



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Uso de nanotecnología en el tratamiento de  
cáncer de cabeza y cuello**

**Use of nanotechnology  
in the treatment of head and neck cancer**

**Autor: Clara Cagigas Castro**

**Director/es: Nerea Iturrioz Rodríguez**

**Juan Carlos Villegas Sordo**

**Santander, junio 2018**

## ÍNDICE

RESUMEN	3
<b>1. RASGOS GENERALES DEL CÁNCER</b>	<b>4-10</b>
1.1 Características del cáncer	5-10
1.1.1 Mantenimiento de la señalización proliferativa	5
1.1.2 Evasión de señales supresoras de crecimiento	5-6
1.1.3 Resistencia a la muerte celular	6-7
1.1.4 Capacidad de división ilimitada	8
1.1.5 Inducción de la angiogénesis	8-9
1.1.6 Activación de la invasión de tejidos y metástasis.	9-10
<b>2. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO</b>	<b>11-21</b>
2.1 Patogénesis del carcinoma escamoso de cabeza y cuello	12-15
2.1.1 Patogénesis mediada por HPV	13-15
2.2 Cambios en las vías de señalización	15-16
2.2.1 La ruta EGFR	15
2.2.2 La ruta TGF $\beta$	15-16
2.3 Invasión y metástasis	16
2.4 Tratamiento actual del HNSCC	16-21
2.4.1 Objetivos del tratamiento	16
2.4.2 Estadificación	17
2.4.3 Diagnóstico clínico	17-19
2.4.4 Agentes quimioterapéuticos	19-21
<u>Quimioterapia sistémica</u>	20
<u>Agentes dirigidos</u>	20-21
<u>Inmunoterapia</u>	21
<b>3. NANOMEDICINA</b>	<b>22-35</b>
3.1 Introducción a la nanomedicina	22-25

<b>3.2 Distribución, propiedades y funcionalización de las nanopartículas</b>	<b>25-29</b>
3.2.1 <i>Abordaje activo-pasivo</i>	26-27
3.2.2 <i>Propiedades de las nanopartículas</i>	27-28
3.2.3 <i>Funcionalización de las nanopartículas</i>	28-29
<b>3.3 Sistemas de transporte y su aplicación en el cáncer de cabeza y cuello</b>	<b>29-35</b>
3.3.1 <i>Sistemas virales</i>	29
3.3.2 <i>Nanopartículas inorgánicas</i>	29-31
<u>Nanotubos de carbono</u>	29
<u>Nanopartículas de oro</u>	29-30
<u>Nanopartículas de hierro (hipertermia)</u>	30-31
3.3.3 <i>Sistemas lipídicos</i>	32-33
<u>Liposomas</u>	32-33
<u>Sistemas híbridos</u>	33
3.3.4 <i>Sistemas poliméricos</i>	33-35
<u>Dendrímeros</u>	33
<u>Nanopartículas de albúmina</u>	34-35
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>37-43</b>

## RESUMEN

Para los pacientes con HNSCC que no son curados por cirugía y/o radioterapia, hay pocas opciones de tratamiento efectivas. La radiorresistencia se ha señalado como la principal causa de fracaso del tratamiento locoregional, y la identificación de los mecanismos moleculares que están detrás de ella podría contribuir a una mejora en la selección del tratamiento y pronóstico. La primera terapia dirigida con éxito (anticuerpos específicos EGFR) ha demostrado que la mejora de la comprensión de los mecanismos moleculares del HNSCC permitirá desarrollar nuevos protocolos de tratamiento. Actualmente, la investigación en el campo del cáncer de cabeza y cuello se está enfocando en el desarrollo de nuevos sistemas de transporte basados en nanotecnología, con el objetivo de hacer frente a los inconvenientes de las actuales técnicas y de mejorar las estrategias de diagnóstico y tratamiento. El propósito de la comunidad científica es el de desarrollar nuevos y más efectivos sistemas para la distribución de los fármacos basados en nanopartículas, optimizando las rutas de tratamiento tanto orales, como bucales e intravenosas y reduciendo los efectos nocivos sobre los tejidos sanos.

Palabras clave: Cáncer cabeza cuello, sistemas de transporte, nanopartículas

## ABSTRACT

For patients with HNSCC that are not cured by surgery and/or chemotherapy, there are few effective choices of treatment. Radioresistance has been identified as the main cause of failure of the locoregional treatment, and the identification of the molecular mechanisms that are behind it could contribute to a better selection of treatment and prognosis. The first target therapy with reported success (EGFR specific monoclonal antibodies) has proved that the improvement in the understanding of HNSCC's molecular mechanisms will lead to the development of new treatment protocols. Currently, research in the field of head and neck cancer focuses on the design of new devices based on nanotechnology in order to face the disadvantages of current techniques and to improve diagnosis and treatment strategies. The aim of the scientific community is to develop newer and more effective nanoparticle-based delivery systems, optimizing oral, buccal and intravenous routes of treatment and decreasing toxic effects in healthy tissues.

Keywords: Head and neck cancer, delivery systems, nanoparticles

## 1. RASGOS GENERALES DEL CÁNCER

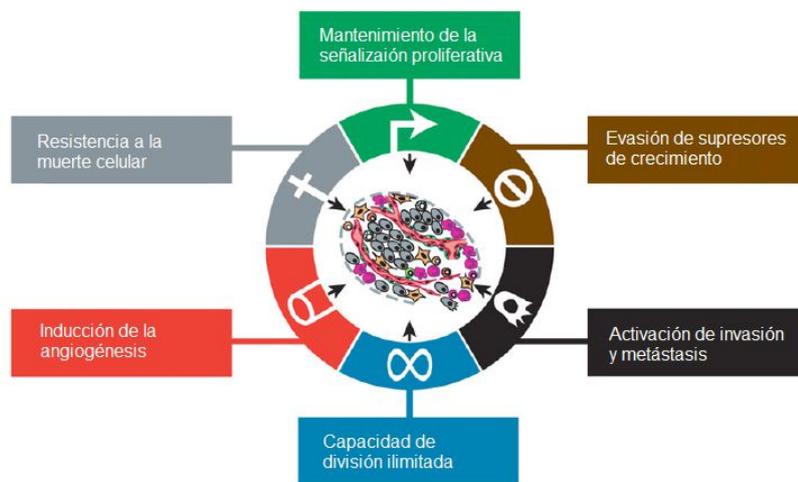
El cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas que tienen en común la división incontrolada de un grupo de células, que podrán diseminarse o no a otros tejidos del organismo. Una característica importante de las células cancerosas, que las diferencia de las normales, es que sufren un proceso de dediferenciación, es decir, se vuelven menos especializadas y adquieren otras capacidades como la evasión de la apoptosis y del sistema inmunitario (Instituto Nacional del Cáncer).

Las células tumorales sufren una acumulación de múltiples mutaciones que determinarán su comportamiento. Dichas mutaciones tienden a afectar a tres tipos principales de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de DNA. Los proto-oncogenes intervienen en la regulación del crecimiento y la división celular normal. Cuando sufren alteraciones que conllevan un aumento de su actividad (sobreexpresión) pueden convertirse en genes causantes del cáncer u oncogenes, permitiendo que las células crezcan y sobrevivan cuando no deberían. Los genes supresores de tumores se encargan también del control del crecimiento y la división celular, por lo que una disminución en su expresión puede otorgar a las células una capacidad de división descontrolada. Por último, los genes reparadores de DNA tienen la función de reparar el DNA cuando éste está dañado. De este modo, las células con mutaciones en ellos tienden a formar mutaciones adicionales en otros genes, lo que podría hacer que las células se vuelvan cancerosas (Instituto Nacional del Cáncer).

Sin embargo, los tumores no son simplemente un grupo de células que se dividen sin control, sino que en realidad son tejidos muy complejos formados por distintos tipos de células, que trabajan activamente unas con otras. Dentro de ellas juegan un papel fundamental un “pool” de células normales que forman el estroma asociado al tumor, y que tienen un papel activo en el proceso de tumorigénesis (Hanahan & Weinberg, 2011).

Hoy en día, cuando describimos un tumor, no sólo podemos hacer referencia a las características de las células tumorales, sino que hay que tener también en cuenta las contribuciones del microambiente tumoral, como lo describieron Hanahan y Weinberg en su trabajo (Hanahan & Weinberg, 2011).

Durante las diferentes fases del desarrollo tumoral se van adquiriendo una serie de funciones biológicas distintas que dan lugar a las características del cáncer (**Figura 1**). Éstas incluyen: 1) el



**Figura 1.** Las seis características del cáncer modificado del trabajo de Hanahan y Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011).

mantenimiento de la señalización proliferativa, 2) la evasión de señales supresoras de crecimiento, 3) la resistencia a la muerte celular, 4) la capacidad de división ilimitada, 5) la inducción de la angiogénesis y 6) la activación de la invasión de tejidos y metástasis. Detrás de estas características están la inestabilidad del genoma, lo que genera la diversidad genética que facilita su adquisición, y la inflamación, lo cual fomenta múltiples funciones de las citadas anteriormente (Hanahan & Weinberg, 2011).

## 1.1. Características del cáncer

### 1.1.1 Mantenimiento de la señalización proliferativa

La proliferación crónica podría considerarse el rasgo principal de las células tumorales. Los tejidos normales controlan rigurosamente la producción y liberación de señales de crecimiento que promueven la entrada y la progresión de la célula a lo largo del ciclo celular, lo cual permite mantener la correcta función y arquitectura del tejido. Este proceso de señalización está mediado en gran parte por factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular, los cuales suelen contener dominios intracelulares tirosina-quinasa. Tras esta unión se emiten señales intracelulares que regulan desde la progresión a través del ciclo celular hasta aspectos como el metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011).

Las células cancerosas tienen una serie de mecanismos para mantener la señalización proliferativa, entre los que se encuentran:

- Producir factores de crecimiento ligandos por ellas mismas (proliferación autocrina).
- Mandar señales a las células del estroma que a su vez responden al ser estimuladas produciendo factores de crecimiento que tienen como diana las células tumorales (Cheng et al., 2008).
- Aumentar la cantidad de receptores de la superficie celular para hacer las células hipersensibles a esos estímulos.
- Modificar la estructura de los receptores para que el ligando se una fácilmente independientemente de su concentración.
- Activar de manera constitutiva circuitos de señalización que en condiciones normales deberían ser activados sólo mediante receptores de factores de crecimiento (Hanahan & Weinberg, 2011).
- Interrumpir los mecanismos de retroalimentación negativa que atenúan la señalización proliferativa, y que están presentes en las células normales con el objetivo de regular la homeostasis (Wertz & Dixit, 2010).

