



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO

**“EFECTO DEL CELECOXIB MICROENCAPSULADO EN PARTICULAS DE PLGA
SOBRE LA ANGIOGÉNESIS EN TUMOR TA3-MTX-R EN RATONES (*Mus
musculus*)”**

IGNACIO JAVIER ROA HENRÍQUEZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN MORFOLOGÍA**

Director de Tesis

Prof. Dr. David Lemus Acuña

2014

*Dedico este trabajo a mi esposa Stephania quien me acompaña en
cada campaña por ardua que sea,
a mi familia a quienes amo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. David Lemus, por su confianza y el conocimiento adquirido bajo su tutela.

Al Prof. Carlos Rosas por su constante apoyo y consejos. Ambos han contribuido de manera importante en el desarrollo de esta tesis así como en mi formación como académico.

Al Dr. Jorge Ferreira de la Universidad de Chile y al Dr. Cristian Vilos de la Universidad de Santiago, por su importante contribución al desarrollo de la tesis, sin la cual no hubiese podido ser realizada.

A la Sra Irma Orellana y al Sr. Jorge Leiva, por su desinteresado apoyo técnico en el desarrollo de esta tesis.

A todos y cada uno de los que apoyaron mi estadía, Mariana, Carolina, Daniel, Claudio, Alvaro, Daniela, Guillermo, gracias por su alegría que cargo de energía mis días en el magister.

INDICE

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Marco Teórico	8
Angiogénesis	8
Factores Pro y Antiangiogénicos	9
VEGF	10
Estrategia antiangiogénica	13
Celecoxib	15
Micropartículas de PLGA	17
Hipótesis	23
Objetivo General y Específicos	23
Material y Método	24
Resultados	31
Discusión	50
Conclusiones	57
Referencias	58

RESUMEN

La angiogénesis es el proceso en el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura ya existente. Está fuertemente implicada en el crecimiento tumoral y metástasis, y si bien actualmente se han desarrollado terapias antineoplásicas que permiten reducir de cierta manera el avance tumoral, es necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas que permitan suprimir la angiogénesis. Es así como el Celecoxib (Cx) ha sido utilizado por su potente acción antiangiogénica en combinación con algunos compuestos poliméricos, tal como el PLGA, el cual ayudaría a mejorar la biodisponibilidad y evitaría efectos derivados de largas administraciones del fármaco. Para tal efecto se ha utilizado un modelo de tumor experimental, inducido por células TA3-MTX-R, en ratones, los cuales fueron tratados con dos presentaciones de Cx (Cx y Cx/PLGA). El objetivo central fue analizar el efecto del fármaco microencapsulado en partículas de PLGA, versus una administración intramuscular sin las micropartículas. Los resultados indican que no hubo una significancia estadística en cuanto a la disminución de la microvascularización así como en la disminución del crecimiento tumoral. Por otra parte, existió disminución en la expresión de VEGF y de la proliferación celular además del aumento de la apoptosis, resultados que lograron ser mejores en el grupo que fue inoculado con Cx/PLGA ($P < 0,0001$). El efecto antiangiogénico del Cx está bien reportado en la literatura; este sumado a la microencapsulación con PLGA, aportarían un sistema de administración útil, ya que nos otorga una administración sostenida en el tiempo, lo cual podría ayudar a mantener los niveles de droga durante un período más prolongado, lo cual sería beneficioso en la terapia tumoral antiangiogénica.

PALABRAS CLAVE: Angiogénesis; VEGF; Celecoxib; PLGA.

ABSTRACT

Angiogenesis is the process whereby new blood vessels are generated from existing vasculature. It is strongly implicated in tumor growth and metastasis, and while there have now been developed antineoplastic therapies that reduce certain ways of tumor progression, it is necessary to find new therapeutic alternatives to suppress angiogenesis. Thus Celecoxib (Cx) has been used for its strong anti-angiogenic action in combination with certain polymeric compounds such as PLGA, which would improve the bioavailability and avoid effects resulting from long drug administrations. For this purpose we used a model of experimental tumor induced TA3 -MTX -R cells in mice, which were treated with two forms of Cx (Cx and Cx / PLGA). The main objective was to analyze the effect of microencapsulated drug particles PLGA versus intramuscular administration without the microparticles. The results indicate that there was no statistical significance in terms of decrease of the microvasculature as well as in reducing tumor growth. Furthermore, there was decreased expression of VEGF and cellular proliferation in addition to increased apoptosis, results achieved do better in the group that was inoculated with Cx / PLGA ($P < 0.0001$). The antiangiogenic effect of Cx is well reported in the literature, this added to the microencapsulation with PLGA, would provide a set of useful management because it gives us a sustained release over time, which may help maintain drug levels for a longer period, which would be beneficial in tumor therapy antiangiogenic.

KEY WORDS: Angiogenesis; VEGF; Celecoxib; PLGA.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es un proceso que permite el desarrollo de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes (Fakhejahani & Toi, 2012). Este está implicado tanto en la reparación de heridas, como en diversos procesos patológicos tales como el cáncer, donde juega un rol fundamental, para su crecimiento y capacidad invasiva (Folkman, 1971; Carmeliet & Jain, 2011). La angiogénesis normalmente está regulada por factores pro y antiangiogénicos, balance que se pierde durante el proceso tumoral, en el cual se estimulan las vías proangiogénicas. El más importante de los mediadores proangiogénicos es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual se encuentra en concentraciones elevadas durante la angiogénesis tumoral (Gavalas *et al.*, 2013). Algunos inhibidores selectivos de la COX-2, tal como el Celecoxib, han sido utilizados como factores antiangiogénicos en variedades de tumores, gracias a su acción sobre el VEGF (Dai *et al.*, 2012). Con el fin de mejorar la disponibilidad de estos fármacos y evitar los efectos adversos que presentan, estos han sido asociados a diversas sustancias poliméricas para crear nuevos sistemas de liberación de fármacos, tales como el ácido poli-láctico/glicólico (PLGA), el cual ha sido particularmente importante en la formulación de micro y nanoesferas como dispositivos de liberación sostenida del fármaco en el tiempo (Dhanda & Kompella, 2005). Actualmente estas técnicas son utilizadas en medicina con variadas aplicaciones entre ellas la terapia antiangiogénica en cáncer (Kim *et al.*, 2011). El objetivo del presente estudio es analizar la efectividad de la asociación de Celecoxib y PLGA con el fin de comprobar su efectos en la disminución de la angiogénesis en tumor sólido inducido por células tumorales TA3-MTX-R en ratones (*Mus musculus*), al ser comparado con una versión no encapsulada.

MARCO TEORICO

Angiogénesis

La angiogénesis (AG) puede ser descrita como el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes (Fakhejehani & Toi, 2012). Esta incluye fenómenos tales como: migración y proliferación de células endoteliales (CEs), formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables (Dvorak, 2005; Fakhejehani & Toi, 2012).

Evidencia reciente indica la existencia de cuatro tipos de mecanismos involucrados en la AG, dos que se establecen durante AG normal y dos en la AG tumoral que estarían implicados en distintos momentos en el proceso tumoral, durante el crecimiento y remodelación de los vasos sanguíneos. Estos mecanismos son: la ramificación (brotes) en la cual los vasos sanguíneos se dividen dicotómicamente formando nueva vasculatura y la intususcepción en la cual la pared del vaso se invagina formando un tabique luminal formando ramificaciones nuevas. En la AG tumoral por su parte, las células tumorales (CT) se mimetizan adoptando un fenotipo endotelial formando una red vascular, fenómeno conocido como mimetismo. Por otro lado la coopción se caracteriza por la habilidad de crecimiento del tumor hacia lechos vasculares preexistentes (De Spiegelaere *et al.*, 2012).

Proliferación persistente de CEs se presenta durante el ciclo reproductivo de la mujer, cicatrización de heridas (Carmeliet, 2005) y en diversos procesos patológicos como artritis reumatoide, psoriasis, y retinopatía proliferativa, cáncer etc. En efecto, algunos tumores, especialmente los sólidos, inducen vasos sanguíneos que promueven crecimiento mediante el suministro de nutrientes, oxígeno, y eliminación de residuos además de la capacidad metastásica. Existe evidencia de que tumores precoces de mama muy vascularizados se correlacionan con un mal pronóstico, cuadro donde el bloqueo de factores angiogénicos es importante (Fan *et al.*, 2012).

Factores Pro y Antiangiogénicos

La AG normalmente es regulada por factores pro y antiangiogénicos. Es aquí donde juega un rol importante el término "*switch angiogénico*", acuñado en los años ochenta, se refiere a un evento de tiempo limitado durante la progresión tumoral en el cual existe un equilibrio entre los factores pro y antiangiogénicos (Baeriswyl & Christofori, 2009).

Los inhibidores o factores antiangiogénicos, corresponden a un grupo de moléculas que participan del balance angiogénico e inhiben la AG, tales como Arrestenos, Canstatinas, Endorrepelinas, Trombospondinas, Endostatinas (Folkman, 2007).

Por su parte, un factor proangiogénico es una molécula que puede alterar en forma selectiva a las CEs y estructuras perivasculares asociadas con el fin de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos (Schalper *et al.*, 2003). El principal factor es el VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial), y además de éste existen distintas moléculas implicadas en la regulación positiva de la AG, incluyendo al factor de crecimiento de fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), angiogenina, interleucina 8 (IL-8) y las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang-1 y 2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF derivado de la glándula endocrina (EGVEGF), leptina, las prostaglandinas, lípidos, entre otros. Algunos de ellos como el TGF- α y bFGF, actuando al menos en parte, en la regulación de la expresión del VEGF (Dvorak, 2005). Sin duda VEGF es uno de los más importantes factores proangiogénicos debido a su participación crucial en los procesos angiogénicos (Yancopoulos *et al.*, 2000).

VEGF

La familia VEGF está conformada por seis citoquinas; VEGFA, B, C, D, E, y el factor de crecimiento placentario (PGF o PLGF), así como de sus respectivos receptores (VEGFRs), entre los cuales encontramos; VEGFR1 y 2 (Mäkinen *et al.*, 2001; Kaplan

et al., 2005; Veikkola *et al.*, 2000). Son los factores más críticos en la regulación de los procesos de vasculogénesis, AG y linfangiogénesis. VEGFA es un regulador esencial de la vasculogénesis y la AG, actuando principalmente en las CEs promoviendo la división celular y la migración. VEGFB actúa principalmente como un factor de supervivencia para las CEs, células musculares lisas presentes en los vasos y los pericitos (Oklu *et al.*, 2010). VEGFC es esencial para linfangiogénesis y en los tumores humanos, su expresión se ha correlacionado con el desarrollo de la metástasis linfática (Ohta *et al.*, 2003). A su vez VEGFD promueve la metástasis linfática en modelos tumorales experimentales de ratón. La expresión de este ha demostrado ser un indicador de mal pronóstico para el carcinoma de endometrio (Yokoyama *et al.*, 2003). PGF, al igual que VEGFB, promueve la supervivencia de las CEs y modula la actividad de señalización de VEGFA (Adini *et al.*, 2002).

Los receptores de la familia VEGF pertenecen a una subfamilia de receptores tirosina-kinasa transmembrana de la clase III (TKs; RTKs) que se expresan en altos niveles en las CEs. Existen tres tipos de receptores para VEGF (VEGFRs); VEGFR1, regula negativamente la AG mediante la modulación de la actividad de VEGFR2. VEGFR1 es requerida para el normal desarrollo y ensamblaje de angioblastos en los vasos sanguíneos (Kaplan *et al.*, 2005).

VEGFR2 se expresa principalmente en las CEs activas y sus precursores embrionarios, además es necesario para diferenciación de los angioblastos durante

la vasculogénesis, mientras que VEGFR3 es predominantemente expresada en endotelio linfático (Mäkinen *et al.*, 2001). Células progenitoras hematopoyéticas expresan VEGFR1 y precursores de CEs expresan VEGFR2 son ambos implicados en la promoción de la vascularización de los tumores primarios (Kaplan *et al.*, 2005).

Todas las isoformas del VEGF son capaces de unirse a alguno de estos tres receptores: VEGFR-1 (*Flt-1*), VEGFR-2 (KDR o *Flk-1*) (Partanen & Paavonen, 2001) y/o VEGFR-3 (*Flt-4*) (Veikkola *et al.*, 2000; Ferrara, 2002). Además, algunos VEGFs que se unen al VEGFR-1 y/o VEGFR-2 también pueden unirse a co-receptores como las neuropilinas (NRPs) (Ferrara, 2002). Al igual que otros RTKs, los VEGFRs se dimerizan y experimentan trans-autofosforilación con la unión al ligando, desencadenando una cascada de señalización fosforilando distintas proteínas, como la proteína kinasa-C (PKC), fosfolipasa C-gamma (PLC- γ), fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), regulando mecanismos involucrados en AG, activados por el VEGF (Dvorak, 2005).

El fenómeno AG se lleva a cabo principalmente por los siguientes pasos; unión de la molécula señal, VEGF a un receptor de membrana de ECs (VEGFR1 *Flt-1*), lo cual promueve la fosforilación de su respectivo receptor. Como consecuencia de esta fosforilación, se activan varias rutas intracelulares: a) la vía de señalización MEK/ERK, que media la proliferación de células endoteliales; b) una cascada en la que interviene la activación de kinasa de adhesión focal (FAK), que media la

reorganización del citoesqueleto y la migración celular; c) la vía fosfoinositol 3- kinasa (PI3K), que media la supervivencia de las células, y d) activación de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ), que regula la permeabilidad vascular y la proliferación celular (Fig. 1) (Oklu *et al.*, 2010; Carmeliet & Jain, 2011, Fan *et al.*, 2012).

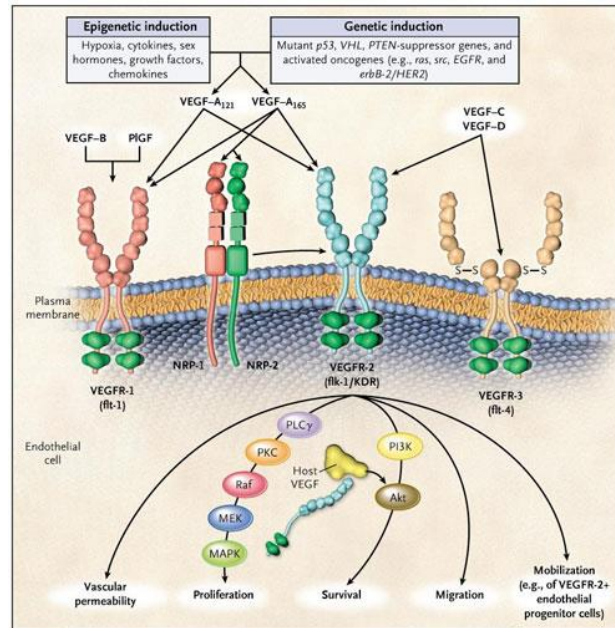


Fig. 1: Familia de VEGF, receptores y vías de señalización.

Tomado de Kerbel, Tumor Angiogenesis. N. Eng. J. Med. 358:2039-49, 2008.

Estrategia Anti-Angiogénica

El VEGF y sus receptores juegan un papel fundamental en los distintos eventos tumorales tales como la AG y metástasis, por lo que su inactivación resulta conveniente dentro de las estrategias anti-angiogénicas. Las CEs corresponden al principal blanco de esta estrategia porque, en teoría, su estabilidad genómica no les

permitiría adquirir resistencia a las intervenciones antiangiogénicas (Carmeliet, 2005).

