida por FGF en fibroblastos y la angiogénesis inducida por FGF-1 in vivo en ratas. Además, la administración intraperitoneal del 2,5-DHPS en ratas con gliomas subcutáneos inducidos por implantación de células C6, resultó en la inhibición de la progresión de estos tumores (*Fernandez et al., 2010*). La reducción de tamaño de los gliomas iba asociada a una clara inhibición en la vascularización del tumor, tanto en la periferia como en la parte interior (núcleo) de los tumores.

4.3.3 Impacto del 2,5- DHPS sobre el crecimiento y la supervivencia de las células C6 de glioma

La demostración de la eficacia anti-tumoral de 2,5-DHPS en el modelo de glioma de rata heterotópico fue de hecho precedida por las evidencias que muestran su efecto inhibitorio en células C6 de glioma in vitro. El tratamiento con 2,5-DHPS inhibe la proliferación de células C6 con una IC50 de 25 μ M. Esta capacidad antiproliferativa está relacionada con un aumento en la apoptosis de las células de glioma (*Cuevas P. et al., 2005a*), efecto que se asocia con una

interferencia en la expresión y/o activación de los efectores intracelulares y factores de transcripción relacionados con la vía de señalización de FGF/FGFR.

Para empezar, el 2,5-DHPS reduce la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), ERK1/2 en células de glioma C6 (Cuevas P. et al., 2006a), una vía de señalización responsable de la transducción de estímulos proliferativos. Otra sustancia importante es STAT-3, que desempeña un papel pleiotrópico en la tumorigénesis y es necesario para el crecimiento y auto-renovación de células madre de glioblastoma (Sherry et al., 2009), lo que apunta a la inhibición de STAT-3 como otro posible objetivo prometedor para el tratamiento de la enfermedad. Se observó que la activación de STAT-3, así como la expresión de la ciclina D1 y Bcl-XL, son inhibidas por el 2,5-DHPS en las células de glioma (Cuevas P. et al., M. 2006b).

Por otro lado, la p53 es un factor supresor que regula la apoptosis en las células. Cualquier alteración en la actividad de p53 puede generar crecimiento indefinido y malignidad, considerándose los errores en la regulación de la p53 parte fundamental de la gliomagénesis y de la progresión del cáncer (Royds, 2006). Cultivos de células C6 muestran una expresión débil de p53, mientras que el tratamiento con 2,5- DHPS produce un aumento en dicha expresión. Este efecto podría explicarse por la capacidad inhibitoria del 2,5-DHPS sobre la señalización de FGF que evita la apoptosis inducida por p53 (Rodríguez-Enfedaque et al., 2009). Por lo tanto, el 2,5-DHPS modula negativamente las vías de señalización responsables de la proliferación y supervivencia de las células de glioma C6, mientras que modula positivamente la expresión de factores intracelulares implicados en la respuesta apoptótica, probablemente como consecuencia de la inhibición de la vía de señalización del FGF/FGFR.

4.3.4 Eficacia preclínica del 2,5- DHPS en un modelo de glioma en rata

El 2,5-DHPS ha mostrado capacidad anti-tumoral en un modelo de rata ortotópico de glioma. Administrado por minibombas subcutáneas conectadas al lugar de implantación de las células C6 en el cerebro, 2,5-DHPS reduce la progresión del tumor, aumenta la apoptosis del glioma y reduce su angiogénesis (Cuevas P. et al., 2011b). Además de reducir la extensión de la vascularización de los gliomas, 2,5-DHPS también disminuye la permeabilidad de los vasos que

se forman, un efecto que podría tener implicaciones en algunas manifestaciones clínicas del glioma como el edema cerebral. Además, la presencia intracerebral de 2,5-DHPS evita Signos histopatológicos de invasión del glioma en este modelo, incluyendo la satelitosis perivascular, la infiltración del plexo coroideo y la difusión subpial (*Cuevas P. et al., 2011b*).

El mismo modelo de rata de glioma ortotópico sirvió para evaluar el uso de 2,5- DHPS en entornos de tratamiento más estrechamente relacionados con la situación clínica. El tratamiento comenzó 2 semanas después de la implantación de células de glioma C6 en el cerebro de las ratas, una vez se confirmó la presencia de un glioma por RMN. El 2,5-DHPS se administró por vía intraperitoneal (200 mg/kg), y se evaluó su combinación con un agente quimioterapéutico habitual, irinotecán (CPT-11). El irinotecan por sí mismo no logró inhibir la progresión del glioma, y la administración individual de 2,5-DHPS produjo sólo una ligera inhibición, pero la combinación de ambos dio lugar a una marcada inhibición del crecimiento del glioma (*Cuevas P. et al., 2011b*). Por lo tanto, además de los efectos anti-glioma ejercidos por sí mismo, el 2,5-DHPS mejoró la eficacia de otras quimioterapias, afirmación que es apoyada por experimentos in vitro con células de glioma C6 que muestran que los efectos anti-proliferativos de varios agentes citostáticos se potencian significativamente por la administración simultánea de 2,5-DHPS.

4.4 Implicaciones terapéuticas

4.4.1 Terapias anti-angiogénicas para inhibir la progresión del glioma

La formación de los vasos sanguíneos en la angiogénesis requiere del efecto combinado de los FGF y del VEGF, siendo quizá estos factores los únicos que promueven directamente la proliferación de las células endoteliales (*Hanahan y Weinberg, 2000*). El aumento de expresión de FGF y VEGF se observó en muchos tumores vascularizados en comparación con los tejidos normales, por lo que la inhibición de la actividad de estos factores parece una diana potencial para el desarrollo de terapias antiangiogénicas. Los esfuerzos se han centrado en terapias dirigidas a la inhibición de la actividad del VEGF. En 2004 la versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra el VEGF tipo A (VEGF-A, el más abundante), el bevacizumab (Avastin ®, Genentech, South San Francisco, CA), se convirtió en el primer medicamento antiangiogénico aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos. El

anticuerpo reconoce todas las isoformas de VEGF-A, y tiene una vida media en circulación de hasta 21 días después de su infusión intravenosa. Fue aprobado como agente de tratamiento de primera línea para el cáncer colorrectal metastásico, en combinación con 5- fluorouracilo, y posteriormente fue aprobado para el tratamiento de cáncer de pulmón recurrente o metastásico de células no escamosas, el cáncer de mama y el glioblastoma.

El objetivo de las terapias dirigidas a la inhibición de la actividad del VEGF es la regresión de los tumores por el ayuno, al privarles de los nutrientes y oxígeno aportados por la vascularización. Sin embargo, los vasos tumorales son estructuralmente y funcionalmente anormales, lo que impide la distribución eficaz de los agentes terapéuticos a todas las regiones de los tumores y crea un microambiente edematoso anormal en la que la hipoxia reduce la eficacia de la terapia. La terapia anti-VEGF tiene el potencial para normalizar estructuralmente y funcionalmente la vasculatura anormal del tumor y mejorar el microambiente del tumor (*Zhang et al., 2003*). Sin embargo, a pesar de que la terapia anti-VEGF normaliza la vasculatura del tumor y alivia el edema vasogénico en pacientes con glioblastoma, su eficacia clínica no está clara. La fase II del estudio aleatorizado BRAIN en glioblastoma mostró que la tasa de supervivencia media después del tratamiento con Avastin® es sólo 2-3 meses superior a la de otros tratamientos (*Junck, 2011*). Además hay evidencias clínicas y experimentales que sugieren que la terapia anti-VEGF podría estar asociada con la recurrencia del tumor y acelerar la formación de metástasis (*Ebos J.M. et al., 2009a; Ebos J.M. et al., 2009b; Paez-Ribes et al., 2009*). Además, el uso de Avastin® es costoso y puede causar efectos secundarios graves, como perforación gastrointestinal, hemorragias e hipertensión.

4.4.2 La inhibición de FGF como estrategia para superar la resistencia a las terapias anti-VEGF

Es posible que la inhibición de la angiogénesis patológica del glioma mediante la inhibición de FGF en lugar de VEGF sea un enfoque más adecuado al problema, dado que la inhibición del FGF por sí misma suprime igualmente la angiogénesis inducida por VEGF (*Jonca et al., 1997*), mientras que el FGF induce la angiogénesis dependiente e independientemente del VEGF (*Seghezzi et al., 1998; Zubilewicz et al., 2001*). Además, la activación de FGF parece responsable de la falta de eficacia a medio y largo plazo de las terapias antitumorales basadas en la inhibición

de VEGF (*Casanovas et al., 2005*). Prueba de esto es que la progresión del glioma durante el tratamiento con anti-VEGF se correlacionó con aumentos significativos del FGF en plasma (*Batchelor, et al., 2007*). Por ello la inhibición de la señalización de FGF se ha sugerido como estrategia para compensar la resistencia a la terapia anti-VEGF (*Alessi et al., 2009*). Por otro lado, la inhibición combinada de ambas señalizaciones lógicamente podría causar un impacto más profundo en la vasculatura del tumor, habiéndose probado in vitro que la inhibición combinada de FGF-2 y VEGF es superior a la inhibición individual de VEGF para impedir la angiogénesis (*Stahl et al., 2009*). Hay además que recordar que, además de ser un potente estimulador de la angiogénesis en glioma, el FGF también regula múltiples procesos en las células de glioma, por lo que la inhibición de la señalización de FGF impactaría negativamente la progresión del glioma a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de la angiogénesis, según sugiere la evidencia preclínica (*Auguste et al., 2001*).

4.4.3 Potencial terapéutico del 2,5- DHPS

El 2,5-DHPS, desde el punto de vista de la eficacia anti-glioma, tendría pues las ventajas derivadas de su capacidad de inhibir la señalización del FGF/FGFR. Sin embargo, este compuesto tendría otras ventajas adicionales.

Para empezar, como otros factores de crecimiento, incluyendo el VEGF, también poseen dominio de unión a heparina e interactúan con los heparán sulfatos para ejercer sus actividades biológicas, el 2,5-DHPS, dadas su interacción estructural con el dominio de unión a heparina del FGF, potencialmente podría interferir en las actividades de esos otros factores de crecimiento. En este sentido, el 2,5-DHPS tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células endoteliales, la relajación arterial, la permeabilidad vascular y la angiogénesis in vivo inducida por el VEGF (*Angulo et al., 2011*). Esta doble capacidad inhibitoria sobre la señalización de VEGF y FGF aumentaría la eficiencia del tratamiento.

Un segundo aspecto está relacionado con su seguridad. Dado el papel prominente de la señalización de FGF/FGFR en múltiples procesos fisiológicos, uno puede pensar que la inhibición de esta vía podría causar alteraciones significativas en estos procesos lo que, a su vez,

provocaría efectos secundarios importantes. Sin embargo, en condiciones fisiológicas el FGF está fuertemente unido a heparán sulfatos de las matrices extracelulares y las membranas basales, y no es susceptible de ser inhibido por 2,5-DHPS. Es en situaciones patológicas (cáncer, inflamación, angiogénesis...), cuando se produce una liberación excesiva de FGF, momento en el que el 2,5-DHPS puede interactuar con él, impidiendo la activación del receptor y la cascada de señalización intracelular subsiguiente.

Las heparanasas son enzimas que degradan los heparán sulfatos y provocan la liberación de las proteínas, como el FGF, unidas a estos compuestos en la matriz extracelular, provocando un aumento rápido de su concentración y la activación de su señalización. El papel relevante de las heparanasas en la tumorigénesis y metástasis es bien conocida (*Vlodavsky et al., 1990; Vlodavsky et al., 2000; Sanderson, 2001; Iozzo y Sanderson 2011*). Este escenario explica fácilmente el por qué la inducción de inmunogenicidad dirigida contra el dominio de unión a heparina de FGF-2 es capaz de inhibir la progresión de la enfermedad metastásica pulmonar en ratones, pero no afecta negativamente a la curación de heridas y la fertilidad en estos animales (*Plum et al., 2004*). Teniendo en cuenta esta característica biológica de los FGF, los medicamentos que contuviesen 2,5-DHPS, que sólo interactúa con un exceso de FGF, tienen una clara ventaja sobre los inhibidores del dominio de tirosina quinasa intracelular de FGFR, que inhibirían la señalización FGF/FGFR de forma independiente de las condiciones fisiológicas o patológicas del medio ambiente, y que por lo tanto podrían causar efectos secundarios importantes. De hecho, los inhibidores de la tirosina quinasa que han alcanzado fases clínicas de desarrollo producen un amplio espectro de eventos adversos, algunos de los cuales pueden ser fatales (*Reck, 2010*). Además de la falta de efectos adversos observados en modelos animales preclínicos, 2,5-DHPS tiene la característica única de demostrar un buen perfil de seguridad en seres humanos.

El 2,5-DHPS, en su forma conocida como dobesilato de calcio, es el principio activo de Doxium[®], un medicamento utilizado durante más de 35 años que se da por vía oral para el tratamiento de la retinopatía diabética y la insuficiencia venosa crónica, y se aplica tópicamente para el tratamiento de hemorroides. Aunque no se conoce claramente su mecanismo de acción, tiene un buen perfil de seguridad (*Allain et al., 2004*). Su actividad demostrada contra FGF y su falta de

problemas de seguridad llevaron a la evaluación de dobesilato (2,5-DHPS) para el tratamiento tópico de diversas patologías humanas relacionadas con la angiogénesis y la hiperproliferación en casos clínicos y en ensayos clínicos prueba de concepto (POC). 2,5-DHPS ha mostrado eficacia en el tratamiento de pacientes con enfermedades dependientes de la angiogénesis tales como la rosácea (Cuevas y Arrazola, 2005b) y la psoriasis (Cuevas y Arrazola, 2005a), así como en el tratamiento de lesiones pre-tumorales, como la queratosis actínica (Cuevas P. et al., 2011c), y tumorales, como el carcinoma basocelular (Cuevas y Arrazola, 2005a; Cuevas P. et al., 2011a) de la piel, estando aparentemente desprovisto de efectos secundarios adversos.

4.5 Conclusión

La señalización FGF / FGFR es fundamental en la tumorigénesis del glioma, y la inhibición de esta vía de señalización es una estrategia razonable para la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad. Modelos del glioma en rata, tales como las células de glioma C6, son herramientas útiles para la evaluación preclínica de los inhibidores de FGF. Entre ellos, el 2,5-DHPS (dobesilato) parece ser razonablemente eficaz en la inhibición de progresión del glioma a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de la angiogénesis. Este inhibidor del FGF parece razonablemente seguro, y se espera que cause menos efectos indeseados que otros medicamentos que siguen otro enfoque antiangiogénico, en concreto medicamentos asociados a la terapia anti-VEGF. Además se han observado efectos potenciadores sobre la capacidad anti-proliferativa de otras quimioterapias, por lo que es un candidato prometedor para la utilización en tratamientos terapéuticos combinados.

5. Apoptosis en Gliomas

5.1 Introducción

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fundamental en la regulación del volumen tisular, con un papel opuesto al de la mitosis. Las alteraciones en la regulación de este proceso generan un exceso de proliferación celular que se asocia con el cáncer (*Majno y Joris 1995*). Una de las características de las células del glioma es la enorme dificultad para eliminarlas, ya que la cirugía no puede hacerlas desaparecer por completo, y son muy resistentes a radioterapia y quimioterapia. Estudios recientes han demostrado que la capacidad de evitar la apoptosis es el principal factor detrás de su capacidad de supervivencia (*Krakstad y Chekenya et al. 2010; Johnstone et al., 2002; Hersey y Zhang, 2003; Kaufmann y Vaux, 2003*), por lo que existe un elevado interés en eliminar esta resistencia y provocar este proceso, de manera controlada, en el glioma (*Hengartner, 2000; Evan y Vousden, 2001*).

La apoptosis se caracteriza por procesos morfológicos y bioquímicos específicos como la condensación del citoplasma y el encogimiento y deformación de las células (*Lamkanfi et al., 2002*). También se generan endonucleasas, que degradan el ADN de la célula dando fragmentos nucleosomales u oligonucleosomales de muy bajo peso molecular que dan un patrón característico en electroforesis de geles de agarosa (*Arends et al., 1990*). La apoptosis tiene una duración variable, pero suele necesitar entre tres y seis horas, siendo bastante más breve que la mitosis.

5.2 Aspectos bioquímicos de la apoptosis

Casi todos estos cambios parecen deberse a un grupo de cisteín-proteasas, llamadas caspasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas a nivel de un residuo de ácido aspártico (Asp). Son un conjunto de proteínas altamente conservadas en la evolución, apareciendo en toda clase de organismos (*Lamkanfi et al., 2002*).

Las caspasas son capaces de actuar sobre enzimas encargadas de la reparación del ADN y sobre proteínas estructurales como las de la lámina nuclear o la actina a las que degradan, y sobre endonucleasas como la ADNasa a las que activan. También participan en la respuesta inflamatoria, siendo necesarias para la secreción de algunas citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 β (IL-1 β) y la interleuquina18 (IL-18) (*Nicholson, 1999*). En los seres humanos se han contabilizado once miembros de la familia génica de las caspasas.

Las caspasas son proenzimas (zimógenos) enzimáticamente inertes, que necesitan ser activadas por corte proteolítico para poder tener actividad biológica. Contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20) con el centro activo con cisteína y una subunidad pequeña (p10) en el C-terminal. El prodominio y la subunidad grande están separados por un lugar de corte en Asp, y la subunidad grande está separada de la pequeña por una o dos secuencias de corte en Asp. La presencia de lugares de corte en Asp para la activación es consistente con la habilidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación. En todos los casos estudiados, la enzima madura es un heterotetrámero que contiene dos p20/p10 heterodímeros y dos centros activos (*Yuan y Horvitz, 2004*).

Existen dos tipos generales de caspasas, según su mecanismo de activación, lo que determina su papel en la apoptosis (*Lamkanfi et al., 2007*). Tenemos así caspasas iniciadoras, que inician el proceso de apoptosis, y las caspasas efectoras, que disparan la velocidad del proceso pero que necesitan de la activación previa por las iniciadoras.

Las caspasas iniciadoras se activan cuando se dan una serie de condiciones externas. La caspasa-9 se activa por una subunidad reguladora, siendo necesaria la asociación con un factor proteico, el Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), el cual es generado como resultado de actividad mitocondrial, en lo que se conoce como vía intrínseca de la apoptosis. Por otro lado, la caspasa-8 se activa ante los llamados receptores de muerte, agentes externos que disparan la llamada vía extrínseca de la apoptosis. Ambas iniciadoras, cuando están en concentración suficiente, provocan que otras caspasas se corten mutuamente y activen entre ellas (*Chen y Wang, 2002*). Las caspasas efectoras (principalmente caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7) se

activan al exponerse a otra caspasa ya activada. Al ser proteasas que cortan tras un residuo de Asp, y al tener ella misma puntos de corte de Asp entre prodominios y subunidades, las caspasas pueden originar una reacción en cadena en la que se activan entre sí. Esto se denomina cascada de caspasas. La caspasa-3 parece ser la más importante en el proceso. El proceso completo se realiza siguiendo uno de los patrones conocidos como vías de inducción de la apoptosis, las cuales no funcionan correctamente en células cancerosas.

5.3 Vías de inducción de la apoptosis

Existen dos vías principales, la intrínseca o mitocondrial y la extrínseca o de receptores de muerte. Las dos vías terminan en un punto común: la activación de la caspasa-3 y las demás caspasas efectoras.

5.3.1 Vía intrínseca

Esta vía implica la segregación de proteínas pro-apoptóticas por las mitocondrias, y está relacionada con la actividad de un conjunto de sustancias denominadas B- cell lymphoma 2 (Bcl-2). Esta familia de proteínas incluye miembros anti- apoptóticos y pro-apoptóticos, y se considera dividida en tres subfamilias. La subfamilia Bcl-2 incluye compuestos anti-apoptóticos como Bcl-2 o Bcl-XL, mientras que las subfamilias Bax (que incluye a Bax, Bak, Bok y otros) y BH3 (que incluye a Bad, Bid, Bik, PUMA, Noxa y otros) son pro-apoptóticas. Cada miembro posee al menos uno de los cuatro motivos conservados denominados dominios de homología con Bcl-2 (Bcl-2 homology domains, BH): BH1-BH4. La subfamilia Bcl-2 posee los 4 dominios BH, mientras que la subfamilia Bax ha perdido el dominio BH4, lo que hace que active, en vez de inhibir, la apoptosis. La subfamilia BH3 sólo tiene el dominio BH3 (*Danial y Korsmeyer, 2004; Taylor et al., 2008b*). Tras activarse, los agentes pro-apoptóticos como Bak y Bax sufren un cambio conformacional y se insertan en la membrana mitocondrial. Esto cambia la permeabilidad de la membrana y permite la salida de citocromo c (*Brenner y Mak, 2009*). Es esta sustancia la que genera el Apaf-1 que activará la caspasa-9, lo que a su vez provocará la activación de la caspasa-3 y las otras caspasas efectoras. Otros factores apoptogénicos similares al citocromo c son el factor de inducción de apoptosis AIF (apoptosis-inducing factor), la endonucleasa G, el Smac/DIABLO o el Omi/HtrA2. Estos dos últimos operan eliminando las sustancias inhibitoras de la apoptosis (IAPs) (*van Loo et al., 2002*).

Por su parte, los miembros anti-apoptóticos de la familia como Bcl-2 y Bcl-XL operan principalmente interactuando con el dominio BH3, impidiendo así la activación y traslocación de Bax y Bak (*Cory y Adams, 2002*), aunque también pueden modificar los canales mitocondriales (*Cheng et al., 2003*).

5.3.2 Vía extrínseca

En la vía extrínseca los estímulos que generan la apoptosis son externos, y reciben el nombre de receptores de muerte. Algunos de estos receptores son el TNFR1 (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral), Fas receptor (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) / Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Todos ellos son parte de una familia de sustancias denominada TNFR (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral), involucrados en procesos de proliferación, inflamación y apoptosis. Los miembros de esta familia están caracterizados por presentar de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína. Los receptores de muerte también poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor DED denominado dominio efector de muerte (denominado dominio efector de muerte) (*Albeck et al., 2008*). El NGF (nerve growth factor) también tiene un DED y puede inducir apoptosis. Los receptores de muerte se activan por oligomerización en respuesta a la unión de ligandos. El más importante en inmunología es el Fas o CD95. Este compuesto es clave en la regulación de la apoptosis en diferentes tipos de células, incluyendo las del sistema inmunitario, donde el CD95 se usa para inducir la muerte celular en linfocitos y otros tipos celulares (*Walczak y Krammer, 2000; Ashkenazi y Dixit, 1998; Krammer, 2000*). Se ha sugerido que esta sustancia puede ser producida por el tumor para atacar células T antitumor induciendo su apoptosis, aunque no se ha demostrado todavía *in vivo* la importancia de este proceso en la supervivencia de las células tumorales (*Igney y Krammer, 2002*). CD95 se une a sus ligandos formando trímeros, y reclutando moléculas adaptadoras como FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) mediante interacción homofílica mediada por el DED (*Kischkel et al., 1995; Barnhart et al., 2003*). FADD a su vez se une a la caspasa-8 para formar un compuesto denominado DISC (death-inducing signalling complex) (*Fouqué et al., 2014*). La oligomerización de la caspasa-8

tras la formación del compuesto DISC provoca su activación, y la caspasa-8 a su vez activa las caspasas efectoras en cascada (*Donepudi et al., 2003; Kischkel et al., 2001*). También la caspasa-10 puede actuar así, pero su importancia en la inducción de la apoptosis es muy discutida (*Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002*).

Se distinguen dos tipos de células en lo que se refiere a la señalización del CD95. En las células de tipo I el mecanismo aquí descrito es suficiente para activar a las caspasas efectoras, mientras que en las de tipo II la cantidad de caspasa-8 activa creada por el DISC es insuficiente, y se requiere la participación de mitocondrias (vía intrínseca), a través de la emisión de sustancias como citocromo c. En este tipo de células, la apoptosis puede bloquearse con sustancias como Bcl-2 o Bcl- XL, inhibidores de la vía intrínseca de la apoptosis (*Scaffidi et al., 1998*).

Respecto a TRAIL/Apo-2L, es una proteína transmembrana identificada en múltiples tipos de tejidos (*Wiley et al., 1995; Marsters et al., 1996*). Posee un sistema de receptores muy complejo, con cinco sustancias denominadas TRAIL-R1 a -R5. Los receptores antagónicos TRAIL-R1 y TRAIL-R2 contienen un DED que les permiten activar la maquinaria apoptótica de la célula (*Chaudhary et al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Walczak et al., 1997; Wu et al., 1997*). TRAIL-R3, -R4 y -R5 se unen a TRAIL pero no poseen un DED y no causan muerte celular (*Degli-Esposti et al. 1997a; Degli-Esposti et al. 1997b; Pan et al., 1997; Marsters et al., 1997; Pan et al., 1998*). Otro posible receptor del TRAIL es la osteoprotegerina, que carece de DED y está involucrada en la regulación de la osteoclastogénesis (*Emery et al., 1998*). La vía de señalización de TRAIL es similar a la de la de CD95, incluyendo la diferenciación entre los dos tipos de células.

5.4 Inhibición de la apoptosis

También existen en las células inhibidores naturales de las caspasas, denominados IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) (*Vamos et al., 2013*). Los IAPs son una familia de al menos siete proteínas que tienen en común una o más estructuras llamadas dominios BIR (baculoviral IAP repeats) (*Liston et al., 2003; LaCasse et al., 1998*). Operan uniéndose a las caspasas e inhibiéndolas (*Holcik et al. 2001a; Holcik et al. 2001b*), y se han sugerido como un punto de ataque a las células cancerosas (*Tamm et al., 2000; Huang et al., 2004*).

5.4.1 XIAP

El más conocido inhibidor endógeno de las caspasas es el XIAP (X-linked IAP) (*Stennicke et al., 2002*), cuya presencia bloquea por completo el suicidio celular (*Holcik et al. 2001a; Holcik et al. 2001b*). Se ha comprobado su presencia anormalmente alta en tumores (*Hofmann et al., 2002; Krajewska et al., 2003; Shiraki et al., 2003*) y se le ha asociado a resultados clínicos desfavorables y a la resistencia a la quimioterapia (*Tamm et al., 2000; Parton et al., 2002*). Estudios con ratones prueban que la ausencia de XIAP no afecta negativamente al desarrollo de tejido sano (*Harlin et al., 2001*), mientras que la inhibición de la sustancia tiene efectos antitumorales (*Hu et al., 2003*), algo que también se ha probado in vivo contra células cancerosas humanas (*Schimmer et al., 2004*).

5.4.2 Vivina

La survivina es una pequeña proteína que posee un único dominio BIR y carece de los dominios CARD y RING encontrados en otros inhibidores de la apoptosis (*Altieri et al. 2003a*). Su presencia se ha correlacionado repetidas veces con el desarrollo canceroso (*Ambrosini et al., 1997; Kawasaki et al., 1998; Sarela et al., 2000; Rodel et al., 2002; Badran et al., 2003; Kennedy et al., 2003; Endo et al., 2004*). Aunque su efectividad como inhibidor de las caspasas es baja, se sabe que asiste a la citocinesis y a la segregación cromosómica durante la mitosis (*Li et al., 1998*), interactuando con el dominio catalítico de la quinasa Aurora-B, que desempeña un papel clave en la condensación cromosómica. No está claro si la survivina inhibe la apoptosis interfiriendo con el funcionamiento de las caspasas o a través de la interacción con Aurora-B (*Hu et al., 2003; Jansen y Zangemeister-Wittke, 2002*).

5.4.3 NF- κ B

El NF- κ B es un factor de transcripción involucrado en la regulación de sustancias como Bcl-XL, XIAP, cIAP-2 y FLIP (*Lin y Karin, 2003*). Su presencia en exceso en cánceres ha sido comprobada en repetidas ocasiones (*Orlowski y Baldwin, 2002; Nakshatri y Goulet, 2002; Arlt y Schafer, 2002; Hayashi et al., 2003; Lin y Karin, 2003*).

5.5 Aspectos de la apoptosis en gliomas

Como cabe esperar, se observan defectos y pérdida de regulación en ambas vías de inducción de apoptosis en los tejidos cancerosos, incluyendo los gliomas (*Itahana et al., 2001; Sah et al., 2006*).

5.5.1 Alteraciones en los receptores de muerte celular

El sistema que regula los receptores de muerte no funciona adecuadamente en el tejido canceroso (*Friesen et al., 1997; Fulda et al., 1998; Strand et al., 1996; Moller et al., 1994; Shin et al., 1999*). Una alteración observada en prácticamente todos los tumores es la mutación del gen CD95 o la presencia de defectos en su regulación (*Debatin et al., 2003; Maeda et al., 1999; Landowski et al., 1997; Wohlfart et al., 2004; Shen et al., 2002*), lo que evidencia la importancia de esta sustancia como supresor natural de tumores (*Igney y Krammer, 2002*). Por ejemplo, se ha observado generación excesiva de Decoy Receptor 3, un ligando de CD95 que le impide realizar su función, en varios tipos de cáncer, incluyendo glioblastomas (*Roth et al., 2001; Pitti et al., 1998*).

La señalización de los receptores de muerte puede estar interferida igualmente mediante proteínas que se asocian con sus dominios citoplasmáticos, como FLIP (FLICE Inhibitory Protein) o PEA-15. FLIP es una proteína con dos DED, con dos isoformas (FLIP-l y FLIP-s) siendo muy similares a la caspasa-8 y a la caspasa-10, pero careciendo de sus capacidades, por lo que su unión al complejo DISC en vez de las caspasas bloquea la activación de las mismas (*Krueger et al., 2001*). Muchos tumores, incluyendo los gliomas, tienen sobreabundancia de FLIP (*Fulda et al., 2000; Zhang et al., 1999*), y se han detectado tumores que generan análogos virales de FLIP, como el herpesvirus-8 humano (HHV8) (*Stuzl et al., 1999*). No obstante, parece que el impacto de FLIP en la apoptosis varía según el tipo de célula (*Kinoshita et al., 2000*), y de hecho hay evidencias de que al menos FLIP-l es un regulador dual de la activación de la caspasa-8 y de la creación del DISC, estimulando o inhibiendo la apoptosis dependiendo de diferentes factores (*Chang et al., 2002*). Respecto a PEA-15, es otra proteína que contiene un DED, capaz de bloquear CD95, TRAIL y en general cualquier receptor de la clase TNF α perturbando el

funcionamiento de la caspasa-8 (*Hao et al., 2001*). Su expresión se ha relacionado con la resistencia al TRAIL del glioma (*Xiao et al., 2002*).