### 1.1.2 Evasión de señales supresoras de crecimiento

Además de inducir y mantener señales de estimulación de crecimiento, las células tumorales son capaces también de eludir ciertas vías que regulan negativamente la proliferación celular, muchas de las cuales dependen de la acción de los genes supresores de tumores. Los dos supresores tumorales más importantes codifican para el retinoblastoma (RB) y las proteínas TP53. Ambos se encargan de regular los circuitos de proliferación y apoptosis de las células (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por un lado, El RB es un gen que se encuentra mutado o funcionalmente inactivo en la mayoría de los cánceres. Es un regulador de la transcripción que lleva a cabo su función de control del ciclo celular a través de su interacción con factores de crecimiento y modeladores de la cromatina que contribuyen a la supresión de genes importantes en la progresión del ciclo celular. Sus funciones en la regulación de la cromatina afectan a la estabilidad del genoma, contribuyendo a 1) la reparación del DNA, 2) el mantenimiento de telomerasas, 3) la condensación y cohesión de los cromosomas, y por último, 4) el silenciamiento de regiones repetidas (Vélez-Cruz & Johnson, 2017).

Por su parte, la proteína p53 es un factor de transcripción que controla el estado del DNA, e inhibe la progresión del ciclo celular si existe alguna lesión en esta molécula (Angosto et al., 2003). La p53 se une a elementos específicos del DNA, modulando la transcripción de genes que gobiernan los principales mecanismos de defensa contra el crecimiento tumoral (Kang & Rosenwaks, 2018).

Estos genes se han visto mutados e inactivados en cánceres tanto humanos como animales, favoreciendo el crecimiento y la proliferación de los mismos (Hanahan & Weinberg, 2011).

### *1.1.3 Resistencia a la muerte celular*

La muerte celular por apoptosis es un proceso celular fundamental esencial para el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos y constituye una barrera natural para el desarrollo del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Su misión es eliminar las células dañadas, infectadas o transformadas. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye: 1) la condensación citoplasmática y nuclear, 2) la rotura específica de proteínas celulares, 3) la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos y 4) la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos (Angosto et al., 2003). Ante estímulos como daños en el DNA asociados a la hiperproliferación o niveles elevados de señalización oncogénica, la célula pone en marcha mecanismos que la llevarán a entrar en apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011).

A grandes rasgos existen dos mecanismos en el proceso apoptótico, uno que recibe y procesa señales extracelulares de inducción a la muerte celular (por unión de ligando) y otro intrínseco que detecta señales de origen intracelular (estrés celular o daño en el DNA) (**Figura 2**). Ambos mecanismos convergen en la activación de una proteasa normalmente latente (la 8 en la vía extrínseca y la 9 en la intrínseca), que inicia la cascada de proteólisis y que incluye la acción de caspasas efectoras en el camino hacia la apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011).

La vía intrínseca, requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c y smac/diablo. El citocromo c funciona uniéndose a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas, mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). El IAP afecta tanto a las caspasas iniciadoras como a las ejecutoras (Angosto et al., 2003).

En cuanto a la vía extrínseca, después de la activación de un receptor de los denominados de muerte, la proteína adaptadora FADD media la inmediata activación de la caspasa-8 (caspasa iniciadora). La caspasa-8 una vez activada, desencadena su vez, la activación de otras caspasas, entre las que se incluye la caspasa-3 (caspasa ejecutora) (Angosto et al., 2003).

De este modo, pueden distinguirse dos tipos de reguladores en el proceso de apoptosis: activadores (como el citocromo c, smac/diablo, AIF o BIR3, por ejemplo) y reguladores negativos o inhibidores (como IAP, Hsp, Bcl-2 y BclXL entre otros) (Angosto et al., 2003).

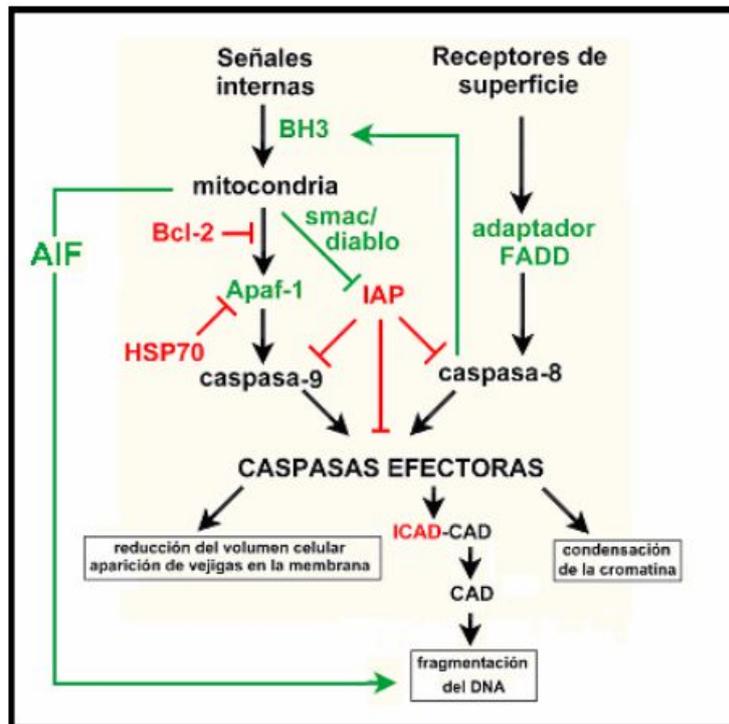


Figura 2. Esquema de las fases del proceso de apoptosis y de los factores que en él intervienen (Angosto et al., 2003).

Existen ya evidencias que establecen una relación entre algunos genes que intervienen en la regulación de la apoptosis y los que intervienen en el desarrollo del cáncer. Los dos ejemplos más conocidos son los genes que codifican para la proteína p53 y los miembros de la familia Bcl-2 (Figura 3). Una vez detectada la lesión en el DNA, la p53 se eleva y las células en proliferación se detienen en G1. Esto proporciona un lapso de tiempo para que se lleve a cabo la reparación del DNA, antes de iniciar la siguiente ronda de replicación. Si se mantienen concentraciones elevadas de p53 por un tiempo prolongado, se desencadenará la apoptosis por inducción de la expresión de Bax y otras proteínas. Sin embargo, la sobreexpresión de Bcl-2 contrarresta el efecto apoptogénico de p53, haciendo que las células continúen proliferando, como ocurre en ciertos tumores (Angosto et al., 2003).

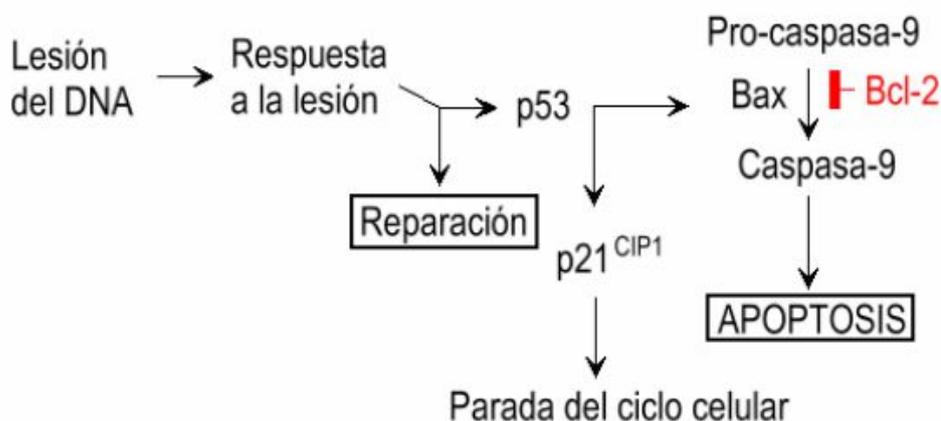


Figura 3. Papel de las proteínas p53 y BCL-2 en la ejecución de la apoptosis (Angosto et al., 2003).

#### *1.1.4 Capacidad de división ilimitada*

En condiciones normales, las células son capaces de llevar a cabo un cierto número de ciclos de crecimiento y división, limitados por la senescencia y la muerte celular. Los responsables de este proceso son los telómeros, repeticiones de hexanucleótidos colocados en tándem que se sitúan en los extremos de los cromosomas y que se van acortando en cada ciclo de división. La telomerasa, una DNA polimerasa especializada que añade segmentos repetidos a los extremos del DNA, se encuentra inactiva en las células mortales, pero se encuentra expresada en niveles funcionalmente significativos en la gran mayoría (~90%) de las células espontáneamente inmortalizadas, permitiéndoles adquirir un potencial replicativo ilimitado (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### *1.1.5 Inducción de la angiogénesis*