En virtud de que el VEGF es uno de los factores clave en la promoción de la AG, se han llevado a cabo distintos esfuerzos para inhibirlo, uno de estos es el desarrollo de anticuerpos específicos, como es el caso de Bevacizumab (Avastin®), que es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado contra el VEGFA₁₆₅ (rhu Mab VEGF), así como el pegaptinib, un aptamero que bloquea al mismo factor, para el tratamiento de cáncer colorectal metastásico en combinación con regímenes de quimioterapia basada en 5-fluorouracilo y el ranibizumab, que es un fragmento molecular de un anticuerpo monoclonal (Fab) que neutraliza a todas las isoformas del VEGF, los cuales son ampliamente utilizados en las terapias antiangiogénicas (Ferrara & Kerbel, 2005).

Además de los fármacos que actúan específicamente a nivel de VEGF, los glucocorticoides; también poseen un efecto antiangiogénico (Illanes *et al.*, 2002; Zúñiga *et al.*, 2003). Se ha comprobado de manera experimental que la betametasona tendría capacidad de disminuir la densidad microvascular, además de disminuir el volumen tumoral, mejorando así el tiempo de supervivencia (Garrido *et al.*, 2010).

Por otra parte la calreticulina, proteína multifuncional, derivada de *Trypanosoma cruzi*, ha demostrado poseer una potente actividad antiangiogénica en distintos modelos experimentales (Toledo *et al.*, 2010). Dentro sus efectos antiangiogénicos, podemos encontrar inhibición de la morfogénesis y migración de las células

experimentales, eventos indispensables durante el proceso de AG (López *et al.*, 2010).

Celecoxib

Otro de los fármacos altamente estudiado como agente antiangiogénico, está el Celecoxib (Cx), potente inhibidor de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), que es actualmente utilizado como anti-inflamatorio en el tratamiento de la artritis reumatoide y la osteoartritis. Este ha sido objeto de investigación en el tratamiento de diversos tumores malignos y premalignos, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de mama de pulmón y próstata (Gosh *et al.*, 2010).

Además investigaciones han demostrado que la COX-2 se sobreexpresa con frecuencia en diversos tipos de cáncer del tracto gastrointestinal, tales como el cáncer colorrectal, el carcinoma de esófago, cáncer gástrico y cáncer de páncreas (Masferrer *et al.*, 2000), por lo cual su inhibición resultaría beneficiosa en el tratamiento de estos.

Cada vez más estudios han demostrado que los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) no selectivos, así como los inhibidores selectivos de la COX-2, pueden reducir la proliferación celular, inducir la apoptosis, promover la vigilancia inmunológica, y/o reducir la AG (Fig. 2) (Hilmi & Goh, 2006, Husain *et al.*, 2002).

Los mecanismos por los cuales Cx actúa inhibiendo la AG estarían dados por su capacidad de inhibir la motilidad endotelial y por la inhibición de la producción de factores proangiogénicos como el VEGF-A (Gosh *et al.*, 2010).

En estudios de la acción de Cx administrado vía oral, sobre el tumor TA3-MTX-R en ratones, se observó que el fármaco disminuyó los síntomas asociados a la presencia del tumor así como la invasión tumoral, proliferación celular, y la presencia de factores proangiogénicos, mientras que la apoptosis de células tumorales se vio aumentada, debido presumiblemente a la acción del Cx sobre la producción de VEGF, Prostaglandinas y Survivina (Rosas *et al.*, 2014).

Si bien los efectos del Cx son favorables, su administración oral durante tiempos prolongados causarían complicaciones tales como toxicidad sistémica (Bombardier *et al.*, 2000) y problemas gastrointestinales (Silverstein *et al.*, 2000) o daño y eventos cardiovasculares (Cadwel *et al.*, 2006). Otros estudios indican que la administración frecuente en animales de experimentación de altas dosis de Cx oral, causaría infiltración mononuclear, hiperplasia y degeneración a nivel renal, además de pérdida de algunas funciones hepáticas (Koçkaya *et al.*, 2010).

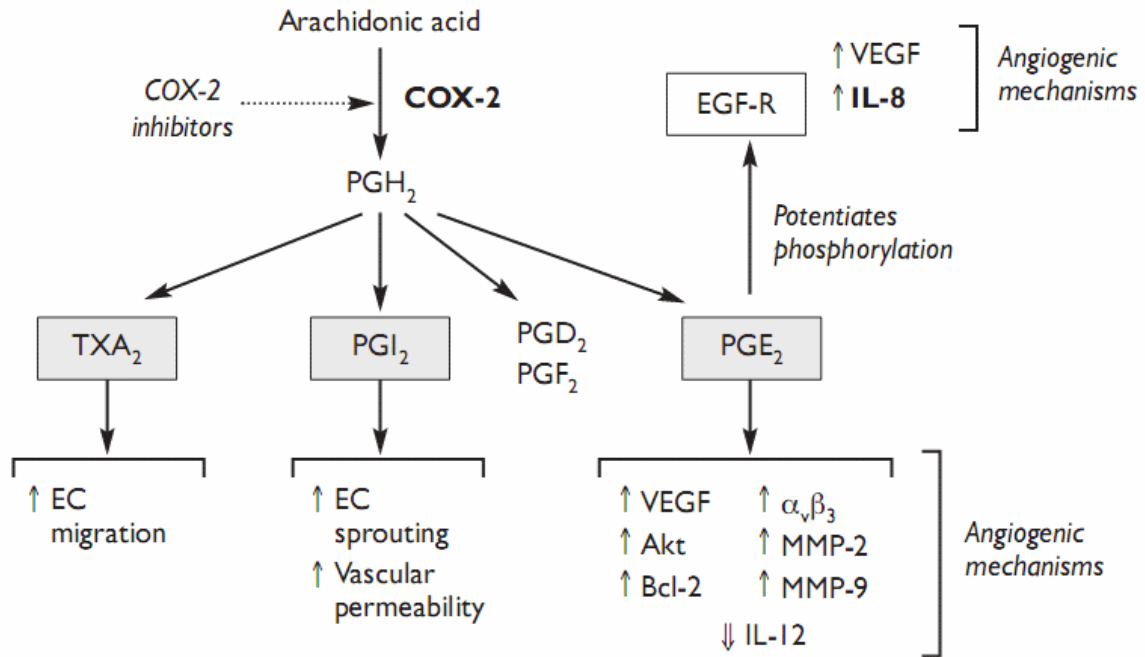


Fig. 2: Vías de activación de angiogénesis dependientes de COX-2.

Tomado de Gately & Li. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol.*, 31(Suppl 7):2, 2004.

Micropartículas de PLGA

La administración convencional de medicamentos (es decir, tabletas, cápsulas e inyecciones), y la solubilidad limitada de los fármacos a menudo requieren dosis altas para alcanzar suficientes concentraciones de fármaco en su sitio de acción para lograr un efecto terapéutico apropiado. Además de que la aplicación de algunos protocolos terapéuticos requieren la administración de dosis repetidas para mantener una concentración adecuada de fármaco en el torrente sanguíneo y proporcionar una acción terapéutica durante largos períodos de tiempo. Las concentraciones en

sangre de los medicamentos y la administración de dosis múltiples pueden generar fluctuaciones significativas de fármaco en el torrente sanguíneo, que puede alcanzar los parámetros toxicológicos , y generar reacciones adversas para los pacientes. Todos estos inconvenientes han llevado a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces y con menos efectos secundarios para los pacientes (Vilos & Velasquez, 2011).

El avance de la ciencia de los materiales y la tecnología farmacéutica ha permitido la creación de varias estrategias para la administración de fármacos, tales como micropartículas poliméricas. Los principales objetivos de estos dispositivos de administración de fármacos son la generación de una liberación sostenida del fármaco en el tiempo, un número reducido de dosis necesarias para el tratamiento de enfermedades, y la protección de los fármacos de la inactivación antes de alcanzar el tejido diana (Vilos & Velasquez, 2011).

El proceso de microencapsulación, que se define como el recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una película de material polimérico o graso, que origina partículas micrométricas de flujo libre. El producto de este proceso tecnológico se denomina “micropartícula”, “microcápsula” o “microesfera”, y son sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna (Remuñan & Alonso, 1997).

Entre los materiales más utilizados están los polímeros sintéticos tales como los derivados acrílicos y los poliésteres. Estos últimos son polímeros de carácter

biodegradable, lo que permite su administración por la vía parenteral. Entre ellos, los más conocidos son la poli-caprolactona, el ácido poliláctico, y los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico (PLGA) (Vilos & Velasquez, 2012).

El PLGA es utilizado en formulaciones en el sector farmacéutico y que está formado por unidades de ácido láctico y ácido glicólico. Este polímero, soluble en disolventes orgánicos pero insoluble en agua, es además, biodegradable y biocompatible, por lo que se puede administrar por vía parenteral sin problemas de toxicidad. Estos sistemas se caracterizan por liberar de forma controlada; péptidos, proteínas o plásmidos durante un período de tiempo de 1 a 4 semanas, lo que los hace atractivos para una administración subcutánea o intramuscular de compuestos de distintas naturaleza (Remuñan & Alonso, 1997).

Las micropartículas de PLGA pueden ser administradas en una variedad de tejidos tendiendo a permanecer en ellos por largo tiempo. Por ejemplo, 60 mg de partículas en suspensión, inyectados en el nervio isquiático pudieron ser observadas en el lugar de inyección 8 semanas más tarde (Kohane, 2007). Existe diferencia en la biodisponibilidad de estos elementos si comparamos micro y nanopartículas, es así como micropartículas inyectadas en el peritoneo de ratones, permanecieron allí durante al menos dos semanas, por el contrario, igual masa de nanopartículas del mismo material mostró desaparición casi completa del peritoneo en el mismo período de tiempo (Kohane *et al.*, 2002).

Las partículas tienen la capacidad de penetrar en las células por un conjunto de procesos que incluyen fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis permite captar estructuras de hasta 10 μm de diámetro, puede ser realizado por células tales como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas. La pinocitosis por su parte, puede ser realizado por todos los tipos de células, donde pueden captar un material inferior a 1 μm además de sustancias en disolución (Tabata & Ikada, 1988).

La mayoría de las partículas, si se inyectan en concentraciones suficientes, provocarán una respuesta inflamatoria aguda, con macrófagos y neutrófilos. Después de aproximadamente 7 a 14 días, la inflamación crónica con linfocitos y macrófagos continuará, sobre todo si el material particulado aún está presente (Kohane, 2007).

Otra característica es que en las partículas de mayor tamaño será menos probable que se desplacen desde el sitio diana en el largo plazo no así las nanopartículas que tienen una tendencia a dejar un lugar donde quieren ser mantenidos (Yeo *et al.*, 2007).

Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de los fármacos, es que estos han sido asociados a PLGA, donde en formulaciones de nano y micropartículas han sido usadas en conjunto con múltiples agentes antiangiogénicos en terapias antitumorales (Arand *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2011).

Qi *et al.*, (2011) utilizaron PNAS-4 humano (Hpnas-4), un gen pro-apoptótico, el cual posee la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral al ser sobreexpresado en células

tumorales, junto con cisplatina, en carcinoma ovárico, lo cual trajo consigo un aumento en la inducción de la apoptosis, inhibición de la proliferación celular y supresión de la AG.

Zhang *et al.* (2010), estudiaron los efectos de la temozolomida, fármaco ocupado en la terapia anticáncer en tumores del SNC, microencapsulado en PLGA, en conjunto con Vetalanib, inhibidor del receptor de VEGF, sobre un modelo de glioma ortotópico en rata, estos encontraron que la combinación de estos fármacos trajo consigo una disminución en el volumen del tumor, mejorando así el tiempo de supervivencia, así como un incremento en el número de CT apoptóticas e inhibición de la AG tumoral.

Chen *et al.* (2010) utilizaron Docetaxel, un potente agente antitumoral, usado como quimioterapéutico, el cual fue microencapsulado con PLGA, y usado en el hepatoma humano, donde se demostró ser más efectivo al disminuir la actividad angiogénica del tumor.

Otras sustancias han sido utilizadas microencapsuladas junto con PLGA, para la terapia anticáncer, es así como Mukerjee & Vishwanatha (2009) utilizaron curcumina cargada en nanoesferas de PLGA, como terapia contra el cáncer de próstata. Estos autores concluyeron que al asociar la curcumina con las nanoesferas de PLGA, esta era entregada durante un período más prolongado y sostenido en el tiempo, convirtiéndose así en un potencial candidato para la terapia en líneas celulares de cáncer de próstata.

Dentro de los fármacos utilizados en la terapia antiangiogénica está el Celecoxib, el cual ha sido ocupado para evaluar la disminución de la AG en patologías oculares de tipo vascular, donde se ha visto una disminución de la vascularidad (Amrite *et al.*, 2006),

Por su parte Dhanda & Kompella (2005), describieron el uso de Celecoxib encapsulado en micropartículas de PLGA, administrado a nivel de la tráquea el cual redujo significativamente los niveles de VEGF y de PGE2, en un modelo de tumor pulmonar en ratones de la cepa AJ.

Dado que ha sido relatada la efectividad de la acción antiangiogénica del Celecoxib y que han sido descritos múltiples efectos adversos en su utilización en altas dosis por largo tiempo, es necesario evaluar nuevas vías de administración tales como las otorgadas gracias a la microencapsulación con PLGA. El motivo principal del presente estudio es comprobar la efectividad en la disminución de la angiogénesis del Celecoxib microencapsulado en PLGA, en tumor sólido inducido por células tumorales TA3-MTX-R en ratones (*Mus musculus*).

HIPÓTESIS

La aplicación de Celecoxib microencapsulado con partículas de PLGA disminuye la proliferación de vasos sanguíneos tumorales en ratones (*Mus musculus*) inoculados con la línea tumoral TA3-MTX-R.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta angiogénica de las células TA3-MTX-R, en ratones tratados con Celecoxib microencapsulado en partículas de PLGA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el crecimiento tumoral en ratones inoculados con células TA3-MTX-R, tratados con Celecoxib microencapsulado v/s no encapsulado.
2. Evaluar el desarrollo de metástasis en ratones inoculados con células TA3-MTX-R, tratados con Celecoxib microencapsulado v/s no encapsulado.
3. Cuantificar la densidad microvascular en el tumor TA3-MTX-R, de ratones sometidos a Celecoxib microencapsulado en PLGA.
4. Comprobar la inocuidad del PLGA como antioangiogénico.
5. Evaluar la proliferación celular, la producción de VEGF y la apoptosis por medio de técnicas inmunohistoquímicas.
6. Comparar los efectos de dos medios de administración de Celecoxib en el desarrollo del tumor TA3-MTX-R.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Para el presente estudio se utilizaron 30 ratones hembras (*Mus musculus*) cepa AJ, clínicamente sanos, de 2 meses de edad con un peso promedio de 23 gr, obtenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Fueron mantenidos *ad libitum*, en jaulas conservadas a temperatura ambiente y de acuerdo a las normas impuestas por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA # 0498 FMUCH).

Línea Tumoral

Se utilizaron células tumorales TA3-MTX-R, de crecimiento ascítico provenientes de una línea tumoral mamaria TA3, que es resistente a Metotrexato (MTX) (Guerrero *et al.*, 1992), estas fueron donadas por el Prof. Jorge Ferreira, del Laboratorio de Bioenergética y Cáncer, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las células TA3-MTX-R fueron seleccionadas a partir de un tumor ascítico TA3 *in vivo*, a través de trasposos sucesivos del fluido ascítico de los ratones, tratados por vía peritoneal con MTX. La dosis de MTX fue aumentada con cada trasposo, de 0,1 a 2,5 mg/kg/48 hrs., de acuerdo a lo descrito por Gajardo *et al.* (2001). Esta línea

tumoral es resistente además a Vinblastina, 5-Fluoruracilo, Cisplatino y CARFENISOP.