5.5.2. Alteraciones en el funcionamiento de las caspasas

Aunque las caspasas son determinantes en la apoptosis, la presencia de mutaciones en las propias caspasas es muy rara (*Mandruzzato et al., 1997; Kim et al., 2003*). Generalmente, el funcionamiento de las caspasas en tumores es alterado por mecanismos epigenéticos, como la hipermetilación de secuencias de regulación del gen de la caspasa-8, fenómeno encontrado en una variedad de tumores, incluyendo gliomas (*Teitz et al., 2000; Hopkins-Donaldson et al., 2003; Pingoud-Meier et al., 2003; Harada et al., 2002*). Esta hipermetilación habitualmente actúa también en los genes FLIP y TRAIL-R1/R2, sugiriendo que estas metilaciones no ocurren al azar en el cáncer (*van Noesel et al., 2003*). Recuperar la expresión de caspasa-8 por transferencia genética, desmetilación o por tratamiento con IFN γ estimula la apoptosis (*Fulda y Debatin, 2002; Yang et al., 2003*) considerándose probado que el IFN γ activa la transcripción de las caspasas, lo que puede ser una estrategia válida para tratamientos orientados a aumentar la sensibilidad a los receptores de muerte (*Banelli et al., 2002*).

5.5.3 Alteraciones en los IAPs

Los inhibidores de la apoptosis están presentes en exceso en el tejido canceroso. Hay numerosas evidencias de altas concentraciones de survivina en la mayoría de los tumores, siendo su papel aparentemente más complejo que el de las otras IAPs (*Altieri, 2003b; Velculescu et al., 1999*), y se han encontrado cantidades excesivas de cIAP2 y ML-IAP en determinados cánceres (*Dierlamm et al., 1999; Hersy y Zhang, 2001*).

Existen proteínas nucleares como XAF-1 (XIAP-associated factor 1) que inhiben el efecto de las IAPs, y se han observado cantidades anormalmente bajas de XAF-1 en una amplia variedad de tumores, residiendo el gen de XAF-1 en el cromosoma 17p13.2, una región fuertemente mutada en muchos cánceres (*Fong et al., 2000*). Además se ha detectado silenciamiento epigenético por hipermetilación de las islas CpG del gen XAF-1 en tumores gástricos, por lo que se ha sugerido que esta proteína puede ser un buen represor tumoral (*Byun et al., 2003*).

Existen numerosos estudios ligando la alta presencia de survivina con los pronósticos médicos desfavorables en numerosos tipos de cánceres, incluyendo tumores cerebrales (*Schlette et al., 2004; Adida et al., 1998; Adida et al., 2000; Wurl et al., 2002; Chakravarti et al., 2002; Sarela et al., 2000; Sarela et al., 2002; Monzo et al., 1999; Tanaka et al., 2000*). No obstante, hay otros cánceres donde esta relación no existe (*Kennedy et al., 2003*) y existen diferentes estudios que muestran que la relación entre la malignidad del cáncer y la presencia de IAPs puede ser enormemente compleja (*Tamm et al., 2003; Carter et al., 2003; Ferreira et al., 2001*).

5.5.4 Proteínas Bcl-2 en gliomas

Esta familia de proteínas son fundamentales en la vía intrínseca, existiendo tanto miembros de la familia anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1,...) como pro-apoptóticos (subfamilias Bax y BH3). Bajo las condiciones que se encuentran en las cercanías de un glioma, los agentes anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, como el Bcl-XL, inhiben a los agentes pro-apoptóticos como Bax y Bak, dificultando de esta manera el acceso a la vía intrínseca (*Lessene et al., 2008*). Se ha detectado la inactivación del gen Bax en el cáncer de colon, lo que genera una deficiencia en la cantidad de Smac/DIABLO generada por la mitocondria, provocando así una alta resistencia a la apoptosis por TRAIL, resistencia que puede disminuirse restaurando la expresión de Bax (*Deng et al., 2002*). Mediante biopsia se ha encontrado además correlación directa entre la ausencia de Bax y resultados clínicos adversos en el tratamiento del glioblastoma multiforme (*Ruano et al., 2008*), y se ha asociado el exceso de Bcl-XL no sólo a un aumento de la resistencia a la apoptosis en el glioma, sino al incremento de la movilidad de las células tumorales (*Wick et al., 1998*). De la subfamilia BH3, se ha encontrado que Noxa y PUMA son fundamentales en las respuestas apoptóticas inducidas por el gen p53 (*Villunger et al., 2003*).

Otra proteína anti-apoptótica de la familia, la BCL-2L12, ha sido localizada en prácticamente todos los glioblastomas multiformes (*Stegh et al., 2007*). Su presencia estimula la generación del anticuerpo α B-crystallin, que inhibe de manera completa la activación de la caspasa-3 (*Stegh et al., 2008*). Además de alteraciones genéticas, defectos en la regulación transcripcional durante la expresión de Bcl-2 pueden causar problemas con la apoptosis. Muchas proteínas anti-apoptóticas

de la familia Bcl-2 están reguladas durante su transcripción por NFκB. Una expresión excesiva de Bcl-XL por el NFκB se ha observado en lesiones premalignas de cáncer de páncreas, lo que puede indicar que deficiencias en la apoptosis pueden contribuir a la carcinogénesis del cáncer de páncreas (*Greten et al., 2002*).

-OBJETIVOS-

HIPÓTESIS:

El trabajo considera que la modificación del inhibidor del FGF, 2,5-dihidroxifenil sulfonato (DHPS), generando un derivado diacetilado, el 2,5-diacetoxifenil sulfonato (DAPS), mediante la descrita aportación de una nueva actividad inhibitoria sobre la ciclooxigenasa (COX), dotaría de una mayor actividad anti-inflamatoria y supondría una estrategia dual más eficaz en la inhibición de la angiogénesis y la progresión tumoral.

OBJETIVOS:

Analizar los efectos antiproliferativos del DHPS y su derivado diacetilado, DAPS, sobre la línea celular C6 de glioma de rata in vitro.

Determinar la capacidad antiangiogénica del DHPS y del DAPS, mediante la valoración de la neovascularización en esponjas de gelatina implantadas subcutáneamente en ratas.

Valorar la eficacia de DHPS y DAPS para inhibir la progresión tumoral de los gliomas subcutáneos generados por la implantación de células C6 en las ratas.

Evaluar la eficacia oral del DAPS en la inhibición de los gliomas subcutáneos y determinar su impacto sobre la angiogénesis, apoptosis e inflamación en estos tumores.

Analizar los efectos que el DAPS pueda ejercer sobre la salud general de este modelo animal de experimentación.

-MATERIAL Y MÉTODOS-

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación se ha realizado en el Servicio de Histología, del Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal.

Material

1.1 Laboratorio de cultivos celulares (*Figura 1*)



Figura 1. Fotografía del laboratorio de cultivos celulares

Campana de flujo laminar horizontal y vertical Telstar modelo AV-30/70.

Incubadora Forma Scientific, Inc modelo 3111.

Centrifugadora Kubota modelo 2100.

Microscopio óptico Nikon modelo TMS.

Bidones de nitrógeno líquido de la marca MVE. Inc de USA.

Arcón de congelación a -85°C Ultra Low Freezer de New Brunswick Scientific modelo U41085.

Baño a 37°C.

Placas de cultivo de 24 pocillos marca Costar modelo 3524.

Soporte para cultivo de células o flask de 75 cm² marca BD Falcon™ Becton, Dickinson and Company USA.

Falcon de 50 ml de polypropylene.

Criotubos de 1,8 ml marca Nalgene Nunc International.

Nevera.

Pipeteadores automáticos.

Contador de células con cámara de Neubauer.

Medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) (Biowest).

Suero fetal bovino (SFB) (Gibco)

Solución (10x) Tripsina-EDTA (Sigma)

Solución (100x) de antibiótico/antimicótico (Sigma)

L-Glutamina 200 mM (Lonza)

Hank's Balanced Salts Solution (Biowest)

Glutaraldehído al 25% (Merck)

Preparación del medio de cultivo suplementado:

DMEM

+ Suero fetal bovino 10%

+ Antibiótico/antimicótico 0,1%

+ L-Glutamina 2 mM

1.2 Animalario / cirugía experimental

El animalario del Departamento de Investigación posee el número de registro ES280790002001.

El quirófano experimental (*Figura 2*) consta de un microscopio quirúrgico Zeiss, instrumental de microcirugía y los fármacos necesarios para la anestesia de las ratas SD.



Figura 2. Quirófano de experimentación de animales.

1.3 Laboratorio de histología:

Microtomo Leitz modelo 1213.

Nevera.

Kit TUNEL inmunofluorescencia (GenScript EEUU Inc).

Microscopio confocal Nikon modelo Nikon C-HGFIE Eclipse ti

Centrifuga

Productos e instrumental para la aplicacion de tenir los cortes histológicos con hematoxilina-eosina

1.4 Cultivo de células tumorales

Las células C6 fueron aisladas de un glioma de rata Wistar inducido por la inyección del carcinógeno N- Nitrosometilurea, (Benda *et al.*, 1968). La forma de estas células depende, en gran parte, de las condiciones y cultivos utilizados, casi siempre son redondas, con pocas prolongaciones (Benda *et al.*, 1968), (Figura 3). El origen glial de las C6 fue confirmado por la producción de altos niveles de la proteína S-100, el fenotipo molecular de célula glial más característico del cerebro de los vertebrados, observado en numerosos tumores cerebrales, tanto en humanos como en otros animales (Benda *et al.*, 1968; Gysin *et al.*, 1980; Pfeiffer *et al.*, 1970). La línea celular de glioma C6 tiene una tasa de crecimiento muy elevado y apenas desarrolla uniones gap (Naus *et al.*, 1991).

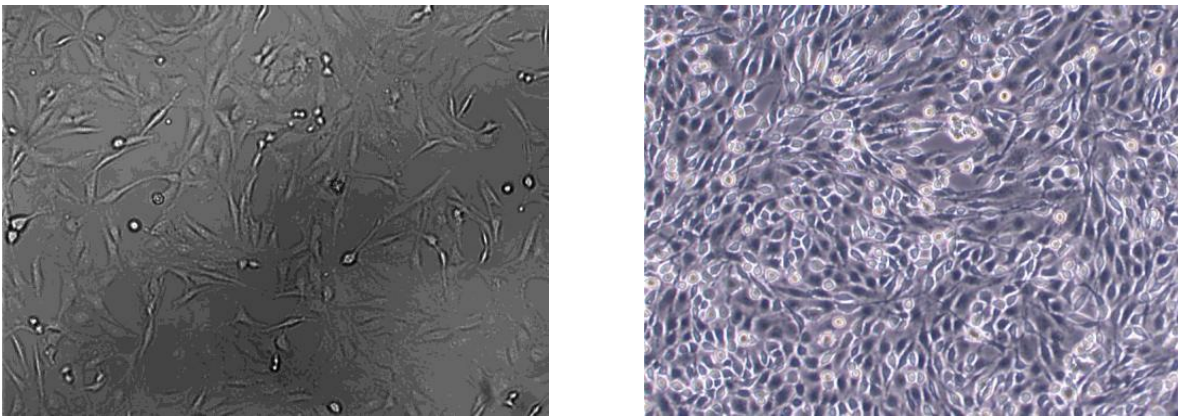


Figura 3. Fotografías de cultivos de células de glioma C6. Microscopía de contraste de fases.

2. MÉTODOS

2.1 Cultivos celulares

El cultivo de las células C6 se realizó de acuerdo a lo previamente descrito (*Cuevas et al. 2005a*). Las células C6 que se encontraban congeladas en nitrógeno líquido, en viales de 10^6 células aproximadamente, se descongelaron mediante agitación rápida durante 40-60 segundos en un baño de agua a 37°C. Una vez descongeladas, se sembraron en un frasco de 25 cm², al que se le añadieron 6ml del medio Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10% y se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Cuando el cultivo celular llegaba a confluir ocupando toda la superficie de la base del frasco se procedió al despegado de células. Para despegar las células adheridas, se retiró el medio de cultivo del frasco y se añadió una solución de EDTA y tripsina al 0,5% incubando 5 minutos a 37°C. Se retiró todo el sobrenadante donde estaban las células despegadas en suspensión y se llevó a un tubo estéril para centrifugar 5 minutos a 1500 rpm, descartando el sobrenadante y seleccionando las células o pellet celular (*figura 4*). Posteriormente se añadió medio DMEM con FCS al 10% y se resuspendieron las células para lavarlas con el medio Hank's Balanced Salts Solution (Biowest). Una vez lavadas las células, se realizaron subcultivos celulares en proporción 1:3 en medio DMEM con FCS al 10% en frascos de 75 cm² o se emplearon para la realización de los procedimientos experimentales.



Figura 4. Pellet celular y sobrenadante

2.1.1 Congelación

Con el objetivo de seguir manteniendo el stock de células C6, éstas fueron sometidas a un proceso de congelación para su almacenamiento en nitrógeno líquido y su posterior utilización en función de las necesidades. Una vez despegadas las células, se contaron y se pipeteó el volumen necesario para conseguir 10^6 células; después se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células con 900 μ l de FCS en un criotubo. Posteriormente se añadieron 100 μ l del crioprotector dimetil sulfóxido (DMSO). A continuación se colocó el vial en una cubeta de congelación y se introdujo en un congelador a -80°C . A las 24 horas se pasó el vial a un contenedor de nitrógeno líquido donde se conservaron las células hasta su uso.

2.1.2 Preparación de la jeringa de inyección. Recuento directo de células:

Una vez despegadas las células, se contaron y se pipeteó el volumen necesario para conseguir 10^6 células. Para ello, realizamos el contaje celular mediante el uso de la cámara de Neubauer y la visualización al microscopio óptico. Al contar bajo el microscopio el número de células presentes en un volumen conocido de (20 μ l) se puede determinar la densidad celular en la suspensión de origen. Estas células fueron previamente teñidas con un colorante natural como es el azul de Tripano que nos permite distinguir células viables, que extruyen el colorante, de células muertas. Una vez determinado el número de células en la suspensión (10^6) se procedió al centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm descartando el sobrenadante y seleccionando el pellet celular (*Figura 4*). Posteriormente se añadieron 300 μ l de medio DMEM y se aspiran 0,3 ml en una jeringa de 1 ml para su posterior inyección subcutánea en la rata.

2.2 Estudios *in vitro*

Ensayo de proliferación celular mediante colorimetría en placas de 24 pocillos

Se realizaron estudios *in vitro* para evaluar el efecto de diferentes tratamientos sobre la proliferación de las células tumorales. Para ello se sembraron las células C6 en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 24.000 células por pocillo con medio DMEM. Los pocillos basales son 4 pocillos que se fijaron a las 24 horas con 0,5ml de glutaraldehído al 1% durante 10 minutos. Dieciséis de los 24 pocillos restantes se sometieron a los diferentes tratamientos experimentales. Los 4 pocillos restantes o pocillos control no recibieron tratamiento. Se estudió la proliferación celular 48 horas después de la siembra de acuerdo a lo previamente descrito (Cuevas *et al.* 2005a). Después de fijar las células para su estudio, como se ha descrito antes, fueron lavadas con salino tamponados con fosfato (PBS) y posteriormente teñidas con colorante violeta cristal (Sigma) al 1% durante 10 minutos. Tras un lavado exhaustivo con agua destilada, las placas se dejaron secar y se extrajo el violeta cristal de las células mediante la adición de 2 ml de ácido acético al 10% y se transfirió 1 ml de cada pocillo por duplicado a una cubeta de espectrofotómetro. El contenido celular en cada pocillo fue determinado mediante la medición de absorbancia a 595 nm en un lector de placas GENios Plus (TECAN trading AG, Mannedorf, Suiza). El efecto de los compuestos, 2,5-dihidroxifenil sulfonato (DHPS) y 2,5-diacetiloxifenil sulfonato (DAPS) (Figura 6) se determinó a distintas concentraciones calculando el porcentaje de absorbancia respecto al grupo de pocillos control de células no tratadas.

2.3 Estudios in vivo

Los estudios con animales se realizaron con las normativas de la Unión Europea para el manejo y manipulación de animales de experimentación. El trabajo fue aprobado con el consentimiento del Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid (Acta nº 2 /2010).

En lo que se refiere al animalario del Hospital Universitario Ramon y Cajal, se encuentra con las condiciones necesarias para alojar animales de experimentación (nº de registro EX-027-UC). Tanto la temperatura (22°C) como la humedad (70%), como el ciclo de luz/oscuridad (12h/12h), se mantienen constantes y son adecuados para el bienestar de estos animales.

Los animales de experimentación empleados en nuestro estudio fueron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 250-350 g y 3-4 meses de edad. Las ratas se mantuvieron con libre acceso a agua y comida ad libitum.

Los procedimientos quirúrgicos para implantar las esponjas de gelatina, así como para inyectar las células C6 en las ratas, y la posterior extirpación de esponjas y tumores, se realizaron en el quirófano de cirugía experimental con material microquirúrgico y la ayuda de un microscopio quirúrgico.

2.3.1 Anestesia

Se inyectó por vía intraperitoneal a las ratas una dosis de 3 ml/kg de una mezcla de ketamina (Pfizer, Alcobendas, España) (25 mg/ml), valium (Roche Farma, Leganes, España) (2 mg/ml) y atropina (B.Braun Medical S.A., Rubí, España) (0,1 mg/ml). Este protocolo anestésico se aplicó para todos los procedimientos con animales: implantación subcutánea de células tumorales C6 y esponjas de gelatina así como la extirpación de los tumores y las esponjas y el sacrificio de los animales.

2.3.2 Ensayo de angiogénesis *in vivo*

Las esponjas de gelatina estériles (1 cm³; Curaspon Dental, Clinimed Holding, Zwanenburg, The Netherlands) se empaparon con 200 µl de PBS con o sin (controles) 25 µg/ml de heparina y 10 µg/ml de FGF-1, y se implantaron subcutáneamente conforme a lo descrito previamente (*Fernandez et al., 2010*) mediante una incisión en la piel en la región dorsal del cuello de las ratas previamente anestesiadas. La incisión se cerró posteriormente con puntos de sutura. Después de la implantación, las ratas que recibieron esponjas conteniendo FGF-1 se asignaron aleatoriamente a los diferentes grupos de tratamiento: Un grupo recibió 0.3 ml de vehículo (agua corriente), y los otros dos recibieron DHPS (150 mg/kg) ó DAPS (150 mg/kg) dos veces al día mediante administración oral forzada (300 mg/kg/d en total). En una serie experimental separada, se realizó una curva dosis-respuesta a la administración oral de DAPS a 20, 50, 100 and 300 mg/kg/d para evaluar la dependencia del efecto respecto a la dosis. Siete días después, una vez anestesiadas las ratas, se retiraron las esponjas con la ayuda de un microscopio quirúrgico. Las esponjas obtenidas se fijaron e incluyeron en parafina para su estudio histológico.

2.3.3 Implantacion de células tumorales

Con la rata anestesiada, y una vez obtenido el preparado con 10⁶ células C6 conforme a lo descrito anteriormente en el 2.1.2, la implantación de células tumorales se realizó mediante una inyección subcutánea en la región abdominal, a 1 cm a la derecha de la línea media y a 3 cm craneales de la región inguinal (*Figura 5*). A partir del quinto día tras la implantación, se estudió la evolución del volumen tumoral mediante la medición por encima de la piel, del largo y ancho del tumor con un calibre Vernier. Se calculó el volumen según la fórmula $V=4/3\pi \times (D/2) \times (d/2)^2$, donde D es el diámetro mayor y d es el diámetro menor, ambos en mm. Estas mediciones se realizaron el los días 5, 7, 11, 13 y 15 tras la implantación tumoral. Los tratamientos se administraron desde el día 5 post-implante, una vez comprobada la existencia de un proceso tumoral. En el día 15 posterior a la administración de células tumorales, se procedió, con la ayuda de un microscopio quirúrgico (Zeiss), a la extirpación quirúrgica del tumor y, posteriormente, al sacrificio del animal (*Figura 5*). Una vez extirpados los tumores, se cuantificó su volumen y su peso (*Figura 15*), y se obtuvieron fotografías de los mismos. A continuación, los tumores se fijaron en paraformadehído al 4% para su posterior estudio histológico e inmunológico.

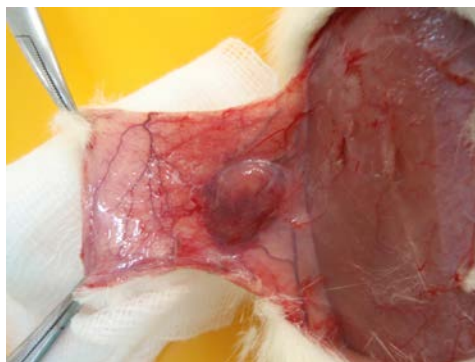


Figura 5. La imagen A muestra una rata del grupo de control indicando el sitio de inyección de células C6. Las imágenes inferiores muestran el tumor originado a los 15 días de la inyección de células C6, antes (B) y durante (C) la disección del glioma subcutáneo.

2.3.4 Tratamientos

Se realizaron dos series de experimentos, una para evaluar la eficacia del DHPS y del DAPS tras su administración por vía intraperitoneal y otra para determinar la eficacia del DAPS administrado por vía oral.

2.3.5 Administración intraperitoneal

En esta serie experimental, una vez constatada la presencia de tumor subcutáneo en el día 5 después del implante, las ratas se dividieron en tres grupos: el grupo vehículo recibió dos inyecciones intraperitoneales diarias de salino (0.9% NaCl; n=11), y los otros dos grupos experimentales recibieron dos inyecciones intraperitoneales diarias de DHPS (100 mg/kg; n=12) o de DAPS (100 mg/kg; n=13) disueltos ambos compuestos en salino. El volumen de inyección administrado fue de 1 ml/kg en todos los casos. La dosis diaria de DHPS y DAPS fue, por tanto, de 200 mg/kg/d. El tratamiento se prolongó durante 10 días desde su comienzo hasta el día anterior a la extirpación del tumor y el sacrificio del animal.

2.3.6 Administración oral

En esta serie experimental, una vez constatada la presencia de tumor subcutáneo en el día 5 después del implante, las ratas se dividieron en dos grupos: el grupo vehículo recibió dos administraciones forzadas orales diarias de agua corriente (n=8) mediante el empleo de una cánula metálica. Los animales del grupo experimental recibieron dos administraciones forzadas orales diarias de DAPS (100 mg/kg; n=10) disuelto en agua corriente. El volumen administrado fue de 1 ml/kg en todos los casos. La dosis diaria de DAPS fue, por tanto, de 200 mg/kg/d. El tratamiento se prolongó durante 10 días desde su comienzo hasta el día anterior a la extirpación del tumor y el sacrificio del animal.

2.4 Determinación de lactato deshidrogenasa

Se extrajo sangre por punción cardiaca de las ratas anestesiadas en el momento de la extracción del glioma subcutáneo y de 8 ratas de la misma edad a las que no se les había inducido tumor (ratas control). La sangre se recogió en tubos secos y se aisló el suero mediante centrifugación. Las muestras de suero se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -80°C hasta los ensayos. El contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) sérica se determinó empleando un kit comercial (Architect c Systems, Abbott, Abbott Park, IL, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5 Procesamiento de las muestras histológicas

Los tumores, tras su extracción, fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 3 días, antes de su inclusión en parafina. Se realizaron dos lavados de 30 minutos en PBS. Las muestras fueron deshidratadas a concentraciones crecientes de alcohol: dos lavados de 30 minutos en alcohol al 70%, y dos lavados de 30 minutos en alcohol al 80%. De igual modo, se realizó con alcohol al 96% y con alcohol al 100%. A continuación, los tumores se sumergieron en xilol durante aproximadamente 2 h. tiempo suficiente para que las muestras adquiriesen un aspecto transparente. Después se pasaron al primer baño en parafina en estufa a 60°C ; a las 2 horas se cambiaron al segundo baño en parafina en estufa a 60°C , durante toda la noche. Los tumores se colocaron el día siguiente en unos moldes donde se realizó un tercer baño de parafina en estufa a 60°C . A continuación, se extrajeron los moldes de la estufa y se dejaron solidificar a temperatura ambiente para después hacer el tallaje y obtener secciones del tejido con el microtomo.

Una vez realizados los procesos de fijación e inclusión, se obtuvieron con el microtomo secciones de 5 a 7 μm ; los cortes fueron puestos en un baño con agua destilada a 45°C , y recogidos en portaobjetos de silano, almacenándolos en estufa a 37°C , hasta que se colorearon con hematoxilina-eosina, o se realizaron las técnicas inmunohistoquímicas.

2.6 Coloración con hematoxilina-eosina

A fin de conseguir la coloración de los cortes con hematoxilina-eosina, se realizó el proceso de la desparafinización de los cortes. Se fueron sumergiendo los portaobjetos en una cubeta con xilol durante 10 minutos, dos veces. Luego, fueron rehidratados sumergiéndolos durante 5 minutos en cubetas con alcoholes de concentración decreciente, empezando con alcohol al 100%, luego con alcohol al 96%, alcohol al 80%, alcohol al 70%, y alcohol al 50%, y por último en una cubeta con agua destilada.

Rehidratados los cortes, se sumergieron en una cubeta con hematoxilina de Harris (Merck, Damstadt, Germany) durante 7 minutos. A continuación, se sumergieron en una cubeta con agua durante 5 minutos y después en solución etanol-clorhídrico (ácido clorhídrico 0,07 N en etanol al 70%) durante 30 segundos. Posteriormente, fueron lavados con agua y sumergidos en bicarbonato sódico durante 30 segundos, pasándolos a agua de nuevo durante 5 minutos, y luego a alcohol al 80% otros 5 minutos. Después, fueron bañados en eosina 3 minutos, pasándolos más tarde a alcohol al 96% 5 minutos, alcohol al 100% 5 minutos, y xilol durante 10 minutos. Finalmente, se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos utilizando el pegamento DePeX. Una vez cubiertos, los cortes histológicos fueron analizados y fotografiados como se describe a continuación.

2.7 Cuantificación de la neovascularización

2.7.1 Cuantificación de la neovascularización en los ensayos de angiogénesis

Las esponjas parafinadas se cortaron en secciones de 6 μm y se tiñeron con hematoxilina/eosina como se ha descrito en el apartado anterior. Se obtuvieron imágenes de 6 campos (0.176 mm^2) seleccionados aleatoriamente de cada esponja y se cuantificó la extensión de la neovascularización utilizando un programa de análisis de imagen (Motic Images). Los efectos de los diferentes tratamientos sobre la densidad vascular se evaluaron determinando el número de vasos sanguíneos funcionales (aquellos que contenían eritrocitos) por campo.

2.7.2 Cuantificación en los gliomas subcutáneos

Para cuantificar el grado de vascularización en los gliomas subcutáneos, se digitalizaron las imágenes de las secciones completas de cada tumor teñidos con hematoxilina-eosina utilizando el microscopio C-HGFIE Eclipse ti (Nikon) y empleando el software IMAGEJ-RSB capaz de diferenciar, dibujar y medir las áreas del tumor y el conteo de los vasos en las muestras de tejido tumoral de forma visual.

De forma aleatoria se seleccionaron de 2 a 6 cortes histológicos de cada tumor (*Figura 17*) (*Figura 19*). A partir de cada corte histológico se realizaron un total de 6 fotografías al microscopio óptico a 200 aumentos, de las cuales 4 fotos fueron de los extremos de un eje de coordenadas y las 2 fotos restantes, del interior del campo visual. De cada fotografía se colorearon digitalmente los vasos sanguíneos y se calculó el porcentaje del área coloreada respecto al área total a fin de cuantificar el área de vascularización. Después, se calculó la media del porcentaje de vasos coloreados en las 6 fotografías.

2.8 Estudio de la Apoptosis: Método de la transferasa terminal o TUNEL

Para la determinación de la apoptosis se empleó el método de la transferasa terminal o TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling). La valoración de la apoptosis por este método se basa en la detección de la rotura del ADN internucleosomal, típica de la apoptosis. La reacción enzimática de la transferasa terminal sobre el ADN nuclear fragmentado enlaza en el extremo de los fragmentos el mononucleótido dUTP marcado.

Específicamente, se empleó para la detección de la apoptosis un kit comercial de fluorescencia (Promega). Los cortes de 7 μm de espesor se desparafinaron, hidrataron y permeabilización con metanol al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 15 minutos. A fin de degradar las proteínas nucleares que estorban el acceso de la enzima y el sustrato al ADN tisular, los cortes se trataron a continuación con 20 μg de proteinasa K. Se realizó la mezcla de la reacción enzimática en frío y se añadió a los cortes, que se dejaron incubando a 37 °C durante 60 min en oscuridad y con humedad.

Los núcleos se contrastaron con Hoechst 33342 y las preparaciones se montaron en medio Prolong para la detección de la fluorescencia en un microscopio Eclipse Ti (Nikon, Japan). La superposición de imágenes de fluorescencia verde (dUTP) sobre la fluorescencia azul de todos los núcleos contrastados reveló núcleos marcados intensamente de un color cian muy claro (núcleos apoptóticos).

Se seleccionó aleatoriamente un corte histológico de cada tumor (*Figura 18*). A partir de este corte histológico se realizaron 6 fotografías con microscopio de fluorescencia a 200 aumentos. Cuatro imágenes de la zona periférica según los extremos de un eje de coordenadas y 2 fotos del interior del tumor. En cada imagen se determinó manualmente el número de los núcleos positivos o en apoptosis y el total de los núcleos en cada campo para calcular el porcentaje de núcleos apoptóticos y se calculó la media de todas las imágenes de cada tumor.