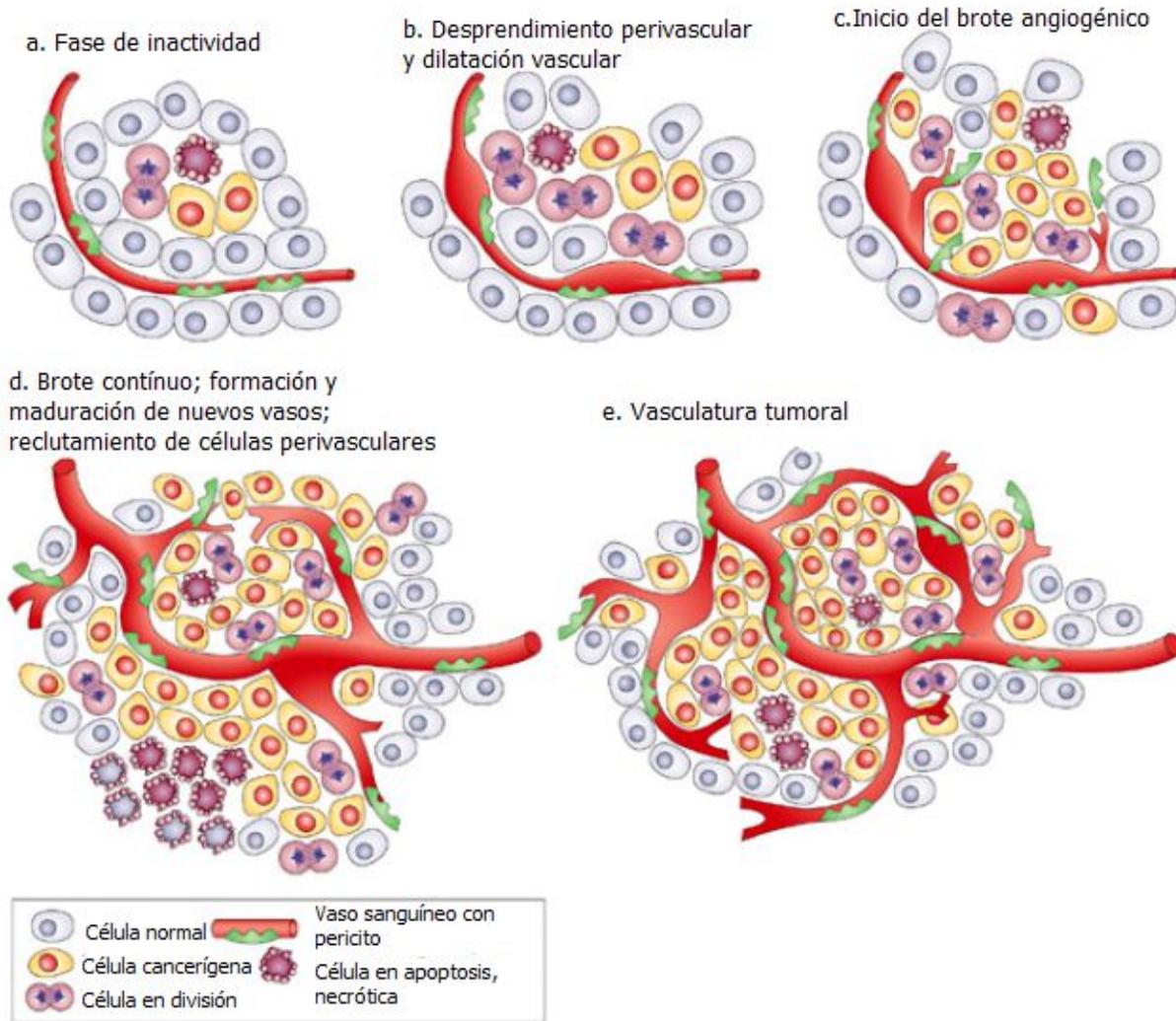
La angiogénesis es el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Ocurre a lo largo de la vida tanto en condiciones fisiológicas como de enfermedad. Al igual que los tejidos normales, las células tumorales requieren de un sistema de aporte de nutrientes y oxígeno y retirada de desechos metabólicos y dióxido de carbono, lo cual consiguen a través de la angiogénesis; proceso que en el adulto en condiciones fisiológicas sólo ocurre de forma transitoria (Adair & Montani, 2010).

Ante un estímulo angiogénico (**Figura 4**), como ocurre en los tumores, el vaso original incrementa su actividad de síntesis, aumentando así el número de células endoteliales. Posteriormente se disuelve su membrana basal, dejando paso a células que van constituyendo yemas vasculares que se ramifican y se ahuecan, formando nuevos entramados capilares. Los neovasos van a ser vasos dilatados, tortuosos y con poca elasticidad muscular, por los que la sangre circula lentamente. Además, las células endoteliales están más separadas, lo que las permite ser más permeables a proteínas plasmáticas y al paso de células (Biocancer Research Journal).

El proceso de angiogénesis tiene lugar como resultado de un equilibrio entre factores inductores como el factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF-A) e inhibidores, como la trombospondina-1 (TSP-1), producidos tanto por células tumorales como por células del estroma (Hanahan & Weinberg, 2011).

La expresión génica de VEGF puede ser activada por hipoxia y por oncogénesis. Además, algunos miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) están también implicados en el mantenimiento de la angiogénesis tumoral cuando su expresión está aumentada crónicamente (Baeriswyl & Christofori, 2009).

A su vez, la TSP-1, evoca señales supresoras que contrarrestan los estímulos proangiogénicos, al igual que fragmentos de plasmina (angiostatina) y colágeno de tipo 18 (endostatina), que pueden actuar como inhibidores endógenos de la angiogénesis (Kazerounian et al., 2008).



**Figura 4.** Fases principales del proceso de angiogénesis. El inicio del proceso se conoce como “cambio angiogénico”, a través del cual los tumores adquieren la capacidad de crecer y diseminarse más allá de su localización primaria, y que puede ser activado por hipoxia, hipoglucemia, estrés mecánico e inflamación (Loizzi et al., 2017).

Es de destacar que este proceso no ocurre sólo en tumores macroscópicos de rápido crecimiento, sino que también está presente ya en las fases iniciales de la progresión neoplásica (Hanahan & Weinberg, 2011). Este mecanismo, supone además un sistema de transporte mediante el cual las células tumorales pueden metastatizar a órganos distantes (Kazerounian et al., 2008).

#### 1.1.6 Activación de invasión y metástasis

La invasión es el proceso mediante el cual las células tumorales interaccionan con la matriz extracelular (formada por las membranas basales y el estroma intersticial), para conseguir su salida del tejido de origen. Este proceso se lleva a cabo gracias a la intervención de diversas proteínas.

Al contrario que las células normales, las células tumorales no necesitan de un anclaje para dividirse (Hanahan & Weinberg, 2011). Permanecen unidas entre sí mediante unas glucoproteínas de adhesión, como la cadherina-E, por lo que la pérdida de función o de expresión de las cadherinas, determina la pérdida de adhesión de las células y su desprendimiento del tumor, facilitando la invasión de tejidos circundantes. Diferentes mecanismos de inactivación de la E-cadherina han sido

identificadas en cánceres humanos, como mutaciones hereditarias y somáticas, procesamiento aberrante de proteínas, incremento en la metilación de promotores e inducción de represores de la transcripción entre otros (Berx & Roy, 2009).

Además, en algunos carcinomas altamente invasivos, la expresión de genes que codifican otras moléculas de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular están demostrablemente alteradas. Por el contrario, moléculas de adhesión asociadas normalmente con migraciones celulares que tienen lugar durante la embriogénesis y la inflamación, ven aumentada su expresión en tejidos tumorales. Un ejemplo es la N-cadherina, proteína expresada normalmente en neuronas que migran y en células mesenquimales durante la organogénesis, que tiene aumentada su expresión en numerosas células de carcinomas invasivos (Cavallaro & Christofori, 2004).

Una vez que las células se han desprendido del tumor original van a adherirse en primer lugar a la matriz extracelular, para después continuar con su proceso de diseminación por distintas estructuras, tanto por contigüidad, como a través de vasos sanguíneos o linfáticos. En este proceso están implicadas distintas glucoproteínas presentes en la matriz extracelular (Cavallaro & Christofori, 2004). Una vez invadida la matriz extracelular, el 80% de los tumores llegarán a los tejidos periféricos, aunque sólo el 0.01% conseguirán formar colonias metastásicas (Biocancer Research Journal). Las metástasis pueden permanecer silentes en forma subclínica hasta años más tarde, dependiendo del equilibrio entre la proliferación, la apoptosis y la actividad angiogénica (Biocancer Research Journal).

En este trabajo nos centraremos en concreto en el cáncer de cabeza y cuello, de gran importancia en la actualidad, tanto por el incremento de su prevalencia como por la aparición de nuevas estrategias de tratamiento.

## 2. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El tipo de cáncer más común de cabeza y cuello es el carcinoma de células escamosas o carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC), que aparece en la cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, nasofaringe, glándulas salivares y senos paranasales, ocupando el sexto lugar en cuanto a incidencia mundial de cáncer (Kamangar, 2016). Representa en torno al 90% de los cánceres de cabeza y cuello y comprende un grupo heterogéneo de tumores que en general son de naturaleza agresiva y difíciles de tratar, y cuyo tratamiento puede causar efectos secundarios severos y a largo plazo (Suh et al., 2014).

Se pueden distinguir al menos dos subclases genéticas dentro del HNSCC: HPV-positivo y HPV-negativo, cuyas principales diferencias vienen recogidas en la **Tabla 1**. Su estadio viene determinado por la extensión del tumor y la presencia de metástasis en vasos linfáticos y metástasis a distancia (siendo lo más frecuente la invasión primaria de nódulos linfáticos regionales, y más raramente a otros órganos por vía hematógena). El estadio del tumor se determina en base a la exploración clínica, técnicas de imagen, citología de los ganglios linfáticos y un examen histopatológico después de la cirugía (Leemans et al., 2011).

El principal factor de riesgo identificados son la exposición a carcinógenos, en especial el consumo de alcohol y el tabaco, que parecen tener un efecto sinérgico. Por otro lado, los subtipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (HPV) se han relacionado en particular con el carcinoma orofaríngeo. Además de los factores de riesgo exógenos citados, es de señalar la predisposición genética: existen algunas enfermedades hereditarias como la anemia de Falconi que predisponen al desarrollo del HNSCC (Kutler et al., 2003).

Durante la pasada década, la incidencia del HNSCC ha disminuido levemente en algunas zonas del mundo occidental, lo cual se atribuye a una reducción en la exposición a factores de riesgo tradicionales, especialmente el tabaco, gracias en parte a las medidas de salud pública. Sin embargo, en la actualidad los cánceres de lengua y en particular orofaríngeos están aumentando su prevalencia, debido probablemente al incremento de las infecciones orales y orofaríngeas por el VPH de alto riesgo (Leemans et al., 2011).

**Tabla 1.** Diferencias clínicas y biológicas entre HNSCC HPV negativos y HPV positivos (Leemans et al., 2011).

	HNSCC HPV-negativo	HNSCC HPV-positivo
<b>Incidencia</b>	Disminuyendo	Incrementando
<b>Etiología</b>	Tabaco, consumo excesivo de alcohol	Sexo oral
<b>Edad</b>	Mayores de 60 años	Menores de 60 años
<b>Cancerización del campo</b>	Sí	Desconocido
<b>Mutaciones TP53</b>	Frecuentes	Infrecuentes
<b>Localización preferente</b>	No hay	Orofaringe
<b>Pronóstico</b>	Pobre	Favorable

## 2.1 Patogénesis del HNSCC

En cuanto a la patogénesis, la lesión precursora más común del HNSCC es la leucoplasia oral (**Figura 5**), una lesión blanquecina en la mucosa de la cavidad oral cuya prevalencia varía entre 0.1% y 0.5%. (Napier & Speight, 2008).