La obtención de las células tumorales de la línea TA3-MTX-R se realizó al sexto día post-inoculación intraperitoneal de células tumorales contenidas en el fluido ascítico de ratones de la cepa AJ. Una vez eutanasiados, se obtuvo 2 mL de líquido ascítico y se diluyeron en 8 mL de suero fisiológico. Luego se realizó un conteo en cámara de Neubauer, donde se obtuvo una concentración final de 2×10^6 células por mL de la suspensión tumoral.

Con el fin de verificar la vitalidad de las células tumorales se tomaron 25 μ L de la suspensión de células tumorales y se mezclaron con 25 μ L de Azul de Trypan 0,5%, obteniendo un 97% de células vitales.

Posteriormente, se procedió a inocular a los grupos de ratones que recibirán las células tumorales por vía intramuscular en el miembro posterior derecho, con 0,2 mL del líquido ascítico tratado anteriormente.

Preparación del Celecoxib/Droga

Se utilizó Celecoxib 200 mg (Celebra®, Pfizer©). Para la administración del fármaco se diluyó una cápsula en el agua destilada hasta alcanzar la concentración media de 1000 ppm.

Por otra parte se encapsuló Celecoxib 200 mg (Celebra® de Laboratorios Pfizer©) en microcápsulas de PLGA de acuerdo a lo descrito por Ayalasomayajula & Kompella (2005), en una concentración media de 1000 ppm. Se utilizó PLGA (poli (D, L-láctico-co-glicólico)) con una proporción de monómero 50:50, de terminación éster y viscosidad de 0,15-0,24; 0,26-0,54 y 0,55-0,75 dl/g (Lactel absorbibles Polymers, Pelham, Alabama, EE.UU.). El poli (vinil-alcohol) (PVA) fue hidrolizado un 87-90%, con un peso promedio 30,000-70,000 mol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). El diclorometano (DCM) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

Las micropartículas (MPs) de PLGA fueron preparadas por método de emulsión de evaporación del disolvente agua-agua-aceite (w/o/w). Una solución de 1 mL de agua doble destilada fue emulsificada en 5 mL de DCM que contuvo 100 mg de PLGA, utilizando un homogeneizador de alta velocidad a 35.000 rpm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de sistema Ultra-Turrax. En esta primera emulsión (w/o) se agregó a 50 ml de PVA al 1% (1 mg / mL) y emulsionó con el mismo sistema. En la emulsión final (w/o/w) se procedió a mezclar con 100 ml de poli vinil alcohol (PVA) a 0,01%. Las micropartículas fueron posteriormente recolectadas por filtración. Una vez tamizadas, las microesferas fueron liofilizadas y almacenadas a -20 °C. Se obtuvieron micropartículas de entre 0,5 y 10 µm de diámetro. La microencapsulación del fármaco se realizó en el Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de Santiago, Chile.

Grupos experimentales

Se utilizaron 30 ratones (*Mus musculus*) de la cepa AJ, los que fueron divididos en 5 grupos de la siguiente manera (Tabla I):

Tabla I Distribución y tratamiento de grupos experimentales.

Grupos	N	Tratamiento*
1	6	0,2 mL TA3-MTX-R + Cx 1000 ppm
2	6	0,2 mL TA3-MTX-R + 50 mg Cx (1000 ppm)/PLGA
3 (control)	6	0,2 mL TA3-MTX-R
4	6	0,2 mL TA3-MTX-R + 50 mg PLGA
5	6	50 mg PLGA

Tanto las células TA3-MTX-R como el Celecoxib microencapsulado en PLGA y no microencapsulado y la partículas de PLGA, fueron administradas en una monodosis vía intramuscular en el miembro posterior derecho, previa desinfección del sitio de punción.

El diámetro del tumor se obtuvo diariamente, con la ayuda de un caliper digital, en donde se midió el ancho y largo de este. El volumen se calculó en base a las medidas tomadas con el caliper y usando la fórmula de O'Reilly (O'Reilly *et al.*, 1997):

$$\text{Volumen} = \text{ancho}^2 \times \text{largo} \times 0,52$$

Se dejó que el tumor evolucionara hasta el día de muerte del primer animal del Grupo 3 (TA3-MTX-R) y se procedió a la eutanasia de todos los ratones y a la extracción de los tumores, realizando una descripción inmediata. Además de las muestras de tumor, se tomaron muestras de hígado, pulmón, corazón, para evaluar los efectos de la terapia y de la presencia de las células del tumor TA3-MTX-R, de cada uno de los grupos en comparación al Grupo 3. Los aspectos a evaluar fueron la celularidad y presencia de metástasis, según lo descrito por Rosas *et al.* (2013). Tanto los tumores como las muestras de los órganos fueron fijados en Formalina tamponada al 10% durante 48 horas.

Técnicas Histológicas e Histoquímicas

Para el estudio histológico e histoquímico se utilizó el protocolo de acuerdo a las técnicas descritas por Prophet *et al.* (1995). Se obtuvieron cortes histológicos de 4 a 5 μm y teñidos con las siguientes técnicas:

1. Hematoxilina-Eosina-Azul Alcían.
2. Arteta.
3. Acido Peryódico de Schiff (PAS).

Técnicas Inmunohistoquímicas

Evaluación de Proliferación Celular

Para la evaluación de la proliferación de células se utilizaron cortes histológicos en los que se detectó la presencia de Ki-67, proteína que se caracteriza por estar presente durante las fase G1, S, G2 y M del ciclo celular y ausente en la fase G0. Esta característica la hace excelente para determinar una fracción de crecimiento de una población celular. Para el estudio de Ki-67 se usará el Anticuerpo Primario “*Ki-67 Antigen Rabbit Polyclonal Antibody*” (Novocastra, Cat# NCL-Ki67-P) y será revelado por “HistoMouse-MAX Kit” (Invitrogen) y que se basa en el uso de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y revelado posteriormente con Amino Etil Carbasol (AEC).

CONTROL NEGATIVO: Se reemplazó el Anticuerpo Primario por Suero No Inmune de Conejo.

CONTROL POSITIVO: Se incluirán cortes histológicos de Intestino de Ratón.

Evaluación de Presencia de VEGF

Para su detección se utilizó el Anticuerpo Primario “Anti-VEGF₁₆₅ Polyclonal Antibody” (Millipore®). Para el revelado se utilizará “HistoMouse-MAX Kit” (Invitrogen).

CONTROL NEGATIVO: Se reemplazará el Anticuerpo Primario por Suero No Inmune de Conejo.

CONTROL POSITIVO: Se incluirán cortes de Placenta.

Evaluación de la Apoptosis

Para la evaluación de la apoptosis se utilizó el kit *FragEL™ DNA Fragmentation Detection* (Calbiochem®). Este sistema se basa en el marcaje de DNA fragmentado de células apoptóticas usando un ensayo TUNEL modificado. El nucleótido biotinilado se une al extremo 3'-OH del DNA usando la enzima terminal deoxynucleotidyl transferasa recombinante (rTdT). Luego la streptavidina-HRP se une a los nucleótidos biotinilados, los que son detectados usando el sustrato peroxidasa, peróxido de hidrógeno, y el cromógeno estable, diaminobenzidina.

CONTROL NEGATIVO: Se reemplazó el TdT por Agua destilada.

CONTROL POSITIVO: Se incluyeron placas con Células HL60 tratadas con Actinomicina D.

Evaluación de la densidad microvascular

Se procedió a hacer un conteo de vasos sanguíneos en muestras histológicas de tumor y pulmón con ayuda de un Microscopio óptico (Zeiss® Primo Star, Gottingen, Germany) con un aumento de 400X, empleando un retículo graduado de 1 cm² dividido en 10 segmentos.

RESULTADOS

Celecoxib microencapsulado en PLGA no disminuye el crecimiento tumoral en ratones inoculados con células TA3-MTX-R.

Al comienzo de la etapa experimental, todos los ratones presentaron las mismas condiciones de salud y no mostraron síntomas que los diferenciaron uno de otro.

Luego de 4 a 6 días de realizada la inoculación, se observó que los grupos 1, 2, 3 y 4 comenzaron a exhibir un aumento del volumen en la zona del muslo (Fig.3) Cabe destacar que durante el transcurso de los días ya mencionados hubo un crecimiento tumoral, el cual no fue evidente, hasta la fecha ya mencionada. El grupo 5 no presentó aumento del volumen en la zona del muslo, además de no presentar reactividad o inflamación visible al contacto con el PLGA inyectado.

Entre los días 1 y 5 post tratamiento, los grupos presentaron volúmenes en el muslo relativamente similares (600 mm^3 aprox.), hasta el día 6, en donde ya se observó un aumento de volumen atribuible a las células tumorales inoculadas (900 mm^3 aprox.), aumento que ya podía ser medido (Fig.3). A partir de dicha fecha, todos los grupos comenzaron a ser tratados con la terapia de Cx. Entre los días 15 al 18 el grupo 2 (TA3-MTX-R/CxPLGA) obtiene los valores más bajos de volumen tumoral (1800 mm^3 aprox.), posteriormente éste asciende hasta hacerse levemente menor que los valores entregados en el tumor 3 (control). Los valores menores de volumen tumoral son presentados por el grupo 1 al día 20 (2200 mm^3 aprox.), como se aprecia en el

gráfico 1. Mediante el Test de Wilcoxon, se pudo establecer que no existieron diferencias significativas entre los grupos 1, 2, 3 ($p=0,500$).

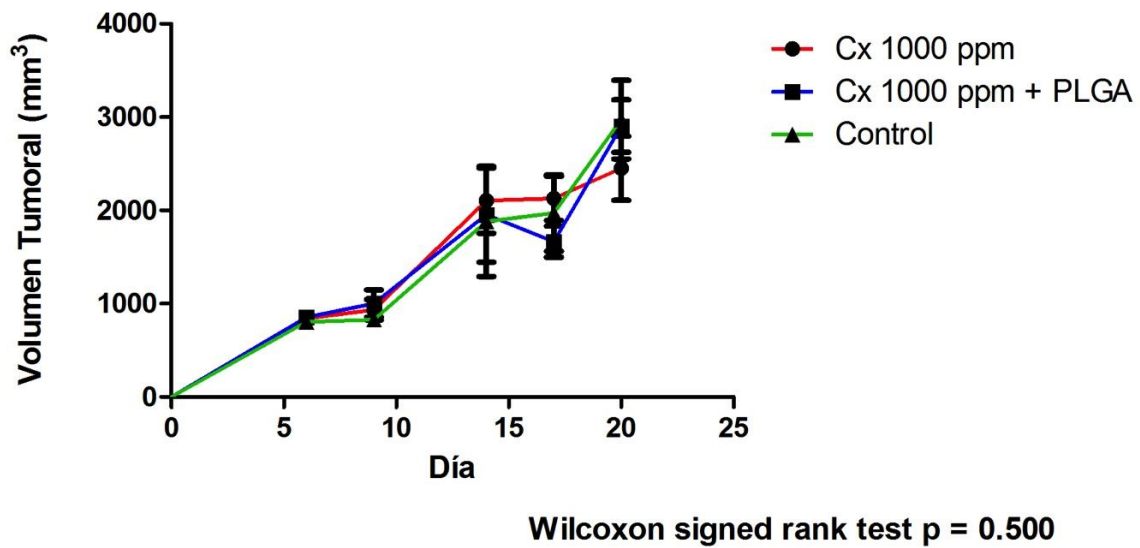


Gráfico 1. Volumen del Tumor TA3-MTX-R por grupo de estudio.



Fig. 3. Volumen tumoral en ratón (*Mus musculus*) inoculado con células TA3-MTX-R, en miembro posterior derecho. Nótese diferencia de volúmenes entre ambos miembros, inoculado (derecho) y no inoculado (izquierdo).

Celecoxib microencapsulado disminuye el desarrollo de metástasis en ratones inoculados con células TA3-MTX-R.

Durante la necropsia se obtuvieron muestras de corazón, hígado y pulmón de los ratones de los 5 grupos, según lo realizado por Rosas *et al.* (2013). Para la comparación grupal de un determinado órgano se realizó una estimación semicuantitativa de un campo microscópico de acuerdo a la presencia de células tumorales usando la siguiente escala:

0 = Sin presencia.

+ = Leve presencia.

++ = Moderada presencia.

+++ = Abundante presencia.

La estimación por grupo se realizó observando 30 campos microscópicos con la técnica de doble ciego y tabulando los datos de acuerdo a lo observado en cada uno de ellos.

GRUPO TA3-MTX-R/Cx: Se caracterizó por presentar una invasión tumoral leve en hígado y pulmón. El corazón no presentó alteraciones morfológicas. **Corazón:** Este órgano no presentó alteraciones a nivel de su miocardio. Hubo ausencia de CT entre las células musculares, además de no presentarse neovascularización en el tejido. **Pulmón:** La invasión celular afectó levemente el parénquima pulmonar, pudiéndose identificar fácilmente células tumorales. La metástasis fue caracterizada por formar

pequeños nódulos celulares bien definidos que deformaban levemente el parénquima pulmonar. Por su parte los vasos se encontraban llenos de eritrocitos, polimorfonucleares y linfocitos (Fig. 4/Cx 1000ppm). **Hígado:** El parénquima hepático se vio levemente afectado; se observaron nidos de CT que estaban alrededor de vasos sanguíneos; tales como venas centrolobulillares y espacios porta. En la zona de los sinusoides hepáticos, se pudo observar eritrocitos, además de polimorfonucleares, linfocitos (Fig. 6/Cx 1000ppm).

GRUPO TA3-MTX-R/CxPLGA: Se caracterizó por presentar una invasión tumoral leve en hígado y pulmón. El corazón no presentó alteraciones morfológicas. **Corazón:** Este órgano no presentó alteraciones a nivel de su miocardio u otros componentes cardíacos. Hubo ausencia de CT entre las células musculares, además de no presentarse neovascularización. **Pulmón:** El parénquima pulmonar, al igual que el del hígado se vio levemente afectado por la invasión de las CT, las cuales fueron heterogéneas y de fácil identificación. La metástasis se caracterizó por acúmulos celulares organizados que abarcaron algunas áreas del parénquima deformando el tejido pulmonar (Fig. 4/Cx 1000ppm/PLGA). Los vasos se encontraron llenos de eritrocitos y diversas células tumorales, polimorfonucleares y linfocitos. Las células tumorales presentaban las características ya descritas (Fig. 5/Cx 1000ppm/PLGA). **Hígado:** El parénquima hepático se vio levemente afectado, presentando en algunas áreas de infiltración las cuales no alteraron la morfología de las columnas de hepatocitos. Se aprecian además algunos pequeños nidos de células alrededor de vasos sanguíneos centrolobulillares y de los espacios porta, los

cuales además presentaban polimorfonucleares y linfocitos (Fig.6/Cx 1000ppm/PLGA y Fig.7/Cx1000ppm/PLGA).

GRUPO TA3-MTX-R: Al observar las muestras de este grupo, se caracterizaron por presentar una invasión tumoral moderada en aquellos órganos muy vascularizados, tales como hígado y pulmón. El corazón no presentó alteraciones morfológicas. Las células más características de esta invasión eran CT y polimorfonucleares. Además de la alta celularidad se observó gran cantidad de vasos cerca de acúmulos celulares que fueron encontrados. **Corazón:** Este órgano no presentó alteraciones a nivel de su miocardio al igual a lo visto en los dos grupos anteriores. **Pulmón:** El parénquima pulmonar se vio seriamente afectado por la invasión celular. La población celular era heterogénea y se pudieron identificar fácilmente células tumorales. La metástasis se caracteriza por formar nódulos celulares con forma de “bala de cañón” bien definidos que abarcaban importantes áreas del parénquima perdiendo la forma sacular de los alveolos y deformando el tejido pulmonar. Además de la morfología característica se lograba apreciar células PAS positivas y abundantes vasos sanguíneos aparentemente formados por la AG tumoral existente en el tejido. Por su parte los vasos se encontraban llenos de eritrocitos y diversas células tumorales, polimorfonucleares y linfocitos (Fig. 4/Control; Fig. 5/Cx 1000ppm/PLGA y 5/Control). **Hígado:** El parénquima hepático se vio afectado moderadamente debido a que en diversas áreas del hígado se observó un desplazamiento de las columnas de hepatocitos y que fue reemplazado por nidos de células que estaban alrededor de vasos sanguíneos como las venas centrolobulillares y espacios porta. Además en los

sinusoides hepáticos, se podía observar una gran cantidad de células además de eritrocitos. La morfología de las células observadas era variada, encontrando polimorfonucleares, linfocitos y células compatibles con CT. Esta invasión celular provocó una desorganización de la arquitectura lobulillar característica del hígado (Fig. 6/Control y 7/Control).