2.9 Análisis estadístico

El programa informático InStat 2.0 (GraphPad software, Inc. San Diego, USA) fue utilizado para realizar los análisis estadísticos. Se efectuaron dos tipos de análisis estadísticos. Cuando se analizaron dos grupos se empleó el análisis *t* de Student (análisis paramétrico que asume poblaciones gaussianas y con similares desviaciones estándar) o el test de Mann-Whitney (análisis no paramétrico) en función de la distribución de los datos. Cuando se analizaron más de dos grupos se empleó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, utilizando el post-test Student-Newmann-Keuls. Se consideró un valor de *p* inferior a 0,05 ($p < 0,05$) como significativo, un valor de *p* inferior a 0,01 ($p < 0,01$) como muy significativo y un valor de *p* inferior a 0,001 ($p < 0,001$) como extremadamente significativo. Los resultados fueron representados como la media \pm el error estándar de la media (SEM).

-RESULTADOS-

VII. RESULTADOS

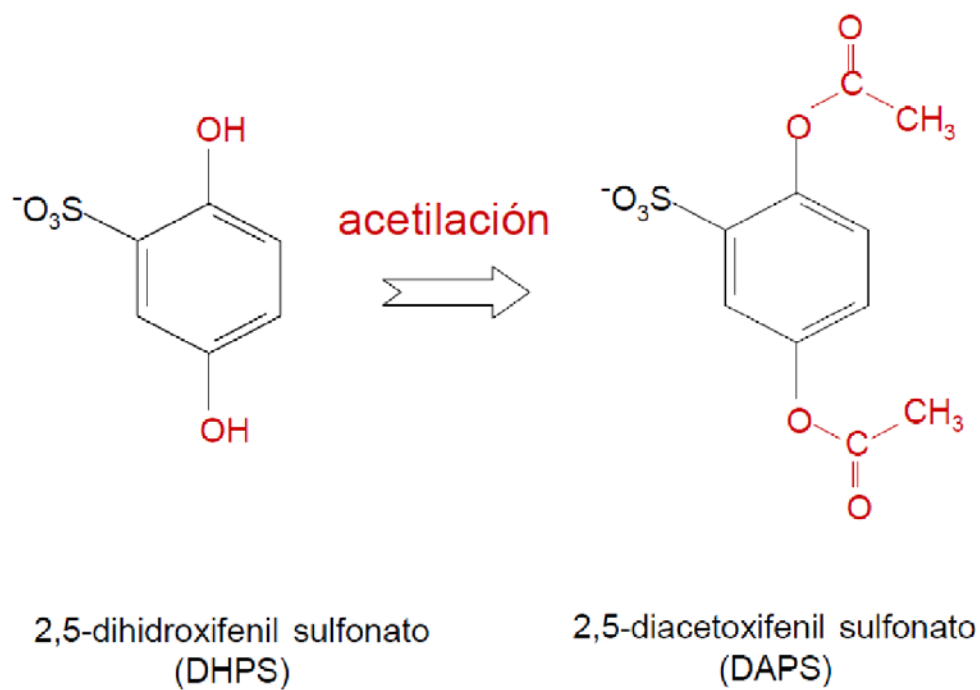


Figura 6: Estructuras del 2,5-dihidroxifenil sulfonato (DHPS) y del 2,5- diacetoxifenil sulfonato (DAPS). En rojo están destacados los grupos funcionales de la molécula que se modifican en el DHPS para dar lugar al DAPS mediante el proceso de acetilación.

1. DAPS inhibe la proliferación de células C6 de glioma de rata *in vitro*

Incluso en ausencia del estímulo con suero fetal bovino (FCS), las células C6 de glioma de rata muestran una intensa proliferación durante 48 horas. En estas condiciones, la proliferación de las células C6 fue inhibida por el inhibidor del FGF, DHPS (10 – 300 μ M) de una forma concentración-dependiente (*Figura 7*). Aunque con una potencia significativamente menor (IC50 400 μ M vs. 180 μ M), DAPS (30 – 1000 μ M) también inhibió significativamente la proliferación de las células C6 *in vitro* (*Figura 7*). En ambos casos, tanto para el DHPS como para el DAPS, se detectó una inhibición significativa de la proliferación de las células C6 a la concentración de 100 μ M (*Figura 7*).

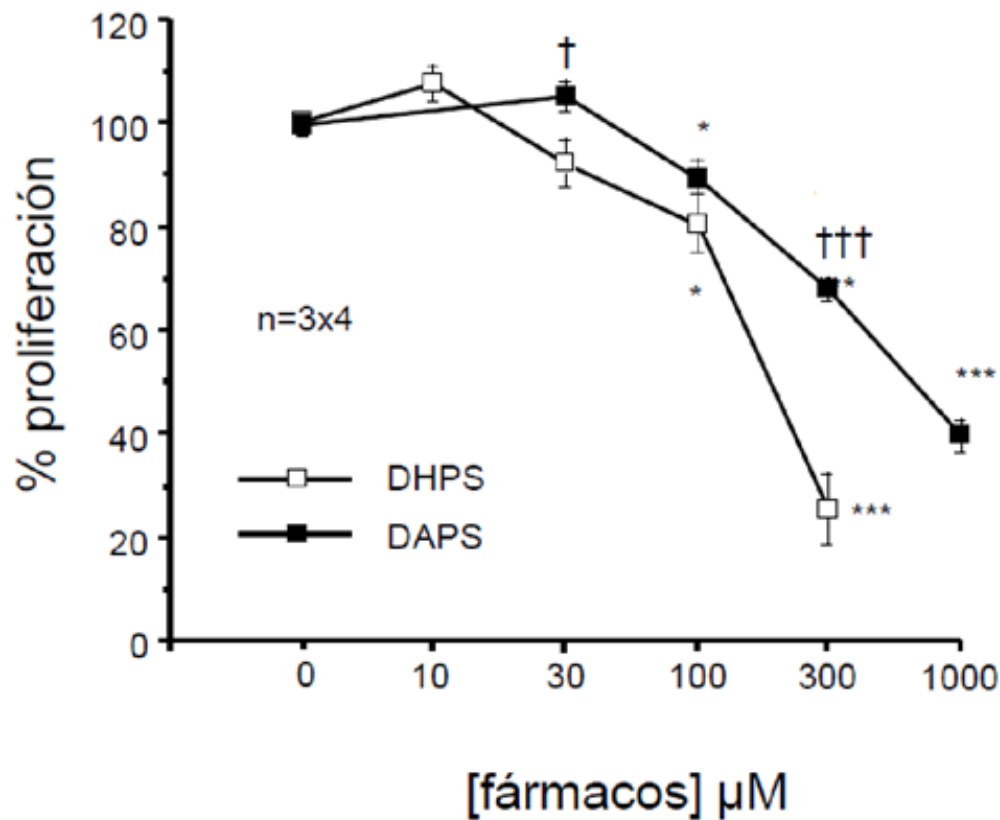


Figura 7: Efectos del tratamiento *in vitro* con DHPS (10 – 300 μM) ó DAPS (30 – 1000 μM) sobre la proliferación de las células C6 de glioma de rata. Los datos se expresan como la media \pm EEM del porcentaje del valor obtenido en ausencia de fármacos (control). Los datos corresponden a 3 experimentos diferentes realizados por cuadruplicado. * indica $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control; † indica $p < 0.05$, ††† $p < 0.001$ vs. DHPS; mediante ANOVA de un factor seguido del post-test Student- Newmann-Keuls.

2. DAPS manifiesta una actividad antiangiogénica *in vivo* superior a la mostrada por DHPS.

El aspecto macroscópico de las esponjas después de ser extraídas quirúrgicamente de los animales a los 7 días después de la implantación subcutánea, ya sugiere que la presencia de FGF-1 en las mismas produjo una marcada angiogénesis. Como se puede apreciar en la (*figura 8A*), la esponja con FGF-1 presenta un color rojo intenso que está ausente en la esponja sin FGF-1. Además, el tratamiento oral con DAPS (300 mg/kg/día) previene la aparición de esta angiogénesis como se deduce de la ausencia del color rojo intenso (*Figura 8A*, esponja de la derecha). Los cortes histológicos de estas esponjas confirmaron la presencia de un gran número de vasos funcionales (aquellos con presencia de eritrocitos) en las esponjas tratadas con FGF-1 (*Figura 8B*). La densidad de vascularización se vio claramente disminuida por el tratamiento oral con DHPS (300 mg/kg/día) o con DAPS (300 mg/kg/día) (*Figura 8C y 8D*, respectivamente). La cuantificación, mediante el uso de un software de morfometría, de los cortes histológicos reveló que la administración oral (300 mg/kg/día) tanto de DHPS como de DAPS causó una inhibición significativa de la angiogénesis inducida por FGF-1 en las esponjas de gelatina implantadas subcutáneamente. Sin embargo, la inhibición producida por el DAPS fue significativamente superior a la alcanzada con DHPS (*Figura 9A*). Además, el marcado efecto inhibitorio que ejerció el DAPS sobre la angiogénesis inducida por FGF-1 *in vivo* tuvo una clara dependencia de la dosis, como refleja la evaluación de distintas dosis orales de DAPS (de 20 mg/kg/día a 300 mg/kg/día) sobre la vascularización de las esponjas subcutáneas empapadas en FGF-1 (*Figura 9B*). La inhibición de la angiogénesis inducida por FGF-1 se acompañó de una clara reducción de la infiltración leucocitaria en las esponjas, como muestran los cortes histológicos de la (*Figura 10*).

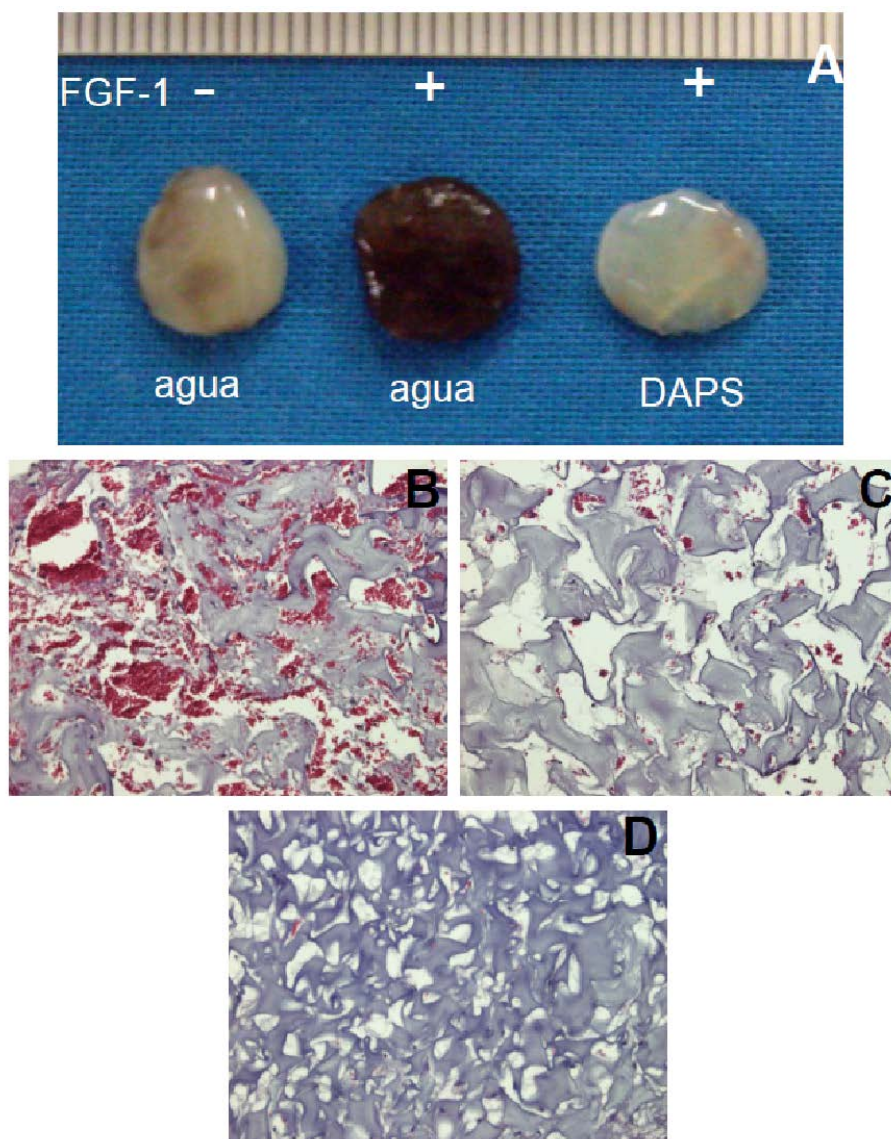


Figura 8: El panel A es una fotografía representativa que muestra el aspecto macroscópico de las esponjas de gelatina extraídas de ratas tratadas por vía oral con vehículo (agua corriente) (las dos de la izquierda) ó DAPS (300 mg/kg/día) (la situada más a la derecha) 7 días después de haber sido implantadas subcutáneamente. En la figura se indica si las esponjas contenían o no FGF-1. Los otros paneles son microfotografías (x200) representativas de cortes histológicos de esponjas con FGF-1 extraídas de ratas tratadas con agua (B), DHPS (300 mg/kg/día) (C) ó DAPS (300 mg/kg/día) (D) que muestran una marcada disminución de la vascularización con los tratamientos.

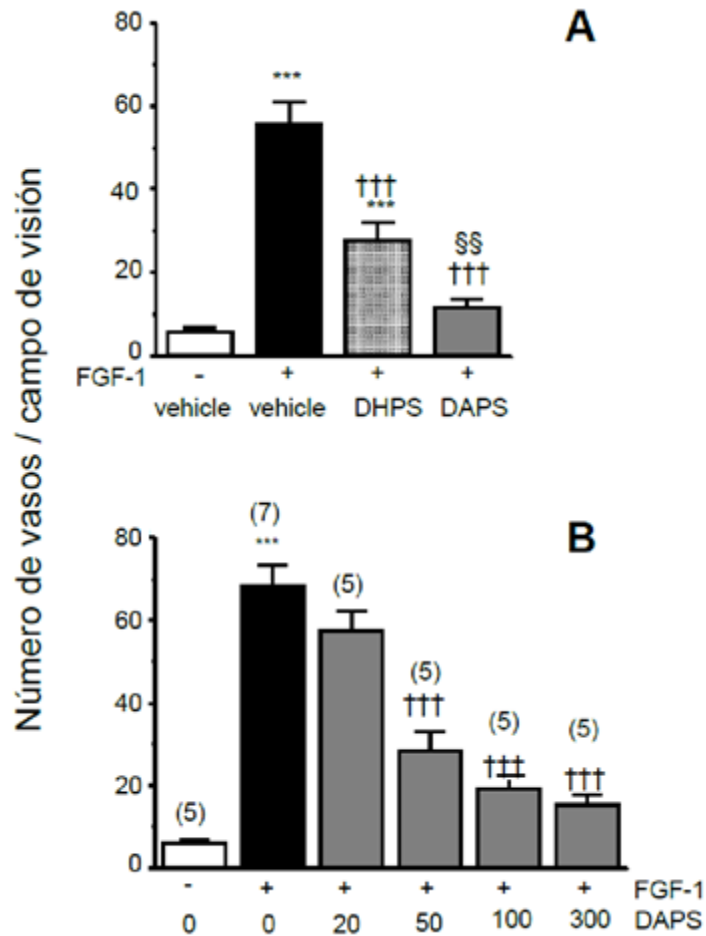


Figura 9: Cuantificación de la extensión de la neovascularización inducida por FGF-1 en las esponjas de gelatina y evaluación de los efectos del tratamiento oral con vehículo (agua corriente), DHPS y DAPS. En el panel A se comparan los efectos del tratamiento con DHPS (300 mg/kg/día) y DAPS (300 mg/kg/día) durante los 7 días del ensayo. En el panel B se muestran los resultados de un ensayo independiente que analiza relación entre la dosis y los efectos de la administración oral de DAPS (de 20 a 300 mg/kg/día). Los datos se expresan como media±EEM del número de vasos funcionales por campo determinados en seis campos por espécimen aleatoriamente elegidos. El número de ratas empleado para cada determinación se indica entre paréntesis. *** indica $p < 0.001$ vs. neovascularización en ausencia de FGF-1; ††† indica $p < 0.001$ vs. Vehículo+FGF-1; §§ $p < 0.01$ vs. DHPS+FGF-1 mediante ANOVA de un factor seguido del post-test Student-Newmann-Keuls.

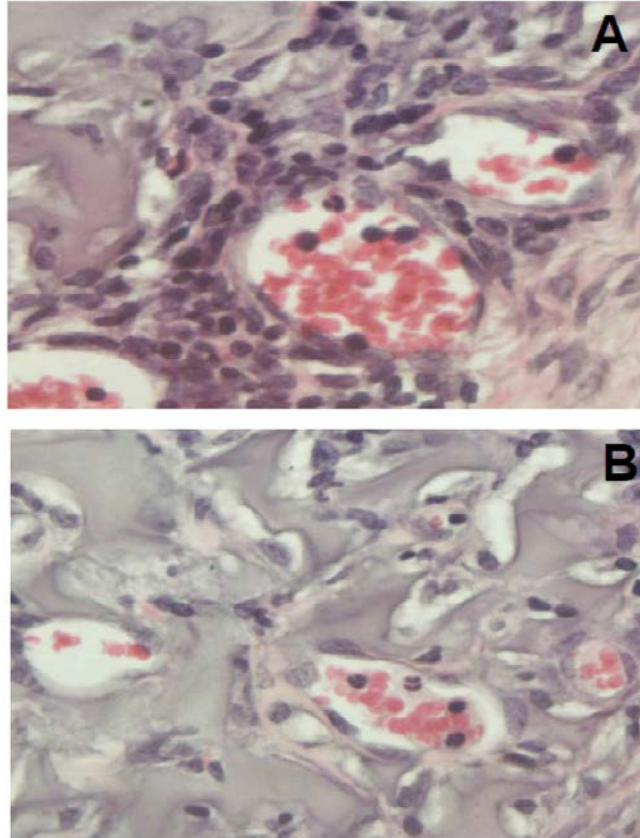


Figura 10: Efecto de la administración oral de DAPS (300 mg/kg/día) sobre la infiltración leucocitaria observada en las esponjas de gelatina empapadas en FGF-1 extraídas de los animales 7 días después de su implante subcutáneo. Se observa una intensa infiltración leucocitaria alrededor de los vasos sanguíneos en las esponjas procedentes de los animales tratados con agua (A) mientras que ésta se reduce marcadamente en los animales tratados con DAPS (B).

3. DAPS es más eficaz inhibiendo la progresión tumoral in vivo que el DHPS

Considerando la capacidad demostrada por DAPS de inhibir la angiogenesis, la inflamación y la proliferación, y dado el relevante papel de estos procesos en la carcinogénesis, se evaluaron los efectos del DHPS y el DAPS sobre la progresión tumoral. Para ello se empleó un modelo de glioma heterotópico inducido por la inyección subcutánea de células C6 en ratas inmunocompetentes. La administración intraperitoneal de DHPS (100 mg/kg/día) empezando el quinto día tras la inyección de células C6, una vez que se constató la presencia de un tumor subcutáneo apreciable a través de la piel, resultó en una clara reducción del tamaño de los gliomas subcutáneos extraídos después de 10 días de tratamiento (*Figura 11*). La administración de DAPS (100 mg/kg/día) no solo produjo la disminución del tamaño de los gliomas, sino que en 4 casos (de un total de 13) resultó en la completa desaparición del tumor previamente establecido (*Figura 11*), algo que no sucedió en ningún caso del grupo tratado con vehículo (0.9% NaCl) ni tampoco del grupo tratado con DHPS.

De hecho, la cuantificación reveló una reducción significativa del volumen tumoral en los animales tratados con DHPS que fue aún mayor en los tratados con DAPS (*Figura 12*). Es más, DAPS causó una disminución del peso del glioma al final del tratamiento que fue significativa con respecto al grupo tratado con vehículo pero que también fue significativamente mayor que la producida por el tratamiento con DHPS (*Figura 12*). Por tanto, el DAPS mostró una eficacia superior al DHPS en la inhibición de la progresión de los gliomas subcutáneos.

La reducción un poco más atenuada del peso del tumor podría ser explicada por la existencia de procesos necróticos en tumores tratados con vehículo, un fenómeno frecuentemente observado que consiste en una disminución de la densidad tumoral según aumenta el volumen. En este sentido, el marcador de progresión y necrosis tumoral, LDH (Soletti et al., 2010; Stuepp et al., 2013), está significativamente elevado en el suero de las ratas con glioma subcutáneo que han sido tratadas con vehículo con respecto a las ratas control (a las que no se les implantaron células C6). Estos niveles séricos de LDH en las ratas con gliomas subcutáneos se redujeron significativamente en ratas tratadas con DHPS (100 mg/kg/d; i.p.) e incluso se normalizaron (sin diferencia significativa respecto a ratas control) en aquellos animales tratados con DAPS (100 mg/kg/d; i.p.), (*Figura 13*).

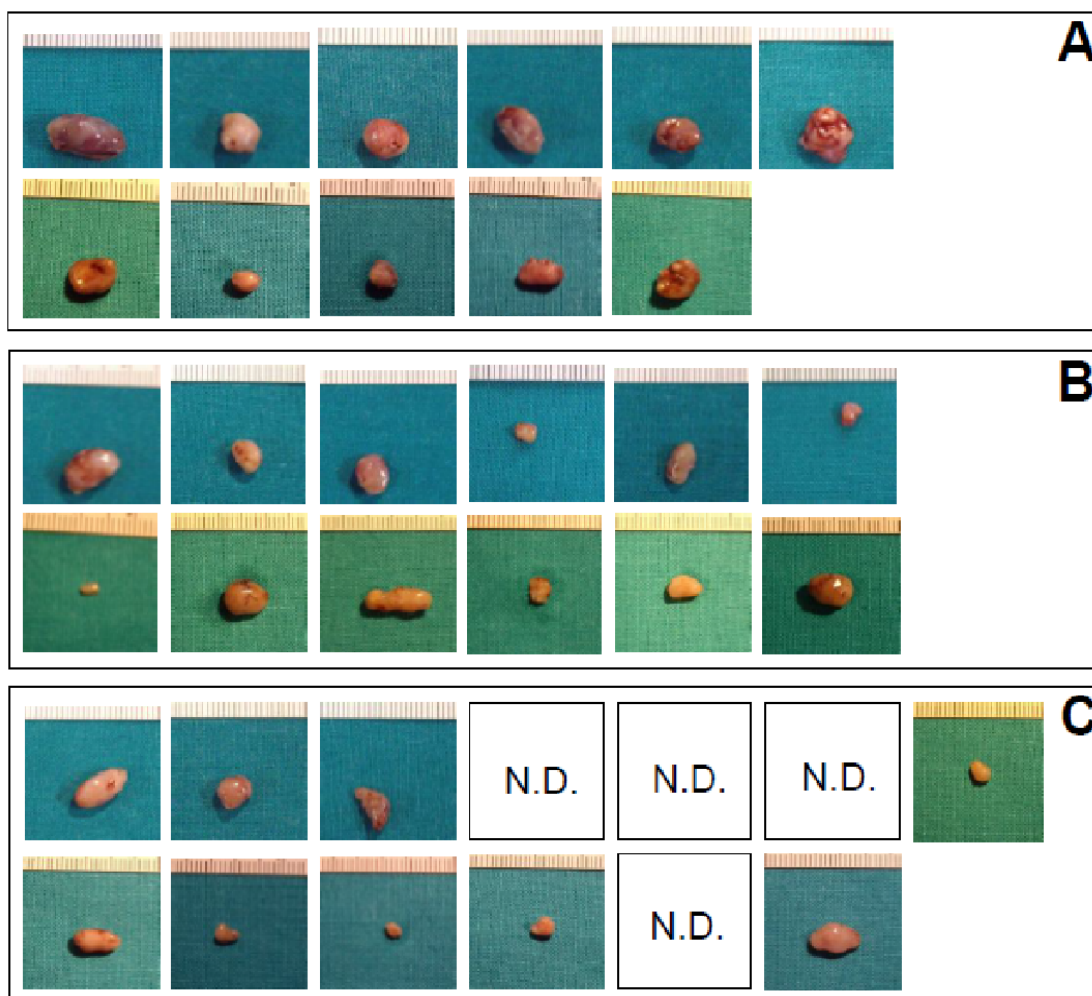


Figura 11. Efectos de la administración intraperitoneal de DHPS y DAPS sobre la progresión de tumores inducidos en ratas mediante implantación subcutánea de células de glioma de rata C6 (5×10^5 células). Las fotografías muestran tumores extraídos de las ratas de los grupos de animales tratados con vehículo (0.9% NaCl; n=11) (A), DHPS (100 mg/kg/día; n=12) (B), ó DAPS (100 mg/kg/día; n=13) (C) durante 10 días. El tratamiento comenzó en el quinto día tras la implantación de las células C6, una vez confirmada la presencia del tumor. Los tumores se retiraron a los diez días de tratamiento. Los espacios en blanco en el panel C corresponden a tumores que han desaparecido por completo tras el tratamiento con DAPS (N.D.: no detectados).

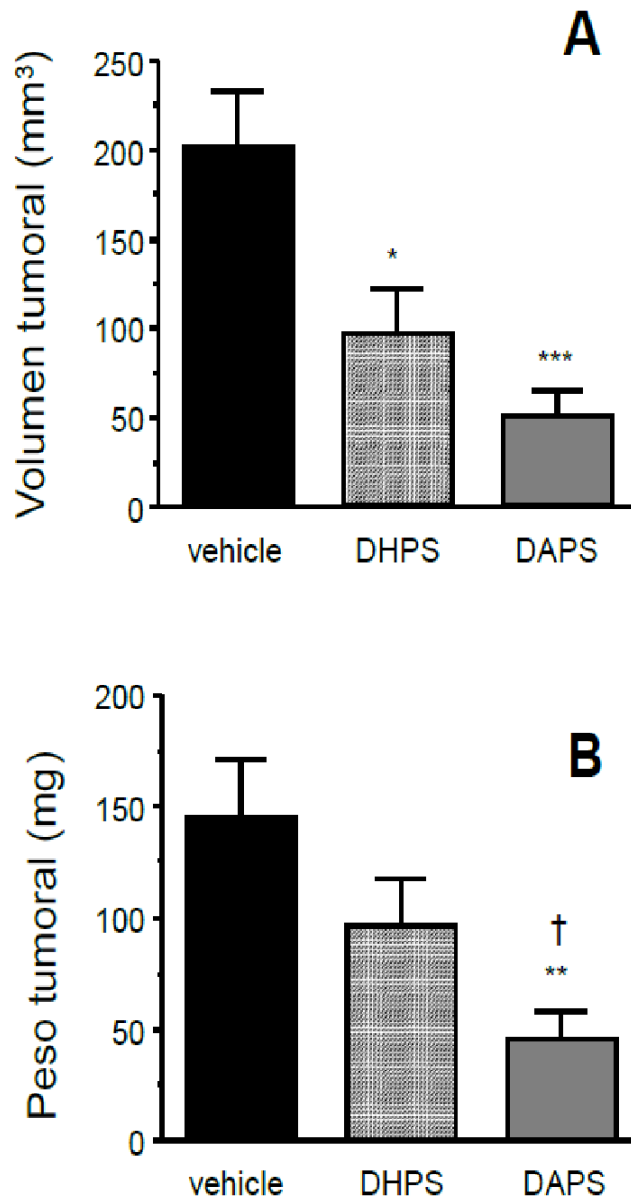


Figura 12: Cuantificación del volumen (A) y el peso (B) de los gliomas extraídos de animales tratados intraperitonealmente con vehículo (0.9% NaCl; n=11), DHPS (100 mg/kg/día; n=12), ó DAPS (100 mg/kg/día; n=13) durante 10 días. Los datos se expresan como media±EEM del volumen en mm³ o el peso en g. * indica $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Vehículo; † indica $p < 0.05$ vs. DHPS mediante ANOVA de un factor seguido del post-test Student-Newmann- Keuls.

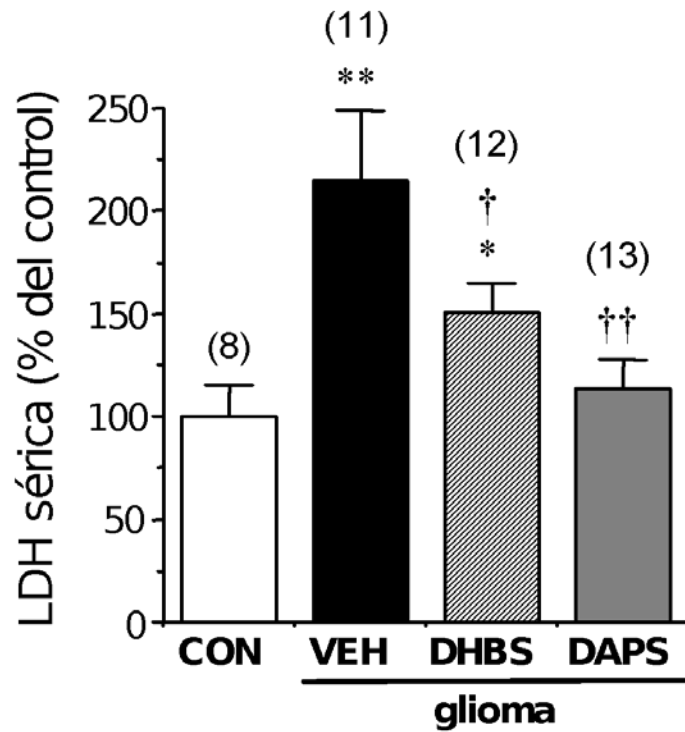


Figura 13. Efectos del desarrollo de gliomas subcutaneous y el tratamiento intraperitoneal con DHBS y DAPS (ambos a 100 mg/kg/d) sobre las concentraciones séricas de lactate deshidrogenasa (LDH) en ratas. Los datos se expresan como la media \pm EEM del porcentaje de LDH sérica detectado en ratas control sin glioma (CON). El número de animales empleados se muestra entre paréntesis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; vs. CON; † $p < 0.05$ vs. VEH, mediante ANOVA de un factor seguido de un test Student-Newman-Keuls.