*Figura 5. Imagen representando leucoplasia oral (círculo rojo) (Carrard & Van der Waal, 2017).*

Aunque la proporción de leucoplasia oral que deriva en cáncer depende de varios factores, como la población estudiada, la definición de leucoplasia usada y el tiempo de observación, se puede asumir que la tasa de transformación maligna está entre 1-2% al año. Los factores de riesgo para la progresión son el género femenino, el tamaño de la lesión y el grado de displasia (Napier & Speight, 2008).

A pesar de los grandes avances en el campo de la biología molecular no hay ningún marcador fiable que prediga la potencial transformación maligna de la mucosa oral. Por ello, se considera adecuado siempre que sea posible tratar la leucoplasia oral u orofaríngea mediante cirugía o técnica de láser (Van der Waal, 2010), aunque no hay evidencia científica de que este procedimiento sea capaz de prevenir el HNSCC. Esto puede deberse o bien a que la leucoplasia recurre, aunque se extirpe, o bien a que el cáncer se desarrolla independientemente de las lesiones visibles (Partridge et al., 2000). Por tanto, se recomienda en estos pacientes un seguimiento oral de por vida a intervalos de no más de seis meses. (Van der Waal, 2010).

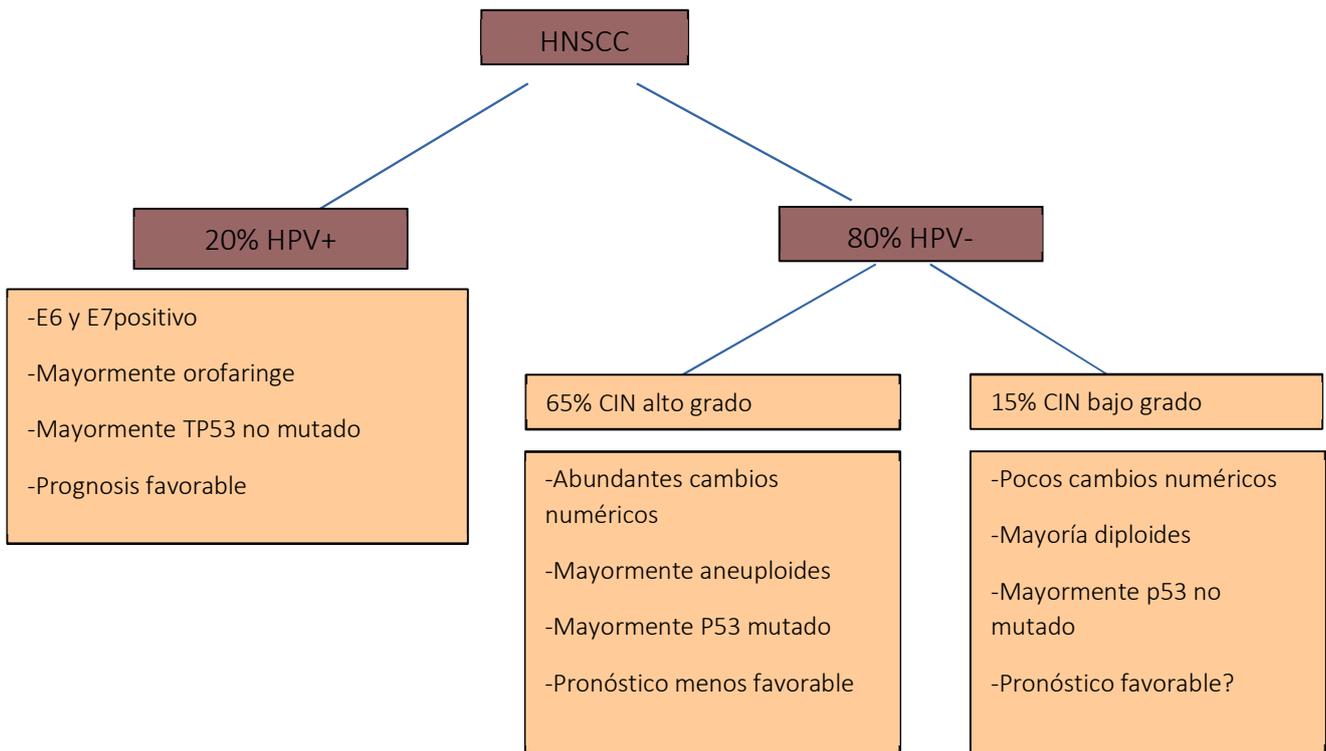
Los problemas de clasificación histológica y el tratamiento de la leucoplasia han potenciado el desarrollo de estudios moleculares para evaluar el riesgo de la progresión y la identificación de dianas de tratamiento. Algunos estudios han demostrado que la presencia y número de cambios genéticos asociados al cáncer pueden ser usados para distinguir las leucoplasias de bajo riesgo de aquellas de alto riesgo de transformación maligna (Napier & Speight, 2008).

En 1996, se postuló el primer modelo genético de progresión de HNSCC basado en la caracterización genética de los cambios morfológicos en el epitelio escamoso (Califano et al., 1996). La pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 3, 9 y 17 parecían tener lugar en la displasia, reflejando aparentemente una carcinogénesis inicial, mientras que otras alteraciones en los cromosomas 11 y 8 se presentaban típicamente en los carcinomas, correspondiendo probablemente con una fase más tardía de la carcinogénesis (Leemans et al., 2011). Usando estos marcadores genéticos combinados con mutaciones en TP53, se demostró que en al menos un 35% de los tumores orales y orofaríngeos analizados, el carcinoma estaba rodeado de epitelio mucoso que contenía cambios genéticos, el cual recibe el nombre de "field" (Tabor et al., 2001). Este epitelio tenía una apariencia macroscópica

normal, pero era histológicamente displásico (Tabor et al., 2003). Es importante señalar que dichos "fields" se encuentran a veces en los márgenes quirúrgicos cuando el tumor es extirpado, lo que significa que pueden permanecer en el paciente pudiendo explicar la alta tasa de recurrencias y de segundos tumores primarios a veces vistos en pacientes tratados de HNSCC (Tabor et al., 2001).

### 2.1.1 Patogénesis mediada por HPV

La primera clasificación de los HNSCC diferencia los que han sido causados por la infección de los tipos de HPV de alto riesgo y los que no tienen relación con el HPV, como se refleja en la **Figura 6** (Leemans et al., 2011).

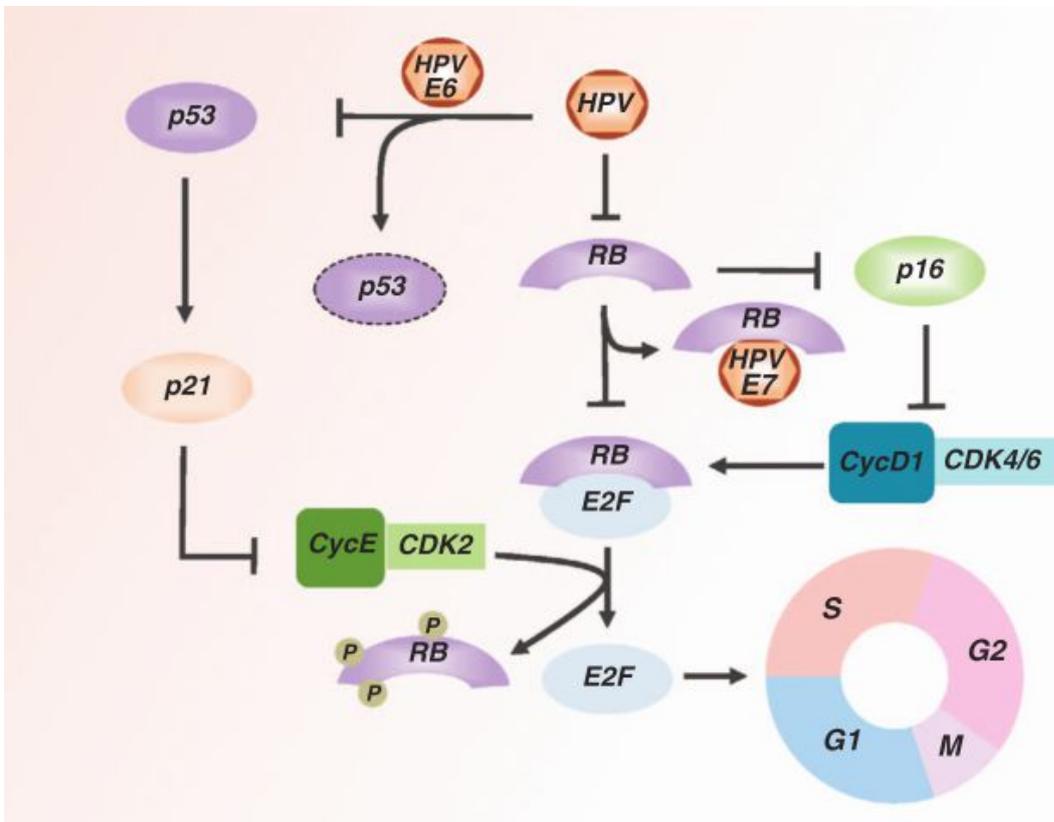


**Figura 6.** Esquema de la clasificación genética del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Leemans et al., 2011). Se pueden distinguir en la actualidad al menos tres subclases genéticas de HNSCC: tumores que contienen HPV transcripcionalmente activo (HPV+) y tumores que son HPV negativos (HPV-). A su vez estos últimos se dividen en aquellos HNSCC con presencia de numerosos cambios genéticos (alta inestabilidad cromosómica, CIN de alto grado) o aquellos con un bajo número de cambios genéticos numéricos (CIN de bajo grado).

El virus HPV contiene una doble cadena circular de DNA, es estrictamente epiteliotrópico, y se conoce por ser la principal causa de cáncer de cérvix (Zur Hausen, 2002).