GRUPO TA3-MTX-R/PLGA: Este grupo presentó infiltración celular moderada de características similares a las encontradas en hígado y pulmón del grupo N°3. Con alta presencia de CT, polimorfonucleares y linfocitos. En el caso del corazón este no presentó infiltración celular, resultados similares a los encontrados en el grupo 3. En el caso de las muestras obtenidas del corazón de rata de este grupo estas presentaban partículas de PLGA en la zona más externa. **Corazón:** Este órgano no presentó alteraciones a nivel de su miocardio. Hubo ausencia de CT entre las células musculares, además de no presentarse neovascularización en el tejido. **Pulmón:** El parénquima pulmonar se vio seriamente afectado por la invasión celular. Pudiéndose identificar fácilmente CT. La metástasis se caracteriza por formar nódulos celulares con forma de “bala de cañón” bien definidos que abarcaban importantes áreas del parénquima pulmonar, se observó además abundantes vasos sanguíneos los cuales se encontraban llenos de eritrocitos y diversas CT, polimorfonucleares y linfocitos. **Hígado:** El parénquima hepático se vio afectado moderadamente, en diversas áreas del hígado se observó un desplazamiento de las columnas de hepatocitos y que fue reemplazado por nidos de células que estaban alrededor de vasos sanguíneos. Además en los sinusoides hepáticos, se podía observar una gran cantidad de células

además de eritrocitos. La morfología de las células observadas era variada, encontrando polimorfonucleares, linfocitos y células compatibles con CT.

GRUPO PLGA: Al realizar la observación de los órganos de los especímenes del grupo 5, podemos constatar que no se observaron elementos morfológicos ajenos a la histología normal.

Corazón: El tejido normal comprende miocardiocitos estriados ramificados y anastomosados con un núcleo central. En los cortes longitudinales es posible observar un conjunto de uniones intercelulares denominadas disco intercalares y que unen a los miocardiocitos entre sí. Fácilmente pueden distinguirse 3 capas: epicardio, que es la capa más externa del corazón. Corresponde a células mesoteliales y tejido conectivo. Se observan vasos sanguíneos y nervios rodeados de tejido adiposo; el miocardio que es la capa más abundante y que presenta las células musculares y finalmente el endocardio que es una capa interna de endotelio y tejido conectivo subendotelial, una capa de tejido conectivo y células musculares lisas y una capa externa de tejido conectivo que se conecta con el miocardio.

Pulmón: El parénquima pulmonar está conformado por una diversidad de bronquios y bronquiolos, compuesto por un epitelio estratificado cilíndrico ciliado con células caliciformes que posteriormente se transforma a un epitelio cilíndrico a cúbico. Estos bronquiolos se caracterizan por estar formados además por células musculares lisas, los que van escaseando a medida que se acercan a la porción respiratoria, así como la altura del epitelio va disminuyendo de manera importante. En la porción respiratoria del parénquima pulmonar existe un epitelio simple plano en estructuras como el caso de los sacos alveolares que están conformados por neumocitos tipo I y células cúbicas intercaladas que corresponden a los neumocitos tipo II. Entre los sacos alveolares se pueden distinguir estructuras vasculares como los capilares, que

son muy abundantes en todo el parénquima. También pueden encontrarse, de forma mucho más escasa algunas venas y arterias (Fig. 4/PLGA).

Hígado: Histológicamente el hígado del ratón presenta una arquitectura lobulillar y los espacios porta constituidos por estructuras vasculares y canaliculares biliares. Sin embargo, se pueden observar que los lóbulos hepáticos no presentan una forma poligonal característica y que sus límites no estaban bien definidos. En el interior de estas estructuras aparece ocupado por cordones de células hepáticas rodeadas por capilares sinusoides de orientación radial que se dirigen a la vena centrolobulillar y que en muchas ocasiones está poblado por células sanguíneas. Las venas centrales constituyen espacios óptimamente vacíos en los que con técnicas convencionales apenas se puede apreciar su revestimiento endotelial. Los cordones parenquimatosos están constituidos por hepatocitos de aspecto cuboide a poligonal y núcleo redondeado de cromatina laxa. El espacio porta presenta una trama de tejido conectivo laxo en el seno de la cual apreciamos estructuras vasculares con pared muscular correspondiente a las ramas de la arteria hepática. Estructuras venosas de las ramas de la vena porta y conductos biliares tapizados por epitelio cúbico correspondientes a ramas colangiolas biliares (Fig. 6/PLGA).

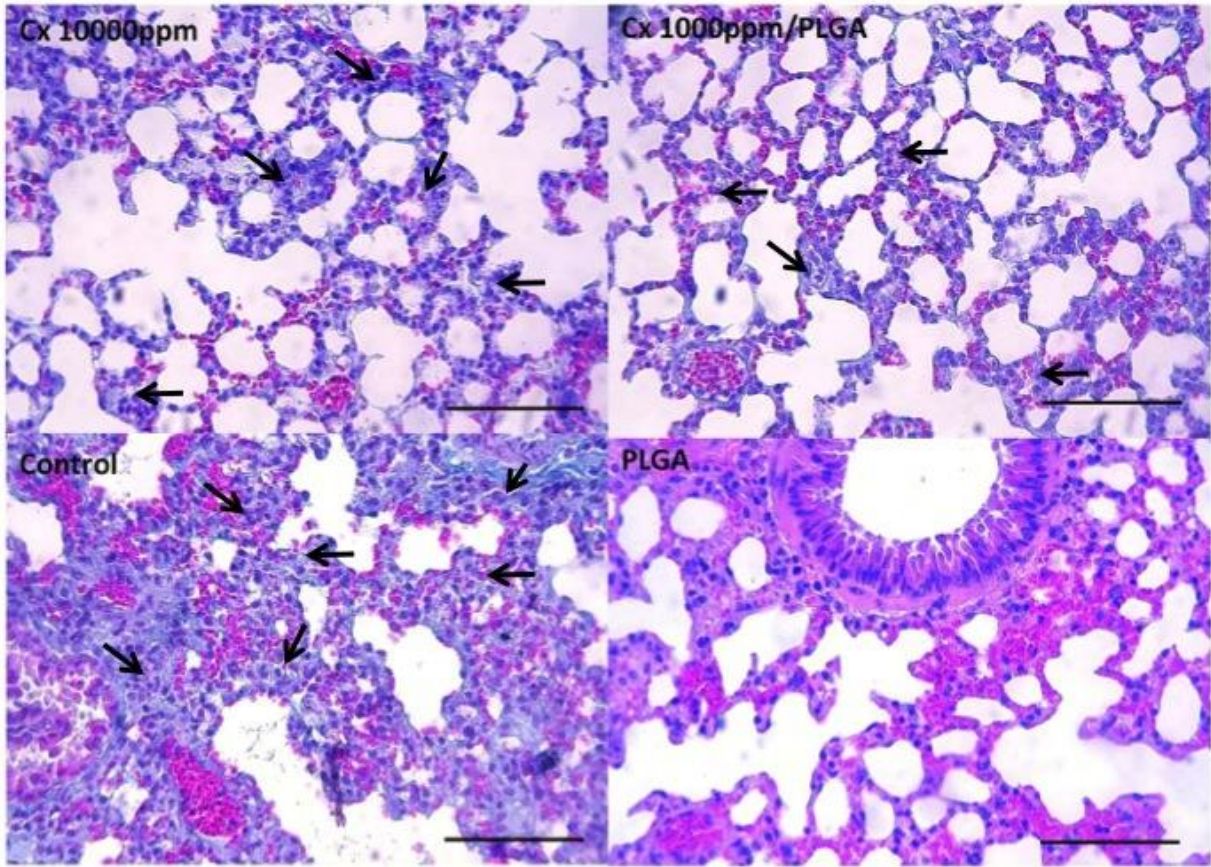


Fig. 4. Aspecto histológico de pulmón de ratón (*Mus musculus*). Se puede apreciar parénquima pulmonar infiltrado por células tumorales (flecha negra), nótese la asociación de las células tumorales y los vasos sanguíneos (Técnica de Arteta , 400x; barra 100 μ m).

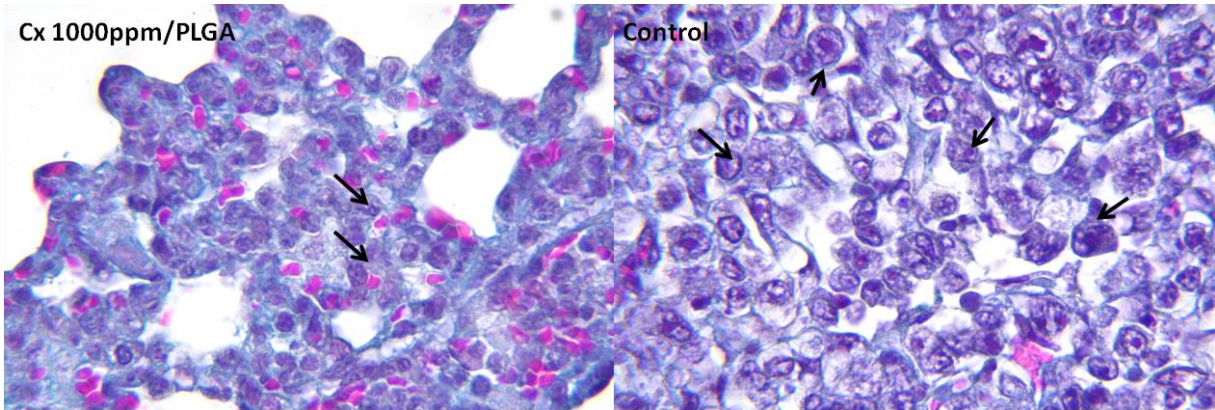


Fig. 5. Aspecto histológico de pulmón de ratón (*Mus musculus*). Se puede apreciar en aumento mayor, la infiltración de células tumorales (flecha negra), (Técnica de Arteta , 1000x).

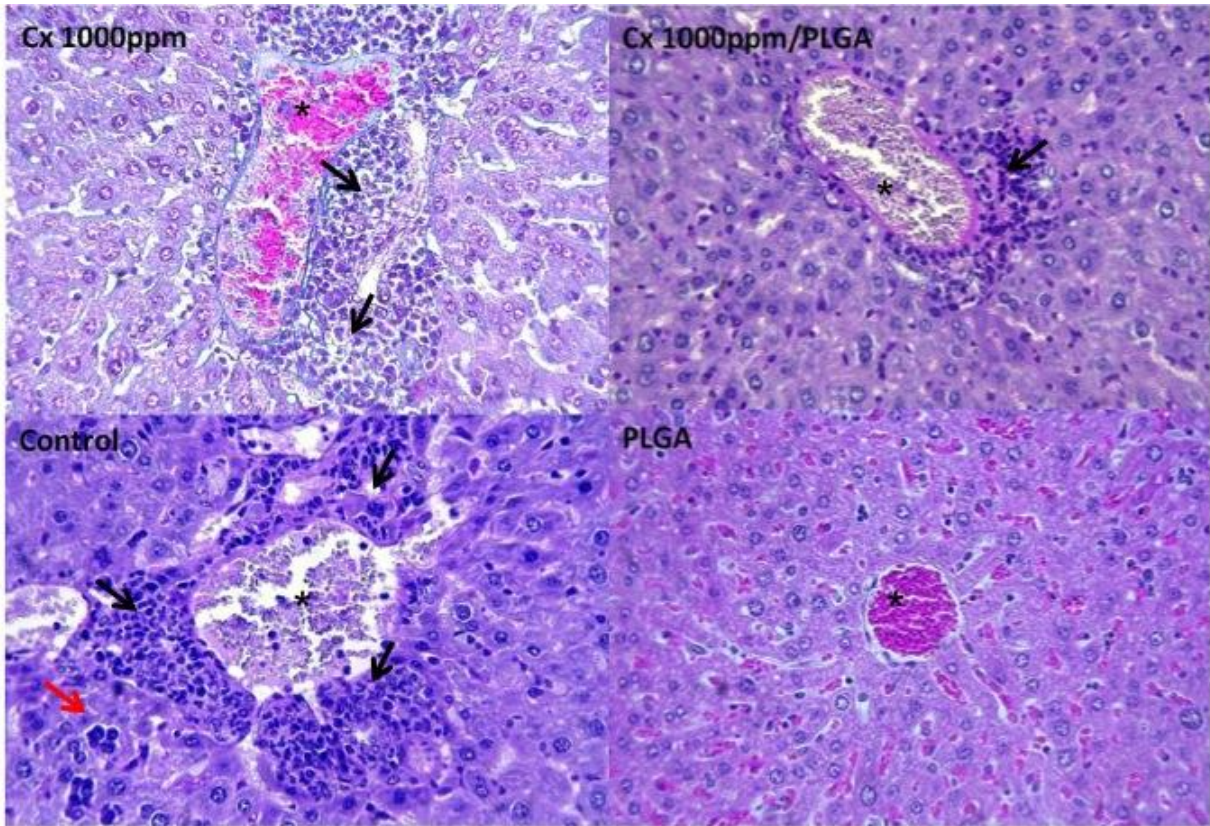


Fig. 6. Aspecto histológico del hígado de ratón (*Mus musculus*). Células tumorales (flecha negra) en torno a los elementos vasculares, vena centro lobulillar (*). En control las células tumorales (flecha roja) logran infiltrar los cordones hepatocitos desplazándolos levemente (Técnica de Arteta, 400x; barra 100 μ m).

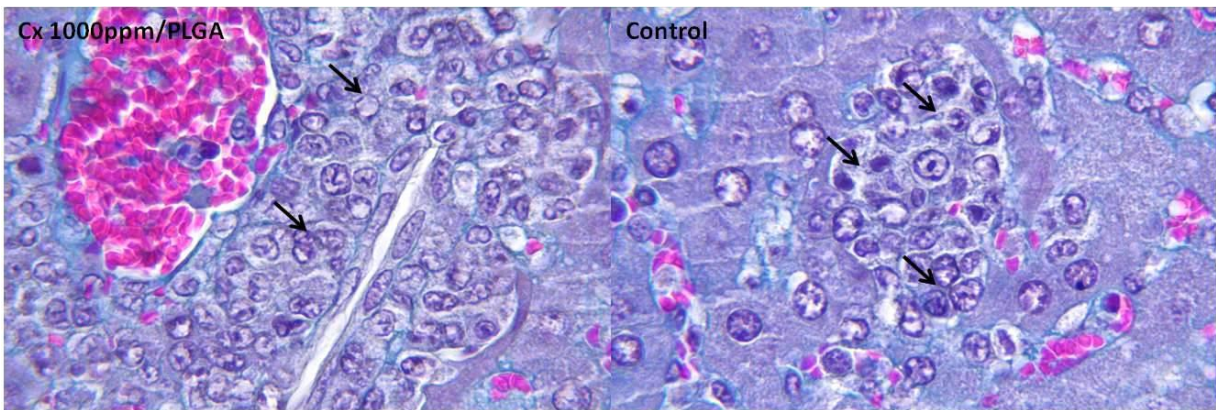


Fig. 7. Aspecto histológico del hígado de ratón (*Mus musculus*). Células tumorales (flecha negra) (Técnica de Arteta, 1000x).