4. DAPS es eficaz en inhibir la progresión de los gliomas subcutáneos cuando se administra de forma oral.

Posteriormente, se evaluó la eficacia por vía oral de DAPS sobre la progresión tumoral de los gliomas subcutáneos. Como muestra la (*Figura 14*), la administración oral de DAPS (200 mg/kg/día) a las ratas que portaban un glioma subcutáneo inhibió significativamente la progresión de estos tumores en comparación a las ratas tratadas con vehículo (agua corriente). Así, a todos los tiempos estudiados, el volumen tumoral en las ratas tratadas con DAPS fue significativamente menor que en la tratadas con vehículo. De hecho, la medición de los tumores una vez extraídos, a los 10 días de tratamiento (15 desde la implantación) reveló una disminución significativa tanto en el volumen (*Figura 15A*) como en el peso (*Figura 15B*) de los gliomas subcutáneos obtenidos de las ratas tratadas con DAPS. La administración oral de DAPS durante 10 días no pareció causar efectos tóxicos en los animales ya que la ganancia de peso a lo largo del desarrollo experimental en las ratas tratadas con DAPS fue muy similar a la observada en ratas tratadas con agua (*Tabla 1*). De hecho, el aspecto macroscópico de los estómagos de los animales tratados con DAPS no mostró señal alguna de irritación gástrica (*Figura 16*).

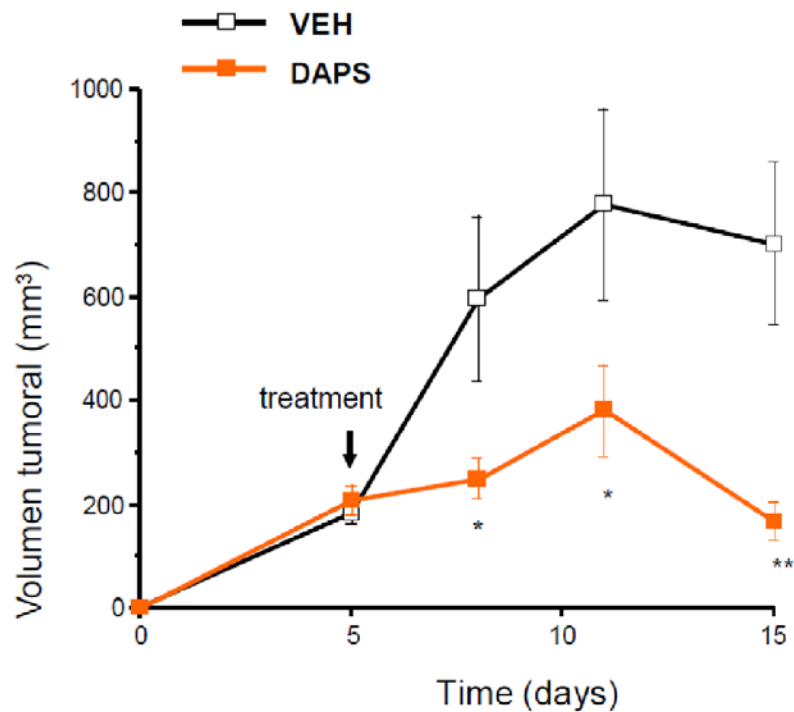


Figura 14. Evaluación de la eficacia de la administración oral de DAPS sobre la progresión de tumores inducidos en ratas mediante implantación subcutánea de células de glioma de rata C6 (5×10^5 células). Se muestra el curso del tamaño de los gliomas subcutaneous de ratas tratadas con vehículo (VEH, agua corriente) (n=8) ó DAPS (200 mg/kg/día) (n=10). El tratamiento comenzó (flecha) una vez que se verificó la presencia de tumor en el quinto día después de la implantación de células C6 y los gliomas se extirparon 10 días después. * indica $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. VEH mediante *t* de Student no pareado.

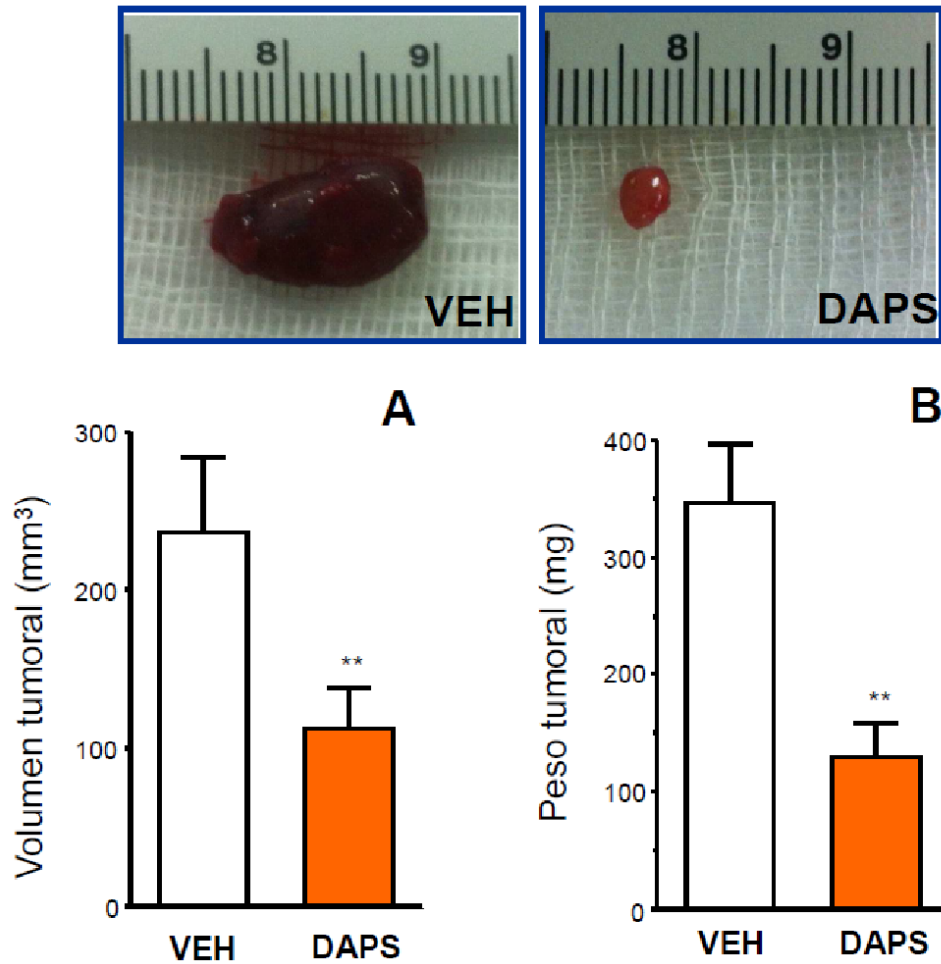


Figura 15. Cuantificación del volumen (A) y el peso (B) de los gliomas extraídos de animales tratados por vía oral con vehículo (VEH, agua corriente) (n=8) ó DAPS (200 mg/kg/día) (n=10) durante 10 días. Los datos se expresan como media±EEM del volumen en mm³ o el peso en g. ** indica $p < 0.01$ vs. VEH mediante análisis *t* de Student no pareado. Las fotografías en la parte superior muestran imágenes representativas de la disminución producida por el tratamiento oral con DAPS sobre el tamaño de los gliomas subcutáneos.

Tabla 1. Efecto del tratamiento oral con DAPS sobre el peso de los animales

| | Vehículo (n=8) | DAPS (n=10) |
|------------------|----------------|-------------|
| Peso inicial (g) | 332±12 | 319±14 |
| Peso final (g) | 374±15* | 373±13* |
| Incremento (g) | 42.5±5.9 | 49.2±8.2 |
| Incremento (%) | 12.6±1.7 | 16.1±3.5 |

* indica $p < 0.05$ vs. peso inicial (en el día 0, antes de la implantación de células C6). El peso final se refiere a aquél obtenido el día 15, antes del sacrificio para la resección del tumor. No existen diferencias significativas entre los grupos de animales. El 2,5- diacetoxifenil sulfonato potásico (DAPS) fue administrado por vía oral forzada (100 mg/kg dos veces al día) durante 10 días (del 5 al 14 ambos inclusive).

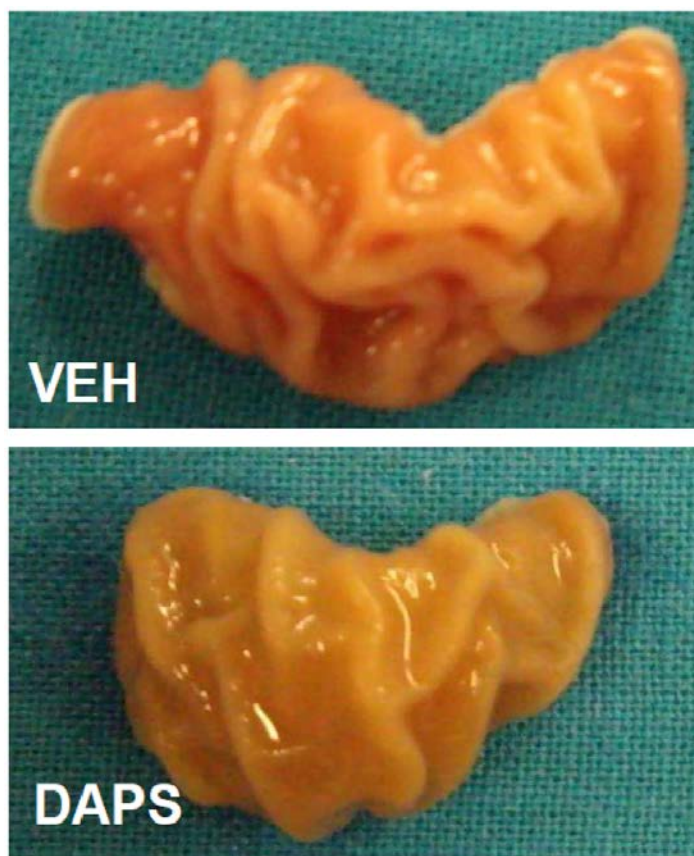


Figura 16. Aspecto macroscópico de la cara luminal de estómagos procedentes de ratas tratadas por vía oral con vehículo (VEH, agua corriente) ó con DAPS (200 mg/kg/día) durante 10 días. No se aprecian lesiones macroscópicas en los estómagos de las ratas tratadas con DAPS por vía oral.

5. La inhibición de la progresión tumoral causada por DAPS se asocia a una reducción de la vascularización, un aumento de la apoptosis y una disminución de la infiltración leucocitaria vascular en los gliomas subcutáneos.

El estudio histológico de los gliomas subcutaneous reveló que los tumores obtenidos de las ratas tratadas por vía oral con DAPS (200 mg/kg/día) presentaban un número significativamente reducido de vasos funcionales (aquellos que contenían eritrocitos) con respecto a los gliomas de las ratas tratadas con agua (*Figura 17*). Asimismo, la escasa presencia de apoptosis, detectada mediante el ensayo TUNEL de inmunofluorescencia, en las células tumorales de los gliomas obtenidos de las ratas tratadas con agua se incrementó muy significativamente en las células tumorales de los gliomas obtenidos de los animales tratados oralmente con DAPS (200 mg/kg/día) (*Figura 18*). Finalmente, estos efectos se acompañan de una marcada reducción de la infiltración leucocitaria en los vasos peritumorales de los gliomas subcutáneos de las ratas tratadas con DAPS (*Figura 19*).

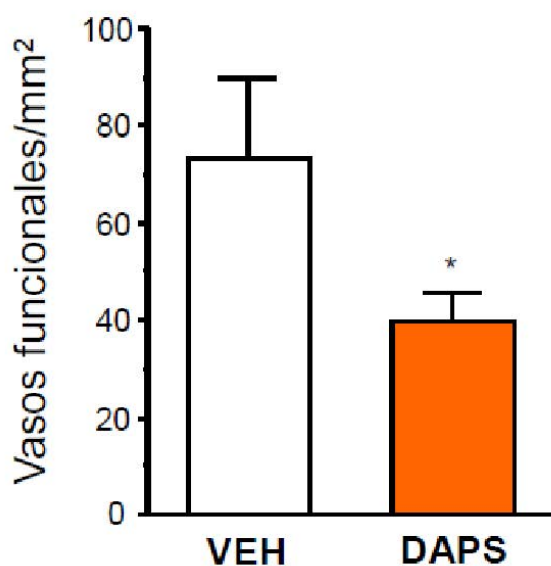
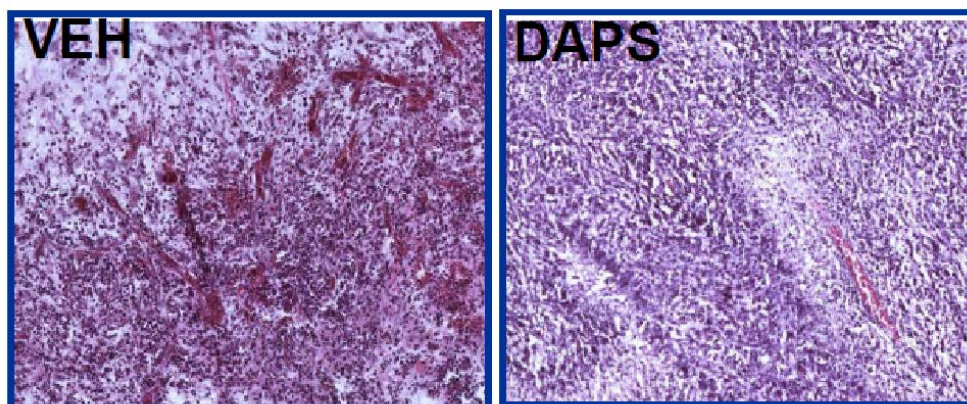


Figura 17. Efecto del tratamiento por vía oral con DAPS sobre la vascularización de los gliomas subcutáneos. Las microfotografías (x200) de la parte superior muestran cortes histológicos representativos de tumores obtenidos de ratas tratadas con vehículo (VEH, agua corriente) (n=8) ó con DAPS (200 mg/kg/día) (n=10) durante 10 días. El DAPS produce una marcada reducción de la intensa vascularización observada en los gliomas subcutáneos. La cuantificación de la vascularización se muestra en la gráfica de la parte inferior. Los datos se expresan como media±EEM del número de vasos funcionales (aquellos que contenían eritrocitos) por mm² de superficie del corte histológico del tumor. * indica $p < 0.05$ vs. VEH mediante análisis t de Student no pareado.

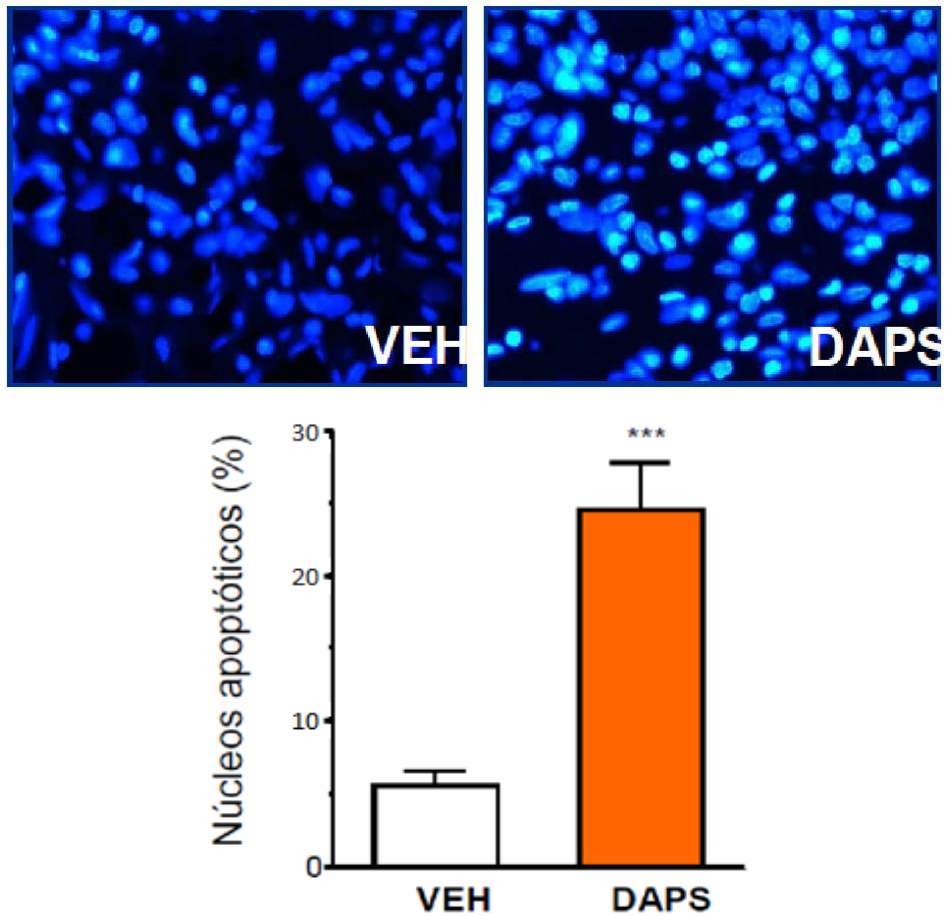


Figura 18. Efecto del tratamiento por vía oral con DAPS sobre la apoptosis celular en los gliomas subcutáneos. Las microfotografías (x400) de la parte superior muestran cortes histológicos representativos de tumores obtenidos de ratas tratadas con vehículo (VEH, agua corriente) (n=8) ó con DAPS (200 mg/kg/día) (n=10) durante 10 días. El DAPS produce un claro incremento en el escaso número de núcleos apoptóticos observado en los gliomas subcutáneos. Los núcleos apoptóticos son aquellos que muestran una señal fluorescente de color azul muy claro. La cuantificación de la apoptosis se muestra en la gráfica de la parte inferior. Los datos se expresan como la media \pm EEM del porcentaje de núcleos apoptóticos por campo.

** indica $p < 0.01$ vs. VEH mediante análisis t de Student no pareado.

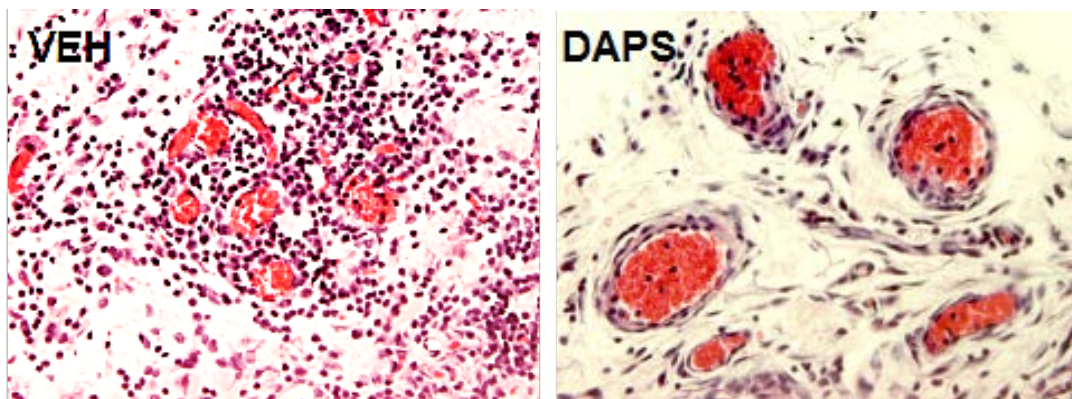


Figura 19. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina representativos de los gliomas subcutáneos procedentes de ratas tratadas con vehículo (VEH; agua) o 2,5-diacetoxifenil sulfonato potásico (DAPS) (200 mg/kg/día). Se puede observar que el tratamiento con DAPS resulta en una marcada reducción de la intensa infiltración leucocitaria que se observa alrededor de los vasos peritumorales en las ratas tratadas con vehículo.

-DISCUSIÓN-

DISCUSIÓN

A pesar de todos los esfuerzos al respecto, ninguno de las estrategias terapéuticas desarrolladas para tratar el glioma puede considerarse un éxito, y el pronóstico para esta enfermedad sigue siendo devastador. La dificultad a la hora de desarrollar un tratamiento radica en la gran heterogeneidad molecular presente en los gliomas malignos, incluso en un mismo tumor, presentado alteraciones en múltiples vías.

La quimioterapia interfiere la capacidad de crecimiento y reproducción de las células tumorales, pero es un tratamiento inespecífico e ineficaz al afectar también a células normales, sobre todo a las que se dividen más rápidamente, generando graves efectos secundarios, por lo que existe una necesidad apremiante de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Estas estrategias deberían basarse en la inhibición o reversión completa de los procesos que caracterizan este tipo de tumor, que son además las causas de la dificultad en su cura: proliferación celular incontrolada, infiltración difusa, alta resistencia a la apoptosis y vigorosa angiogénesis. Por ello es necesaria una comprensión profunda de estos procesos a nivel molecular. Los avances en esta comprensión y las complicaciones observadas con el uso de algunos medicamentos para tratar el glioma suponen un incentivo para la búsqueda de alternativas.

Tanto el FGF como el VEGF son dos potentes inductores de la angiogénesis tumoral lo que los convierte en claras dianas terapéuticas en el tratamiento del glioma. Se busca así encontrar sustancias que modifican la estructura del factor de crecimiento para impedir su unión con el receptor o que alteran este receptor para impedir el acoplamiento o que inhiben la fosforilación del dominio intracitoplasmático con actividad tirosín quinasa. Esta última posibilidad es la que presenta los más graves efectos secundarios. Esto es debido a los numerosos procesos de fosforilación que ocurren en las células y a la alta semejanza entre los dominios con actividad tirosín-quinasa de muchos de los receptores de factores de crecimiento y de los de otros ligandos. Tradicionalmente, las terapias anti-angiogénicas se han orientado a la inhibición del VEGF. Aunque en ensayos preclínicos la terapia anti-angiogénica con inhibidores del VEGF generó resultados esperanzadores, en ensayos clínicos la eficacia ha sido muy discreta, y se han presentado efectos secundarios graves (*Molema y Griffioen, 1998*). En general se acepta que la

resistencia al tratamiento con sustancias que inhiben el VEGF se debe a la sobreexpresión de FGF (Casanovas *et al.*, 2005) provocada por el propio tratamiento. Es posible que la inhibición de la angiogénesis patológica del glioma mediante la inhibición de FGF en lugar de VEGF sea un enfoque más adecuado, dado que la inhibición del FGF en sí misma suprime igualmente la angiogénesis inducida por VEGF (Jonca *et al.*, 1997), mientras que el FGF induce la angiogénesis dependiente e independientemente del VEGF (Seghezzi *et al.*, 1998; Zubilewicz *et al.*, 2001). De hecho, se ha sugerido que la activación de FGF puede ser la responsable de la falta de eficacia a medio y largo plazo de las terapias antitumorales basadas en la inhibición de VEGF (Casanovas *et al.*, 2005), como indican estudios donde se correlaciona la progresión del glioma durante el tratamiento con anti-VEGF con aumentos significativos del FGF en plasma (Batchelor *et al.*, 2007). Es por ello que la inhibición de la señalización del FGF se ha sugerido como estrategia para superar la resistencia a la terapia anti-VEGF (Alessi *et al.*, 2009). Además, la inhibición combinada de ambas señalizaciones parece causar un impacto más profundo en la vasculatura del tumor (Stahl *et al.*, 2009). Otro factor a tener en cuenta es que, además de ser un potente estimulador de la angiogénesis, el FGF también regula múltiples procesos de las células de glioma, por lo que la inhibición de la señalización de FGF impactaría negativamente en la progresión del glioma a través de mecanismos tanto dependientes como independientes de la angiogénesis (Auguste *et al.*, 2001). Por estas razones, el desarrollo de inhibidores del FGF eficaces, seguros y de fácil administración representa una muy razonable estrategia terapéutica para acometer el tratamiento del glioma.

En este sentido, el dobesilato (DHPS), pertenece a una familia de inhibidores del FGF, encabezada por el ácido genticico, que se unen al dominio de unión a heparina del FGF y que poseen un claro efecto anti-tumoral y anti-angiogénico. La heparina y otros glicosaminoglicanos sulfatados son fundamentales en la unión y activación del FGFR (Ornitz *et al.*, 1995). FGF y FGFR se combinan con estas sustancias para dar un complejo ternario que se requiere para la transducción de la señal (Jastrebova *et al.*, 2006). Esta unión puede ser antagonizada por sustancias que imiten las características químicas de los glicosaminoglicanos, y que sean capaces de unirse a FGF/FGFR e inhibir así la formación de dicho complejo ternario. Pequeñas moléculas polisulfonadas como el mioinositol hexasulfato (Pineda-Lucena *et al.*, 1996) o la suramina, una urea binaftilo polisulfonada que se utiliza como fármaco anti-parasitario, son

capaces de hacer esto, teniendo efectos inhibitorios sobre la señalización del FGF y mostrando un efecto anti-tumoral (*Pesenti et al., 1992*). Una función química de la suramina, el 1, 3, 6-naftalenotrisulfonato (NTS), es capaz de impedir significativamente la formación de dicho complejo (*Lozano et al., 1998*), inhibiendo así la angiogénesis inducida por FGF (*Cuevas et al. 1999a*), e induciendo apoptosis en el tejido tumoral (*Cuevas et al. 1999b*). En este sentido el NTS impidió el crecimiento del glioma en estudios realizados con células de glioma de rata C6 implantadas en la córnea de un conejo (*Cuevas et al. 1999c*).

Posteriormente, se encontró un mejor inhibidor de la actividad mitogénica del FGF en una versión simplificada del NTS, el 1-naftalenomonosulfonato (NMS). En un estudio de un glioma ortotópico inducido por células C6 en ratas Sprague–Dawley, se observó una reducción significativa del volumen del tumor tras un tratamiento con administración continua de NMS en el lugar de la implantación de las células, 6 horas después de la misma. De nuevo, la reducción del crecimiento del glioma por NMS se asoció con una reducción en la vascularización del tumor unida a un incremento de la apoptosis (*Cuevas et al., 2001*).

El análisis de la estructura tridimensional del complejo formado por el FGF y otro derivado naftalénico, el 5A2NMS, permitió la formulación de una serie de reglas para identificar posibles candidatos para la inhibición del FGF. La búsqueda, en bibliotecas de productos naturales, de sustancias con estas características dirigió la atención hacia el ácido gentísico, un ácido dihidroxibenzoico que se produce en pequeñas cantidades durante la ruptura metabólica de la aspirina (*Fernandez et al., 2010*). El estudio de esta sustancia llevó a la definición de una potente familia de inhibidores del FGF, encabezados por el ácido gentísico.

Las características comunes de estas sustancias eran la sustitución en posición '*para*' de los grupos hidroxilos y la funcionalización del anillo aromático por un grupo ácido. Estos compuestos reconocen tanto a los factores de crecimiento como a sus receptores, desplazando a la heparina de su sitio de unión con ellos, cambiando la estructura tridimensional del factor de crecimiento en el lugar de unión a su receptor, y disociando así el complejo de señalización.

El candidato más prometedor de esta familia fue un compuesto sintético que tiene función de sulfonato, el 2,5-dihidroxifenil sulfonato (DHPS, dobesilato). El DHPS muestra un IC_{50} 3.000 veces menor que el NTS para inhibir la proliferación inducida por FGF en fibroblastos, y se demostró que dicha sustancia, administrada por vía oral, inhibía la angiogénesis inducida por FGF-1 *in vivo* en ratas (Fernandez *et al.*, 2010). En otro ensayo, el DHPS se administró por vía intraperitoneal en ratas con gliomas subcutáneos inducidos por implantación de células C6, observándose nuevamente una inhibición de la progresión de estos tumores. La reducción de tamaño de los gliomas iba asociada a una clara inhibición en la vascularización del tumor, tanto en la periferia como en la parte interior (núcleo) de los tumores (Fernandez *et al.*, 2010). Además de reducir la extensión de la vascularización de los gliomas, DHPS también disminuye la permeabilidad de los vasos que se forman, un efecto que podría tener implicaciones en algunas manifestaciones clínicas del glioma, como el edema cerebral. También se observa una reducción en signos histopatológicos de invasión del glioma, como la satelitosis perivascular, la infiltración del plexo coroideo y la difusión subpial (Cuevas *et al.* 2011b).

Existen varias ventajas en el uso del DHPS. En primer lugar, dado que otros factores de crecimiento, incluyendo el VEGF, también poseen dominio de unión a heparina e interactúan con los heparán sulfatos para ejercer sus actividades biológicas, el DHPS, al interactuar con el dominio de unión a heparina del FGF, potencialmente podría interferir en las actividades de esos otros factores de crecimiento. Específicamente, se ha comprobado que el DHPS tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células endoteliales, la relajación arterial, la permeabilidad vascular y la angiogénesis *in vivo* inducida por el VEGF (Angulo *et al.*, 2011).

En segundo lugar, el tratamiento con DHPS presenta una importante ventaja relacionada con su seguridad. Resulta sorprendente que un inhibidor tan potente del FGF pueda exhibir un perfil de seguridad tan bueno como el DHPS (Allain *et al.*, 2004), dado el amplio espectro de actividades fisiológicas en las que están implicados los FGF (Gimenez-Gallego y Cuevas, 1994; Szebenyi y Fallon, 1999). Después de todo, los FGFs se han descrito en la mayoría de tejidos adultos derivados del mesodermo y neuroectodermo embrionario, en los que están estrechamente ligados a los glicosaminoglicanos sulfatados de la matriz extracelular, a veces a niveles muy altos (Cuevas *et al.* 1996b). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, el FGF está fuertemente unido a

heparán sulfatos de la matriz extracelular y la membrana basal, y no es susceptible de ser inhibido por DHPS, siendo la constante de afinidad de este compuesto para el FGF aproximadamente 3000 veces menor que la de los glicosaminoglicanos sulfatados de la matriz extracelular, que pueden además alcanzar concentraciones locales extraordinariamente altas (*Fernandez et al., 2010*). El dobesilato no realiza así acción alguna en condiciones normales, siendo sólo en situaciones patológicas (cáncer, inflamación, angiogénesis,...), en las que se produce una liberación excesiva de FGF, cuando el DHPS puede interactuar con él e interferir su acción patológica (*Vlodavsky et al., 1990; Vlodavsky et al., 2000; Sanderson, 2001; Iozzo y Sanderson, 2011*).