Los HPVs entran al huésped por vía de heridas o abrasiones en la mucosa, e infectan a las células basales epiteliales, donde la maquinaria de replicación del DNA de la célula huésped es utilizada para la replicación viral. El virus contiene dos oncogenes, E6 y E7, cuya expresión inactiva respectivamente el p53 y el Rb (**Figura 7**), causando alteraciones en la regulación del ciclo celular de las células infectadas e iniciando así el proceso de carcinogénesis. La proteína E6 interacciona con la proteína asociada a E6 (E6-AP), resultando en una rápida degradación del supresor tumoral p53 por vía ubiquitina-proteasoma. Esto lleva a una inhibición de las funciones proapoptóticas de p53 y una elusión de los puntos de control mediados por p53 (Scheffner et al., 1990). Por su parte, la proteína E7 compete con el factor de transcripción E2F para unirse al supresor tumoral pRb, desplazando a E2F,

el cual se encarga de activar genes responsables de la progresión del ciclo celular (Dyson et al, 1989). pRb es un regulador negativo del inhibidor kinasa dependiente de ciclina p16, y por ello su inactivación resulta en una regulación positiva de p16, lo cual se puede detectar mediante técnicas de inmunohistoquímica en muestras de tumores asociados a HPV, y representa un marcador biológico significativo de la expresión de oncoproteínas del HPV (Weinberger et al., 2006).



**Figura 7.** Mecanismo de acción del virus del papiloma humano (HPV) en la regulación del ciclo celular (Suh et al., 2014). En la progresión desde la fase G1 a la S del ciclo celular, las células tienen que superar el punto de restricción bajo control de la pRb. pRb se une e inhibe los factores de transcripción E2F. La señalización mitogénica a través de CiclinaD1/CDK4 o CiclinaD1/CDK6 fosforila a la pRb, provocando la liberación de E2F. La CiclinaE/CDK2 completa la fosforilación de pRb, permitiendo la entrada en la fase S. El HPV interfiere en el ciclo celular por medio de dos oncoproteínas, E6 y E7. La proteína E6 se une a p53 y produce su degradación, mientras que la proteína E7 se une e inactiva pRb. Estas oncoproteínas virales determinan la entrada en el ciclo celular y la inhibición de la apoptosis mediada por p53. La inhibición de pRb dependiente de HPV promueve la acumulación de p16. P16 representa un marcador del HNSCC HPV positivo.

El modo de detectar el virus, dado que no puede ser fácilmente cultivado, es mediante la detección con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del genoma viral o de la expresión de los genes virales (Leemans et al., 2011).

Existen más de 100 subtipos de HPV, clasificándose en alto o bajo riesgo según su potencial para inducir transformación maligna. Los de alto riesgo son los subtipos 16, 18, 31 y 33, siendo el 16 el responsable de en torno a un 90% de los HNSCC (Husain & Neyaz, 2017).

Los cánceres derivados de la infección por HPV constituyen un subgrupo caracterizado por perfiles biológicos y clínicos específicos y mejor pronóstico. Los pacientes con carcinoma orofaríngeo de células escamosas (OPSCC) asociado al VPH tienden a ser hombres blancos, de media cinco años más jóvenes que los pacientes HPV negativos, con estatus socioeconómico más alto y con menos tendencia a fumar o a beber alcohol (Chaturvedi et al., 2013).

Los factores de riesgo para el HNSCC HPV-positivo están relacionados con el comportamiento sexual, incluyendo la edad de la primera relación y el número alto de compañeros sexuales, además de anticuerpos contra la proteína de la cápside viral HPV16 y la oncoproteína E6 (Gillison et al., 2008).

Comparado con el OPSCC HPV-negativo, los pacientes tienen de un 60-80% de reducción del riesgo de muerte debido a su cáncer después de controlar otros factores, evidenciando la necesidad de diferentes estrategias de tratamiento para reducir la mortalidad relacionada con el tratamiento actual. Las razones del mejor pronóstico no se conocen con exactitud, pero se cree que es debido a factores del paciente como la menor edad, menos comorbilidades relacionadas con el tabaco, y características del tumor como una mayor sensibilidad a la radioterapia, ausencia de cancerización del “*field*” (encontrada fundamentalmente en fumadores), diferente respuesta del sistema inmune a la infección viral, y la presencia de p53 no mutado, que puede activarse en respuesta a la radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, no todos los pacientes HPV-positivo tienen una buena evolución, y se clasificarán en categorías de riesgo de muerte bajo o intermedio dependiendo de su historia tabáquica (Ang et al., 2011).

## 2.2 Cambios en las vías de señalización

En el HNSCC, los genes reguladores del ciclo celular que intervienen en el proceso de carcinogénesis son los ya comentados p53 y el Rb, que les permite adquirir el potencial replicativo ilimitado que caracteriza a las células cancerígenas. El p53 se encuentra inactivado tanto por mutaciones somáticas en los tumores HPV-negativo como por HPV16 E6 en los tumores inducidos por HPV. Además, se encuentran mutaciones somáticas en el TP53 en el 60-80% de los casos de HNSCC (Poeta et al., 2007). En la progresión temprana de los HNSCC HPV-negativos, la pérdida del cromosoma 9p21 (donde se encuentra el gen CDKN2A, también relacionado con el cáncer en este grupo de pacientes), y mutaciones en TP53 se encuentran frecuentemente en los “*fields*” precursores (Califano et al., 1996).

### 2.2.1 Cambios en la señalización de factores de crecimiento: la ruta EGFR

EGFR (ErbB1) es un miembro de la familia de receptores transmembrana tirosina-kinasa que juega un papel esencial en la proliferación celular, diferenciación, supervivencia y migración. EGFR se compone de un dominio extracelular de unión a ligando, un segmento transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosin-kinasa. La unión de ligando resulta en un cambio de conformación del receptor, llevando a una autofosforilación y activación del mismo. Esto resulta en la activación de una señal que activa las cascadas Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT y JAK/STAT3 (Hynes & Lane, 2005). Se puede producir también una translocación al núcleo del ligando EGF, funcionando como un factor de transcripción. Una de las dianas nucleares es CCND1, que codifica para la ciclina D1 implicada en la progresión del ciclo celular (Lin et al., 2001).

Se ha comprobado que hay una hiperexpresión de EGFR en numerosos casos de HNSCC, detectada por inmunohistoquímica en más del 90% de los casos de HNSCC. Además, ha sido demostrado en ensayos clínicos un incremento de la eficacia de la radioterapia cuando se combina con anticuerpos específicos anti EGFR (Bonner et al., 2006). La hiperexpresión de EGFR es fundamentalmente a nivel transcripcional, ya que existen pocas mutaciones activadoras en HNSCC (Grandis & Twardy, 1993).

A veces, aunque no siempre, hay una asociación entre una hiperexpresión de EGFR y desfavorables resultados clínicos. En general, el 60% de los estudios muestran una asociación entre una hiperexpresión de EGFR y resultados clínicos desfavorables, mientras que el 40% restante no (Leemans et al., 2011).

### 2.2.2 Cambios en la señalización de factores de crecimiento: La ruta TGF- $\beta$

Otra vía de factores de crecimiento importante en el HNSCC es la TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  1 actúa como inhibidor del crecimiento fosforilando a SMAD2 y SMAD3, que junto con SMAD4 regulan la transcripción de genes diana. Existen algunas líneas de evidencia que relacionan TGF- $\beta$  con el HNSCC. En ocasiones en los tumores se encuentra una regulación negativa del TGF- $\beta$  (Huntley et al., 2004). Esto puede tener relación con la pérdida frecuente del cromosoma 18q, que contiene los genes de SMAD2, SMAD3, SMAD4 y el receptor II de TGF- $\beta$ .

Recientemente se ha evidenciado una conexión entre la vía de señalización TGF- $\beta$  y el factor nuclear KB (NF-KB) (Mishra et al., 2006), un factor de transcripción que actúa como una importante señal de supervivencia. Cohen y colaboradores (2009), han mostrado que una abolición de la vía TGF- $\beta$  se asocia con una activación de NF-KB. Sin embargo, los datos disponibles actualmente hacen difícil señalar con seguridad cuáles son los oncogenes más importantes en estas vías de señalización.

### **2.3 Invasión y metástasis**

El HNSCC se comporta generalmente como la mayoría de los tumores, metastatizando primariamente en los ganglios linfáticos regionales. Además de la presencia de tumores, el número de metástasis en ganglios linfáticos, la proporción en el cuello y la extensión extranodular también son importantes factores pronósticos y predictores de afectación a distancia y supervivencia.

Las células epiteliales no poseen la plasticidad celular para la diseminación metastática, y pueden sufrir un proceso de transición epitelial a mesenquimal (ETM, originalmente descubierta en la morfogénesis embrionaria) para obtener un fenotipo más mesenquimal, y por tanto metastático. La vía TGF- $\beta$  ha sido identificada como una pieza clave en el proceso de ETM (Ikushima & Miyazono, 2010).

Por otro lado, las células cancerígenas inducen el desarrollo de un estado inflamatorio exagerado en el estroma, el cual favorece el crecimiento del cáncer, la invasión y metástasis (Colotta et al., 2009). Se producen una serie de mediadores químicos de la inflamación entre los que se incluye TGF- $\beta$ , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 6 (IL-6), ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la metaloproteasa de matriz-7 (MMP-7). La IL-6 y TNF- $\alpha$  son producidos por queratinocitos malignos, fibroblastos del estroma y macrófagos, y promueven el crecimiento del tumor modificando la expresión de moléculas de adhesión celular y proteínas de matriz extracelular y estimulando la angiogénesis (Georgakopoulou et al., 2012). Por otro lado, COX-2 juega un papel importante en el proceso de invasión local y metástasis. Niveles elevados de su expresión se asocian a una alta tasa de recurrencias después del tratamiento, con una pobre respuesta a la radioterapia y un pronóstico desfavorable (Goulart et al., 2009). Las metaloproteasas de matriz, por su parte, están involucradas en la migración celular, angiogénesis, y activación proteolítica de factores de crecimiento, todos ellos eventos necesarios para la invasión de los tejidos conectivos adyacentes por las células neoplásicas (Impola et al., 2004). Así, niveles aumentados de la expresión de MMP-7 han sido relacionados con el cáncer de la cavidad oral (Impola et al., 2004).