Cx disminuye densidad microvascular en pulmón y tumor TA3-MTX-R.

El ensayo de capacidad angiogénica se realizó sobre cortes de tumor y pulmón, sobre una reglilla graduada de 1 cm² y observados con un objetivo de 400x en microscopio óptico. Se calculó el promedio \pm error standar en cada estructura analizada. Se contaron 30 campos microscópicos con la técnica de doble ciego y se analizó un calculo de t de student para estudiar su significancia estadística.

a) Tumor

En el grupo 1, tratado con Celecoxib, el conteo en la zona tumoral, arrojó un promedio de $26,55 \pm 0,32$ vasos/cm². Al estudiar al grupo inoculado celecoxib y PLGA, se obtuvo un promedio de $25,8 \pm 0,26$ vasos/cm². Con respecto al grupo inoculado con el tumor TA3-MTX-R, se obtuvo un promedio de $48,5 \pm 0,28$ vasos/cm² (Gráfico 2). Al comparar los resultados del grupo 1, 2 y 3 se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$), al comparar el grupo 3 con los tratados con celecoxib observando una marcada disminución de la densidad vascular en el tumor de los ratones tratados con Celecoxib; pero no existiendo una disminución considerable al comparar ambas presentaciones del fármaco (Fig.8).

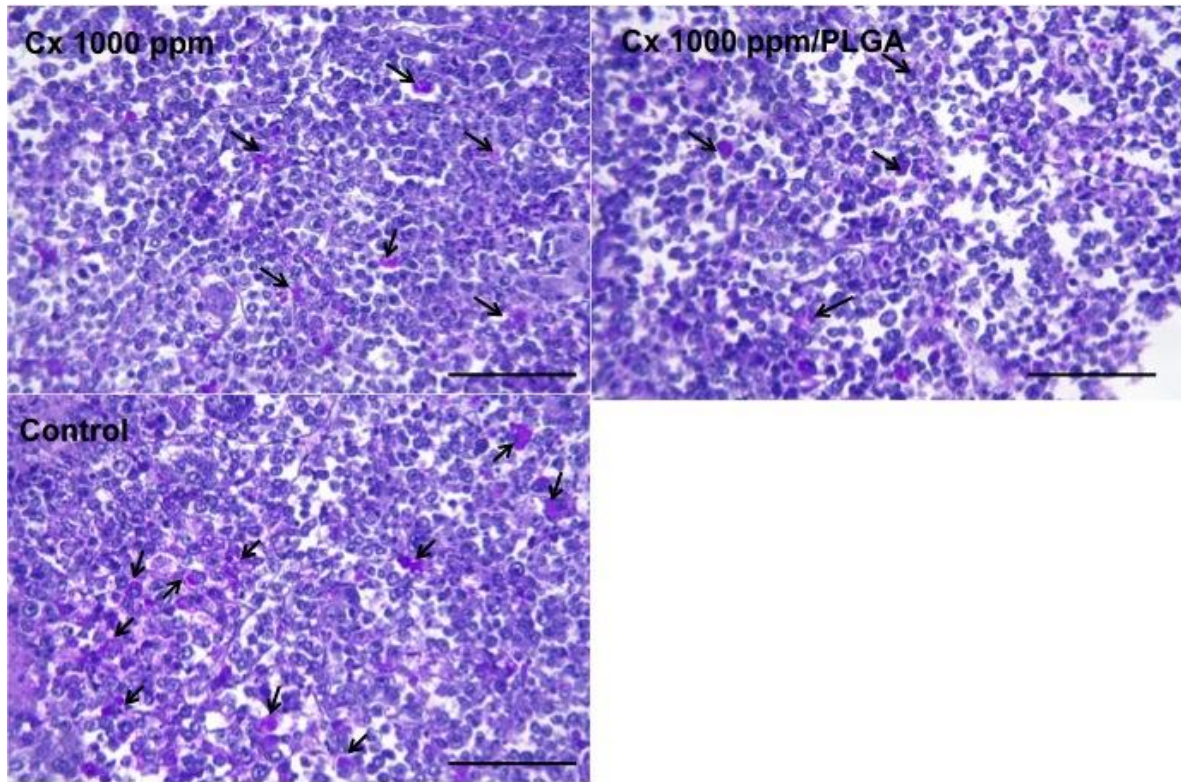


Fig. 8. Aspecto histológico de los microvasos del tumor TA3-MTX-R de ratón (*Mus musculus*). Nótese los vasos sanguíneos (flecha negra) en torno a las células tumorales (Técnica de Arteta, 400x; barra 100 μ m).

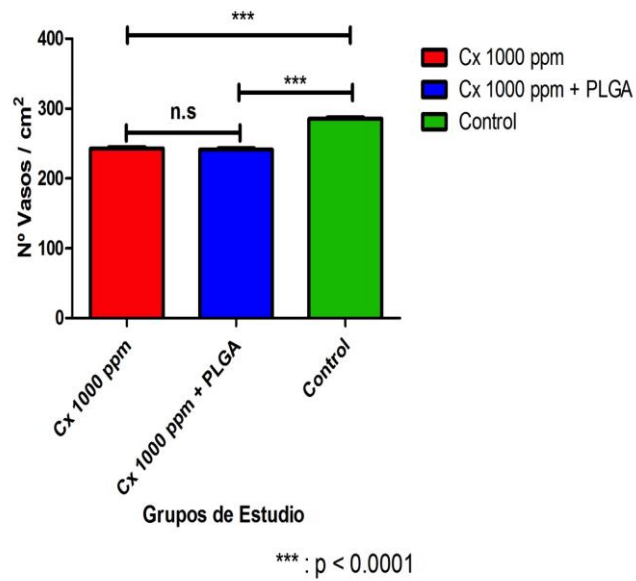


Gráfico 2. Densidad microvascular del Tumor TA3-MTX-R por grupo de estudio.

b) Pulmón

En los cortes de pulmón de los ratones del Grupo TA3-MTX-R/Cx, se contabilizaron $242,9 \pm 1,807$ vasos/cm², a diferencia del Grupo TA3-MTX-R/CxPLGA en el que se logró visualizar se obtuvo un promedio de $241,3 \pm 1,758$ vasos/cm². Por su parte el Grupo 3 TA3-MTX-R presentó una cantidad de $285,7 \pm 1,945$ vasos/cm² (Fig. 9). Al realizar una comparación de los resultados entre el grupo que fue inoculado con Celecoxib y el que fue inoculado con Celecoxib/PLGA, se logró concluir que no existió una disminución significativa en este último grupo, significancia que sí existió al comparar el grupo TA3-MTX-R con los otros dos por separado ($P < 0,05$) (Gráfico 3).

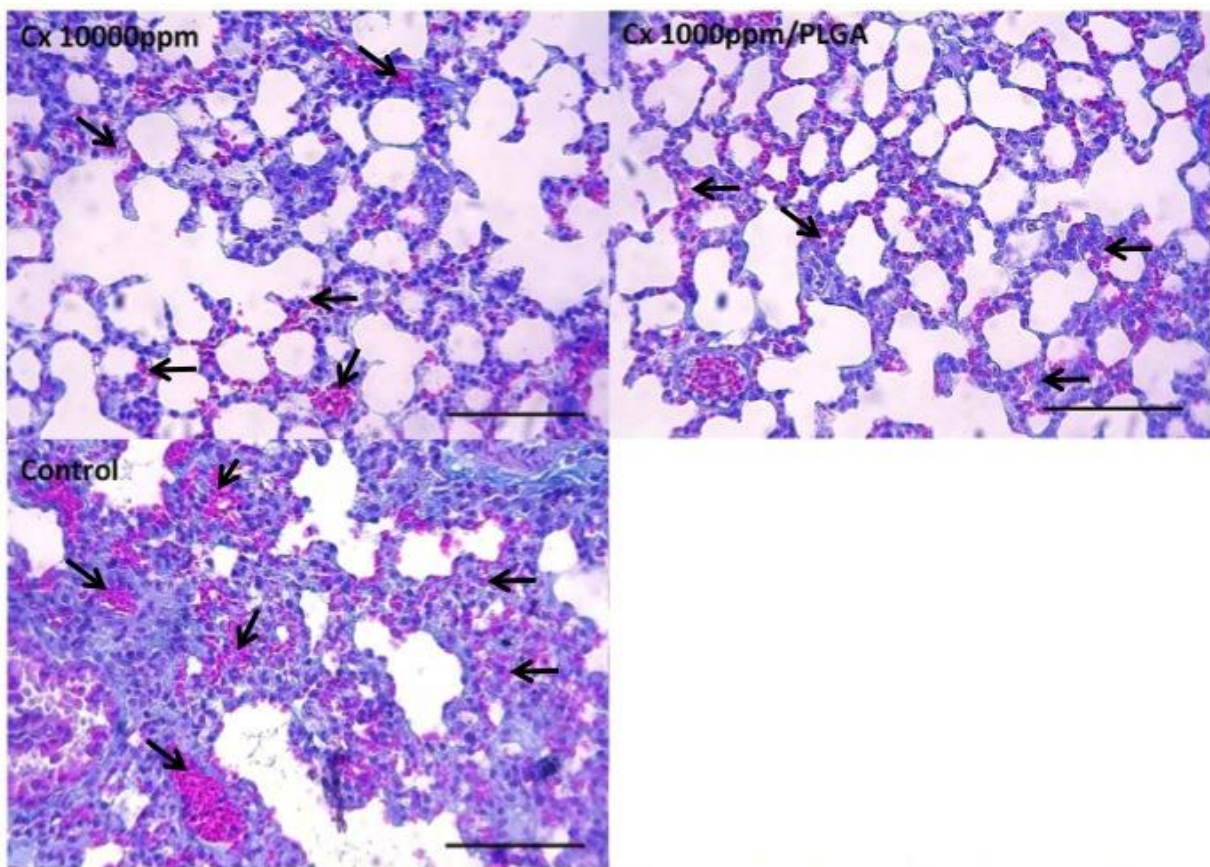


Fig. 9. Aspecto histológico del pulmón de ratón (*Mus musculus*). Nótese los vasos sanguíneos (flecha negra) en torno a las células tumorales y elementos alveolares (Técnica de Arteta, 400x; barra 100 μ m).

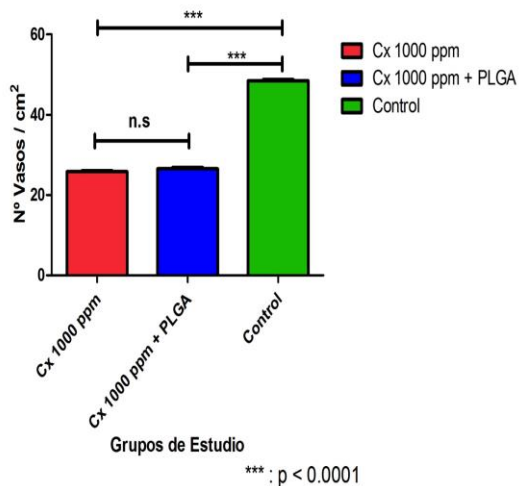


Gráfico 3. Densidad microvascular del pulmón por grupo de estudio.

PLGA no disminuye densidad microvascular en tumor TA3-MTX-R.

Cuando se analizó la acción del PLGA frente a la angiogénesis, se observó que este compuesto no presentó acción frente a la microvascularización, para tal hecho fueron comparados los grupos 3 (TA3-MTX-R) y 4 (TA3-MTX-R/PLGA), los cuales arrojaron valores de $48,5 \pm 0,2860$ vasos/cm² y $47,22 \pm 0,2987$ vasos/cm², respectivamente, valores no estadísticamente significativos ($P < 0,2518$) (Gráfico 4).

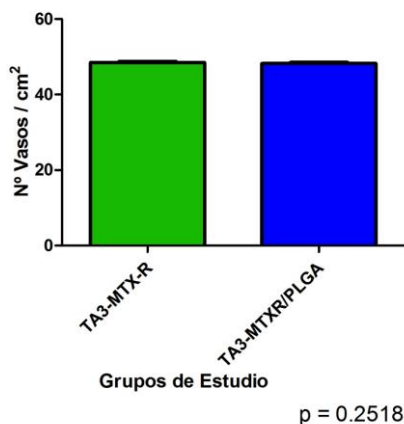


Gráfico 4. Densidad microvascular del Tumor TA3-MTX-R versus Tumor TA3-MTX-R/PLGA.

Celecoxib microencapsulado en PLGA disminuye expresión de VEGF y Ki67 en tumor TA3-MTX-R.

Usando los mismos cortes histológicos obtenidos del tumor, se realizó un perfil inmunohistoquímico de los grupos 1, 2 y 3, con el fin de observar la existencia de diferencias significativas en cuanto al tratamiento de Celecoxib y sus métodos de administración.

Para la evaluación de VEGF y Ki-67, se realizó una estimación cuantitativa de un campo microscópico de acuerdo a la presencia de células inmunomarcadas positivamente usando la ayuda del software ImageJ (Rasband, 1997-2008). En el caso de la estimación de la apoptosis se realizó la estimación cuantitativa de un campo microscópico de acuerdo a la presencia de células inmunomarcadas positivamente.

La estimación por grupo se realizó observando 50 campos microscópicos con la técnica del doble ciego y tabulando los datos de acuerdo a lo observado en cada uno de ellos. Se calculó el promedio, error estándar y se aplicó el test t de Student.

VEGF

Con respecto a los resultados encontrados al analizar la expresión de VEGF en las áreas del tumor observadas, se logró observar un patrón de marcaje citoplasmático, el cual predominó en las células tumorales (Fig.10 y 11). El Grupo 2 TA3-MTX-R/CxPLGA presentó un inmunomarcaje más bajo en comparación a lo observado con los Grupos TA3-MTX-R/Cx y TA3-MTX-R, las células que presentaron dichas características fueron principalmente células tumorales distribuidas indistintamente en el tumor. Los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,0001$).