Esto explica los resultados de un estudio en el que se inhibió la progresión de la enfermedad metastásica pulmonar en ratones mediante la inducción de inmunogenicidad dirigida contra el dominio de unión a heparina del FGF-2, sin afectar negativamente a la curación de heridas y la fertilidad en estos animales (*Plum et al., 2004*).

Por ello, el uso terapéutico del DHPS, que sólo muestra actividad si existe un exceso de FGF, tienen una clara ventaja sobre el empleo de los inhibidores del dominio de tirosina quinasa intracelular de FGFR, que inhibirían la señalización FGF/FGFR de forma independiente de las condiciones fisiológicas o patológicas del medio ambiente, y que por lo tanto podrían causar efectos secundarios importantes. De hecho, los inhibidores de la tirosina quinasa que han alcanzado fases clínicas de desarrollo producen un amplio espectro de eventos adversos, algunos de los cuales pueden ser fatales (*Reck, 2010*).

El DHPS es el principio activo de Doxium ®, un fármaco también conocido como dobesilato de calcio, utilizado durante más de 40 años, que se administra por vía oral para el tratamiento de la retinopatía diabética y de la insuficiencia venosa crónica, y se administra tópicamente para el tratamiento de hemorroides. Aunque no se conoce claramente su mecanismo de acción en tales patologías, tiene un buen perfil de seguridad (*Allain et al., 2004*). Su actividad demostrada contra FGF (*Fernández et al., 2010*) y su falta de problemas de seguridad llevó a la evaluación del dobesilato para el tratamiento tópico de diversas patologías humanas relacionadas con la angiogénesis y la hiperproliferación en casos clínicos y en ensayos clínicos de prueba de

concepto (POC). Así se comprobó su eficacia en el tratamiento de pacientes con enfermedades dependientes de la angiogénesis tales como la rosácea y la psoriasis (Cuevas y Arrazola, 2005b), así como en el tratamiento de lesiones de la piel pre-tumorales (Cuevas et al. 2011a) y tumorales (Cuevas y Arrazola, 2005a; Cuevas et al. 2011a), estando aparentemente desprovisto de efectos adversos. Otro estudio, más reciente, con nueve pacientes con carcinoma basocelular volvió a confirmar la alta eficacia del DHPS contra las células cancerosas, con excelentes resultados en todos los pacientes (Cuevas et al. 2011a). Además de los procesos tumorales de la piel, el DHPS inhalado mostró eficacia terapéutica en un paciente con cáncer de pulmón (Cuevas et al., 2012).

En el presente estudio se ha utilizado la línea de células C6 de glioma de rata, que fue producida originalmente a finales de los sesenta en el laboratorio del Hospital General de Massachusetts, mediante la administración repetida de N,N'-nitroso-metilurea a ratas Wistar no consanguíneas durante un período de unos 8 meses (Benda et al., 1968; Schmidek et al., 1971). Una vez que aparecieron signos neurológicos los animales fueron sometidos a eutanasia y los tumores se extirparon y se cultivaron *ex vivo*. Uno de los tumores (# 6) se clonó y fue designado como C6 (Pfeiffer et al., 1970). Inicialmente, el tumor fue histopatológicamente clasificado como un astrocitoma para luego ser designado como un tumor glial tras su clasificación por la American Type and Culture Collection (ATCC # CCL- 107).

La línea de células C6 proporciona un modelo ampliamente usado para el estudio del glioma al haberse observado que presenta características casi idénticas a sus equivalentes humanos. Su fuerte angiogénesis, reproducibilidad, alta velocidad de crecimiento y fácil localización del tumor que generan hace que la implantación de estas células sea una excelente manera de estudiar los tumores intracraneales (modelo ortotópico). Además el método permite el estudio de la progresión del glioma en animales cuyo sistema inmune está aún intacto. Evidencias recientes apuntan a la inflamación y a las acciones de células inflamatorias como determinantes en el proceso de tumorigénesis (Widera et al., 2008; Grivennikov et al., 2012), por lo que conviene usar modelos que utilizan animales no inmunosuprimidos.

Los cambios observados en la expresión génica en las células C6 son equivalentes a los que ocurren en cerebros humanos (Shih et al., 2004). Las células C6 no expresan mRNA de los

supresores de tumores p16 y p19ARF, codificados por el mismo gen, pero expresan un p53 competente (*Schlegel et al., 1999; Asai et al., 1994*). El modelo celular de glioma en rata C6 fue usado tanto para la creación de modelos empleados para incrementar el conocimiento de la fisiopatología del glioma (*Karmakar et al., 2007; Assadian et al., 2008*), y para la evaluación de terapias con quimioterapia (*Doblas et al., 2008*), terapia antiangiogénica (*Solly et al., 2008*), inhibidores de proteosomas (*Ahmed et al., 2008*), tratamiento con toxinas (*Zhao et al., 2008*), radioterapia (*Sheehan et al., 2008*), terapia fotodinámica (*Mannino et al., 2008*), y otras estrategias terapéuticas. Se ha comprobado que las células C6 expresan FGF y sus receptores (*Grobben et al., 2002*). Igualmente, se ha observado que el FGF secretado actúa como un estimulador autocrino de las células C6 de glioma (*Bernstein et al., 1990*), y se ha demostrado que la interrupción de la señalización de FGF/FGFR en estas células dificulta su capacidad proliferativa y tumorigénica (*Chicoine y Silbergeld, 1995*).

Las células C6 de glioma también desarrollan tumores cuando se implantan en la región subcutánea abdominal (*Watanabe et al., 2002*) (heterotópico) cuando se implantan en ratas Wistar y ratas SD (*Grobben et al., 2002; Barth y Kaur, 2009; Jacobs et al., 2011*). Aunque los estudios subcutáneos dan menos información que los ortotópicos, principalmente por la importancia del microambiente en la progresión del tumor, los exámenes histopatológicos de estos gliomas subcutáneos revelan características similares a las de los tumores que crecen en los cerebros de las mismas ratas (*Watanabe et al., 2002*). Este modelo tiene además la ventaja de una inducción fácil y la posibilidad de un control continuo del tumor que sobresale, lo que permite un estudio del mismo sin la necesidad de emplear técnicas muy complejas que requieren una manipulación excesiva del animal, como la resonancia magnética. Los gliomas subcutáneos alcanzan el volumen máximo a los 15 días después de la implantación y luego comienzan a regresar (*Watanabe et al., 2002*), un patrón de evolución tumoral a tener en cuenta en la evaluación experimental de las terapias anti-glioma.

La hipótesis de este estudio es que la esterificación de los dos grupos hidroxilo del DHPS va a generar un derivado, DAPS, con actividades adicionales, además de la capacidad del DHPS de inhibir el FGF, que podrían potenciar su acción anti-inflamatoria y anti-angiogénica, y por tanto, presentar una mayor eficacia anti-tumoral que la molécula parental, el DHPS.

In vivo, al extraer quirúrgicamente las esponjas de gelatina siete días después de la implantación, se observa que su aspecto macroscópico evidencia la presencia de angiogénesis inducida por FGF-1, apreciándose un color rojo intenso causado por la exuberante vascularización. El tratamiento oral con DHPS ó DAPS (300 mg/kg/día) previene la angiogénesis inducida por FGF-1 como se deduce de la ausencia de dicha coloración. El análisis de los cortes histológicos de las esponjas mediante el uso de un software de morfometría confirmó esta apreciación macroscópica, revelando la presencia de un gran número de vasos funcionales (con presencia de eritrocitos) tras la estimulación con FGF-1 que se vio claramente disminuida por el tratamiento oral con DHPS (300 mg/kg/día) o con DAPS (300 mg/kg/día).

Esta inhibición de la angiogénesis está probablemente relacionada con la capacidad de estos compuestos de interferir con la acción del FGF. De hecho, entre las distintas actividades que demostraron la actividad inhibitoria del DHPS sobre el FGF-1, se constató su capacidad de inhibir la angiogénesis inducida por FGF cuando se co-administró localmente junto a este factor en esponjas implantadas en ratones, efecto que se produjo tanto con FGF-1 como FGF-2 y empleando distintas sales del DHPS (Cuevas *et al.* 2005a). Posteriormente se confirmó esta capacidad inhibitoria de la angiogénesis manifestada por el DHPS, ya que su administración oral fue capaz de inhibir la neovascularización inducida por FGF-1 en esponjas implantadas en ratas (Fernández *et al.*, 2010). El DHPS también mostró su capacidad de inhibir la angiogénesis inducida por VEGF (Angulo *et al.*, 2011) sugiriendo que estos compuestos podrían interferir con otros factores angiogénicos con dominio de unión a heparina, aunque no se puede descartar que la reducción de la angiogénesis inducida por VEGF estuviese relacionada por la propia inhibición sobre el FGF y que éste contribuyese a los efectos pro-angiogénicos del VEGF *in vivo*, como se ha sugerido (Mandriota *et al.*, 1997). Un hecho fundamental que revela nuestro estudio que la inhibición de la angiogénesis inducida por el FGF *in vivo* que alcanza el tratamiento con el derivado diacetilado del DHPS, DAPS, es significativamente superior a la alcanzada con la molécula parental. Y esto se produce a pesar de que el DAPS es menos potente que el DHPS inhibiendo *in vitro* la proliferación de fibroblastos 3T3 inducida por FGF-1 (Angulo *et al.*, 2015). Es más, el presente trabajo demuestra también una menor potencia del DAPS en la inhibición *in vitro* de la proliferación de células C6 de glioma de rata (Figura 7). La capacidad

antiproliferativa del DHPS ya era conocida, y está producida por una interferencia en la expresión y activación de diferentes efectores intracelulares y factores de transcripción relacionados con la vía de señalización de FGF/FGFR (Cuevas *et al.* 2005a). En primer lugar, el DHPS produce un descenso en la activación de la proteína quinasa ERK1/2 en células de glioma C6, sustancia clave en la vía de señalización MAPK, responsable de la transducción de estímulos proliferativos (Cuevas *et al.*, 2006a). Otro factor importante es el llamado “transductor de señal y activador de la transcripción 3” (STAT-3), que desempeña un papel pleiotrópico en la tumorigénesis y parece ser necesario para el crecimiento y auto-renovación de células madre de glioblastoma (Sherry *et al.*, 2009). Este factor, y otros implicados en la supervivencia celular, como la ciclina D1 y el Bcl-XL, son inhibidos por el DHPS en las células de glioma (Cuevas *et al.* 2006b). Por lo tanto, la modulación negativa de las vías de señalización responsables de la proliferación y supervivencia de las células de glioma C6 estimuladas por el FGF parece ser la clave de la capacidad anti-proliferativa de DHPS y DAPS. La menor potencia en la inhibición del FGF por el DAPS no es sorprendente dado el fino ajuste del DHPS en un estrecho hueco en la superficie del FGF-1 (Fernández *et al.*, 2010). Sin embargo, el DAPS sigue siendo mejor inhibidor que otros compuestos usados como guía en el descubrimiento del DHPS y que han sido ampliamente utilizados para inhibir la angiogénesis inducida por FGF (Fernández-Tornero *et al.*, 2003; Angulo *et al.*, 2015).

Por lo tanto, no parece que la mayor eficacia antiangiogénica obtenida con el proceso de acetilación se deba a una ganancia en la potencia de inhibición del FGF. Cabría especular que el DAPS habría adquirido alguna actividad adicional además de la capacidad de inhibir al FGF que ya poseía el DHPS. De hecho, se ha demostrado muy recientemente que el DAPS, pero no el DHPS tiene la capacidad de inhibir la actividad ciclooxigenasa (COX), tanto de la isoforma COX-1 como de la COX-2 (Angulo *et al.*, 2015).

La superioridad del DAPS como anti-angiogénico sobre el DHPS se debe probablemente a su actividad anti-inflamatoria relacionada con la inhibición de la COX, ya que la actividad COX y la síntesis de prostaglandinas tienen una participación activa en los procesos de angiogénesis patológica (Kuwano *et al.*, 2004; Howe *et al.*, 2013). De hecho, parece claro que la inflamación parece ser clave en el proceso de la angiogénesis inducida por FGF en las esponjas implantadas.

Es más, en estudios previos, la inducción de la angiogénesis por FGF y la inhibición de la misma in vivo por el DHPS se asociaron consistentemente con el aumento y la disminución, respectivamente, de la aparición de células inflamatorias en las esponjas de gelatina implantadas (*Fernández-Tornero et al., 2003*). El papel del FGF en los procesos inflamatorios ha recibido poca atención, pero hay evidencia significativa de la implicación de los FGF en estos procesos. Ya en 1990 se describe un aumento de células T dependiente de la expresión de FGF-1 en las articulaciones inflamadas de pacientes con artritis reumatoide, correlacionándose directamente con el grado y la intensidad de la inflamación (*Sano et al., 1990*). Posteriormente, se encuentra regulación positiva de FGF-1 en aloinjertos sometidos a rechazo crónico (*Zhao et al., 1993; Zhao et al. 1995*) y en procesos de inflamación renal (*Rossini et al., 2005*), mientras que también se encontraron niveles elevados de FGF-2 en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (*Kanazawa et al., 2001*) y esofagitis eosinofílica (*Huang et al., 2010*). Además, el fluido pericárdico (fluido de los pacientes con enfermedad pericárdica inflamatoria) contiene altos niveles de FGF-2 (*Karatolios et al., 2012*). Y hay evidencia de que el FGF-1 estimula la producción de citoquinas en células T a través la activación de NF-KB (*Byrd et al., 1999*), mientras que la activación del FGFR2 por FGF-1 potencia la secreción de citoquinas inflamatorias en astrocitos humanos y microglia (*Lee et al., 2011*). En este sentido, las citoquinas pro-inflamatorias y las células inflamatorias contribuyen a la angiogénesis inducida por FGF in vivo en el proceso de neovascularización como indica el patrón de expresión de las células microvasculares estimuladas con FGF (*Andrés et al., 2009; Presta et al., 2009; Kaga et al., 2012*). Esto explicaría porqué el DHPS tiene un cierto efecto anti-inflamatorio en modelos preclínicos (*Cuevas et al. 2005b; Angulo et al., 2015*) y en pacientes con inflamación (*Cuevas et al. 2011d*) mientras que la capacidad del DAPS de revertir procesos inflamatorios en modelos preclínicos es superior al DAPS muy probablemente porque incluye la inhibición de COX anivel local y modula también la producción sistémica de citoquinas pro-inflamatorias (*Angulo et al., 2015*). Efectivamente, el análisis histológico muestra una clara disminución de la infiltración leucocitaria en las ratas tratadas con DAPS.

Desde una visión traslacional de los resultados aquí mostrados, cabe destacar que el DAPS es claramente eficaz en inhibir la angiogénesis inducida por FGF-1 cuando se administra de forma oral. Es más, el efecto inhibitorio del DAPS sobre la angiogénesis mostró una clara dependencia

de la dosis, como refleja la evaluación de distintas dosis orales de DAPS (de 20 mg/kg/día a 300 mg/kg/día) sobre la vascularización de las esponjas subcutáneas empapadas en FGF-1.

Considerando la capacidad demostrada por el DHPS y el DAPS de inhibir la angiogenesis, la inflamación y la proliferación, y dado el relevante papel de estos procesos en la carcinogénesis, se evaluaron los efectos del DHPS y el DAPS sobre la progresión tumoral *in vivo*, empleando un modelo de glioma heterotópico inducido por la inyección subcutánea de células C6 en ratas inmunocompetentes. En primer lugar, la administración intraperitoneal de DHPS (100 mg/kg/día) empezando el quinto día tras la inyección de las células C6, y una vez constatada la presencia de un tumor subcutáneo apreciable a través de la piel, resultó en una clara reducción del tamaño de los gliomas, extraídos a los 10 días de tratamiento. La administración de DAPS (100 mg/kg/día) no solo produjo la disminución del tamaño de los gliomas, sino que en 4 casos (de un total de 13) resultó en la completa desaparición del tumor previamente establecido, algo que no sucedió en ningún caso, ni del grupo tratado con vehículo (0.9% NaCl), ni del grupo tratado con DHPS.

La actividad antitumoral del DHPS ya se había demostrado en este mismo modelo de glioma subcutáneo (*Fernández et al., 2010*) y el modelo de glioma ortotópico que supone un entorno de tratamiento estrechamente relacionado con la situación clínica. Se realizó la administración de DHPS por vía intraperitoneal (200 mg/kg), y se evaluó su combinación con un agente quimioterapéutico habitual, el irinotecán (CPT-11). El irinotecán no logró inhibir la progresión del glioma, y la administración sistémica de DHPS individualmente produjo sólo un ligero efecto, pero la combinación de ambos produjo una muy significativa inhibición del crecimiento del glioma. Se observó así que además de los efectos anti-glioma ejercidos por sí mismo, el DHPS era capaz de mejorar la eficacia de otras quimioterapias. Esta afirmación también se apoya en experimentos *in vitro* con células de glioma C6, que muestran que los efectos anti-proliferativos de varios agentes citostáticos se potencian significativamente por la administración simultánea de DHPS (*Cuevas et al. 2011b*).

En el presente estudio, se demuestra que la acetilación del DHPS origina un compuesto, DAPS, que es también más eficaz en la inhibición de la progresión tumoral que la molécula parental. A diferencia de los modelos de xenoinjertos en animales inmunodeprimidos, las ratas usadas en estos estudios tienen un sistema inmune intacto, que es una distinción importante si aceptamos que la inflamación es un factor crítico en el proceso de tumorigénesis (Karin, 2006; Grivennikov *et al.*, 2012). La mayoría de los tumores malignos sólidos desencadenan respuestas inflamatorias intrínsecas que promueven microambientes pro-tumorigénicos (Mantovani *et al.*, 2008). Es más, la actividad COX y los productos derivados de la misma están específicamente implicados en la carcinogénesis (Trifan y Hla, 2003; Menter y Dubois, 2012; Ishii *et al.*, 2013). Así, la inhibición de la COX potencia la eficacia de la quimioterapia antiangiogénica en modelos preclínicos (Xu *et al.*, 2014) y, de hecho se ha propuesto la COX como una diana terapéutica para el tratamiento del glioma (Giglio y Levin, 2004; New, 2004). Su capacidad de inhibir la actividad COX y la participación crítica de la inflamación en los procesos tumorales pueden explicar la superior eficacia del DAPS en la inhibición de la progresión de gliomas subcutáneos, llegando en algunos casos a la regresión completa de tumores establecidos. De hecho, el análisis histológico de los tumores revela que el DAPS inhibe marcadamente la intensa infiltración leucocitaria observada en los vasos que proveen de sangre al tumor.

De nuevo, también respecto a la actividad anti-tumoral, el DAPS demostró ser eficaz cuando se administra de forma oral. El tratamiento oral con DAPS inhibió la progresión del crecimiento tumoral y disminuyó significativamente el peso y volumen de los tumores. Los estudios histológicos demuestran que este efecto se asocia con una disminución de la vascularización tumoral y la infiltración leucocitaria, y un incremento de la apoptosis en los tumores de las ratas tratadas con DAPS. Esto es consistente con la potenciada actividad anti-inflamatoria y anti-angiogénica del DAPS. Aunque la apoptosis podría incrementarse como consecuencia de la disminución de aporte sanguíneo al tumor, dicho incremento estaría más probablemente relacionado con la actividad inhibitoria sobre el FGF. Como ya se ha discutido, el FGF estimula diferentes vías de señalización implicadas en la supervivencia celular mientras que su inhibición DHPS inhibe estas vías y favorece la apoptosis *in vitro* e *in vivo* (Cuevas *et al.*, 2005a; Cuevas *et al.*, 2006b; Cuevas *et al.*, 2006a; Cuevas *et al.* 2011a). Además de inhibir señales de supervivencia, el DHPS también ha mostrado su capacidad de incrementar la expresión de la

proteína pro-apoptótica p53 (*Angulo et al., 2012*), lo que sugiere que el efecto anti-apoptótico del DAPS está probablemente relacionado con su capacidad de inhibir la actividad del FGF.

La administración oral de DAPS durante 10 días no pareció causar efectos tóxicos en los animales ya que la ganancia de peso a lo largo del desarrollo experimental en las ratas tratadas con DAPS fue muy similar a la observada en ratas tratadas con agua. De hecho, el aspecto macroscópico de los estómagos de los animales tratados con DAPS no mostró señal alguna de irritación gástrica.

-DISCUSSION-

DISCUSSION

Despite all efforts in this regard, none of the developed therapeutic strategies to treat glioma has been successful, and the prognosis for this disease remains devastating. The difficulty in developing effective therapy relates to the large molecular heterogeneity present in malignant gliomas. Even within the same tumor, multiple genetic alterations can be detected.

Chemotherapy interferes with the growth and reproduction of tumor cells but is a nonspecific, often ineffective therapy that also affects normal cells, especially those that divide rapidly; serious side effects may result. Thus, there is a serious need to develop new therapeutic strategies. These strategies should be based on the inhibition or complete reversal of the processes that characterize this type of aggressive tumor,: uncontrolled cell proliferation, diffuse infiltration, high resistance to apoptosis and a vigorous angiogenesis. Therefore a sound understanding of these processes at the molecular level is necessary. Both the recent advances in the understanding of tumor pathogenesis and the appreciation of complications associated with the medications currently used to treat glioma have provided important incentive for finding new treatment alternatives.

FGF and VEGF are two potent inducers of tumor angiogenesis, both representing clear targets for the treatment of glioma. This can be by identifying molecules that alter the structure of these growth factors in order to prevent receptor binding, or that modify the receptor to prevent its coupling, or by inhibition of the phosphorylation of an intercytoplasmic domain with tyrosine kinase activity. This last possibility is the one which produces the most serious side effects. This is due to the numerous phosphorylation processes occurring normally in cells and the marked similarity between the domains of many of the growth factor receptors with tyrosine kinase activity and other ligands. Traditionally, anti-angiogenic therapies have focused on the inhibition of VEGF. Although preclinical anti-angiogenic therapeutic studies with inhibitors of VEGF produced encouraging results, efficacy in clinical trials has been limited, and there have been serious side effects (*Molema y Griffioen, 1998*). It is generally accepted that the resistance to treatment with substances that inhibit VEGF is due to the overexpression and activation of FGF caused by the treatment itself (*Casanovas et al., 2005; Batchelor et al., 2007*). It is possible that inhibition of FGF instead of VEGF in the pathological angiogenesis of glioma is a more

appropriate approach, given that the inhibition of FGF also suppresses the angiogenesis induced by VEGF (*Jonca et al., 1997*), even as FGF induces angiogenesis dependently and independently of VEGF (*Seghezzi et al., 1998; Zubilewicz et al., 2001*). For this reason, the inhibition of FGF signaling has been suggested as a strategy to overcome resistance to anti-VEGF therapy (*Alessi et al., 2009*). Furthermore, combined inhibition of both signals appears to cause a deeper impact on the tumor vasculature (*Stahl et al., 2009*). Another factor to consider is that, besides being a potent stimulator of angiogenesis, FGF also regulates multiple processes of the glioma cells, so that inhibition of FGF signalling negatively impacts on the glioma progression through mechanisms dependent and independent of angiogenesis (*Auguste et al., 2001*). These facts suggest that the development of effective, safe and easily administered FGF inhibitors represents a reasonable therapeutic strategy for the treatment of glioma.

Dobesilate (DHPS) belongs to a family of FGF inhibitors of which gentisic acid is a prime example, that binds to the heparin binding domain of FGF and has a clear anti-tumor and anti-angiogenic effect. Heparin and other sulfated glycosaminoglycans are essential for the binding and activation of FGFR (*Ornitz et al., 1995*). FGF and FGFR combine with these substances to form a ternary complex, which is required for signal transduction (*Jastrebova et al., 2006*). This binding can be antagonized by compounds that mimic the chemical characteristics of glycosaminoglycans and are capable of binding to FGF/FGFR and thereby inhibit the formation of the aforementioned ternary complexes. Small polysulfonated molecules such as myo-inositol hexasulfate (*Pineda-Lucena et al., 1996*) or suramin, a polysulfonated binaphthyl urea used as anti-parasitic drug, are able to do this, displaying inhibitory effects on FGF signaling and anti-tumor effect (*Pesenti et al., 1992*). Suramin, 1,3,6-naphthalene trisulfonate (NTS), is able to significantly prevent formation of this complex (*Lozano et al., 1998*), thereby inhibiting angiogenesis and promoting apoptosis in gliomas (*Cuevas et al., 1999a*). In studies of rat C6 glioma cells implanted in the rabbit cornea (*Cuevas et al., 1999c*).

NTS also prevented the growth of glioma cells. Subsequently, a simplified version of NTS, 1-naphthalene monosulfonate (NMS) proved to be a better inhibitor of the mitogenic activity of FGF. In a study using orthotopic glioma induced by C6 cells in Sprague-Dawley rats, a significant reduction of tumor volume was observed after treatment with continuous administration of the NMS at the site of implantation of the cells starting 6 hours after

implantation. The reduction of glioma growth by NMS was associated with decreased vascularization in the tumor coupled with an increase in apoptosis (*Cuevas et al. 2001*).

The analysis of the three dimensional structure of the complex formed by FGF and another naphthalene derivative, 5A2NMS, allowed for the formulation of a set of rules to identify possible candidates for inhibition of FGF. The exploration of substances with these characteristics in libraries of natural products drew attention to gentisic acid, a dihydroxybenzoic acid produced in small quantities during the metabolic breakdown of aspirin (*Fernandez et al., 2010*). The study of this substance led to the definition of a family of potent inhibitors of FGF, headed by gentisic acid. Common features of these substances were the substituted hydroxyl groups at 'para' conformation and the functionalization of the aromatic ring by an acid group. These compounds recognize both growth factor and its receptors, displacing heparin from its binding domain, changing the three dimensional structure of the growth factor at the site of binding to its receptor, and so dissociating the signaling complex.

The most promising candidate of this family was a synthetic compound having a sulfonate function, 2,5-dihydroxyphenyl sulfonate (DHPS, dobesilate). DHPS shows an IC_{50} 3,000 times lower than NTS to inhibit FGF-induced proliferation in fibroblasts. It was also shown to inhibit angiogenesis induced by FGF-1 in vivo when orally administered in rats (*Fernandez et al., 2010*). In another assay, DHPS was administered intraperitoneally in rats with glioma induced by subcutaneous implantation of C6 cells, and inhibition of the progression of these tumors was observed. Reduction of glioma size was associated with a clear inhibition of tumor vascularization in both the core and in the periphery of tumors (*Fernandez et al., 2010*). DHPS also decreased the permeability of the formed vessels, an effect that could have implications in some clinical manifestations of glioma, such as cerebral edema. A reduction in histopathological signs of invasion of glioma, such as, perivascular satellitosis, infiltration of the choroid plexus and subpial dissemination was also observed (*Cuevas et al., 2011b*).

There are several advantages to the use of DHPS. First, other growth factors, including VEGF, possess a heparin-binding domain and interact with heparan sulfate to exert their biological activities. DHPS, by interacting with the heparin-binding domain of FGF, could potentially interfere with the activities of these growth factors. Specifically, it was found that DHPS has the ability to inhibit endothelial cell proliferation, arterial relaxation, vascular permeability and

angiogenesis induced by VEGF *in vivo* (Angulo *et al.*, 2011). Secondly, DHPS has an important safety profile. This was surprising (Allain *et al.*, 2004), given the wide spectrum of physiological activities that FGF controls (Gimenez-Gallego y Cuevas, 1994; Szebenyi y Fallon, 1999). After all, FGFs are found in most adult tissues derived from mesoderm and embryonic neuroectoderm, sometimes at very high levels where they are closely linked to sulfated glycosaminoglycans in the extracellular matrix. (Cuevas *et al.*, 1996b). Under physiological conditions, however, FGF is tightly bound to heparan sulfate of the extracellular matrix and the basement membrane, and is not likely to be inhibited by DHPS, as the affinity constant of this compound for FGF is about 3000 times lower than that of sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix, which in themselves can achieve extremely high local concentrations (Fernandez., 2010). Under normal conditions, Dobesilate would not exert any action. Only in pathological conditions (cancer, inflammation, angiogenesis ...), where there is an excessive release of FGF could DHPS interact with FGF and interfere with its pathological action (Vlodavsky *et al.*, 1990; Vlodavsky *et al.*, 2000; Sanderson, 2001; Iozzo y Sanderso, 2011).

This would explain the results of a study in which the progression of pulmonary metastatic disease in mice was inhibited by inducing immunogenicity directed against the heparin-binding domain of FGF-2, without adversely affecting the wound healing and the fertility in these animals (Plum *et al.*, 2004). Therefore, DHPS, which shows activity only if there is an excess of FGF, has a clear advantage over agents that inhibit the intracellular tyrosine kinase domain of FGFR, which in turn inhibit FGF signaling / FGFR independently of the local physiological or pathological environment, potentially causing significant side effects. Indeed, tyrosine kinase inhibitors that have reached clinical development phases produce a wide range of adverse events, some of which can be fatal (Reck *et al.*, 2010).