En conclusión, se puede afirmar que una serie de complejos mecanismos están envueltos en la progresión del HNSCC, en el que puede destacarse el aumento de producción de factores de crecimiento.

### **2.4 Tratamiento actual del HNSCC**

#### *2.4.1 Objetivos del tratamiento*

El objetivo principal en el control de cualquier tumor maligno es su cura. Sin embargo, existen

objetivos secundarios que deben ser considerados en el abordaje de tumores malignos de cabeza y cuello, en especial la preservación de la forma y la función (o la reconstrucción posterior cuando no sea posible) para mantener una adecuada calidad de vida. Se debe poner atención también en minimizar las secuelas del tratamiento y prevenir un carcinoma primario secundario (Lydiatt & Shah,1995).

En la pasada década se ha visto incrementado el papel de los protocolos de preservación orgánica, permitiendo mejorar la calidad de vida de los pacientes con HNSCC. En la cavidad oral, la estrategia terapéutica se centra en torno a la reestructuración de la masticación y de la deglución, así como la preservación de la claridad del habla. En cuanto a los tumores que envuelven la hipofaringe y la laringe, los objetivos principales son la preservación de la capacidad de comunicación y deglución del paciente (Lydiatt & Shah,1995).

Finalmente, los esfuerzos se dirigen también a la prevención de tumores primarios secundarios, incluyendo un cuidadoso *follow-up* e implantando estrategias para el cese del hábito tabáquico y el consumo de alcohol en los pacientes que hagan uso de ellos (Day et al., 2008). El riesgo de morir por un tumor primario secundario en pacientes con un estadio temprano de cáncer de cabeza y cuello es más alto que el de morir por un primario original (Day et al., 1994). En general, los objetivos del tratamiento se pueden resumir en los siguientes: cura del cáncer, mantenimiento de la calidad de vida y prevención de otros primarios subsiguientes.

#### 2.4.2 Estadificación

Es de vital importancia establecer el estadio de todos los tumores antes de comenzar el tratamiento, ya que una estadificación adecuada constituye la base de una correcta selección de tratamiento y de sus consiguientes resultados. El sistema TNM (basado en el tamaño del tumor, la extensión a ganglios linfáticos y las metástasis a distancia) es el utilizado para su estadificación clínica (American Joint Committee on Cancer).

En general, los tumores de la cavidad oral y orofaringe se estadifican en base a sus dimensiones de superficie; mientras que los tumores de nasofaringe, hipofaringe y laringe son estadificados por su nivel de invasión local de las estructuras anatómicas adyacentes.

Sin embargo, la estadificación de ganglios linfáticos para todas las localizaciones en cabeza y cuello es uniforme, como se muestra en la **Figura 8**.

Finalmente, la confirmación histológica del diagnóstico mediante biopsia es esencial. Si el tumor primario está ya visible o es accesible, se toma la biopsia de este. Si, por el contrario, el tumor primario no es aún evidente, la biopsia mediante punción aspiración con aguja fina es el primer paso a seguir en un paciente que presenta un ganglio cervical metastásico y un tumor primario oculto (Davidson et al., 1994).

#### 2.4.3 Diagnóstico clínico

El tumor primario en la mayoría de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello puede ser fácilmente visualizado mediante una exploración minuciosa. La exploración debe llevarse a cabo utilizando un espejo laríngeo o un nasolaringoscopio flexible. El tumor primario puede ser exofítico, endofítico,

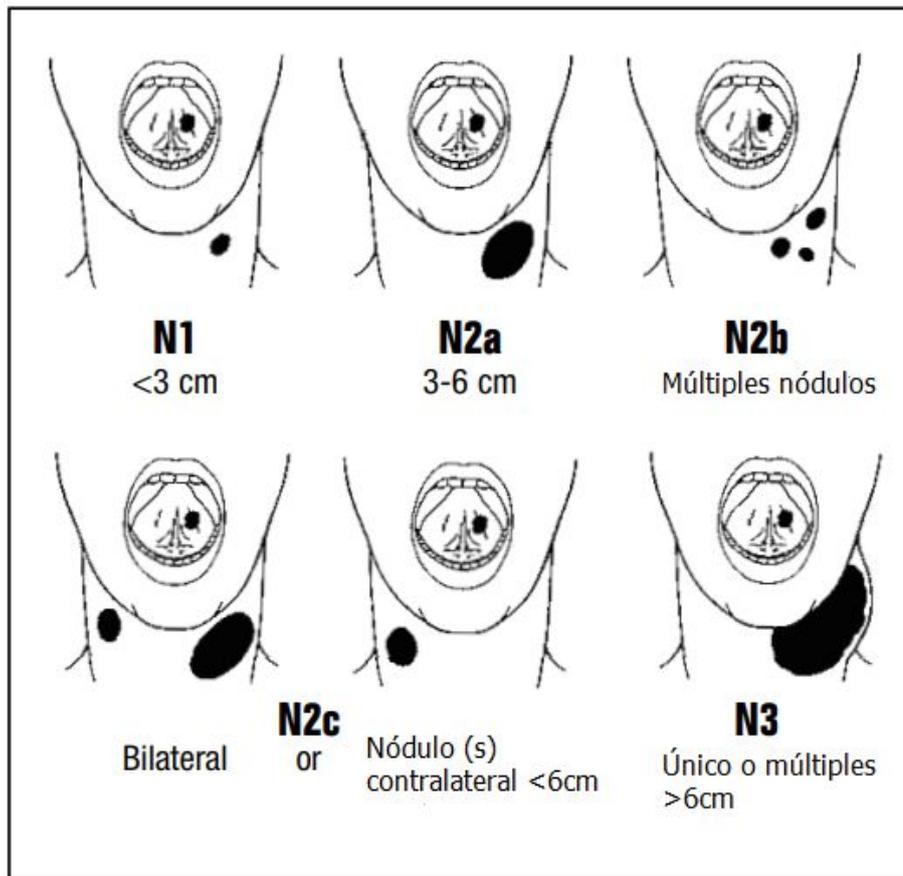


Figura 8. Estadificación de ganglios linfáticos en cabeza y cuello (Lydiatt & Shah,1995).

ulcerado, invasivo o infiltrativo, y en ocasiones puede estar oculto (Lydiatt & Shah,1995).

El drenaje regional linfático de la cabeza y el cuello se sitúa en localizaciones anatómicas específicas organizadas en diferentes niveles, que están representadas en la figura 9.

Los patrones de diseminación metastásica de los cánceres epiteliales del tracto aéreodigestivo alto

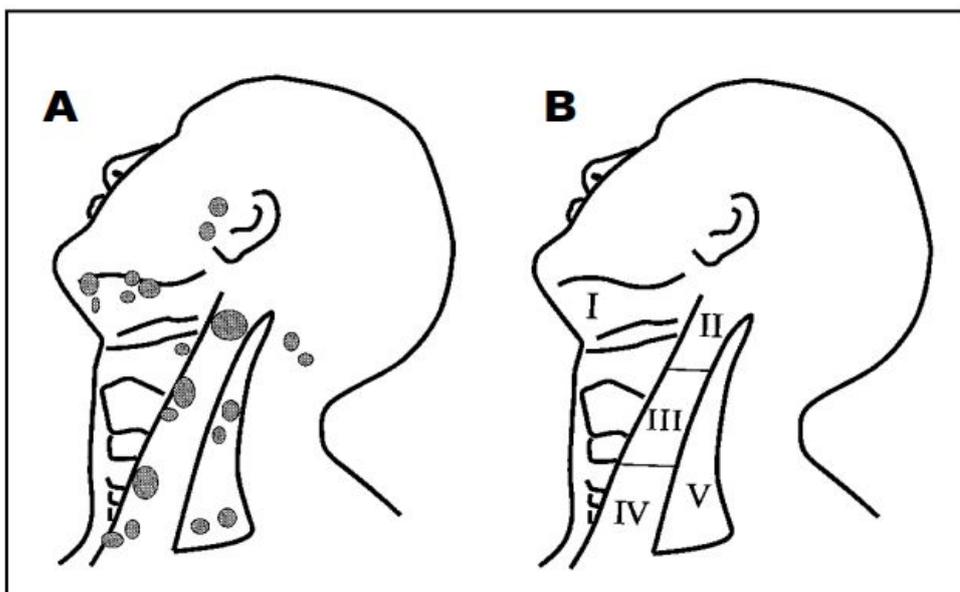


Figura 9. (A) Patrón regional linfático en cabeza y cuello, (B) principales niveles de cabeza y cuello (Lydiatt & Shah,1995).

siguen una secuencia predecible a los ganglios linfáticos regionales (Shah, 1990). Dichos patrones de progresión metastásica secuencial han permitido el desarrollo de modificaciones en la disección del cuello con el objetivo de reducir la discapacidad funcional producida por la disección clásica. A pesar de la morbilidad funcional y estética, la disección radical del cuello continúa siendo el tratamiento de elección en la mayoría de los pacientes que se presentan con 1) estadio N3, 2) múltiples metástasis grandes (N2B), 3) signos clínicos de diseminación extranodular, o 4) enfermedad recurrente después de previa radioterapia (Lydiatt & Shah, 1995).

Una adecuada exploración del cuello debería evaluar la presencia o ausencia de adenopatías palpables; el número, localización, y tamaño de los nódulos palpables; y las manifestaciones clínicas de la extensión extracapsular del tumor, así como la fijación a la piel o a los tejidos blandos subyacentes o la parálisis de nervios craneales (Coster et al., 1992)

Además, se deben llevar a cabo estudios con técnicas de imagen como la radiografía simple o la TAC. Endoscopias múltiples (nasofaringoscopia, laringoscopia, broncoscopia y esofagoscopia), se emplearán selectivamente en pacientes en los que el riesgo de múltiples tumores primarios sea alto, pacientes con carcinomas primarios faríngeos o pacientes que se presentan con un carcinoma metastásico en los ganglios linfáticos cervicales y un primario oculto (Mccombe, 1989).

Actualmente, en el tratamiento de cada cáncer se utiliza un enfoque multidisciplinar, teniendo en cuenta el subtipo histológico, la localización, el estadio, la forma física del paciente y la función respiratoria (Suh et al., 2014).