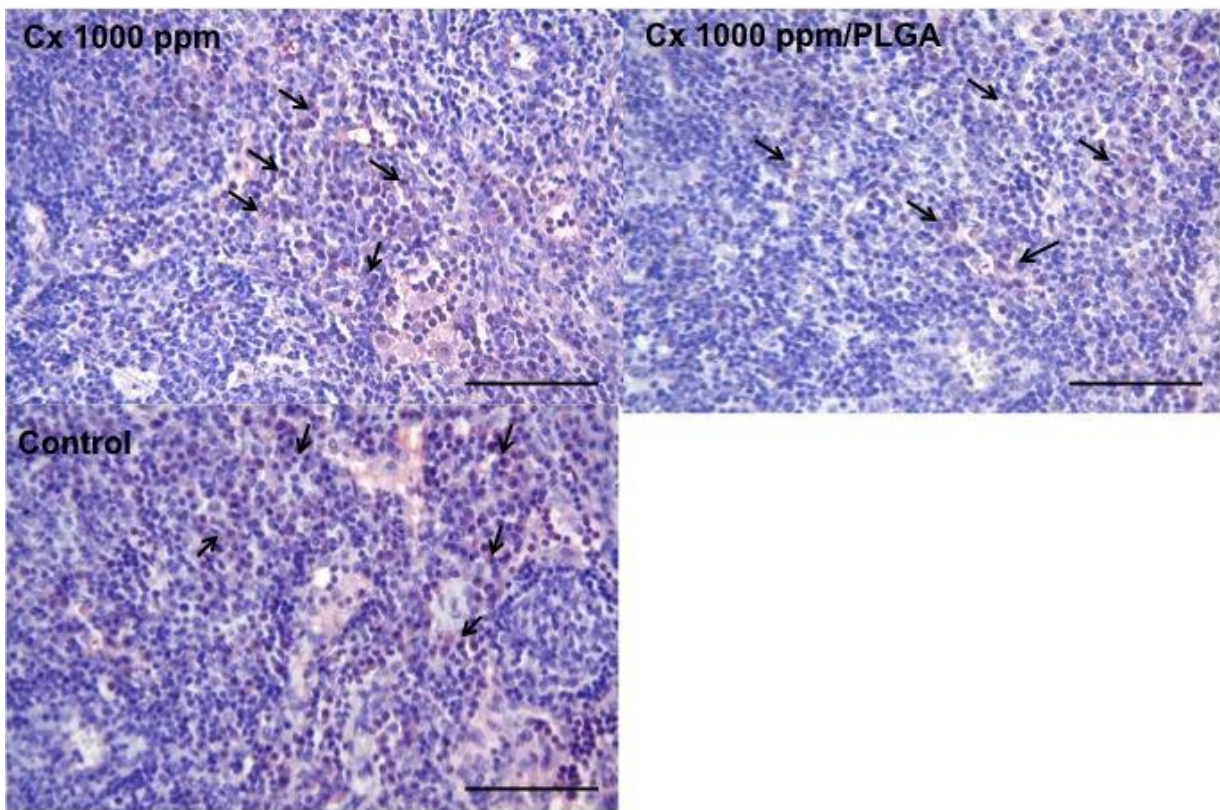


Fig. 10. Aspecto histológico del tumor TA3-MTX-R de ratón (*Mus musculus*). Nótese las células y áreas inmunomarcadas para VEGF (flecha negra) (IHQ VEGF, 400x; barra 100 μ m).

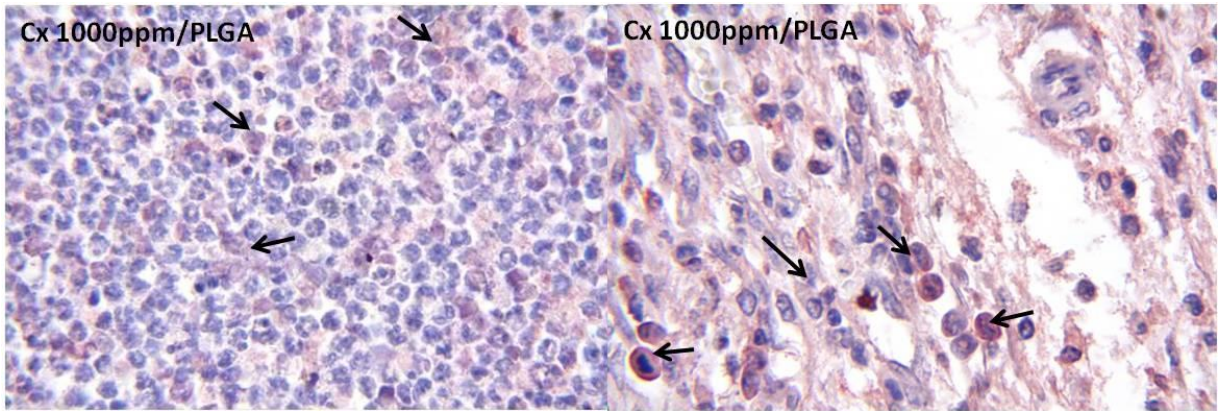


Fig. 11. Aspecto histológico del tumor TA3-MTX-R de ratón (*Mus musculus*). Nótese las células inmunomarcadas para VEGF (flecha negra) (IHQ VEGF, 1000x).

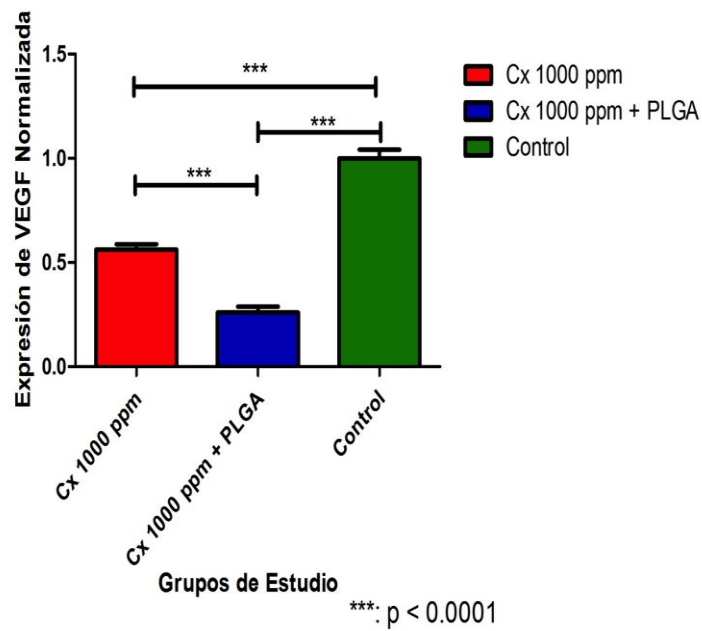


Gráfico 5. Estimación cuantitativa de presencia de VEGF del Tumor TA3-MTX-R por grupo de estudio.

Ki67

Los cortes de los grupos 1, 2 y 3, presentaron inmunomarcación a Ki-67, lo cual indica que en todos ellos existió proliferación celular a nivel del tumor, en distintos grados. El Grupo TA3-MTX-R/CxPLGA presentó distintas áreas con células tumorales en franca actividad de proliferación celular, con un patrón de marcaje nuclear característico, dichas células morfológicamente corresponden en su totalidad a células tumorales (Fig. 12 y 13). Los resultados indican que la proliferación celular en el Grupo TA3-MTX-R/CxPLGA, fue menor en comparación a lo encontrado en el Grupo TA3-MTX-R/Cx y TA3-MTX-R, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$), existiendo reducción de un 75% del inmunomarcaje si es comparado con el Grupo TA3-MTX-R (Gráfico 6).

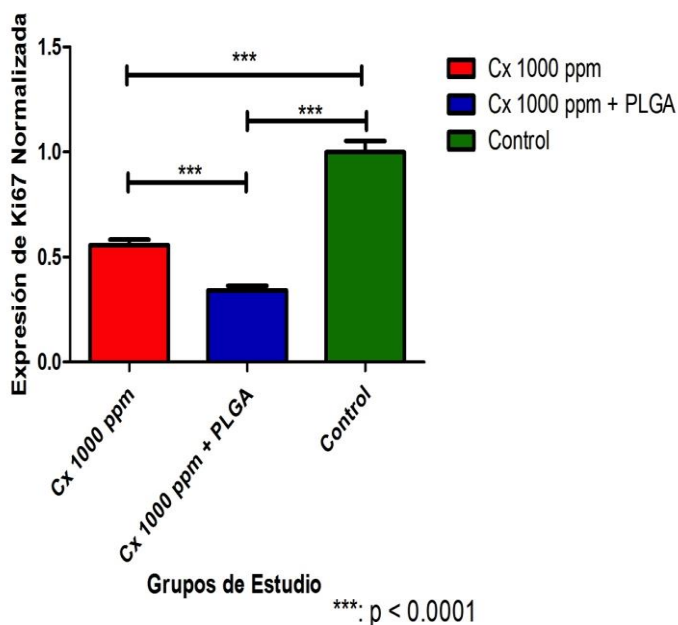


Gráfico 6. Estimación cuantitativa de presencia de Ki67 del Tumor TA3-MTX-R por grupo de estudio.

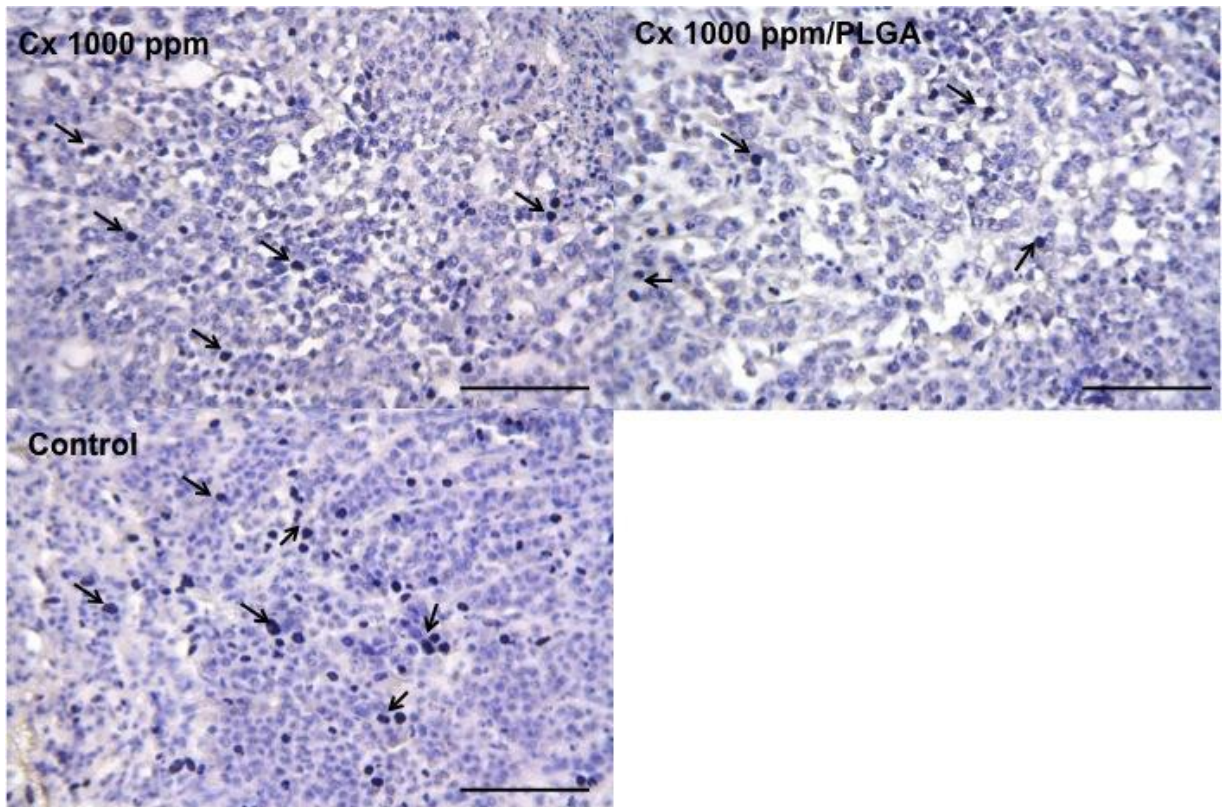


Fig. 12. Aspecto histológico del tumor TA3-MTX-R de ratón (*Mus musculus*). Nótese las células Ki67 positivas (flecha negra) (IHQ Ki67, 400x; barra 100 μ m).

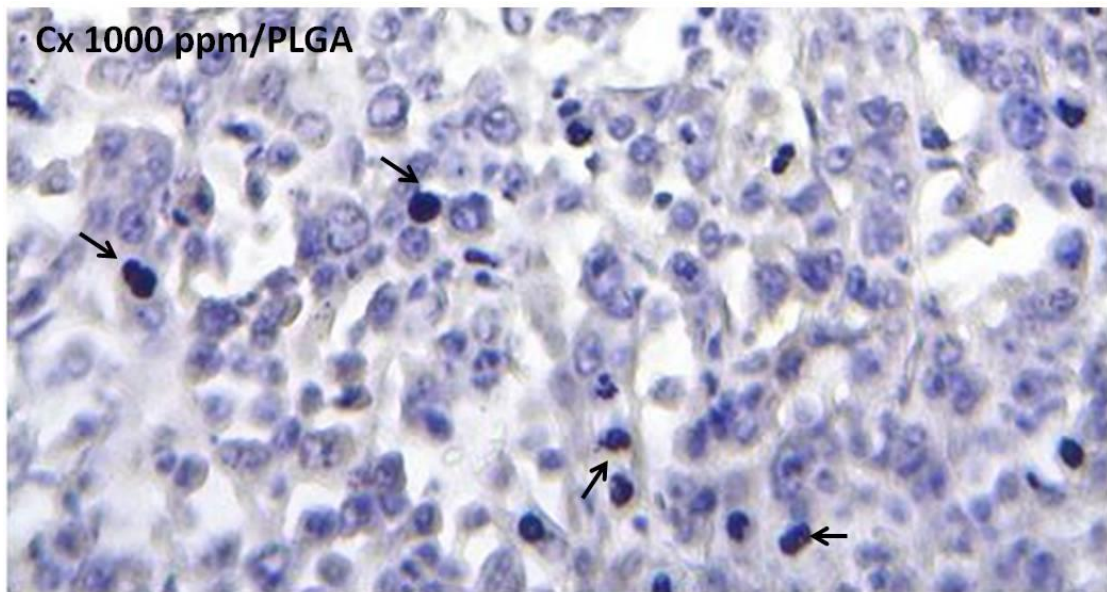


Fig. 13. Aspecto histológico del tumor TA3-MTX-R de ratón (*Mus musculus*). Nótese las células Ki67 positivas con su patrón nuclear característico (flecha negra) (IHQ Ki67, 400x; barra 100 μ m).

Cx microencapsulado en PLGA aumenta apoptosis en tumor TA3-MTX-R.

El análisis inmunohistoquímico de la apoptosis a nivel de los cortes del tumor evidenció la presencia de núcleos y cuerpos apoptóticos a distinto nivel (Fig. 14 y 15). La cantidad de núcleos apoptóticos/campo presentada en el Grupo TA3-MTX-R/Cx fue de $26,72 \pm 1,003$ (media \pm error estándar), con respecto a lo encontrado en el Grupo TA3-MTX-R/CxPLGA fue de $38,25 \pm 1,127$ (media \pm error estándar), por último fue de $8,36 \pm 0,5$ (media \pm error estándar) en el Grupo TA3-MTX-R, resultados que fueron estadísticamente significativos ($p < 0,0001$) (Gráfico 7).