DHPS is the active principle of Doxium®, also known as the drug, calcium dobesilate, which has been used for more than 40 years. It is administered orally for treatment of diabetic retinopathy and chronic venous insufficiency, and is administered topically for the treatment of hemorrhoids. Although its mechanism of action in such circumstances has not been completely elucidated, it shows a good safety profile (Allain *et al.*, 2004). Its demonstrated inhibitory activity on FGF (Fernandez *et al.*, 2010) and its safety profile led to the assessment of dobesilate in case reports and proof of concept (POC) trials for the topical treatment of various human diseases related to

angiogenesis and hyperproliferation. The efficacy of DHPS in treating patients with angiogenesis-dependent diseases such as rosacea and psoriasis (Cuevas y Arrazola, 2005b) and in the treatment of pre-cancerous (Cuevas et al., 2011a) and malignant (Cuevas y Arrazola, 2005a; Cuevas et al., 2011a) lesions of the skin has been demonstrated. The drug is apparently free of adverse effects. A more recent study, in nine patients with basal cell carcinoma, confirmed the high efficacy of DHPS this cancer, with excellent results in all patients (Cuevas et al., 2011a). In a case report, Inhaled DHPS showed therapeutic efficacy in a patient with lung cancer (Cuevas et al., 2012).

In the present study, we have used the rat glioma cell line C6, which was originally produced in the late 1960s in the laboratories of the Massachusetts General Hospital, by repeated administration of N, N'-nitroso-methylurea to outbred Wistar rats for a period of about 8 months (Benda et al., 1968; Schmidek et al., 1971). Once neurological signs appeared the animals were euthanized and tumors were excised and cultured *ex vivo*. One of the tumors (# 6) was cloned and designated as the C6 (Pfeiffer et al., 1970). Initially, the tumor was histopathologically classified as an astrocytoma and then designated as a glial tumor after its classification by the American Type Culture Collection (ATCC # CCL-107).

The C6 cell line provides a widely-used model for the study of glioma that displays characteristics almost identical to its human equivalent. Its strong angiogenesis, reproducibility, high growth rate and easy location of the generated tumor make the implantation of these cells an excellent way to study intracranial tumors (orthotopic model). In addition, this method allows for the study of glioma progression in animals whose immune system is still intact. Recent evidence points to inflammation and the actions of inflammatory cells as determinants of the process of tumorigenesis (Widera et al. 2008; Grivennikov et al., 2012), making more appropriate the use of immunocompetent animal models for study of drug activity.

The changes observed in gene expression in C6 cells are equivalent to those that occur in human brain tumors (Shih et al., 2004). C6 cells do not express the mRNA of the tumor suppressors p16 and p19ARF, encoded by the same gene, but express a competent p53 (Schlegel et al., 1999; Asai et al., 1994). The cellular model of glioma in rat C6 has been used both for creating models that increase our understanding of the pathophysiology of glioma (Karmakar et al., 2007; Assadian et al., 2008), and for the evaluation of therapeutic strategies such as chemotherapy

(Doblas *et al.*, 2008), anti-angiogenesis therapy (Solly *et al.* 2008), proteasome inhibitors (Ahmed *et al.* 2008), treatment with toxins (Zhao *et al.*, 2008), radiotherapy (Sheehan *et al.* 2008), photodynamic therapy (Mannino *et al.*, 2008) among others. C6 cells have been found to express FGF and their receptors (Grobben *et al.*, 2002). It has also been observed that the secreted FGF acts as an autocrine stimulator of C6 glioma cells (Bernstein *et al.*, 1990) and has been shown that the interruption of FGF/FGFR signaling in these cells hampers their proliferative capacity and tumorigenicity (Chicoine y Silbergeld, 1995).

C6 glioma cells also develop tumors when implanted subcutaneously in the abdominal region (Watanabe *et al.*, 2002) (heterotopic glioma) of Wistar rats and Sprague-Dawley rats (Grobben *et al.*, 2002; Barth y Kaur, 2009; Jacobs *et al.*, 2011). Although subcutaneous studies provide less information than orthotopic models, mainly because of the importance of the microenvironment in tumor progression, histopathological examinations revealed similar characteristics of these subcutaneous gliomas to those tumors that grow in the brains of the same rats (Watanabe *et al.*, 2002). This model also has the advantage of easy induction and the possibility of a continuous monitoring of the protruding tumor, allowing the evaluation of glioma progression such as by magnetic resonance imaging (MRI) without the need to use very sophisticated techniques requiring excessive handling of the animal. Subcutaneous gliomas reach their maximum volume 15 days after implantation and then begin to decrease (Watanabe *et al.*, 2002); this pattern of tumor evolution has to be considered in the experimental evaluations of the anti-glioma therapies.

The hypothesis of the current study is that DAPS, a modification of DHPS formed by esterification of its two hydroxyl groups, will have not only duplicate the inhibitory effects of DHPS on FGF but also provide anti-inflammatory and anti-angiogenic activity resulting in a higher anti-tumor efficacy compared to its parent molecule.

Surgical removal of the gelatin sponges seven days after *in vivo* implantation, revealed the gross appearance of angiogenesis induced by FGF-1, as indicated by an intense red color caused by the excessive vascularization. Oral treatment with DHPS or DAPS (300 mg/kg/day) prevents angiogenesis induced by FGF-1 as suggested by the absence of that intense red color. Histological analysis of the sponges by using morphometric software confirms that observed grossly; the large number of functional vessels (containing erythrocytes), after stimulation with

FGF-1 was clearly diminished by oral treatment with DHPS (300 mg/kg/day) or DAPS (300 mg/kg/day).

This inhibition of angiogenesis is probably related to the ability of these compounds to interfere with the action of FGF. In fact, among the various observations documenting the inhibitory activity of DHPS on FGF-1, was its ability to inhibit angiogenesis induced by FGF when co-administered locally into sponges implanted in mice. This effect was seen both with FGF-1 and FGF-2 and by using different salts of DHPS (*Cuevas et al., 2005a*). The inhibitory effect on angiogenesis induced by DHPS was later confirmed in a rat model when its oral administration was shown to inhibit neovascularization induced by FGF-1 in sponges implanted in rats (*Fernandez et al., 2010*). DHPS also showed the ability to inhibit angiogenesis induced by VEGF (*Angulo et al., 2011*) suggesting that these compounds could interfere with other angiogenic factors having heparin-binding domains. However, we cannot exclude the possibility that the inhibition of VEGF-induced angiogenesis was in fact related to inhibition of FGF, as it has been proposed that FGF contributes to the pro-angiogenic effects of VEGF *in vivo* (*Mandriota et al., 1997*).

One key result of our study is that *in vivo* inhibition of FGF-induced angiogenesis achieved by treatment with the diacetyl derivative of DHPS (DAPS) is significantly superior to that achieved with the parent molecule. Furthermore, this occurs despite the fact that DAPS is less potent than DHPS in inhibiting proliferation of 3T3 fibroblasts induced by FGF-1 *in vitro* (*Angulo et al., 2015*). This work also demonstrates a lower inhibitory capacity of DAPS than DHPS to inhibit *in vitro* proliferation of C6 rat glioma cells (Figure 7). The antiproliferative capacity of DHPS is driven by interference with the expression and activation of different intracellular effectors and transcription factors related to the FGF/FGFR signaling pathway (*Cuevas et al., 2005a*). First, DHPS causes a decrease in activation of the protein kinase ERK1/2 in C6 glioma cells, which is a key mediator of the MAPK signaling pathway that is responsible for the transduction of proliferative stimuli (*Cuevas et al., 2006a*). The signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) is an important factor playing a pleiotropic role in tumorigenesis and appears to be necessary for growth and self-renewal of glioblastoma stem cells (*Sherry et al., 2009; Haley y Kim, 2014*). This factor, and others involved in cell survival, such as cyclin D1 and Bcl-XL, is inhibited by DHPS in glioma cells (*Cuevas et al., 2006b*). Therefore, the negative modulation of

the FGF-stimulated signaling pathways responsible for growth and survival of C6 glioma cells seems to be the key to understanding the anti-proliferative capacity of DHPS and DAPS. The lower potency in inhibiting FGF by DAPS compared to DHPS is not surprising given the tight fit of DHPS in a narrow gap on the surface of FGF-1 (*Fernandez et al., 2010*). However, DAPS has a stronger inhibitory potency than other compounds that were identified during the work in development of DHPS, compounds which in themselves have been widely used to inhibit angiogenesis induced by FGF (*Fernández- Tornero et al., 2003; Angulo et al., 2015*). Therefore, it does not seem likely that the strong anti-angiogenic effect following acetylation of DHPS is due to an increase in its potency as an FGF-inhibitor. It could be speculated that DAPS has acquired some additional activity in addition to its ability to inhibit FGF, already present in DHPS. In this respect, it has been recently shown that DAPS but not DHPS possesses the ability to inhibit cyclooxygenase activity (COX) of both COX-1 and COX-2 isoforms (*Angulo et al., 2015*).

The superiority of DAPS over DHPS as anti-angiogenic drug is probably due to its anti-inflammatory activity related to inhibition of COX. COX activity as well as prostaglandin synthesis is actively involved in pathological angiogenic processes (*Kuwano et al., 2004; Howe et al., 2013*). In fact, it seems clear that inflammation is a key player in the process of angiogenesis induced by FGF in the implanted sponges. Indeed, in previous studies, the induction of *in vivo* angiogenesis by FGF and its inhibition by DHPS were consistently associated with the increase and decrease, respectively, of inflammatory cells in the implanted gelatin sponges (*Fernandez - Tornero et al., 2003*). The role of FGF in inflammatory processes has received little attention, but there is significant evidence implicating FGF in these processes. An FGF-1 dependent increase in T cells in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis was described in 1990, and directly correlated with the degree and intensity of inflammation (*Sano et al., 1990*). Subsequently, upregulation of FGF-1 was found in chronic allograft rejection (*Zhao et al., 1993; Zhao et al., 1995*), and renal inflammatory processes (*Rossini et al., 2005*), while high levels of FGF-2 were also found in patients with inflammatory bowel disease (*Kanazawa et al., 2001*) and eosinophilic esophagitis (*Huang et al., 2010*). Furthermore, pericardial fluid of patients with pericardial inflammatory disease contains high levels of FGF-2 (*Karatolios et al., 2012*). In addition, there is evidence that FGF-1 stimulates cytokine production in T cells via activation of NF- κ B (*Byrd et al., 1999*), while the activation of FGFR2

by FGF-1 promotes the secretion of inflammatory cytokines in human astrocytes and microglia (Lee *et al.*, 2011). In vivo, the pro-inflammatory cytokines and inflammatory cells could contribute to the neovascularization seen in angiogenesis induced by FGF as suggested by the pattern of microvascular cells stimulated by the FGF (Andres *et al.*, 2009; Presta *et al.*, 2009; Kaga *et al.*, 2012). This would explain why DHPS exerted an anti-inflammatory effect in preclinical models (Cuevas *et al.*, 2005b; Angulo *et al.*, 2015) and in patients with inflammation (Cuevas *et al.*, 2011d). The capacity of DAPS to reverse inflammatory responses in preclinical models is greater than that of DHPS probably because of the inhibition of COX by DAPS at local and systemic levels. DAPS also seems to modulate the systemic production of pro-inflammatory cytokines (Angulo *et al.*, 2015). Indeed, histological analysis shows a clear decrease in leukocyte infiltration in rats treated with DAPS.

From a translational viewpoint, it is important to note that DAPS is effective in inhibiting FGF-induced angiogenesis when administered orally. Moreover, the inhibitory effect of DAPS on angiogenesis has shown a clear dose-response, as was observed in the evaluation of different oral doses of DAPS (20 mg/kg/day to 300 mg/kg/day) on the vascularization of subcutaneous sponges soaked with FGF-1.

Given the demonstrated capacity of DHPS and DAPS to inhibit angiogenesis, inflammation and cell proliferation, all of which play an important role in carcinogenesis, it was logical to examine the effects of DHPS and DAPS on tumor progression *in vivo*. This was done by using a model of heterotopic glioma induced by subcutaneous injection of C6 cells in immunocompetent rats. After development of a subcutaneous tumor was achieved by injection of C6 cells, DHPS (100 mg/kg/day) was injected intraperitoneally beginning 5 days after the injection of the tumor cells. This resulted in a clear reduction in the size of gliomas removed at the tenth day of treatment compared to untreated control animals. DAPS administration (100 mg/kg/day) produced not only a reduction in the size of gliomas, but also in 4 of 13 cases, there was complete disappearance of pre-established tumor. This complete response did not occur in any of the control animals injected with 0.9% NaCl, or the group treated with DHPS.

The anti-tumor activity of DHPS has been demonstrated in this model of subcutaneous glioma (Fernandez *et al.*, 2010) and in an orthotopic glioma model that closely mimics the clinical reality. In this model, the intraperitoneal administration of DHPS (200 mg/kg/day) was combined

with a standard chemotherapeutic agent, irinotecan (CPT-11) Irinotecan failed to inhibit the progression of glioma, while systemic administration of DHPS alone produced only a slight effect; however but the combination of both produced a highly significant inhibition of growth of glioma. It was therefore shown that DHPS was able to enhance the effectiveness of a chemotherapeutic agent. This assertion is also supported by experiments *in vitro* with C6 glioma cells, showing that the anti-proliferative effects of different cytostatic agents were significantly enhanced by simultaneous administration of DHPS (Cuevas *et al.* 2011b).

In the present study, we show that acetylation of DHPS produces a compound, DAPS, which is more effective in the inhibition of tumor progression than was DHPS itself. Unlike xenograft models of immunodeficient animals, the rats used in these studies have an intact immune system, which is an important distinction considering that inflammation is a critical factor in the process of tumorigenesis (Karin, 2006; Grivennikov *et al.*, 2012). Most solid malignant tumors trigger intrinsic inflammatory responses that provide a pro-tumorigenic microenvironment (Mantovani *et al.*, 2008). Specifically, COX activity and its derived products are involved in carcinogenesis (Trifan & Hla, 2003; Menter & Dubois, 2012; Ishii *et al.*, 2013). In this sense, inhibition of COX enhances the efficacy of antiangiogenic chemotherapy in preclinical models (Xu *et al.*, 2014). Indeed, the use of COX has been proposed as a therapeutic target for the treatment of glioma (Giglio & Levin, 2004; New, 2004). The ability of DAPS to inhibit COX activity and the key participation of inflammation in tumor pathogenesis may explain the higher efficacy of DAPS compared to DHPS in inhibiting the progression of subcutaneous glioma, achieving, in some cases, the complete regression of established tumors., Histological analysis of the tumors revealed that DAPS markedly inhibits leukocyte infiltration observed in the blood vessels supplying the tumor.

DAPS proved its effectiveness when administered orally. Oral treatment with DAPS inhibited the progression of tumor growth which is indicated by a significant decrease in tumor weight and volume in treated animals. Histological studies show that this effect is associated with decreased tumor vascularization and leukocyte infiltration and increased apoptosis in tumors from rats treated with DAPS. This is consistent with the enhanced anti-inflammatory and anti-angiogenic activity of DAPS. Although apoptosis could increase as a result of reduced blood supply to the tumor, such an increase would be more likely related to the inhibition of FGF by DAPS. As

discussed earlier, FGF stimulates different signaling pathways involved in cell survival while its antagonism with DHPS inhibits these pathways *in vitro* and *in vivo* and promotes apoptosis (Cuevas *et al.*, 2005a; Cuevas *et al.*, 2006b; Cuevas *et al.*, 2006a; Cuevas *et al.* 2011a). Besides inhibiting survival signals, DHPS can also increase the expression of the pro-apoptotic protein p53 (Angulo *et al.*, 2012), suggesting that the pro-apoptotic effect of DAPS is probably related to its capacity to inhibit the activity of FGF.

Oral administration of DAPS for 10 days did not seem to cause toxic effects in animals. Weight gain in DAPS-treated rats was similar to that observed in rats treated with water. In addition, the macroscopic appearance of the stomachs of the animals treated with DAPS showed no sign of gastric irritation.

- CONCLUSIONES -

Conclusiones

La principal conclusión de este trabajo es que la acetilación del DHPS genera un compuesto, el DAPS, con mayor eficacia anti-angiogénica y anti-tumoral, un hecho muy probablemente relacionado con su gran capacidad anti-inflamatoria. Esta conclusión general se fundamenta en las siguientes conclusiones parciales:

- 1) La acetilación del DHPS reduce su potencia en la inhibición de la proliferación in vitro de las células C6 de glioma de rata aunque el DAPS conserva eficacia anti-proliferativa. Este hecho está probablemente relacionado con una disminución de la afinidad por el FGF causada por la introducción de los grupos acetilo.
- 2) Sin embargo, la acetilación del DHPS incrementa significativamente su actividad anti-angiogénica in vivo. La reducción de la neovascularización producida por el DAPS es dosis-dependiente y se acompaña de una clara disminución de la infiltración leucocitaria.
- 3) Del mismo modo, el DAPS presenta una actividad anti-tumoral in vivo superior a la molécula parental en la inhibición de la progresión de gliomas subcutáneos en la rata.
- 4) La capacidad de inhibir la progresión de los gliomas mostrada por el DAPS se asocia a una disminución de la angiogénesis tumoral y a un incremento de la apoptosis en los tumores. Además, este efecto se acompaña, de nuevo, de una disminución de las respuestas inflamatorias como indica la reducción de la infiltración leucocitaria en los vasos tumorales.
- 5) La eficacia anti-angiogénica y anti-tumoral del DAPS se demuestra tras la administración oral de este compuesto y no se asocia a efectos adversos manifiestos.
- 6) Por tanto, la dualidad de actividades que presenta el derivado acetilado del DHPS, manteniendo actividad anti-FGF y habiendo demostrado una actividad inhibitoria sobre la COX que le hace un más eficaz anti-inflamatorio, convierte al DAPS en un ejemplo para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de los gliomas combatiendo los procesos responsables de la progresión de estos tumores.

-CONCLUSIONS-

Conclusions

The main conclusion of this work is that acetylation of DHPS generates a compound, DAPS, with superior anti-angiogenic and anti-tumoral efficacy, a fact probably related to its notable anti-inflammatory capacity. This general conclusion is based on the following partial observations:

- 1) Acetylation of DHPS reduces its potency for the inhibition of C6 rat glioma cell proliferation *in vitro*, although DAPS maintains significant anti-proliferative efficacy. This is probably related to a decreased affinity to FGF caused by the introduction of the acetyl groups.
- 2) The acetylation of DHPS significantly increased its anti-angiogenic activity *in vivo*. The reduction of neovascularization caused by DAPS is dose-dependent and is accompanied by a clear decrease in leukocyte infiltration.
- 3) DAPS has superior anti-tumor activity *in vivo* than the parent molecule in the inhibition of subcutaneous glioma progression in the rat.
- 4) The capacity to inhibit glioma progression exhibited by DAPS is associated with a decrease in the tumor angiogenesis and an increase in apoptosis in the tumors. Moreover, this effect is again accompanied by a decrease in inflammatory responses, as indicated by the reduction in leukocyte infiltration in tumor vessels.
- 5) The anti-angiogenic and the anti-tumoral efficacy of DAPS is demonstrated after oral administration of this compound and is not associated with adverse effects.
- 6) The acetylated derivative of DHPS retains the anti-FGF activity of its parent compound while providing effective anti-inflammatory activity by inhibiting COX. DAPS may be useful for the treatment of gliomas, by interrupting processes that are important in the progression of these tumors.

-BIBLIOGRAFIA-

Bibliografia

Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE. Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat* 2005; 8: 59-74.

Abuharbeid S, Czubayko F, Aigner A. The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1463-1468.

Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti- apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuro- blastoma. *Lancet* 1998; 351: 882-883.

Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; 96: 1921-1925.

Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Wilson M, Reinmuth N, Shaheen RM, Bucana CD, Ellis LM. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1255-1259.

Ahmed AE, Jacob S, Nagy AA, Abdel-Naim AB. Dibromoacetonitrile-induced protein oxidation and inhibition of proteasomal activity in rat glioma cells. *Toxicol Lett* 2008; 179: 29–33.

Al Haj Zen A, Madeddu P. DLK1: a novel negative regulator of angiogenesis? *Cardiovasc Res* 2012; 93: 213-214.

Albeck JG, Burke JM, Aldridge BB, Zhang M, Lauffenburger DA, Sorger PK. Quantitative Analysis of Pathways Controlling Extrinsic Apoptosis in Single Cells. *Mol Cell* 2008; 30: 11-25.

Alessi P, Leali D, Camozzi M, Cantelmo A, Albini A, Presta M. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. *Eur Cytokine Netw* 2009; 20: 225-234.

Allain H, Ramelet AA, Polard E, Bentue-Ferrer D. Safety of calcium dobesilate in chronic venous disease, diabetic retinopathy and haemorrhoids. *Drug Saf* 2004; 27: 649-660.

Allerstorfer S, Sonvilla G, Fischer H, Spiegl-Kreinecker S, Gauglhorfer C, Setinek U, Czech T, Marosi C, Buchroithner J, Pichler J, Silye R, Mohr T, Holzmann K, Grasl-Kraupp B, Marian B, Grusch M, Fischer J, Micksche M, Berger W. FGF5 as an oncogenic factor in human glioblastoma multiforme: autocrine and paracrine activities. *Oncogene* 2008; 27: 4180-4190.

Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003a; 22: 8581-8589.

Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Rev Cancer* 2003b; 3: 46-54.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921.

Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R, Bundred NJ. ZD 1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR- positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression. *Int J Cancer* 2001; 94: 774-782.

Andrés G, Leali D, Mitola S, Coltrini D, Camozzi M, Corsini M, Belleri M, Hirsch E, Schwendener RA, Christofori G, Alcamí A, Presta M. A pro-inflammatory signature mediates FGF2-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2083–108.

Angulo J, Carceller F, Cuevas B, Fernández A, Cuevas-Bourdier A, Giménez-Gallego G, Cuevas P. Inhibition of FGF Signaling in Experimental Glioma. En: Pouliquen D (Ed). The rat in cancer research, a crucial tool for all aspects of translational studies. Research Signpost/Transworld Research Network Publishers, Kerala, India, 2012; pp107-130.

Angulo J, Cuevas P, El Youssef M, Cuevas B, Fernández A, Martínez-Salamanca E, González-Corrochano R, Giménez-Gallego G. Diacetyloxyl derivatization enhances the anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-tumoral activities of dobesilate, the most active member of the gentisic acid family of fibroblast growth factor inhibitors. *J Transl Med* 2015; 13: 48

Angulo J, Peiro C, Romacho T, Fernandez A, Cuevas B, Gonzalez- Corrochano R, Gimenez-Gallego G, Saenz de Tejada I, Sanchez-Ferrer CF, Cuevas P. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial proliferation, arterial relaxation, vascular permeability and angiogenesis by dobesilate. *Eur J Pharmacol* 2011; 667: 153-159.

Aoki T, Hashimoto N, Matsutani M. Management of glioblastoma. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 3133-3146.

Arends MJ, Moris RG, Wylie AH. Apoptosis: the role of endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.

Arlt A, Schafer H. NFkappaB-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; 40: 336-347.

Asada M, Shinomiya M, Suzuki M, Honda E, Sugimoto R, Ikekita M, Imamura T. Glycosaminoglycan affinity of the complete fibroblast growth factor family. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 40-48.

Asai A, Miyagi Y, Sugiyama A, Gamanuma M, Hong SH, Takamoto S, Nomura K, Matsutani M, Takakura K, Kuchino Y. Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy. *J Neurooncol* 1994; 19: 259-268.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.

Assadian S, Aliaga A, Del Maestro RF, Evans AC, Bedell BJ. FDG-PET imaging for the evaluation of antiglioma agents in a rat model. *Neuro-Oncology*, 2008; 10: 292–299.

Assanah M, Lochhead R, Ogden A, Bruce J, Goldman J, Canoll P. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci* 2006; 26: 6781- 6790.

Auguste P, Giirsel DB, Lemiere S, Reimers D, Cuevas P, Carceller F, Di Santo JP, Bikfalvi A. Inhibition of Fibroblast Growth Factor/Fibroblast Growth Factor Receptor Activity in Glioma Cells Impedes Tumor Growth by Both Angiogenesis-dependent and independent Mechanisms. *Cancer Res* 2001; 61: 1717-1726.

Avivi A, Yayon A, Givol D. A novel form of FGF receptor-3 using an alternative exon in the immunoglobulin domain III. *FEBS Lett* 1993; 330: 249-252.

Badran A, Yoshida A, Wano Y, Imamura S, Kawai Y, Tsutani H, Inuzuka M, Ueda T. Expression of the antiapoptotic gene surviving in chronic myeloid leukemia. *Anticancer Res* 2003; 23: 589-592.

Banelli B, Casciano I, Croce M, Di Vinci A, Gelvi I, Pagnan G, Brignole C, Allemanni G, Ferrini S, Ponzoni M, Romani M. Expression and methylation of CASP8 in neuroblastoma: identification of a promoter region. *Nat Med* 2002; 8: 1333-1335.

Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME. The death effector domain protein family, death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *Oncogene* 2003; 22: 8634-8644.

Barth RF, Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 2009; 94: 299-312.

Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 2007; 11: 83-95.

Belka C, Schmid B, Marini P, Durand E, Rudner J, Faltin H, Bamberg M, Schulze-Osthoff K, Budach W. Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* 2001; 20: 2190-2196.

Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA. Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J* 1991; 10: 2849-2854.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968; 161: 370-1.

Benedito R, Rocha SF, Woeste M, Zamykal M, Radtke F, Casanovas O, Duarte A, Pytowski B, Adams RH. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF- VEGFR2 signalling. *Nature* 2012; 484: 110-114.

Bennett CL, Angelotta C, Yarnold PR, Evens AM, Zonder JA, Raisch DW, Richardson P. Thalidomide and lenalidomide associated thromboembolism among patients with cancer. *JAMA* 2006; 296: 2558-60.

Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER, Conger D, Morreale V, Wood L. C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting: ultrastructure. *Neurosurgery* 1990; 26: 622-628.

Bian XW, Du LL, Shi JQ, Cheng YS, Liu FX. Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 267-74.

Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 180-185.

Binello E, Germano IM. Targeting glioma stem cells: a novel framework for brain tumors. *Cancer Sci* 2011; 102: 1958-1966.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196: 254-265.

Biven K, Erdal H, Hagg M, Ueno T, Zhou R, Lynch M, Rowley B, Wood J, Zhang C, Toi M, Shoshan MC, Linder S. A novel assay for discovery and characterization of pro-apoptotic drugs and for monitoring apoptosis in patient sera. *Apoptosis* 2003; 8: 263-268.

Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.

Bottcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* 2005; 26: 63-77.

Bottcher RT, Pollet N, Delius H, Niehrs C. The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 38-44.

Bradley WG Jr, Waluch V, Yadley RA, Wycoff RR. Comparison of CT and MR in 400 patients with suspected disease of the brain and cervical spinal cord. *Radiology* 1984; 152: 695-702.

Brahimi-Horn C, Berra E, Pouysségur J. Hypoxia: the tumor's Gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* 2001; 11 32- 36.

Bredel M, Scholtens DM, Harsh GR, Bredel C, Chandler JP, Renfrow JJ, Yadav AK, Vogel H, Scheck AC, Tibshirani R, Sikic BI. A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA* 2009; 302: 261-275.

Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 871-877.

Brian M. Alexander, Meihua Wang, W. K. Alfred Yung, Howard A. Fine, Bernadine A. Donahue, Ivo W. Tremont, Ray S. Richards, Kevin J. Kerlin, Alan C. Hartford, Walter J. Curran, Minesh P. Mehta. A phase II study of conventional radiation therapy and thalidomide for supratentorial, newly-diagnosed glioblastoma (RTOG 9806). *J Neuro-Oncol* 2013; 111: 33-39.

Brockmann MA, Ulbricht U, Grilner K, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K. Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery* 2003; 52: 1391-9.

Brown MF, He K, Yu J. SMAC IAP Addiction in Cancer. *Cell Death Biol Dis* 2013; 255-279.

Burgess WH, Shaheen AM, Ravera M, Jaye M, Donohue PJ, Winkles JA. Possible dissociation of the heparin-binding and mitogenic activities of heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 from its receptor-binding activities by site-directed mutagenesis of a single lysine residue. *J Cell Biol* 1990; 111: 2129-2138.

Burke DJ, Stukenberg PT. Linking Kinetochore-Microtubule Binding to the Spindle Checkpoint. *Dev Cell* 2008; 14: 474-479.

Byrd VM, Ballard DW, Miller GG, Thomas JW. Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) enhances IL-2 production and nuclear translocation of NF-kappaB in FGF receptor-bearing Jurkat T cells. *J Immunol* 1999; 162: 5853-5859.

Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Kang MJ, Kim HR, Chi SG. Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 7068-7075.

Caffo M, Caruso G, Passalacqua M, Angileri FF, Tomasello F. Antisense Oligonucleotides Therapy in the Treatment of Cerebral Gliomas: A Review. *Syndr Gene Ther* 2013; 4:10.

Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, Codd PJ, Romany CA, Reavie LB, Batchelor TT, Futreal PA, Stratton MR, Curry WT, Iafrate AJ, Louis DN. Loss of mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2038-2045

Cancilla B, Jarred RA, Wang H, Mellor SL, Cunha GR, Risbridger GP. Regulation of prostate branching morphogenesis by activin A and follistatin. *Dev Biol* 2001; 237: 145-158.

Cao Y, Cao R, Hedlund EM. R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86: 785-789.

Carlsson J, Ren ZP, Wester K, Sundberg AL, Heldin NE, Hesselager G, Persson M, Gedda L, Tolmachev V, Lundqvist H, Blomquist E, Nistér M. Planning for intracavitary anti- EGFR radionuclide therapy of gliomas. Literature review and data on EGFR expression. *J Neurooncol* 2006; 77: 33-45.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-36.

Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, Wang RY, Schober WD, Milella M, Sung HG, Reed JC, Andreeff M. Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or survivin does not affect cell survival or prognosis. *Blood* 2003; 102: 4179-4186.

Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005; 8: 299-309.

Celik I, Surucu O, Dietz C, Heymach JV, Force J, Hoschele I, Becker CM, Folkman J, Kisker O. Therapeutic efficacy of endostatin exhibits a biphasic dose-response curve. *Cancer Res* 2005; 65: 11044-11050.

Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Dyson NJ, Loeffler JS. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1063-1068.

Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X. c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* 2002; 21: 3704-3714.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD- dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 1997; 7: 821-830.

Chaudhuri MM, Moscatelli D, Basilico C. Involvement of the conserved acidic amino acid domain of FGF receptor 1 in ligand-receptor interaction. *J Cell Physiol* 1993; 157: 209-216.

Chellaiah AT, McEwen DG, Werner S, Xu J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J Biol Chem* 1994; 269: 11620-11627.

Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001b; 276: 9519-9525.

Chen D, Persson A, Sun Y, Salford LG, Nord DG, Englund E, Jiang T, Fan X. Better Prognosis of Patients with Glioma Expressing FGF2-Dependent PDGFRA Irrespective of Morphological Diagnosis. *PLoS One* 2013; 8: e61556.

Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ. Hypoxia activates a platelet- derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res* 2001a; 61: 2429- 2433.

Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7:313-319.

Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003; 301: 513-517.

Chicoine MR, Silbergeld DL. Invading C6 glioma cells maintain tumorigenicity. *J Neurosurg* 1995; 83: 665.

Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, Ross BD, Rehemtulla A. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1754-1759.

Corle C, Makale M, Kesari S. Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. *J Neurooncol* 2012; 106: 1-13.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life- or- death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647-656.

Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 926-937.

Crivellato E, Nico B, Ribatti D. Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 269: 1-6.

Cuevas P, Angulo J, Giménez-Gallego G. Topical treatment of contact dermatitis by pine processionary caterpillar. *BMJ Case Rep* 2011d; 2011: bcr0620114351.

Cuevas P, Arrázola JM. Therapeutic response of rosacea to dobesilate. *Eur J Med Res* 2005b; 10: 454-6.

Cuevas P, Arrázola JM. Treatment of basal cell carcinoma with dobesilate. *J Am Acad Dermatol* 2005a; 53: 526-527

Cuevas P, Calvo M, Angulo J, Cuevas-Bourdier AN, Giménez-Gallego G. Efficacy of the fibroblast growth factor inhibitor 2,5-dihydroxyphenylsulfonate in basal cell carcinoma: a histopathological and immunohistochemical study. *J Dermatolog Treat* 2011a; 22: 348-52.

Cuevas P, Carceller F, Angulo J, Gonzalez-Corrochano R, Cuevas Bourdier A, Gimenez-Gallego G. Antiglioma effects of a new, low molecular mass, inhibitor of fibroblast growth factor. *Neurosci Lett* 2011b; 491: 1-7.

Cuevas P, Carceller F, Diaz D, Reimers D, Fernandez M, Lozano RM, Gonzalez-Corrochano R, Gimenez-Gallego G. Abolished angiogenicity and tumorigenicity of rat glioma by 1-naphthalenemonosulfonate. *Neurosci Lett* 2001; 308: 185-188.

Cuevas P, Carceller F, Reimers D, Cuevas B, Lozano RM, Gimenez Gallego G. Inhibition of intra-tumoral angiogenesis and glioma growth by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurol Res* 1999a; 21: 481-487.

Cuevas P, Carceller F, Reimers D, Fu X, Gimenez-Gallego G. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in choroid plexus of the rat. *Neurol Res* 1994; 16: 310-312.

Cuevas P, Diaz-Gonzalez D, Garcia-Martin-Cordova C, Sanchez I, Lozano RM, Gimenez-Gallego G, Dujovny M. Dobesilate diminishes activation of the mitogen-activated protein kinase ERK1/2 in glioma cells. *J Cell Mol Med* 2006a; 10: 225.

Cuevas P, Diaz-Gonzalez D, Gimenez-Gallego G, Dujovny M. Dihydroxy-2,5 benzenesulphonate (dobesilate) elicits growth arrest and apoptosis in glioma cells. *Neurol Res* 2005a; 27: 797-800.

Cuevas P, Diaz-Gonzalez D, Sanchez I, Lozano RM, Gimenez-Gallego G, Dujovny M. Dobesilate inhibits the activation of signal transducer and activator of transcription 3, and the expression of cyclin D1 and bcl-XL in glioma cells. *Neurol Res* 2006b; 28: 127-130.

Cuevas P, Espinoza W, Perez C, Angulo J, Gimenez-Gallego G. Topical treatment of actinic keratoses with potassium dobesilate 5% cream. a preliminary open-label study. *Eur J Med Res* 2011c; 16: 67-70.

Cuevas P, García-Calvo M, Carceller F, Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Muñoz-Willery I, Martínez-Coso V, Lamas S, Giménez-Gallego G. Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a; 93: 11996-12001.

Cuevas P, Lozano RM, Gimenez-Gallego G. Suppression of acidic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis by the antigrowth activity of 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurol Res* 1999c; 21: 191-194.

Cuevas P, Outeiriño LA, Angulo J, Giménez-Gallego G. Treatment of dry age-related macular degeneration with dobesilate. *BMJ Case Rep* 2012; 2012: bcr 0220125942.

Cuevas P, Reimers D, Diaz D, Lozano RM, Gimenez-Gallego G. Apoptosis of glioma cells induced by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurosci Lett* 1999b; 275: 149.

Cuevas P, Reimers D, Gimenez-Gallego G. Loss of basic fibroblast growth factor in the subcommissural organ of old spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 1996b; 221: 25.

Cuevas P, Sánchez I, Lozano RM, Giménez-Gallego G. Dobesilate is an angiogenesis inhibitor. *Eur J Med Res* 2005b; 10: 369-372.

Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN, Holland EC PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev* 2001; 15: 1913-1925.

Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005 16: 233-247.

De Angelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001; 344: 114-123.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.

De Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, Piao Y, Eterovic K, Ji Y, Conrad CA. Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol* 2010; 12: 233-242.

Debatin KM, Stahnke K, Fulda S. Apoptosis in hematological disorders. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 149-158.

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997a; 7: 813-820.

Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 1997b; 186: 1165-1170.

Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* 2004; 70:217-228.

Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 2002; 16: 33- 45.

Desjardins A, Reardon DA, Herndon JE 2nd, Marcello J, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS, Vredenburgh JJ. Bevacizumab Plus Irinotecan in Recurrent WHO Grade 3 Malignant Gliomas. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 7068-7073.

Di Rocco F, Carroll RS, Zhang J, Black PM. Platelet-derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 1998; 42: 341-346.

Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H, Marynen P. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6ssociated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999; 93: 3601-3609.

Doblas S, Saunders D, Kshirsagar P, Pye Q, Oblander J, Gordon B, Kosanke S, Floyd RA, Towner RA. Phenyl-tert-butyl nitron induces tumor regression and decreases angiogenesis in a C6 rat glioma model. *Free Radic Biol Med*, 2008; 44: 63–72.

Donepudi M, Sweeney AM, Briand C, Grutter MG. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 2003; 11: 543-549.

Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G. HIF-1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008; 13: 206- 220.

DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-1073.

Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, Agarwalla PK, Chheda MG, Campos B, Wang A, Brennan C, Ligon KL, Furnari F, Cavenee WK, Depinho RA, Chin L, Hahn WC. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 2012; 26: 756-784.

Dvorak HF, Rons-Whipple A. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003; 162: 1747-1757.

Ebos JM, Lee CR, Cruz-Muñoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009a; 15: 232-239.

Ebos JM, Lee CR, Kerbel RS. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 2009b; 15: 5020-5025.

Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991; 51: 2164-2172.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4309-4313.

Elenius K, Jalkanen M. Function of the syndecans-a family of cell surface proteoglycans. *J Cell Sci* 1994; 107: 2975-2982.

Eleutherakis-Papaiakovou V, Bamias A, Dimopoulos MA. Thalidomide in cancer medicine. *Ann Oncol* 2004; 15: 1151-1160.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; 273: 14363-14367.

Emrich JG, Brady LW, Quang TS, Class R, Miyamoto C, Black P, Rodeck U. Radioiodinated (I-125) monoclonal antibody 425 in the treatment of high grade glioma patients: ten-year synopsis of a novel treatment. *Am J Clin Oncol* 2002; 25: 541-546.

Endo T, Abe S, Seidler HB, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, Kitagawa M, Hirokawa K. Expression of IAP family proteins in colon cancers from patients with different age groups, *Cancer Immunol Immunother* 2004; 90: 770-776.

Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Boleen P, Guillemin R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6507-6511.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 139-149.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* 2008; 132: 9-14.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348.

Fang J, Shing Y, Wiederschain D, Yan L, Butterfield C, Jackson G, Harper J, Tamvakopoulos G, Moses MA. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is required for the switch to the angiogenic phenotype in a novel tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3884-3889.

Feng S, Wang F, Matsubara A, Kan M, McKeegan WL. Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res* 1997; 57: 5369-5378.

Fernandez IS, Cuevas P, Angulo J, Lopez-Navajas P, Canales-Mayordomo A, Gonzalez-Corrochano R, Lozano RM, Valverde S, Jimenez-Barbero J, Romero A, Gimenez-Gallego G. Gentisic Acid, a Compound Associated with Plant Defense and a Metabolite of Aspirin, Heads a New Class of in Vivo Fibroblast Growth Factor Inhibitors. *J Biol Chem* 2010; 285: 11714-11729.

Fernandez-Tornero C, Lozano RM, Redondo-Horcajo M, Gomez AM, Lopez JC, Quesada E, Uriel C, Valverde S, Cuevas P, Romero A, Gimenez-Gallego G. Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity: crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalene sulfonate. *J Biol Chem* 2003; 278: 21774-21781.

Ferrara N, Kerbel R. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-974.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29: 10- 14.

Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005; 69: 11-16.

Ferreira CG, Van der Valk P, Span SW, Ludwig I, Smit EF, Kruyt FAE, Pinedo HM, Van Tinteren H, Giaccone G. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non- small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2468-2474.

Finetti F, Solito R, Morbidelli L, Giachetti A, Ziche M, Donnini S. Prostaglandin E2 regulates angiogenesis via activation of fibroblast growth factor receptor-1. *J Biol Chem* 2008; 283: 2139-2146.

Firat E, Gaedicke S, Tsurumi C, Esser N, Weyerbrock A, Niedermann G. Delayed cell death associated with mitotic catastrophe in γ -irradiated stem-like glioma cells. *Radiat Oncol*, 2011; 6: 71.

Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 2005; 15:297- 310.

Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 2008; 15: 272-284.

Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 2007; 25: 867-890.

Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 2001; 86: 23-33.

Folkman J. Angiogenesis research: from laboratory to clinic. *Forum (Geneva)* 1999; 9:3 (Suppl 3): 59-62.

Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175:409-416.

Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 2004; 112: 496-507.

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.

Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* 2000; 70: 113-122.

Forsyth PA, Posner JB. Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. *Neurology* 1993; 43: 1678-1683.

Fouqué A, Debure L, Legembre P. The CD95/CD95L signaling pathway: A role in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846: 130-141.

Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol Esp* 2009; 33: 941-951.

Frantz: Lessons learnt from Genasense's failure. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 542-543.

Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* 1997; 11: 1833-1841.

Fukai J, Yokote H, Yamanaka R, Arao T, Nishio K, Itakura T. EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2768-78.

Fukushima S, Kato S, Maeda M, Shigemori M. Caspase-9 pathway activation by inhibiting endogenous fibroblast growth factor signaling in human glioma cells. *Int J Oncol* 2008; 32: 467-73.

Fulda S, Debatin KM. IFN γ sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2295-2308.

Fulda S, Los M, Friesen C, Debatin KM. Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer* 1998; 76: 105-114.

Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res* 2000; 60: 3947-3956.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; 21: 2683-710.

Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C. Sef is a feedback- induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4:170- 174.

Furthauer M, Reifers F, Brand M, Thisse B, Thisse C. sprouty4 acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development* 2001; 128: 2175-2186.

Furthauer M, Van Celst J, Thisse C, Thisse B. FgF signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* 2004; 131: 2853-2864.

Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002; 3: 411-423.

Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 2009; 16: 748-754.

Gan Y, Wientjes MG, Au JLS. Expression of basic fibroblast growth factor correlates with resistance to paclitaxel in human patient tumors. *Pharm Res* 2006; 23: 1324-1331.

Gawantka V, Pollet N, Delius H, Vingron M, Pfister R, Nitsch R, Blumenstock C, Niehrs C. Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech Dev* 1998; 77: 95-141.

Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*, 1996; 39: 235-50.

Giglio P.; Levin V.: Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Glioma Therapy. *Am J Ther* 2004; 11: 141-143

Gillespie LL, Chen C, Paterno GD. Cloning of a fibroblast growth factor receptor 1 splice variant from *Xenopus* embryos that lacks a protein kinase C site for the regulation of receptor activity. *J Biol Chem* 1995; 270: 22758- 22763.

Gimenez-Gallego G, Cuevas P. Fibroblast growth factors, proteins with a broad spectrum of biological activities. *Neurol Res* 1994; 8: 313-316.

Gimenez-Gallego G, Rodkey J, Bennett C, Rios-Candelore M, DiSalvo J, Thomas K. Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science* 1985; 230: 1385-1388.

Glantz MJ, Cole BF, Forsyth PA, Recht LD, Wen PY, Chamberlain MC, Grossman SA, Cairncross JG. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice parameter: anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors. *Neurology* 2000; 54: 1886-1893.

Gliniak B, Le T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemo-therapeutic agent CPT-11. *Cancer Res* 1999; 59: 6153-6158.

González-Moles MA, Galindo P, Gutierrez Fernandez J, Sanchez Fernandez E, Rodriguez Archilla A, Ruiz Avila I, Bravo M. p53 protein expression in squamous cell carcinoma. Survival analysis. *Anticancer Res* 2001; 21: 2889-2894.

Goodarzi AA, Block WD, Lees-miller SP. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5: 393-411.

Gordon MS, Cunningham D. Managing Patients Treated with Bevacizumab Combination *Ther Oncol* 2005; 69: 25-33.

Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 2295-2299.

Greten FR, Weber CK, Greten TF, Schneider G, Wagner M, Adler G, Schmid RM. Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology* 2002; 123: 2052-2063.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2012; 140: 883-899.

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 2002; 310: 257-70.

Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 635-640.

Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ, Cavenee WK, Cheng SY. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* 2003; 162: 1083-1093.

Gysin R, Moore B, Proffitt RT, Deuel TF, Caldwell K, Glaser L. Regulation of the synthesis of S-100 protein in rat glial cells. *J Biol Chem*. 1980; 255: 1515-1520

Haas PS, Denz U, Ihorst G, Engelhardt M. Thalidomide in consecutive multiple myeloma patients: single-center analysis on practical aspects, efficacy, side effects and prognostic factors with lower thalidomide doses. *Eur J Haematol* 2008; 80: 303-309.

Hackett SF, Wiegand S, Yancopoulos G, Campochiaro PA. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J Cell Physiol* 2002; 192: 182-187.

Hadjipanayis CG, Machaidze R, Kaluzova M, Wang L, Schuette AJ, Chen H, Wu X, Mao H. EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Res* 2010; 70: 6303-12.

Haley EM, Kim Y. The role of basic fibroblast growth factor in glioblastoma multiforme and glioblastoma stem cells and in their in vitro culture. *Cancer Lett* 2014; 346: 1-5.

Han W, Zhang T, Yu H, Foulke JG, Tang CK. Hypophosphorylation of residue Y1045 leads to defective downregulation of EGFRvIII. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1361-8.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Hao C, Beguinot F, Condorelli G, Trencia A, Van Meir EG, Yong VW, Parney IF, Roa WH, Petruk KC. Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mediated apoptosis in human malignant glioma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1162- 1170.

Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Chaudhary PM, Gazdar AF. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 2002; 62: 5897-5901.

Hardell L, Carlberg M, Hansson Mild K. Use of mobile phones and cordless phones is associated with increased risk for glioma and acoustic neuroma. *Pathophysiology* 2013; 20: 85-110.

Harlin H, Reffey SB, Duckett CS, Lindsten T, Thompson CB. Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3604-3608.

Harper JW, Strydom DJ, Lobb RR. Human class 1 heparin-binding growth factor: structure and homology to bovine acidic brain fibroblast growth factor. *Biochemistry* 1986; 25: 4097-4103.

Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC. Novel therapies for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003; 120: 10-17.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997-1003.

Hellstrom M Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007; 445: 776-780.

Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.

Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 1994; 36: 714-721.

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nistér M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 1992; 52: 3213-3219.

Hersey P, Zhang XD. Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J Cell Physiol* 2003; 196: 9-18.

Hofmann HS, Simm A, Hammer A, Silber RE, Bartling B. Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 554-560.

Hoh J, Jin S, Parrado T, Edington J, Levine AJ, Ott J. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8467-72.

Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 2001a; 6: 253-261.

Holcik M, Korneluk R.G.: XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001b; 2: 550-556.

Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 120-129.

Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandioler D, Ludwig C, Zangemeister-Wittke U, Stahel R. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ* 2003; 10: 356-364.

Howe LR, Subbaramaiah K, Kent CV, Zhou XK, Chang SH, Hla T, Jakobsson P, Hudis CA, Dannenberg AJ. Genetic deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 suppresses mouse mammary tumor growth and angiogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013; 106: 99–105.

Hsu YC, Liao WC, Kao CY, Chiu IM. Regulation of FGF1 gene promoter through transcription factor RFX1. *J Biol Chem* 2010; 285: 13885-13895.

Hu Y, Cherton-Horvat G, Dragowska V, Baird S, Korneluk RG, Durkin JP, Mayer LD, LaCasse EC. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2826-2836.

Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GN, Wiley HS, Cavenee WK. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997; 272: 2927-2935.

Huang JJ, Joh JW, Fuentesbella J, Patel A, Nguyen T, Seki S, Hoyte L, Reshamwala N, Nguyen C, Quiros A, Bass D, Sibley E, Berquist W, Cox K, Kerner J, Nadeau KC. Eotaxin and FGF enhance signaling through an extracellular signal-related kinase (ERK)-dependent pathway in the pathogenesis of Eosinophilic esophagitis. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010; 6: 25.

Huang YH, Lu M, Wu H. Antagonizing XIAP-mediated caspase-3 inhibition: Achilles' heel of cancers? *Cancer Cell* 2004; 5 : 1-2.

Hunt S, Jones AV, Hinsley EE, Whawell SA, Lambert DW. MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1. *FEBS Lett* 2011; 585: 187-192.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342.

Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 907-920.

Iozzo RV, Sanders RDJ. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Cell Mol Med* 2011; 15: 1013-1031.

Ishii Y, Sasaki T, Serikawa M, Minami T, Okazaki A, Yukutake M, Ishigaki T, Kosaka K, Mouri T, Yoshimi S, Shimizu A, Tsuboi T, Chayama K. Elevated expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 in primary sclerosing cholangitis: implications for cholangiocarcinogenesis. *Int J Oncol* 2013; 43: 1073–1079.

Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2784-2791.

Itoh N, Ornitz DM.: Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 2004 20: 563–569

Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro* 2011; 3: e00063.

Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am* 1994; 271: 58-65.

James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 1988; 48: 5546-5551.

Jane EP, Premkumar DR, Pollack IF. Coadministration of Sorafenib with Rottlerin Potently Inhibits Cell Proliferation and Migration in Human Malignant Glioma Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1070-1080.

Jansen B, Zangemeister-Wittke U. Antisense therapy for cancer-the time of truth. *Lancet Oncol* 2002; 3: 672-683.

Jastrebova N, Vanwildemeersch M, Rapraeger AC, Gimenez-Gallego G, Lindahl U, Spillmann D. Heparan sulfate-related oligosaccharides in ternary complex formation with fibroblast growth factors 1 and 2 and their receptors. *J Biol Chem* 2006; 281: 26884-26889.

Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6: 564-567.

Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S, Kowalski MO, Sayles D, Dimitrijevic S, Fletcher C, Hornick J, Salgia R, Le Chevalier T. Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003a; 9: 5880-5887.

Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams LT. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4728-4736.

Johnson DE, Lu J, Chen H, Werner S, Williams LT. The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4627-4634.

Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993; 60: 1-41.

Johnson JR, Bross P, Cohen M, Rothmann M, Chen G, Zajicek A, Gobburu J, Rahman A, Staten A, Pazdur A, Approval summary: imatinib mesylate capsules for treatment of adult patients with newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Clin Cancer Res* 2003b; 9: 1972-1979.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-164.

Jonca F, Ortega N, Gleizes PE, Bertrand N, Plouet J. Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1997; 272: 24203-24209.

Jost M, Huggett TM, Kari C, Boise LH, Rodeck U. Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 6320-6326.

Junck L. Bevacizumab antiangiogenic therapy for glioblastoma. *Neurology* 2011; 76: 414-415.

Kaga T, Kawano H, Sakaguchi M, Nakazawa T, Taniyama Y, Morishita R. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: Differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vasc Pharmacol* 2012; 57: 3-9.

Kaloshi G, Rroji A, Petrela M. Upfront chemotherapy with CCNU alone for adults' low-grade gliomas: a clinical analysis. *J Neurooncol* 2014; 117: 373-374.

Kan M, Wang F, Xu J, Crabb JW, Hou J, McKeehan WL. An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science* 1993; 259: 1918-1921.

Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 822-828.

Karajannis MA, Vincent L, Drenzo R, Shmelkov SV, Zhang F, Feldman EJ, Bohlen P, Zhu Z, Sun H, Kussie P, Rafii S. Activation of FGFR1beta signaling pathway promotes survival, migration and resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2006; 20: 979-986.

Karatolios K, Moosdorf R, Maisch B, Pankuweit S. Cytokines in pericardial effusion of patients with inflammatory pericardial disease. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 382082.

Karcher S, Steiner HH, Ahmadi R, Zoubaa S, Vasvari G, Bauer H, Unterberg A, Herold-Mende C. Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. *Int J Cancer* 2006; 118: 2182-2189.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431-436.

Karmakar S, Olive MF, Banik NL, Ray SK. Intracranial stereotaxic cannulation for development of orthotopic glioblastoma allograft in Sprague-Dawley rats and histoimmunopathological characterization of the brain tumor. *Neurochem Res* 2007; 32: 2235-2242.

Kaufmann SH, Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7414-7430.

Kawasaki H, Altieri D, Lu C, Toyoda M, Tenji O, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074.

Keane MM, Rubinstein Y, Cuello M, Ettenberg SA, Banerjee P, Nau MM, Lipkowitz S. Inhibition of NF-kappaB activity enhances TRAIL mediated apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 64: 211-219.

Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 1077-1083.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-515.

Kesari S, Stiles CD. The bad seed: PDGF receptors link adult neural progenitors to glioma stem cells. *Neuron* 2006; 51:151-3.

Khasraw M, Holodny A, Goldlust SA, DeAngelis LM. Intracranial hemorrhage in patients with cancer treated with bevacizumab: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Ann Oncol* 2012; 23: 458-463.

Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-969

Kim H, Lee J, Soung Y, Park W, Kim S, Lee J, Park J, Cho Y, Kim C, Jeong SDD, Nam S, Kim S, Lee J, Yoo N, Lee S. Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 2003; 125: 708-715.

Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed JC. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL- induced apoptosis, *J Biol Chem* 2002; 277: 22320-22329.

Kinoshita H, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Nakajima Y, Tasaka K. Cisplatin (CDDP) sensitizes human osteosarcoma cell to Fas/CD95-mediated apoptosis by down-regulating FLIP-L expression. *Int J Cancer* 2000; 88: 986-991.

Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y. Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields. *Cancer Res* 2004; 64: 3288-3295

Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001; 276: 46639-46646.

Kischkel FG, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-5588.

Klagsbrun M, Shing Y. Heparin affinity of anionic and cationic capillary endothelial cell growth factors: analysis of hypothalamus-derived growth factors and fibroblast growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 805-809.

Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12 193-213.

Klint P, Claesson-Welsh L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci* 1999; 4: 165-177.

Kozomora R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-Magic M, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg* 2005; 33: 342-348.

Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Huang XS, Turner B, Bubendorf L, Kallioniemi OP, Shabaik A, Vitiello A, Peehl D, Gao GJ, Reed JC. Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4914-4925.

Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer* 2010; 9: 135.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795.

Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8247-8254.

Kudoh T, Tsang M, Hukriede NA, Chen X, Dedekian M, Clarke CJ, Kiang A, Schultz S, Epstein JA, Toyama R, Dawid IB. A gene expression screen in zebrafish embryogenesis. *Genome Res* 2001; 11: 1979-1987.

Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of Angiogenesis by Eph-Ephrin Interactions. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17: 145-151.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Tissue Renewal, Regeneration and Repair. En: Pathologic Basis of Disease, Robbins & Cotran (Eds) (8th edición), Saunders (Elsevier), Philadelphia, 2009, Chap. 3 pp 79-110;

Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M, Yamamoto T, Kuwano M, Ono M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J* 2004;18: 300–310.

LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259.

Lacroix M, Abi-Said D, Fourney D, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95:190-198.

Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH, Riggins GJ. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* 2002; 62: 3335-3339.

Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 2002; 9: 358-361.

Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 44-55.

Lamothe B, Yamada M, Schaeper U, Birchmeier W, Lax I, Schlessinger J. The docking protein Gab1 is an essential component of an indirect mechanism for fibroblast growth factor stimulation of the phosphatidylinositol 3- kinase/Akt antiapoptotic pathway. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5657-5666.

Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997; 90: 4266-4270.

Larrivé B, Prahst C, Gordon E, del Toro R, Mathivet T, Duarte A, Simons M, Eichmann A. ALK1 Signaling Inhibits Angiogenesis by Cooperating with the Notch Pathway. *Dev Cell* 2012; 22: 489-500

Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions, *Nat Med* 2001; 7: 383-385.

Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, De Nève N, Maris C, Trepant AL, Rorive S, Decaestecker C, Salmon I. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One* 2012; 7: e45475.

Lee DC, Hsu YC, Chung YF, Hsiao CY, Chen SL, Chen MS, Lin HK, Chiu IM. Isolation of neural stem/progenitor cells by using EGF/FGF1 and FGF1B promoter-driven green fluorescence from embryonic and adult mouse brains. *Mol Cell Neurosci* 2009; 41: 348-363.

Lee ES, Locker J, Nalesnik M, Reyes J, Jaffe R, Alashari M, Nour B, Tzakis A, Dickman PS. The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *N Engl J Med* 1995; 332: 19-25.

Lee M, Kang Y, Suk K, Schwab C, Yu S, McGeer PL. Acidic fibroblast growth factor (FGF) potentiates glial-mediated neurotoxicity by activating FGFR2 IIIb protein. *J Biol Chem* 2011; 286: 41230-41245.

Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 1989; 245: 57-60.

Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, McAdow R, Johnson SL, Lewis J. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* 2007; 134: 839-844.

Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:989-1000.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006; 13:1027-36.

Li F., Ambrosinin G., Chu E.Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P.C., Altieri D.C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin, *Nature* 1998; 396: 580-584.

Li H, Ko HP, Whitlock JP. Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF-1 *a*. *J Biol Chem* 1996; 271: 21262-21267.

Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res* 1984; 44: 753-60.

Lin H, Karin M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 107-114.

Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: ameta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1544-1550.

Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003; 22: 8568-8580.

Loilome W, Joshi AD, ap Rhys CMJ, Piccirillo S, Vescovi AL, Gallia GL, Riggins GJ. Glioblastoma cell growth is suppressed by disruption of Fibroblast Growth Factor pathway signaling. *J Neurooncol* 2009; 94: 359-366.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 97–109.

Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53: 11-21.

Lozano RM, Jimenez M, Santoro J, Rico M, Gimenez-Gallego G. Solution structure of acidic fibroblast growth factor bound to 1,3, 6-naphthalenetrisulfonate: a minimal model for the anti-tumoral action of suramins and suradistas. *J Mol Biol* 1998; 281: 899-915.

Lozano RM, Redondo-Horcajo M, Jimenez MA, Zilberberg L, Cuevas P, Bikfalvi A, Rico M, Gimenez-Gallego G. Solution structure and interaction with basic and acidic fibroblast growth factor of a 3-kDa human platelet factor-4 fragment with antiangiogenic activity. *J Biol Chem* 2001; 276: 35723-35734.

Lund-Johansen M, Forsberg K, Bjerkgvig R, Laerum OD. Effects of growth factors on a human glioma cell line during invasion into rat brain aggregates in culture. *Acta Neuropathol* 1992; 84: 190-197.

Lwaleed BA, Bass PS, Cooper AJ. The biology and tumourrelated properties of monocyte tissue factor. *J Pathol* 2001; 193: 3-12.

MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1997; 272: 25417-25420.

Maciag T, Mehlman T, Friesel R, Schreiber AB. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science* 1984 225: 932-935.

Mack F, Schäfer N, Kebir S, Stuplich M, Schaub C, Niessen M, Scheffler B, Herrlinger U, Glas M. Carmustine (BCNU) plus Teniposide (VM26) in recurrent malignant glioma. *Oncology* 2014; 86:369-372.

Maeda T, Yamada Y, Moriuchi R, Sugahara K, Tsuruda K, Joh T, Atogami S, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kamihira S. Fas gene mutation in the progression of adult T cell leukemia. *J Exp Med* 1999; 189: 1063-1071.

Mailleux AA, Tefft D, Ndiaye D, Itoh N, Thiery JP, Warburton D, Bellusci S. Evidence that SPROUTY2 functions as an inhibitor of mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Mech Dev* 2001; 102: 81-94.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-16.

Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stühler K, Meyer HE, Reifenberger G. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol* 2010; 20: 539-550.

Mandl M1, Kapeller B, Lieber R, Macfelda K. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is upregulated in a HIF-1 α -dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 434: 166-172.

Mandrizzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, Bruggen PVD. A CASP- 8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 1997; 186: 785-793.

Mannino S, Molinari A, Sabatino G, Ciafrè SA, Colone M, Maira G, Anile C, Arancia G, Mangiola A. Intratumoral vs systemic administration of meta-tetrahydroxyphenylchlorin for photodynamic therapy of malignant gliomas: assessment of uptake and spatial distribution in C6 rat glioma model. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21: 227-231.

Mansukhani A, Moscatelli D, Talarico D, Levytska V, Basilico C. A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and Kaposi FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4378-4382.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444.

Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Bauer KD, Ashkenazi A. Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked CrmA. *Curr Biol* 1996; 6: 750-752.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997; 7: 1003-1006.