Aproximadamente un tercio de los pacientes presenta un estado inicial de la enfermedad, mientras que los dos tercios restantes presentan un cáncer avanzado con extensión a los ganglios linfáticos. Los tumores en fase inicial son tratados con cirugía o radioterapia dependiendo de la localización primaria del tumor, y tienen un pronóstico favorable. En cambio, en el tratamiento de los tumores avanzados se utiliza la cirugía con posterior radioterapia o quimiorradioterapia, o radioterapia primaria con preservación de órganos con o sin quimioterapia (con compromiso estético reducido) (Pignon et al., 2009).

La radioterapia adyuvante puede administrarse pre- o postoperatoriamente. En general es de elección la segunda opción por sus mayores ventajas, como la carencia de límite de dosis y de riesgo de complicaciones en la curación de la herida quirúrgica, o la disponibilidad de una estadificación precisa del tumor. Las indicaciones de la radioterapia posoperatoria dependen de factores relacionados con el tumor primario y las metástasis en ganglios linfáticos regionales. Se administra en tumores con riesgo significativo de recurrencia, márgenes histológicos positivos, o infiltración perivascular o perineural. Además, la radioterapia posoperatoria está indicada también en tumores sin afectación de ganglios linfáticos no tratados quirúrgicamente cuando el riesgo de micrometástasis es alto, ante la presencia de un residuo tumoral alto tras la resección tumoral, múltiples ganglios linfáticos positivos o diseminación extranodular del tumor (Vikram et al., 1984).

Estos tratamientos son intensos y están asociados a una toxicidad aguda y severa, como mucositis, dermatitis y disfagia, además de secuelas a largo plazo como por ejemplo pérdida de audición neurosensorial, xerostomía permanente o función de deglución alterada (Suh et al., 2014).

#### *2.4.4 Agentes quimioterapéuticos*

La terapia sistémica del HNSCC incluye una serie de opciones que pueden clasificarse en quimioterapia sistémica (con un sólo agente o combinada), terapias dirigidas (con anticuerpos monoclonales o inhibidores de la tirosín-kinasa) o inmunoterapia (Vermorken, 2005).

La elección del tratamiento depende de las comorbilidades del paciente, tratamientos previos, intervalo libre de recurrencias, síntomas, preferencias del paciente, etc. (Vermorken, 2005).

La administración oral de los agentes anticancerígenos es en general la preferida por los pacientes, por ser susceptible de tratamiento ambulatorio. Además, facilita una exposición prolongada al agente citotóxico (Meerum Terwogt et al., 1999). Sin embargo, la baja solubilidad en medios acuosos, baja permeabilidad y aparente pobre biodisponibilidad, constituyen importantes limitaciones para la quimioterapia oral (Agüeros et al., 2009). La administración intravenosa es la más directa, y carece del inconveniente de los patrones de absorción del tracto gastrointestinal. Sin embargo, esta ruta tiene el potencial de ser perjudicial para los tejidos sanos porque a ellos llegan altas concentraciones de fármaco, aumentando la frecuencia de reacciones adversas (Kruijtz et al., 2002).

### Quimioterapia sistémica

Un gran número de agentes quimioterapéuticos han sido investigados en los últimos años en pacientes con HNSCC R/M. Un ejemplo es el 5-Fluorouracilo, un análogo de la pirimidina que se puede administrar tanto por vía tópica como parenteral, o el cisplatino, un agente alquilante que contiene platino y cuya administración es parenteral. Además, destacan otros como el metotrexato carboplatino o la bleomicina. Estos fármacos provocan una tasa de respuesta de aproximadamente el 15-40%, que persiste por un corto periodo de tiempo, entre tres y cinco meses (Colevas, 2006).

Con el objetivo de obtener tasas de respuesta más altas y duraderas, se han empezado a usar combinaciones de agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del HNSCC. La combinación quimioterapéutica más utilizada es el cisplatino y 5-fluorouracilo, habiendo demostrado en varios estudios mejores resultados con esta estrategia de los que se observan en terapias con un solo agente, al menos en lo referido a tasa de respuesta (Bonner et al., 2006).

### Terapias dirigidas

En las últimas décadas, gracias a la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el HNSCC, las terapias han sufrido grandes avances, y está previsto en un futuro cercano el desarrollo de nuevos agentes dirigidos. Varias terapias biológicas han sido investigadas en el HNSCC, entre las que se incluyen fármacos dirigidos a factores de crecimiento y sus receptores, vías de señalización, control del ciclo celular, síntesis de prostaglandinas, degradación de proteínas, hipoxia y angiogénesis (Jacob et al., 2016). Entre todos ellos, los fármacos con mejores resultados han resultado ser los dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Como ya se ha visto, la hiperexpresión de este factor presente en >90% de los HNSCC, ha sido relacionada con un pronóstico pobre de la enfermedad. Los anticuerpos monoclonales y las pequeñas moléculas inhibitoras de la tirosin-kinasa (TKIs), son las dos estrategias utilizadas en la actualidad en la práctica clínica. De esta manera se inhibe el crecimiento del tumor dirigiéndose específicamente contra EGFR, resultando en una inhibición de la progresión del ciclo celular, angiogénesis y metástasis e inducción de la apoptosis. Mientras que los anticuerpos monoclonales se dirigen al dominio extracelular del receptor debido a su gran tamaño, las TKIs actúan intracelularmente (Jacob et al., 2016).

En 2006, Cetuximab se convirtió en la primera terapia molecular dirigida aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de HNSCC (Blasco et al., 2017). Cetuximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 de administración parenteral. Se usa tanto en combinación con la radioterapia en los HNSCC locales avanzados, como en combinación con la quimioterapia basada en cisplatino y 5-fluorouracilo en el tratamiento de primera línea de la enfermedad recurrente/metastática, y como agente único en la enfermedad recurrente/metastática después del

fracaso de la quimioterapia basada en platino (Bonner et al., 2006). La toxicidad cutánea es un efecto secundario común del tratamiento con Cetuximab, y puede considerarse un biomarcador de respuesta positiva al tratamiento, con tasas de respuesta del 33% observadas en pacientes con erupción cutánea frente al 7% en aquellos que no desarrollaban toxicidad cutánea (Burtneš et al., 2005).

A pesar de la alta expresión de EGFR en HNSCC, la inhibición de EGFR con anticuerpos monoclonales tiene un efecto modesto. Los TKIs bloquean la activación y fosforilación de EGFR, y se dan orales ya que son bien absorbidas a través del tracto gastrointestinal. Otros anticuerpos monoclonales como Panitumumab o Zalutumumab han sido estudiados presentando resultados menos favorables, como tasas de respuesta más bajas o mayores efectos adversos (Bossi et al., 2017).

### Inmunoterapia

Dentro de este grupo destacan anticuerpos como Nivolumab o Pembrolizumab, que en estudios recientes han demostrado tener respuestas duraderas en pacientes con R/M HNSCC refractario. Además, el Pembrolizumab es un fármaco que, aunque parece ser relativamente bien tolerado, causa efectos adversos serios en el 10-17% de los pacientes tratados (Seiwert et al., 2016).

Desafortunadamente, pese a los recientes avances en las técnicas quirúrgicas y radioquimioterápicas, la esperanza de vida no se ha visto aumentada notablemente debido a que los pacientes siguen desarrollando frecuentemente recurrencias locorregionales, metástasis a distancia y segundos tumores primarios. La dilación en el comienzo del tratamiento es considerada la causa más importante de que no haya habido una mejora relevante de la tasa de supervivencia (Smith, Sniezek, Weed, & Wax, 2007). Hasta un 50% de los tumores locales avanzados recidivan durante los dos primeros años después del tratamiento, con limitadas opciones de cirugía de rescate o reirradiación (Smith et al., 2007).

Algunos agentes quimioterápicos pueden ser usados para recurrencias inoperables de la enfermedad metastática, con tasas de respuesta de sólo 10-35% y una supervivencia media de 6 a 12 meses (Brockstein, 2011).

Aunque el objetivo principal del tratamiento del cáncer es destruir tantas células cancerígenas como sea posible sin dañar los tejidos sanos, la habilidad de un fármaco para abordar sitios específicos del organismo con el objetivo de conseguir efectos terapéuticos concretos necesita una mejoría. En este contexto, los sistemas de transporte de fármacos basados en nanotecnología emergen como potenciales alternativos para abordar estos obstáculos y llegar eficazmente a las células diana, reduciendo así, los efectos adversos.

### 3. NANOMEDICINA

#### 3.1 Introducción a la nanomedicina

Durante las últimas décadas, nuestro conocimiento de la etiología del cáncer ha aumentado de forma exponencial, apareciendo como consecuencia nuevas clases de terapias antitumorales. Un ejemplo lo constituye la nanomedicina, que es la ciencia basada en la utilización de nanoestructuras (materiales de tamaño nanométrico), conjugadas con un amplio rango de agentes específicos dirigidos con el objetivo de ser usados en aplicaciones como diagnóstico molecular, detección de enfermedades, inmunoterapia a nanoescala y distribución de terapias antitumorales que podrían incorporarse al uso clínico (Jurj et al., 2017).

A lo largo de los años, diferentes nanoterapias dirigidas a tumores han sido desarrolladas (**Figura 10**) y evaluadas, existiendo en la actualidad una clara evidencia de una mejora sustancial de la eficacia terapéutica de agentes antitumorales, ya que permiten mejorar la biodisponibilidad (Jain et al., 2014), potenciar la distribución de agentes terapéuticos o desarrollar técnicas novedosas de imagen (Ajnai et al., 2014). Las características más sorprendentes de estos nanodispositivos son su habilidad para dirigir un fármaco al lugar del tumor, es decir, potenciar los niveles de fármaco antitumoral (site-specific delivery), y/o alejar el fármaco de los lugares del organismo particularmente sensibles a los efectos tóxicos del fármaco (site-avoidance delivery) (Lammers et al., 2008), haciendo frente al principal inconveniente de la quimioterapia (Jurj et al., 2017).