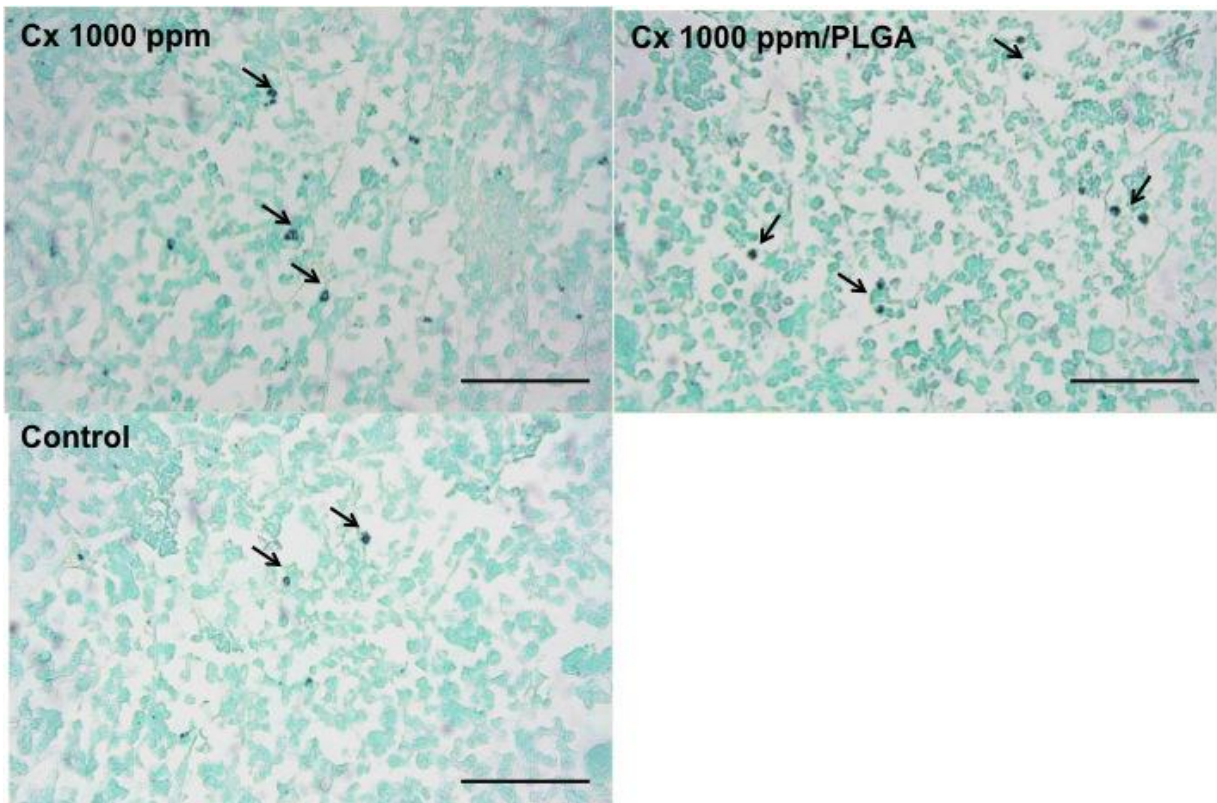


Fig. 14. Aspecto histológico del tumor TA3-MTX-R de ratón (*Mus musculus*). Nótese las células apoptóticas (flecha negra) (IHQ Ensayo TUNEL, 400x; barra 100 μ m).

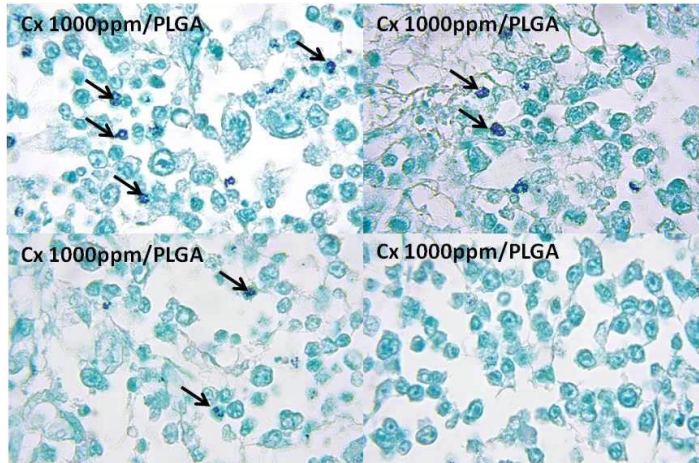


Fig. 15. Aspecto histológico del tumor TA3-MTX-R de ratón (*Mus musculus*). Nótese las células apoptóticas (flecha negra) (IHQ Ensayo TUNEL, 400x; barra 100 μ m).

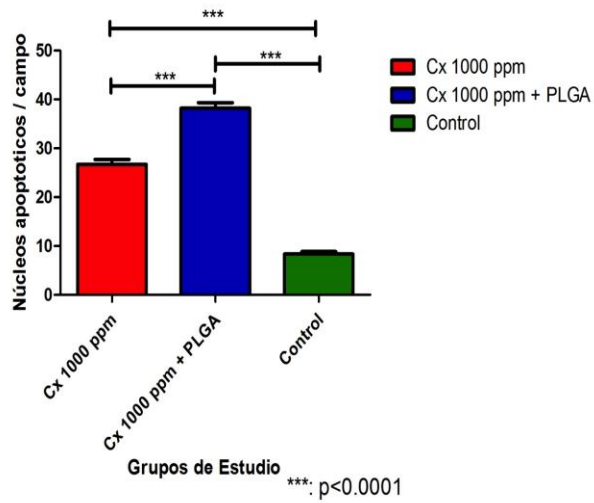


Gráfico 7. Estimación semicuantitativa de presencia de núcleos apoptóticos del Tumor TA3-MTX-R por grupo de estudio.

DISCUSIÓN

Actualmente se han propuesto diez sellos o características (*Hallmarks*) del cáncer los cuales constituyen un principio de organización que proporciona un marco lógico para la comprensión de la notable diversidad de enfermedades neoplásicas. Es así como células normales evolucionan progresivamente a un estado neoplásico, adquiriendo una serie de estos sellos característicos, ayudando a las células cancerosas a adquirir las características que les permitan ser tumorigénicas y malignas en última instancia, dentro de estos *hallmarks* se encuentra la inducción de la angiogénesis (Hanahan & Weinberg, 2011).

El crecimiento de los tumores sólidos y la formación de metástasis posteriores dependen de la generación de nuevos vasos; es así como las células tumorales inducen este proceso, al producir numerosos factores proangiogénicos, uno de ellos es el VEGF (Gavalas *et al.*, 2013). Las terapias antiangiogénicas actuales buscan inhibirlo con el fin de disminuir la neovascularización. VEGF puede ser suprimido por múltiples agentes entre ellos los inhibidores selectivos de la COX-2, tal como el Cx, importante agente anti-inflamatorio (Venkatesan *et al.*, 2011).

La inhibición de COX-2 está relacionada con la supresión de la angiogénesis y procesos metastásicos (Peng *et al.*, 2013), por lo cual es un importante blanco en la terapéutica antiangiogénica. La sobreexpresión de COX-2 en células tumorales afecta la angiogénesis por la producción de eicosanoides (TAX₂; PGI₂ y PGE₂) (Wang *et al.*, 2013), los cuales estimulan la migración de células endoteliales y

angiogénesis por el incremento en la expresión de VEGF estimulando la proliferación de células endoteliales.

Es así como el Celecoxib, fármaco inhibidor de la COX-2, ha sido utilizado con el fin de disminuir los niveles de VEGF y así inhibir eventos tales como angiogénesis y proliferación celular. Este fármaco ha sido asociado a diversos polímeros con el fin de mejorar sus efectos terapéuticos, entre estos polímeros están las partículas de PLGA. Esta asociación Cx/PLGA ha sido utilizada tanto en terapias antiangiogénicas en patologías oculares (Amrite *et al.*, 2006) como en tratamientos antitumorales (Ibrahim *et al.*, 2013). En donde se han visto efectos favorables en la terapia antiangiogénica tales como disminución de la angiogénesis e inducción de la apoptosis de las células tumorales (Cui *et al.*, 2010).

Las características del tumor observado en nuestros resultados se presentan muy similares a las relatadas por Rosas *et al.* (2013), en donde el tipo celular, su morfología, ubicación y áreas del tumor fueron similares a lo descrito en esta tesis, al utilizar la misma línea tumoral TA3-MTX-R. Por su parte, otras líneas tumorales mamarias tales como la SCK se describen muy similares en cuanto a vascularización, invasividad y generación de metástasis a nivel pulmonar cuando son comparados con la línea TA3-MTX-R (Farooqui *et al.*, 2007).

El crecimiento tumoral fue analizado mediante observación del aumento del volumen de este, resultados que indican que no hubo una diferencia entre las dos presentaciones del Cx, y entre estos y el grupo que actuó como control (TA3-MTX-

R), llegando en momentos a tener niveles de crecimiento semejantes en los tres grupos principales (1, 2 y 3). Múltiples son los resultados con respecto a la utilización de Cx. Es así como se ha descrito la disminución del crecimiento tumoral bajo la administración de Cx en distintas líneas tumorales principalmente por una disminución de la COX-2 (Jendrossek, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

Por su parte Raut *et al.* (2004), lograron una disminución del tamaño tumoral con una administración de 10 mg/kg de Celecoxib en una línea de tumor pancreático. Por su parte Xu *et al.* (2008) y Rosas *et al.* (2013) también describen disminución del tamaño tumoral posterior a la administración de Celecoxib. Sin embargo otros estudios han reportado resultados contradictorios, como Jang *et al.* (2002) no lograron evidenciar una reducción del volumen tumoral luego de la administración del fármaco.

Si bien todos los ratones fueron inoculados con la misma cantidad de células tumorales, no todos evidenciaron una externalización del tumor al momento del análisis del volumen, al analizar histológicamente estos individuos estos presentaban microtumores entre las fibras musculares del sitio de inoculación. La acción del microambiente y de los elementos celulares no tumorales juega un rol aún en estudio (Rodríguez *et al.*, 2013). Los actos quirúrgicos o intervenciones a nivel tumoral, promueven la secreción de factores inhibidores que permiten que células inmunosupresoras persistentes repoblen, pequeños focos residuales rápidamente. Esto estaría dado por la presencia de macrófagos, los cuales forman una complejo de red de inmunosupresión a nivel del microambiente tumoral circundante, lo cual

explicaría la resistencia de las células tumorales a algunas terapias contra el cáncer a pesar del pequeño tamaño tumoral (Pedrina *et al.*, 2012).

Con respecto a la microdensidad vascular, los resultados encontrados, no muestran una significancia estadística entre la aplicación de Cx y Cx/PLGA, lo cual indicaría que el modo de presentación del fármaco no afectó a la angiogénesis tumoral. Esto podría estar explicado, a que si bien se produce angiogénesis en todos los tumores a medida que crecen, la intensidad de esta puede variar según los tipos de tumor e incluso entre individuos con el mismo tipo de tumor (Eberhard *et al.*, 2000). Se ha descrito que en algunos carcinomas de mama, el aumento de la densidad microvascular no es atribuible, al menos exclusivamente, a la secreción de VEGF por las células tumorales o por los macrófagos, o a la expresión de COX-2 (Pérez, 2011), ya que existe activación de la angiogénesis a nivel celular por distintas vías que pueden ser inducidas por diversos factores o moléculas que están asociadas para una misma acción (“*cross-talking*”) (Fulda, 2013).

Un proceso vital en la diseminación de las células tumorales es la metástasis, con respecto a esta, al realizar el análisis histológico e histoquímico de los órganos, estos fueron similares a los encontrados por Rosas *et al.* (2013). Los órganos que presentaron metástasis fueron el hígado, presentando una distribución de las células tumorales en torno a los elementos vasculares más importantes como son la vena centrolobulillar y los elementos de la triada portal. Por otra parte el pulmón fue el otro órgano invadido por células tumorales, presentando patrones en “bala de cañón”, las cuales se distribuían a lo largo del órgano, presentándose en ambos casos mayor

cantidad de focos metastásicos en los sujetos inoculados solo con células TA3-MTX-R en comparación con los que se les administró Cx y Cx/PLGA, en donde en estos últimos existió una leve disminución. Con respecto al corazón este no presentó células tumorales y su conformación tisular no se vio afectada, tal a lo relatado por Rosas *et al.* (2013) La existencia de metástasis en estos órganos, concuerda con lo relatado por Labelle & Hynes (2012), los cuales describen que la principal vía de diseminación de las células tumorales, es la vía hematológica.

Dentro de las estrategias empleadas por las células tumorales con el fin de perpetuarse en el tiempo, están la angiogénesis, evasión de la apoptosis y la proliferación celular descontrolada, en muchos estudios se ha encontrado que la expresión del VEGF se correlaciona con el grado de AG tumoral, corroborando el papel clave del VEGF en este proceso.

En el presente estudio Cx/PLGA provocó disminución de la presencia de Ki-67, VEGF y aumento de núcleos apoptóticos en las células tumorales TA3-MTX-R, en comparación a Cx sin partículas. Efectos explicables por la potente acción de la COX-2 y las prostaglandinas sobre el desarrollo de la angiogénesis. Las prostaglandinas son capaces de generar evasión de la apoptosis, a través de la survivina, estimular VEGF a través del HIF-1 α (Jendrosseck, 2013) y estimular la proliferación celular y migración vía MAPK. La asociación existente entre VEGF y COX-2/Prostaglandinas explicaría los efectos observados (Wang & Dubois, 2010).

Resultados similares a los vistos por Dhanda & Kompella (2005), los cuales han relatado que el uso de Cx microencapsulado en PLGA, disminuyó significativamente los niveles de VEGF, cuando fue administrado a nivel de la tráquea, en un modelo de tumor pulmonar resultados similares con lo encontrado en esta tesis, donde la expresión de VEGF se vio disminuida luego de la administración del Cx/PLGA en cepa AJ, al ser comparado con una administración de Cx sin partículas, lo cual indicaría que la presencia de las partículas ayudaría a mejorar los niveles del fármaco a nivel tumoral, permitiendo que este se libere por más tiempo, mejorando la respuesta local.

Si bien los resultados al utilizar Cx son controversiales, este aún logra ser una buena alternativa en la terapia antiangiogénica; la vía de administración podría jugar un rol importante en el proceso de inhibición de la AG, por lo cual la exploración de nuevas vías y asociaciones de fármacos favorecerían la investigación en el área de la oncología, en aspectos tales como vascularización.

Es así como Cx asociado a PLGA o a otro tipo de polímero son vías factibles de administración de fármacos ya que podrían disminuir la frecuencia de administración, lo que lleva a una mayor aceptación por parte del paciente; así como un aumento del beneficio terapéutico, debido a la eliminación de las fluctuaciones en los niveles séricos del fármaco. La potencial disminución de la dosis total requerida para un tratamiento, debido a una mayor eficiencia en el aprovechamiento de la dosis administrada y la potencial disminución de los efectos adversos, ya que disminuye la magnitud de la cantidad de fármaco liberado en el organismo en el momento de la

aplicación (Sáez *et al.*, 2007). Todo esto agregado a la inocuidad del PLGA al ser administrado en distintos tejidos tales como glándulas salivales (Miranda *et al.*, 2013) o tejido muscular, (Acuña *et al.*, 2011), lo cual lo hace un biomaterial propicio para este tipo de asociaciones.

CONCLUSIONES

1. Celecoxib microencapsulado en PLGA no disminuye el crecimiento tumoral del tumor TA3-MTX-R.
2. Celecoxib microencapsulado en PLGA disminuye la invasión del tumor TA3-MTX-R en el hígado y pulmón.
3. Celecoxib disminuye la formación de microvasos, tanto en tumor como en pulmón.
4. Celecoxib asociado a PLGA disminuye la proliferación celular, la presencia de VEGF en las células del tumor TA3-MTX-R.
5. Celecoxib asociado a PLGA promueve la apoptosis en las células del tumor TA3-MTX-R.
6. Celecoxib asociado a PLGA es un fármaco que disminuye la progresión tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- Adini, A.; Kornaga, T.; Firoozbakht, F. & Benjamin, L. E. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res.*, 62:2749-52, 2002.
- Acuña, L.; Suazo, G. I.; Zavando, D.; Elgueta, S.; Velásquez, L.; Vilos, C. & Cantín, M. Morphometric and histopathologic changes in skeletal muscle induced for injectable PLGA microparticles. *Int. J. Morphol.*, 29(2):403-408, 2011.
- Amrite, A. C.; Ayalasmayajula, S. P.; Cheruvu, N. P. S. & Kompella, U. B. Single periocular injection of Celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE2, VEGF, and vascular leakage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47:1149-60, 2006.
- Anand, P.; Nair, H. B.; Sung, B.; Kunnumakkara, A. B.; Yadav, V. R.; Tekmal, R. R. & Aggarwal, B. B. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.*, 79:330-8, 2010.
- Ayalasmayajula, S. P. & Kompella, U. B. Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model. *Euro. J. Pharm.*, 511(2-3):191-8, 2005.
- Baeriswyl, V. & Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 19(5):329-37, 2009.

Bombardier, C.; Laine, L.; Reicin, A.; Shapiro, D.; Burgos-Vargas, R.; Davis, B.; Day, R.; Ferraz, M. B.; Hawkey, C. J.; Hochberg, M. C.; Kvien, T. K.; Schnitzer, T. J. & VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 343(21):1520-8, 2000.