Matsunaga H, Ueda H. Evidence for serum-deprivation-induced co-release of FGF-1 and S100A13 from astrocytes. *Neurochem Int* 2006; 49: 294-303.

McIntosh I, Bellus GA, Jab EW. The pleiotropic effects of fibroblast growth factor receptors in mammalian development. *Cell Struct Funct* 2000; 25: 85-96.

Mellinghoff IK, Sawyers CL. The emergence of resistance to targeted cancer therapeutics. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 603-623.

Menter DG, DuBois RN. Prostaglandins in Cancer Cell Adhesion, Migration, and Invasion. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 723419.

Miebach S, Grau S, Hummel V, Rieckmann P, Tonn JC, Goldbrunner RH. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO grades. *J Neurooncol* 2006; 76: 39-48.

Minowada G, Jarvis LA, Chi CL, Neubuser A, Sun X, Hacoheh N, Krasnow MA, Martin GR. Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* 1999; 126: 4465-4475.

Miyagi N, Kato S, Terasaki M, Aoki T, Sugita Y, Shigemori M, Morimatsu M. Fibroblast growth factor-9 (glia-activating factor) stimulates proliferation and production of glial fibrillary acidic protein in human gliomas either in the presence or in the absence of the endogenous growth factor expression. *Oncol Rep* 1999; 6: 87-92.

Miyagi N, Kato S, Terasaki M, Shigemori M, Morimatsu M. Fibroblast growth factor-2 and -9 regulate proliferation and production of matrix metalloproteinases in human gliomas. *Int J Oncol* 1998; 12: 1085-1090.

Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, Fischer R, Bellot F, Li W, Dionne CA, Jaye M, Rubinstein M, Schlessinger J. A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 5068- 5078.

Mohammadi M, Olsen SK, Goetz R. A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an à la carte menu of heparan sulfate motifs. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15: 506-516.

Molema G, Griffioen AW. Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply. *Immunol Today* 1998; 19: 392-394.

Moller P, Koretz K, Leithauser F, Bruderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994; 57: 371-377.

Monzo M, Rosel RI, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: re- expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2100.

Morgan DO. Cell cycle control in normal and neoplastic cells. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2: 33-37.

Morrison RS, Giordano S, Yamaguchi F, Hendrickson S, Berger MS, Palczewski K. Basic fibroblast growth factor expression is required for clonogenic growth of human glioma cells. *J Neurosci Res* 1993; 34: 502-509.

Morrison RS, Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Yahanda AM, Donehower LA, Berger M. Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. *J Neurooncol* 1994; 18: 207-216.

Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 5536-5539.

Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2811-2816.

Motomura K, Natsume A, Kishida Y, Higashi H, Kondo Y, Nakasu Y, Abe T, Namba H, Wakai K, Wakabayashi T. Benefits of interferon- β and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter. *Cancer* 2011; 117: 1721-1730.

Murono EP, Washburn AL, Goforth DP, Wu N. Biphasic effect of basic fibroblast growth factor on 125I-human chorionic gonadotropin binding to cultured immature Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 92: 121-126.

Murray LJ, Bridgewater CH, Levy D. Carboplatin Chemotherapy in Patients with Recurrent High-grade Glioma. *Clin Oncol* 2011; 23: 55-61.

Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000; 60: 847-853.

Nagendra HG, Harrington AE, Harmer NJ, Pellegrini L, Blundell TL, Burke DF. Sequence analyses and comparative modeling of fly and worm fibroblast growth factor receptors indicate that the determinants for FGF and heparin binding are retained in evolution. *FEBS Lett* 2001; 501: 51-58.

Nakamura JL. The epidermal growth factor receptor in malignant gliomas: pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 463-72.

Nakshatri H, Goulet RJ Jr. NF-kappaB and breast cancer - Current Problems in Cancer. *Cancer* 2002; 26: 282-309.

Naus CC, Bechberger JF, Paul DL. Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci. Lett.* 1991; 13; 126: 33-6.

New P. Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. *Cancer Control* 2004; 11: 152–164.

Nghiempfu PL, Liu W, Lee Y, Than T, Graham C, Lai A, Green RM, Pope WB, Liao LM, Mischel PS, Nelson SF, Elashoff R, Cloughesy TF. Bevacizumab and chemotherapy for recurrent glioblastoma: a single-institution experience. *Neurology* 2009; 72: 1217-1222.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1028-1042.

Niehrs C, Meinhardt H. Developmental biology: Modular feedback. *Nature* 2002; 417: 35-36

Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F. Human brain-cell death induced by tumour- necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 2000; 356: 827-828.

Nutt SL, Dingwell KS, Holt CE, Amaya E. **Xenopus Sprouty2 inhibits** FGF-mediated gastrulation movements but does not affect mesoderm induction and patterning. *Genes Dev* 2001; 15: 1152-1166.

Okazaki T, Kageji T, Kuwayama K, Kitazato KT, Mure H, Hara K, Morigaki R, Mizobuchi Y, Matsuzaki K, Nagahiro S. Up-regulation of endogenous PML induced by a combination of interferon-beta and temozolomide enhances p73/YAP-mediated apoptosis in glioblastoma. *Cancer Lett* 2012; 323: 199-207.

Olsen SK, Garbi M, Zampieri N, Eliseenkova AV, Omitz DM, Goldfarb M, Mohammadi M. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *J Biol Chem* 2003; 278: 34226-34236.

Ong SH, Guy GR, Hadari YR, Laks S, Gotoh N, Schlessinger J, Lax I. FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 979-989.

Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol* 2011; 28: 13.

Orlowski RZ, Baldwin AS Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8: 385-389.

Ornitz DM, Herr AB, Nilsson M, Westman J, Svahn CM, Waksman G. FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. *Science* 1995; 268: 432.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001; 2: REVIEWS 3005.

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996; 271: 15292-15297.

Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 240-247.

Ostertag D1, Amundson KK, Lopez Espinoza F, Martin B, Buckley T, Galvão da Silva AP, Lin AH, Valenta DT, Perez OD, Ibañez CE, Chen CI, Pettersson PL, Burnett R, Daublebsky V, Hlavaty J, Gunzburg W, Kasahara N, Gruber HE, Jolly DJ, Robbins JM. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector. *Neuro Oncol* 2012; 14: 145-159.

Ostrovsky O, Berman B, Gallagher J, Mulloy B, Fernig DG, Delehede M, Ron D. Differential effects of heparin saccharides on the formation of specific fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor complexes. *J Biol Chem* 2002; 277:2444-2453.

Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vifials F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009; 15: 220-231.

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997; 277: 815-818.

Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM. TRUND, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling. *FEBS Lett* 1998; 424: 41-45.

Pang JC, Kwok WK, Chen Z, Ng HK. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 599-611.

Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M, Ahern R, Reed J, Dowsett M. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2100-2108.

Paulus W, Grothe C, Sensenbrenner M, Janet T, Baur I, Graf M, Roggendorf W. Localization of basic fibroblast growth factor, a mitogen and angiogenic factor, in human brain tumors. *Acta Neuropathol* 1990; 79 : 418-23.

Pedersen IM, Zapata JM, Samuel T, Scott FL, Salvesen GS, Honda T, Gribble GW, Suh N, Sporn MB, Kipps TJ, Reed JC. Retraction: The triterpenoid CDDO-Imidazolide induces apoptosis and enhances fludarabine-induced apoptosis of CLL B-cells. *Blood* 2004; 104: 932.

Pellegrini L, Burke DF, von Delft F, Mulloy B, Blundell TL. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 2000; 407: 1029-1034.

Pellegrini L. Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 629-634.

Perez OD1, Logg CR, Hiraoka K, Diago O, Burnett R, Inagaki A, Jolson D, Amundson K, Buckley T, Lohse D, Lin A, Burrascano C, Ibanez C, Kasahara N, Gruber HE, Jolly DJ. Design and selection of Toca 511 for clinical use: modified retroviral replicating vector with improved stability and gene expression. *Mol Ther* 2012; 20: 1689-1698.

Pesenti E., Sola F., Mongelli N., Grandi M., Spreafico F. Suramin prevents neovascularisation and tumour growth through blocking of basic fibroblast growth factor activity. *Br J Cancer* 1992; 66: 367-72.

Pfeiffer SE, Herschman HR, Lightbody J, Sato G. Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system. *J Cell Physiol* 1970; 75: 329-339.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high- grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9: 157-173.

Pineda-Lucena A, Jimenez MA, Lozano RM, Nieto JL, Santoro J, Rico M, Gimenez-Gallego G. Three-dimensional structure of acidic fibroblast growth factor in solution: effects of binding to a heparin functional analog. *J Mol Biol* 1996; 264: 162-178.

Pingoud-Meier C, Lang D, Janss AJ, Rorke LB, Phillips PC, Shalaby T, Grotzer MA. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6401-6409.

Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998; 396: 699-703.

Plate KH, Breier G, Farrell CL, Risau W. Platelet-derived growth factor receptor- beta is induced during tumor development and upregulated during tumor progression in endothelial cells in human gliomas. *Lab Invest* 1992; 67:529-534.

Pless M, Weinberg U. Tumor treating fields: concept, evidence and future. *Expert Opin Invest Drugs* 2011; 20: 1099-1106.

Plum SM, Vu HA, Mercer B, Fogler WE, Fortier AH. Generation of a specific immunological response to FGF-2 does not affect wound healing or reproduction. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2004; 26: 29-41.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 165-197.

Presta M, Andrés G, Leali D, Dell'Era P, Ronca R. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis. *Eur Cytokine Netw* 2009; 20: 39–50.

Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 159-178.

Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, Gururangan S, Friedman AH, Bigner DD, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE 2nd, Walker A, Friedman HS. Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol* 2009; 27:1262-1267.

Reardon DA, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Peters K, Gururangan S, Sampson JH, Marcello J, Herndon JE II, McLendon RE, Janney D, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS. Effect of CYP3A-inducing anti-epileptics on sorafenib exposure: results of a phase II study of sorafenib plus daily temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2011; 101: 57-66.

Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist* 2006; 11: 152-164.

Reck M. Examining the safety profile of angiogenesis inhibitors: implications for clinical practice. *Target Oncol* 2010; 5: 257-267.

Reid HH, Wilks AF, Bernard O. Two forms of the basic fibroblast growth factor receptor-like mRNA are expressed in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1596-1600.

Reijerkerk A, Voest EE, Gebbink MF. No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1695-1705.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-1710.

Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 2-8.

Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 2000; 35: 227-231.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.

Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 389-397.

Rodel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Gunther K, Schick C, Sauer R, Rodel C. High surviving expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection, Strahlenther. *Onkol* 2002; 178: 426-435.

Rodríguez P, Angeles Higuera M, González-Rajal A, Alfranca A, Fierro-Fernández M, García-Fernández RA, Ruiz-Hidalgo MJ, Monsalve M, Rodríguez-Pascual F, Redondo JM, de la Pompa JL, Laborda J, Lamas S. The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 232-241.

Rodriguez-Enfedaque A, Bouleau S, Laurent M, Courtois Y, Mignotte B, Vayssiere JL, Renaud F. FGF1 nuclear translocation is required for both its neurotrophic activity and its p53-dependent apoptosis protection. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1719-1727.

Roelz R, Hippchen B, Machein M, Gläsker S. Neurosurgical complications in patients under bevacizumab therapy. *JSM Neurosurg Spine* 2014; 2: 1021.

Rossini M, Cheunschon B, Donnert E, Ma LJ, Thomas JW, Neilson EG, Fogo AB. Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein (FSP-1) in inflammatory renal disease. *Kidney Int* 2005; 68: 2621-2628.

Roth W, Isenmann S, Nakamura M, Platten M, Wick W, Kleihues P, Bahr M, Ohgaki H, Ashkenazi A, Weller M. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res* 2001; 61: 2759-2765.

Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1017-26.

Ruano Y, Mollejo M, Camacho FI, de Lope Rodriguez A, Fiano C, Ribalta T, Martinez P, Hernandez-Moneo JL, Melendez B. Identification of survival-related genes of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma multiforme. *Cancer* 2008; 112:1575-1584.

Ruiz J, Case D, Enevold G, Rosdhal R, Tatter SB, Ellis TL, McQuellon RP, McMullen KP, Stieber VW, Shaw EG, Lesser GJ. A phase II trial of thalidomide and procarbazine in adult patients with recurrent or progressive malignant gliomas. *J Neurooncol* 2012; 106: 611-617.

Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 2006; 244: 164-171.

Sakata K, Kato S, Fox JC, Shigemori M, Morimatsu M. Autocrine signaling through Ras regulates cell survival activity in human glioma cells: potential cross-talk between Ras and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 975-983.

Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 89-98.

Sano H, Forough R, Maier JAM, Case JP, Jackson A, Case JP, Jackson A, Engleka K, Maciag T, Wilder RL. Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J Cell Biol* 1990; 110: 1417-1426.

Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650.

Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 886-892.

Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 2010; 465: 487-491.

Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, Ma W, Seki N, Raziuddin A, Blazar BR, Zhang X, Elliott PJ, Murphy WJ. The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood* 2003; 102: 303-310.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675-1687.

Schimmer AD, Welsh K, Pinilla C, Wang Z, Krajewska M, Bonneau MJ, Pedersen IM, Kitada S, Scott FL, Bailly-Maitre B, Glinsky G, Scudiero D, Sausville E, Salvesen G, Nefzi A, Ostresh JM, Houghten RA, Reed JC. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell* 2004; 5: 25-35.

Schlegel J, Piontek G, Kersting M, Schuermann M, Kappler R, Scherthan H, Weghorst C, Buzard G, Mennel H. the *p16/cdkn2a/ink4a* gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. *Pathobiology* 1999; 67: 202-206.

Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal structure of a ternary FGF- FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 2000; 6: 743-750.

- Schlessinger J.** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225.
- Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ.** Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1682-1688.
- Schlingemann RO, Oosterwijk E, Wesseling P, Rietveld FJ, Ruiter DJ.** Aminopeptidase a is a constituent of activated pericytes in angiogenesis. *J Pathol* 1996; 179: 436-442.
- Schmidek HH, Nielsen SL, Schiller AL, Messer J.** Morphological studies of rat brain tumor induced by N-nitrosomethylurea. *J Neurosurg* 1971; 34: 335. -340.
- Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP.** CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 1994; 54:6321-6324.
- Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti PJ.** Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *Cell Biol* 1998; 141: 1659-73
- Semenza G.** Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 2003a; 54: 17-28.
- Semenza G.** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003b; 3: 721-731.
- Semenza GL.** Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24: 97-106.
- Sheehan J, Ionescu A, Pouratian N, Hamilton DK, Schlesinger D, Oskouian RJ Jr, Sansur C.** Use of trans sodium crocetinate for sensitizing glioblastoma multiforme to radiation: laboratory investigation. *J Neurosurg* 2008; 108: 972-978.
- Shen J, Samul R, Silva RL, Akiyama H, Liu H, Saishin Y, Hackett SF, Zinnen S, Kossen K, Fosnaugh K, Vargeese C, Gomez A, Bouhana K, Aitchison R, Pavco P, Campochiaro PA.** Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006; 13: 225-234.
- Shen L, Liang ACT, Lu L, Au WY, Kwong YL, Liang RHS, Srivastava G.** Frequent deletion of Fas gene sequences encoding death and transmembrane domains in nasal natural killer/T-Cell lymphoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 2123-2131.

Sherry MM, Reeves A, Wu JK, Cochran BH. STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells* 2009; 27: 2383-2392.

Shi E, Kan M, Xu J, Wang F, Hou J, McKeehan WL. Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 3907-3918.

Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 25-35.

Shih AH, Dai C, Hu X, Rosenblum MK, Koutcher JA, Holland EC. Dose-dependent effects of platelet-derived growth factor-B on glial tumorigenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 4783-4789.

Shim WS, Teh M, Bapna A, Kim I, Koh GY, Mack PO, Ge R. Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel plasticity of human cervical cancer in mice. *Exp Cell Res* 2002; 279: 299-309.

Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999; 154: 1785-1791.

Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Saitou Y, Ito K, Yamamoto N, Yamanaka T, Fujikawa K, Murata K, Nakano T. Overexpression of X-linked inhibitor of apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003; 12: 705-708.

Siekman AF, Lawson ND. Notch Signaling and the regulation of angiogenesis. *Cell Adh Migr* 2007; 1: 104-106.

Sleeman M, Fraser J, McDonald M, Yuan S, White D, Grandison P, Kumble K, Watson JD, Murison JG. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene* 2001; 271:171-182.

Soletti RC, Alves T, Vernal J, Terenzi H, Anderluh G, Borges HL, Gabilan NH, Moura-Neto V. Inhibition of MAPK/ERK, PKC and CaMKII signaling blocks cytolysin-induced human glioma cell death. *Anticancer Res* 2010, 30:1209-1215.

Solly F, Fish R, Simard B, Bolle N, Kruithof E, Polack B, Pernod G. Tissue-type plasminogen activator has antiangiogenic properties without effect on tumor growth in a rat C6 glioma model. *Cancer Gene Ther* 2008; 15: 685-692.

Song S, Wientjes MG, Gan Y, Au JLS. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8658-8663.

Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD- dependent manner but cannot functionally substitute caspase-8. *EMBO J* 2002; 21: 4520-4530.

Stahl A, Paschek L, Martin G, Feltgen N, Hansen LL, Agostini HT. Combinatory inhibition of VEGF and FGF2 is superior to solitary VEGF inhibition in an in vitro model of RPE-induced angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247: 767-773.

Stefanik DF, Rizkalla LR, Soi A, Goldblatt SA, Rizkalla WM. Acidic and basic fibroblast growth factors are present in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1991; 51: 5760-5765.

Stegh AH, Kesari S, Mahoney JE, Jenq HT, Forloney KL, Protopopov A, Louis DN, Chin L, DePinho RA. Bcl2L12-mediated inhibition of effector caspase-3 and caspase-7 via distinct mechanisms in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:10703-10708.

Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, Forloney KL, Zhang J, Schulze H, Park K, Hannon GJ, Yuan J, Louis DN, DePinho RA, Chin L. Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. *Genes Dev* 2007; 21: 98-111.

Stennicke HR, Ryan CA, Salvesen GS. Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 94-101.

Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2: 1361-1366.

Stuepp CS, Figuié M, Mendes FB, Braganhol E, Bernardi A, Frozza RL, Slbego CG, Canto RF, Russowsky D, Eifler-Lima VL, Battastini AM. Activity of LaSOM 65, a monastrol-derived compound, against glioblastoma multiforme cell lines. *Anticancer Res* 2013, 33: 4463-4468.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 392-401.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoom MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Caimcross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-996.

Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, Kirson ED, Taillibert S, Liebermann F, Dbalý V, Ram Z, Villano JL, Rainov N, Weinberg U, Schiff D, Kunschner L, Raizer J, Honnorat J, Sloan A, Malkin M, Landolfi JC, Payer F, Mehdorn M, Weil RJ, Pannullo SC, Westphal M, Smrcka M, Chin L, Kostron H, Hofer S, Bruce J, Cosgrove R, Paleologous N, Palti Y, Gutin PH. NovoTTF-100A versus physicians choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer* 2012; 48: 2192-2202.

Su G, Meyer K, Nandini CD, Qiao D, Salamat S, Friedl A. Glypican-1 is frequently overexpressed in human glioma and enhances FGF-2 signaling in glioma cells. *Am J Pathol* 2006; 168: 2014-2026.

Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors as multifunctional signalling factors. *Int Rev Cytol* 1999; 185: 45-106.

Taberner J, Shapiro G, LoRusso P, Cervantes A, Schwartz G, Weiss G, Paz-Ares L, Cho DC, Infante JR, Alsina M, Gounder MM, Falzone R, Harrop J, White AC, Toudjarska I, Bumcrot D, Meyers RE, Hinkle G, Svrzikapa N, Hutabarat RM, Clausen VA, Cehelsky J, Nochur SV, Gamba-Vitalo C, Vaishnav AK, Sah DW, Gollob JA, Burris HA 3rd. First-in-human trial of RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov* 2013; 3:406-417.

Takahashi JA, Fukumoto M, Igarashi K, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human glioma. *J Neurosurg* 1992; 76: 792-798.

Takahashi JA, Fukumoto M, Kozai Y, Ito N, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. Inhibition of cell growth and tumorigenesis of human glioblastoma cells by a neutralizing antibody against human basic fibroblast growth factor. *FEBS Lett* 1991; 288: 65-71.

Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5710-5714.

Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1796-1803.

Tamm I, Trepel M, Cardo-Vila M, Sun Y, Welsh K, Cabezas E, Swatterthwait A, Arap W, Reed JC, Pasqualini R. Peptides targeting caspase inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278: 14401-14405.

Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134.

Taylor EW, Ambati J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008a; 452:591-597.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008b; 9:231-241.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; 6: 529-535.

Theeler BJ, Yung WK, Fuller GN, De Groot JF. Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults. *Neurology* 2012; 79: 1917-1926.

Thesleff I, Jalkanen M, Vainio S, Bernfield M. Cell surface proteoglycan expression correlates with epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Dev Biol* 1988; 129: 565-572.

Thiessen B, Stewart C, Tsao M, Kamel-Reid S, Schaiquevich P, Mason W, Easaw J, Belanger K, Forsyth P, McIntosh L, Eisenhauer E. A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65: 353-361.

Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 2005; 287: 390-402.

Thomas KA, Rios-Candelore M, Gimenez-Gallego G, DiSalvo J, Bennett C, Rodkey J, Fitzpatrick S. Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6409-6413.

Thompson EM, Frenkel EP, Neuwelt EA. The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. *Neurology* 2011; 76: 87-93.

Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 2005; 96: 488-500.

Todo T, Kondo T, Kirino T, Asai A, Adams EF, Nakamura S, Ikeda K, Kurokawa T. Expression and growth stimulatory effect of fibroblast growth factor 9 in human brain tumors. *Neurosurgery* 1998; 43: 337-346.

Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 207-222.

Tsang M, Dawid IB. Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* 2004; 2004: pe17.

Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 165-169.

Tucker GC. Inhibitors of integrins. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 394-402.

Turner JD, Williamson R, Almefty KK, Nakaji P, Porter R, Tse V, Kalani MY. The many roles of microRNAs in brain tumor biology. *Neurosurg Focus* 2010; 28: E3.

Tysnes BB, Mahesparan R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *J Neurooncol* 2001; 53: 129-47.

Ueba T, Takahashi JA, Fukumoto M, Ohta M, Ito N, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. Expression of fibroblast growth factor receptor-1 in human glioma and meningioma tissues. *Neurosurgery* 1994; 34: 221-225.

Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 1996; 56: 150-153.

Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Birnbaum D, Basilico C, Jaye M, Alitalo K. Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J* 1992; 11: 4273- 4280.

Vamos M, Welsh K, Finlay D, Lee PS, Mace P, Snipas S, Gonzalez M, Ganji S, Ardecky R, Riedl S, Salvesen G, Vuori K, Reed J, Cosford N. Expedient synthesis of highly potent antagonists of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) with unique selectivity for ML-IAP. *ACS Chem Biol* 2013; 8: 725-732.

Van Loo G, Saelens X, van Gorp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1031-1042.

Van Noesel MM, van Bezouw S, Voute PA, Herman JG, Pieters R, Versteeg R: Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38: 226-233.

Van Vuurden DG, Shukla S, Wedekind LE, Kuipers GK, Noske DP, Vandertop WP, Lafleur MVM, Slotman BJ, Hulleman E, Kaspers GJL, Cloos J. Cytotoxicity and radiosensitization of high grade glioma cells by CI-1033, an irreversible pan-ErbB inhibitor. *J Cancer Sci Ther* 2013; 5: 249-255.

Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He TC, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B, Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Zhang W, Zhang X, Zhou W, Haluska FG, Jen J, Sukumar S, Landes GM, Riggins GJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999; 23: 387-388.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17: 98-110.

Verheul HM, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ, Pinedo HM. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2187-2190.

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins Puma and Noxa. *Science* 2003; 302: 1036-1038.

Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8219-8224.

Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, Aingom H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Aviv A, Pecker I, Friedmann Y. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J* 2000; 2: 37-45.

Vlodavsky I, Komer G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 203-226.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:594-604.

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997; 16: 5386-5397.

Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO- 2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000; 256: 58-66.

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E Jr, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Owens G, Ransohoff J 2nd, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR Jr, Wilson CB, Strike TA. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980; 303: 1323-1329.

Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 2008; 15: 261-271.

Wang S. Design of Small-Molecule Smac Mimetics as IAP Antagonists. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2011; 348: 89-113.

Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Lüthi U, Barberis A, Benjamin LE, Mäkinen T, Nobes CD, Adams RH. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010; 465: 483-486.

Watanabe K, Sakamoto M, Somiya M, Amin MR, Kamitani H, Watanabe T. Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. *Neurol Res* 2002; 24: 485-490.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996; 6: 217-223.

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359: 492-507.

Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151-1162.

Werner S, Duan DS, de Vries C, Peters KG, Johnson DE, Williams LT. Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 82-88.

Westermarck B, Heldin CH, Nistér M. Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* 1995; 15: 257-263.

Wick W, Wagner S, Kerkau S, Dichgans J, Tonn JC, Weller M. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 1998; 440: 419-424.

Widera D, Kaus A, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. Neural stem cells, inflammation and NF-kappaB: basic principle of maintenance and repair or origin of brain tumours? *J Cell Mol Med* 2008; 12: 459-470.

Wiedemann M, Trueb B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics* 2000; 69: 275-279.

Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, Kurpad SN, McLendon RE, Moscatello D, Pegram CN, Reist CJ, Traweek ST, Wong AJ, Zalutsky MR, Bigner DD. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995; 55: 3140-3148.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673-682.

Wilkinson DG, Bhatt S, McMahon AP. Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene int-2 suggests multiple roles in fetal development. *Development* 1989; 105: 131-136.

Williams CK, Li JL, Murga M, Harris AL, Tosato G. Upregulation of the Notch ligand Delta like 4 inhibits VEGF induced endothelial cell function. *Blood* 2006; 107: 931-939.

Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 931-946.

Wohlfart S, Sebinger D, Gruber P, Buch J, Polgar D, Krupitza G, Rosner M, Hengstschlager M, Raderer M, Chott A, Mullauer L. FAS (CD95) mutations are rare in gastric MALT lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004; 164: 1081-1089.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2965-2969.

Wong ET, Brem S. Antiangiogenesis treatment for glioblastoma multiforme: challenges and opportunities. *J Natl Compr Canc Netw* 2008; 6: 515-522.

Wu GS, Burns TF, McDonald ER III, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G, el-Deiry WS. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 1997; 17: 141-143.

Wu JL, Abe T, Inoue R, Fujiki M, Kobayashi H. IkappaBalphaM suppresses angiogenesis and tumorigenesis promoted by a constitutively active mutant EGFR in human glioma cells. *Neurol Res* 2004; 26: 785-791.

Wurl P, Kappler M, Meye A, Bartel F, Kohler T, Lautenschlager C, Bache M, Schmidt H, Taubert H. Co-expression of surviving and TERT and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Lancet* 2002; 359: 943-945.

Xia H, Cheung WK, Ng SS, Jiang X, Jiang S, Sze J, Leung GK, Lu G, Chan DT, Bian XW, Kung HF, Poon WS, Lin MC. Loss of brain-enriched miR-124 microRNA enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 9962-9971.

Xiao C, Yang BF, Asadi N, Beguinot F, Hao C. Tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand-induced death- inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 25020-25025.

Xu L, Stevens J, Hilton MB, Seaman S, Conrads TP, Veenstra TD, Logsdon D, Morris H, Swing DA, Patel NL, Kalen J, Haines DC, Zudaire E, St Croix B. COX-2 inhibition potentiates antiangiogenic cancer therapy and prevents metastasis in preclinical models. *Sci Transl Med* 2014; 6: 242ra84.

Yadav AK, Renfrow JJ, Scholtens DM, Xie H, Duran GE, Bredel C, Vogel H, Chandler JP, Chakravarti A, Robe PA, Das S, Scheck AC, Kessler JA, Soares MB, Sikic BI, Harsh GR, Bredel M. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA* 2009; 302: 276-289.

Yamada SM, Yamada S, Hayashi Y, Takahashi H, Teramoto A, Matsumoto K. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 4 correlated with the malignancy of human astrocytomas. *Neurol Res* 2002; 24: 244-248.

Yamaguchi F, Saya H, Bruner JIM, Morrison RS. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 484-488.

Yang L, Cao Z, Yan H, Wood WC. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res* 2003; 63: 6815-6824.

Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 2008; 33: 526-534.

Yuan J, Horvitz HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* 2004; 116 (Suppl 2): S53-S56.

Zachary I Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49:568-581.

Zhang J, Zhou B, Zheng CF, Zhang ZY. A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J Biol Chem* 2003; 278:29901-29912.

Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* 1999; 59 2747-2753.

Zhao S, Zhang X, Zhang J, Zhang J, Zou H, Liu Y, Dong X, Sun X. Intravenous administration of arsenic trioxide encapsulated in liposomes inhibits the growth of C6 gliomas in rat brains. *J Chemother* 2008; 20: 253–262.

Zhao XM, Citrin BS, Miller GG, Frist WH, Merrill WH, Fischell TA, Atkinson JB, Yeoh TK. Association of acidic fibroblast growth factor and untreated low grade rejection with cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 1995; 59: 1005-1010.

Zhao XM, Yeoh TK, Hiebert M, Frist WH, Miller GG. The expression of acidic fibroblast growth factor (heparin-binding growth factor-1) and cytokine genes in human cardiac allografts and T cells. *Transplantation* 1993; 56: 1177-1182.

Zheng F, Liao YJ, Cai MY, Liu YH, Liu TH, Chen SP, Bian XW, Guan XY, Lin MC, Zeng YX, Kung HF, Xie D. The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. *Gut* 2012; 61: 278-289

Zubilewicz A, Hecquet C, Jeanny JC, Soubrane G, Courtois Y, Mascarelli F. Two distinct signalling pathways are involved in FGF2-stimulated proliferation of choriocapillary endothelial cells: a comparative study with VEGF. *Oncogene* 2001; 20: 1403-1413.