Caldwell, B.; Aldington, S.; Weatherall, M.; Shirtcliffe, P. & Beasley, R. Risk of cardiovascular events and celecoxib: a systematic review and meta-analysis. *J. R. Soc. Med.*, 99(3):132–40, 2006.

Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438:932-6, 2005.

Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanism and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473:298-307, 2011.

Chen, Z.; Cai, M.; Yang, J.; Lin, L.; Xue, E.; Huang, J.; Wei, H.; Zhang, X. & Ke, L. Chemotherapy with PLGA microspheres containing docetaxel decreases angiogenesis in human hepatoma xenograft. *Med. Oncol.*, 2010.

Cui, F. Y.; Song, X. R.; Li, Z. Y.; Li, S. Z.; Mu, B.; Mao, Y. Q.; Wei, Y. Q. & Yang, L. The pigment epithelial-derived factor gene loaded in PLGA nanoparticles for therapy of colon carcinoma. *Oncol. Rep.*, 24:661-8, 2010.

Dai, Z.J.; Ma, X. B.; Kang, H. F.; Gao, J.; Min, W. L.; Guan, H. T.; Diao, Y.; Lu, W. F. & Wang, X. J. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor,

celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell Int.*, 19;12(1):53, 2012.

De Spiegelaere, W.; Casteleyn, C.; Van den Broeck, W.; Plendl, J.; Bahramsoltani, M.; Simoens, P.; Djonov, V. & Cornillie, P. Intussusceptive Angiogenesis: A Biologically Relevant Form of Angiogenesis. *J. Vasc. Res.*, 49:390–404, 2012.

Dhanda, D. & Kompella. U. Single intratracheal administration of Celecoxib-PLGA microparticles reduces PGE2 and VEGF levels in a mouse model for lung tumors. *AAPS*, 003016, 2005.

Dvorak, H. F. Angiogenesis: update 2005. *J. Thromb. Haemost.*, 3:1835-42, 2005.

Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 60:1388-1393, 2000. Erratum in: *Cancer Res.*, 1;60:3668, 2000.

Fakhejahani, E. & Toi, M. Tumor angiogenesis: pericytes and maturation are not be ignored. *J. Oncol.*, 2012:261750, 2012.

Fan, F.; Schimming, A.; Jaeger, D. & Podar, K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J. Oncol.*, 2012:281261, 2012.

- Farooqui, M.; Li, Y.; Rogers, T.; Poonawala, T.; Griffin, R. J.; Song, C. W. & Gupta, K. COX-2 inhibitor celecoxib prevents chronic morphine-induced promotion of angiogenesis, tumor growth, metastasis and mortality, without compromising analgesia. *Br J Cancer*, 97(11):1523-31, 2007.
- Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin. Oncol.*, 29:10-4, 2002.
- Ferrara, N. & Kerbel, R. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438:967-74, 2005.
- Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 285:1182-86, 1971.
- Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 6(4):273-86, 2007.
- Fulda, S. How to target apoptosis signaling pathways for the treatment of pediatric cancers. *Front. Oncol.*, 3:22, 2013.
- Gajardo, P.; Cordano, G.; Pavani, M.; Muñoz, S.; Rivera, E.; Guerrero, A. & Ferreira, J. La inhibición de la respiración mitocondrial por estrés 2,6-dihidroxibenzoato de bis isopropilo (Carfenisop) y su papel como restaurador de la sensibilidad a fármacos antineoplásicos en el carcinoma resistente Ta3 MTX-R transplantable. *Revista Chilena de Cancerología y Hematología*, 16:162-74, 2001.
- Garrido, O.; Letelier, R.; Rosas, C.; Fuenzalida, M.; Ferreira, A. & Lemus, D. Betamethasone inhibits tumor development, microvessel density and prolongs

survival in mice with a multiresistant adenocarcinoma TA3. *Biol. Res.*, 43(3):317-22, 2010.

Gately, S. & Li, W. W. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin. Oncol.*, 31(2 Suppl 7):2-11, 2004.

Gavalas, N. G.; Lontos, M.; Trachana, S.-P.; Bagratuni, T.; Arapinis, C.; Liacos, C.; Dimopoulos, M. A.; Bamias, A. Angiogenesis-Related Pathways in the Pathogenesis of Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 15885-15909, 2013.

Guerrero, A.; Zipper, D. & Dabancens, A. Actividad antineoplásica ejercida por quinacrina oral sobre tumores malignos en ratón. *Revista Chilena de Cancerología y Hematología* 2:119-22, 1992.

Ghosh, N.; Chaki, R.; Mandal, V. & Mandal S. C. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmalogical Rec.*, 62:233-44, 2010.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74, 2011.

Hilmi, I. & Goh, K. L. Chemoprevention of colorectal cancer with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Chin. J. Dig. Dis.*, 7:1-6, 2006.

Husain, S. S.; Szabo, I. L. & Tarnawski, A. S. NSAID inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action. *Am. J. Gastroenterol.*, 97:542-53, 2002.

- Ibrahim, M. M.; Abd-Elgawad, A. H.; Soliman, O. A. & Jablonski, M. M. Nanoparticle-based topical ophthalmic formulations for sustained celecoxib release. *J. Pharm. Sci.*, 102(3):1036-53, 2012.
- Illanes, J.; Dabancens, A.; Acuña, O.; Fuenzalida, M.; Guerrero, A.; Lopez, C. & Lemus, D. Effects of betamethasone, sulindac and quinacrine drugs on the inflammatory neoangiogenesis response induced by polyurethane sponge implanted in mouse. *Biol. Res.*, 35(3-4):339-45, 2002.
- Jang, T. J.; Jung, H. G.; Jung, K. H. & O, M. K. Chemopreventive effect of celecoxib and expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 on chemically-induced rat mammary tumours. *Int. J. Exp. Pathol.*, 83(4):173-82, 2002.
- Jendrossek, V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer Letters*, 332:313–324, 2013.
- Kaplan, R. N.; Riba, R. D.; Zacharoulis, S.; Bramley, A. H.; Vincent, L.; Costa, C.; MacDonald, D. D.; Jin, D. K.; Shido, K.; Kerns, S. A.; Zhu, Z.; Hicklin, D.; Wu, Y.; Port, J.L.; Altorki, N.; Port, E. R.; Ruggero, D.; Shmelkov, S. V.; Jensen, K. K.; Rafii, S. & Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438:820–7, 2005.
- Kim, T. H.; Jeong, Y. I.; Jin, S. G.; Pei, J.; Jung, T. Y.; Moon, K. S.; Kim, I. Y.; Kang, S. S. & Jung, S. Preparation of polylactide-co-glycolide nanoparticles incorporating celecoxib and their antitumor activity against brain tumor cells. *Int. J. Nanomedicine*, 6:2621-31, 2011.
- Kerbel, R. S. Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 8;358(19):2039-49, 2008.

- Koçkaya, E. A.; Selmanoğlu, G.; Kismet, K. & Akay, M. T. Pathological and biochemical effects of therapeutic and suprathapeutic doses of celecoxib in Wistar albino male rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 33(4):410-14, 2010.
- Kohane, D.; Lipp, M.; Kinney, R.; Anthony, D.; Louis, D.; Lotan N. & Langer, R. Biocompatibility of lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine in the epineurium. *J. Biomed. Mater. Res.*, 59(3):450-9, 2002.
- Kohane D. Microparticles and Nanoparticles for Drug Delivery. *Biotechnol. Bioengin.*, 96(2):203-9, 2007.
- Mäkinen, T.; Jussila, L.; Veikkola, T.; Karpanen, T.; Kettunen, M. I., Pulkkanen, K. J.; Kauppinen, R.; Jackson, D. J.; Kubo, H.; Nishikawa, S.; Ylä-Herttuala, S. & Alitalo, K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat. Med.*, 7:199-205, 2001.
- Masferrer, J. L.; Leahy, K. M.; Koki, A. T.; Zweifel, B. S.; Settle, S. L.; Woerner, B. M. & Edwards, D. A, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.*, 1;60(5):1306-11, 2000.
- Miranda, P.; Suazo Galdames, I.; Zavando, D.; Arenas, P.; Velásquez, L.; Vilos, C. & Cantín, M. In vivo biocompatibility of the PLGA microparticles in parotid gland. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 6(11):2412-2418, 2013.
- Mukerjee, A. & Vishwanatha, J. K. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Res.*, 29:3867-76, 2009.

- Labelle, M.; Hynes, R. O. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov*, (12):1091-9, 2012.
- López, N. C.; Valck, C.; Ramírez, G.; Rodríguez, M.; Ribeiro, C. et al. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(7): e730, 2010.
- Ohta, M.; Konno, H.; Tanaka, T.; Baba, M.; Kamiya, K.; Syouji, T.; Kondoh, K.; Watanabe, M.; Terada, H. & Nakamura, S. The significance of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in gastric cancer. *Cancer Lett.*, 192:215-25, 2003.
- Oklu, R.; Walker, T. G.; Wicky, S. & Hesketh, R. Angiogenesis and current antiangiogenic strategies for the treatment of cancer. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 21(12):1791-805 2010.
- O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R. & Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 24;88(2):277-85, 1997.
- Partanen, T. A. & Paavonen, K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc. Res. Tech.*, 55:108-21, 2001.
- Pedrina, J.; Eruslanov, E.; Judy, B.; Kapoor, V.; Cheng, G.; Wang, L. C.; Sun, J.; Moon, E. K.; Fridlender, Z. G.; Albelda, S. & Singhal, S. Changes in the local tumor microenvironment in recurrent cancers may explain the failure of vaccines after surgery. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(5): 2013.

Peng, L.; Zhou, Y.; Wang, Y.; Mou, H. & Zhao, Q. Prognostic significance of COX-2 immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*, 8(3):e58891, 2013.

Pérez, V. L. VEGF-A y COX-2 en la angiogénesis del carcinoma de mama. Publicaciones de la Universidad de Málaga, España. 2011.

Prophet, E. B.; Mills, B.; Arrington, J. B. & Sobin, L. H., *Manual de Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América*. 5ª. Washington, 1995.

Qi, X.; Song, X.; Liu, P.; Yi, T.; Li, S.; Xie, C.; Zheng, Y.; Bai, Y.; Sun, C.; Wei, Y. & Zhao, Y. Antitumor effects of PLGA nanoparticles encapsulating the human PNAS-4 gene combined with cisplatin in ovarian cancer. *Oncology Reports*, 6(3):703-10, 2011.

Raut, C. P.; Nawrocki, S.; Lashinger, L. M.; Davis, D. W.; Khanbolooki, S.; Xiong, H.; Ellis, L. M. & McConkey, D. J. Celecoxib inhibits angiogenesis by inducing endothelial cell apoptosis in human pancreatic tumor xenografts. *Cancer Biol. Ther.*, 3(12):1217-24, 2004.

Remuñán, C. & Alonso, M. Microencapsulación de medicamentos. Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Madrid, Ed. Síntesis, S.A., 1997.

Rodríguez, P. Lampurlanés-Balvoa, D. Pérez-Pinto, C. Roa, R. Rivera, C. Revisión sistemática: células e inductores de angiogénesis tumoral. *Rev. Med. Maule*,

29(1), 2013.

Rosas, C. C.; Roa, I.; Sinning, O. M.; Fuenzalida, B. M. & Lemus, A. D. Efecto de celecoxib en una variante multirresistente del tumor TA3. Una descripción histológica. *Int. J. Morphol.*, 31(2):392-398, 2013.

Rosas, C.; Sinning, M.; Ginesta, F.; Ferreira, A.; Fuenzalida, M. & Lemus, D. Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis in a tumor cell line resistance to chemotherapy. *Biol. Res.* 2014. Submitted.

Saez, V.; Hernández, J. R. & Peniche, C. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biología Aplicada*, 24:98-107, 2007.

Schalper, P. J.; Schalper, C. K.; Piérart, Z. C. & Piérart, P. J. Análisis de la distribución de los componentes de membrana basal laminina, fibronectina y colágeno IV en vasos sanguíneos de patología mamaria benigna y maligna *Rev. Chil. Cirg.* 55(3):249-55, 2003.

Silverstein, F. E.; Faich, G.; Goldstein, J. L.; Simon, L. S.; Pincus, T.; Whelton, A.; Makuch, R.; Eisen, G.; Agrawal, N. M.; Stenson, W. F.; Burr, A. M.; Zhao, W. W.; Kent, J. D.; Lefkowitz, J. B.; Verburg, K. M. & Geis, G. S. Gastrointestinal Toxicity With Celecoxib vs Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs for Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *JAMA*, 284:1247-55, 2000.

Tabata, Y. & Ikada, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L- lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22:837–858, 1988.

Toledo, V.; Ramírez, G.; Valck, C.; López, N.; Ribeiro, C. H., Maldonado, I.; Aguilar, L.; Lemus, D. & Ferreira, A. Comparative in vivo antiangiogenic effects of

calreticulin from *Trypanosoma cruzi* and *Homo sapiens sapiens*. *Biol. Res.*, 43(3):287-9, 2010.

Veikkola, T.; Karkkainen, M.; Cleasson-Welsh, L. & Alitalo, K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.*, 60:203-12, 2000.

Venkatesan, P.; Puvvada N, Dash R, Prashanth Kumar BN, Sarkar D, Azab B, Pathak A, Kundu SC, Fisher PB, Mandal M. The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials*, 32(15):3794-806, 2011.

Vilos, C. & Velasquez, L. A. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, Article ID 672760, 2012.

Wang, D. & Dubois, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 10(3):181-93, 2010.

Wang, X.; Zhang, L.; O'Neill, A.; Bahamon, B.; Alsop, D. C.; Mier, J. W.; Goldberg, S. N.; Signoretti, S.; Atkins, M. B.; Wood, C. G. & Bhatt, R. S. Cox-2 inhibition enhances the activity of sunitinib in human renal cell carcinoma xenografts. *Br. J. Cancer*, 108(2):319-26, 2013.

Xu, X.; Xie, C.; Wang, X.; Liu, J.; Yu, Y.; Hu, H. & Guo, C. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Tohoku J. Exp. Med.*, 215:149-157, 2008.

- Yancopoulos, G. D.; Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S.; Wiegand, S. J. & Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407: 242-8, 2000.
- Yeo, Y.; Ito, T.; Bellas, E.; Highley, C.; Marini, R. & Kohane, D. In situ cross-linkable hyaluronan hydrogels containing polymeric nanoparticles for preventing post-surgical adhesions. *Ann. Surg.*, 245(5):819-24, 2007.
- Yokoyama, Y.; Charnock-Jones, D. S.; Licence, D.; Yanaihara, A.; Hastings, J. M.; Holland, C. M.; Emoto, M.; Sakamoto, A.; Sakamoto, T.; Maruyama, H.; Sato, S.; Mizunuma, H. & Smith, S. K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)- D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 9:1361-9, 2003.
- Zhang, Y. H.; Yue, Z. J.; Zhang, H.; Tang, G. S.; Wang, Y. & Liu, J. M. Temozolomide/PLGA microparticles plus vatalanib inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic glioma model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 76:371-5, 2010.
- Zhang, D.; Guo, Q.; Zhu, J. & Chen, W. Increase of cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib combined with 5-FU enhances tumor cell apoptosis and antitumor efficacy in a subcutaneous implantation tumor model of human colon cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 11:16, 2013.
- Zúñiga, J.; Fuenzalida, M.; Guerrero, A.; Illanes, J.; Dabancens, A.; Díaz, E. & Lemus, D. Effects of steroidal and non steroidal drugs on the neovascularization response induced by tumoral TA3 supernatant on CAM from chick embryo. *Biol. Res.*, 36(2):233-40, 2003.