El objetivo principal de los nanotransportadores es el de encapsular los fármacos quimioterápicos que son altamente invasivos o no-específicos por agentes específicos dirigidos que presentarán idealmente las siguientes características (Shi et al., 2017):

- Mejora de los efectos terapéuticos del fármaco incrementando la eficacia y/o reduciendo la toxicidad.
- Distribución dirigida del fármaco a un tejido, célula u orgánulo; potenciando las propiedades farmacéuticas (como estabilidad, solubilidad, vida media de circulación y acumulación en el tumor) de las moléculas terapéuticas; estableciendo una liberación sostenida o dependiente de estímulo.
- Facilitación de la distribución de terapias como por ejemplo DNA, siRNA, mRNA y proteínas a lugares de acción intracelulares.
- Co-distribución de múltiples fármacos para mejorar la eficacia terapéutica y hacer frente a la resistencia al fármaco, dotando de un control más preciso a la exposición espacio-temporal de cada fármaco y a la distribución apropiada de fármaco en el lugar de interés.
- Transcitosis de los fármacos a través de las estrechas barreras endoteliales y epiteliales (como por ejemplo la barrera del tracto gastrointestinal o la barrera hematoencefálica).
- Diagnóstico e imagen más sensible del cáncer.
- Visualización de lugares de distribución del fármaco combinando los agentes terapéuticos con modalidades de imagen, y/o feedback a tiempo real de la eficacia *in vivo* de un agente terapéutico.
- Nuevos abordajes en el desarrollo de vacunas sintéticas.

- Dispositivos médicos miniaturizados para el diagnóstico del cáncer y monitorización del fármaco y distribución.

Para un uso seguro en medicina, las nanopartículas deben ser compatibles, lo cual quiere decir que tienen que ser capaces de integrarse en un sistema biológico sin causar una respuesta inmune o efectos secundarios negativos cuando la terapia es liberada tanto en el tumor como en la corriente sanguínea (Wilczewska et al., 2012).

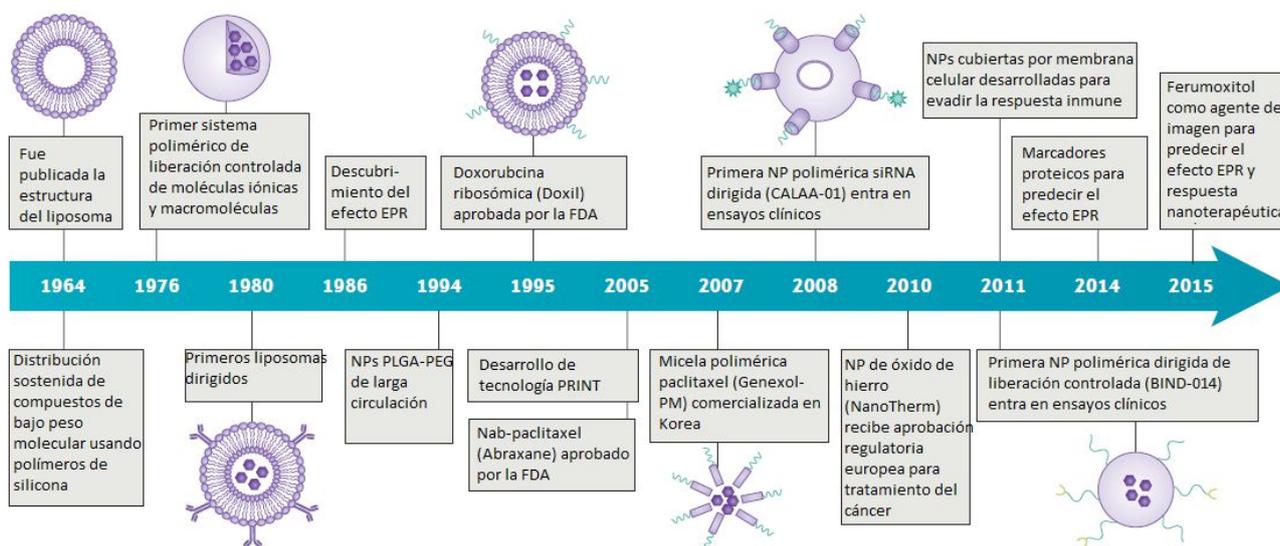


Figura 10. Representación cronológica de los principales avances en el campo de la nanomedicina aplicada en el tratamiento del cáncer (Shi et al., 2017).

En los últimos años, un amplio rango de fármacos anti-cancerígenos (ver **Tabla 2**) como paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, rituximab, o inhibidores de la tirosin-kinasa han sido incorporados en nanopartículas con un potencial efecto contra varios cánceres, y una eficacia terapéutica superior a los quimioterapéuticos libres (Petrushev et al., 2015).

Ciertas nanoterapias que incorporan algunas de estas características han sido aprobadas en el tratamiento del cáncer, como los liposomas, nanopartículas de albúmina y micelas poliméricas, mientras que otras se encuentran en proceso de investigación clínica y se piensa que ofrecerán resultados definitivos prometedores en un futuro cercano (Lammers et al., 2008; Shi et al., 2017).

Tabla 2. Ejemplos de estadio clínico de nanomedicinas en la terapia del cáncer (Lammers et al., 2008; Shi et al., 2017).

Nombre genérico y/o propio		Plataforma nanotecnológica	Compuesto farmacológico activo	Tipo de cáncer	Situación
Doxorubicina (Doxyl)	liposomal	Liposoma PEGilado	Doxorubicina	Sarcoma de Kaposi relacionado con VIH, cáncer de ovario y mieloma múltiple	Aprobado por la FDA
Doxorubicina (Myocet)	liposomal	Liposoma	Doxorubicina	Cáncer de mama metastásico	Aprobado en Europa y Canadá
Daunorubicina (Daunoxome)	liposomal	Liposoma	Daunorubicina	Sarcoma de Kaposi relacionado con el	Aprobado por la FDA

VIH						
Vincristina liposomal (Marqibo)	Liposoma	Sulfato de Vincristina	de	Leucemia linfobástica aguda	Aprobado por la FDA	
Irinotecan liposomal (Onivyde o MM-398)	Liposoma PEGilado	Irinotecan		Cáncer pancreático metastásico post-gemcitabine	Aprobado por la FDA	
Cisplatina liposomal(Lipoplatin)	Liposoma PEGilado	Cisplatina		NSCLC	Fase III	
ThermoDox	Liposoma	Doxorubicina		Carcinoma hepatocelular	Fase III	
MTX-HSA	Nanopartícula de albúmina	Metotrexato		Cáncer de riñón	Fase II	
Nab-paclitaxel (Abraxane)	Nanopartícula de albúmina	Paclitaxel		Cáncer de mama, pulmón y pancreático	Aprobado por la FDA	
Micela polimerica paclitaxel (Genexol-PM)	Micela polimérica	Paclitaxel		Cáncer de mama y NSCLC	Aprobado en Korea	
NK-105	Micela polimérica	Paclitaxel		Cáncer de mama recurrente o metastásico	Fase III	
NanoTherm	Nanoparticula de óxido de hierro	<i>No aplicable</i>		Glioblastoma	Aprobado en Europa	
AuroLase	Núcleo de cobre con nanocubierta de oro	<i>No aplicable</i>		Cáncer de cabeza y cuello, cánceres de pulmón primarios y metastásicos	Estudio piloto	
MM-302	Liposoma dirigido a HER2	Doxorubicina		Cáncer de mama HER2 positivo	Fase II/III	
Inmunoliposomas anti-EGFR cargados con doxorubicina	Liposoma dirigido a EGFR	Doxorubicina		Tumores sólidos	Fase I	
CPX-1	Liposoma	Irinotecan y floxuridine (1:1)		Cáncer colorrectal avanzado	Fase II	
Citarabina-daunorubicina liposomal	Liposoma	Citarabina y daunorubicina (5:1)		Leucemia mieloide aguda de alto riesgo	Fase III	
CALAA-01	Nanopartícula polimérica dirigida a TfR	siRNA contra ribonucleótido reductasa M2		Tumores sólidos	Fase I	
PNT2258	Liposoma	Oligonucleótido de DNA contra BCL-2		Linfoma no-Hodkin refractario y linfoma difuso de células B	Fase II	

<b>MRX-34</b>	Liposoma	Imitador de microRNA-34	Cáncer hepático primario, tumores sólidos y malignidades hematológicas	Fase I
<b>Tecemotide</b>	Liposoma	Antígeno MUC1	NSCL	Fase III
<b>DHER2+AS15</b>	Liposoma	Antígeno recombinante HER2 (dHER2) y adyuvante AS15	Cáncer de mama metastásico	Fase I/II
<b>Lipovaxin-MM</b>	Liposoma	Antígenos melanoma	Melanoma maligno	Fase I

Los liposomas (como Doxil y Myocet) fueron la primera clase de nanopartículas terapéuticas en recibir aprobación clínica para el tratamiento del cáncer (Barenholz, 2012), y junto con otras nanopartículas de base lipídica, aún representan una gran proporción de las nanopartículas que se hallan en estadio clínico.

La nanoestructura compuesta por albúmina y paclitaxel (nab-paclitaxel, Abraxane) fue el segundo tipo de nanodispositivo en ser comercializado. Entre sus ventajas se halla el hecho de ser mejor tolerada y permitir el uso de dosis más altas y una administración más rápida, siendo usada en el tratamiento de cáncer pancreático, de pulmón y de mama (Gradishar et al., 2005).

Por su parte, las micelas poliméricas (como Genexol-PM y NK105) (Ahn et al., 2014) y nanopartículas poliméricas son dos clases de agentes nanoterapéuticos recientemente desarrollados.

Otro tipo de nanomaterial son los inorgánicos, como por ejemplo las nanopartículas (NP) de oro (Hirsch et al., 2003), las NP de óxido de hierro (Maier-Hauff et al., 2011) y las NP de óxido de hafnio (Maggiorella et al., 2012). Estas últimas están siendo también investigadas para su uso en pacientes con cáncer, habiendo sido ya comercializada la Nanotherm, una NP de óxido de hierro para el tratamiento del glioblastoma en Europa (Maier-Hauff et al., 2011).

Más allá de su amplio uso como portadores de agentes quimioterapéuticos, las nanopartículas tienen además la capacidad de distribuir nuevos agentes terapéuticos antitumorales, incluyendo agentes dirigidos a moléculas concretas, siRNA y miRNA u oligonucleótidos inhibidores del DNA (Raez et al., 2013). Además, en los últimos años, gracias al desarrollo de nuevas técnicas de ingeniería genética se ha facilitado el uso de nanopartículas virales para la distribución terapéutica (Yildiz et al., 2011).

### 3.2 Distribución, características y funcionalización de las nanopartículas

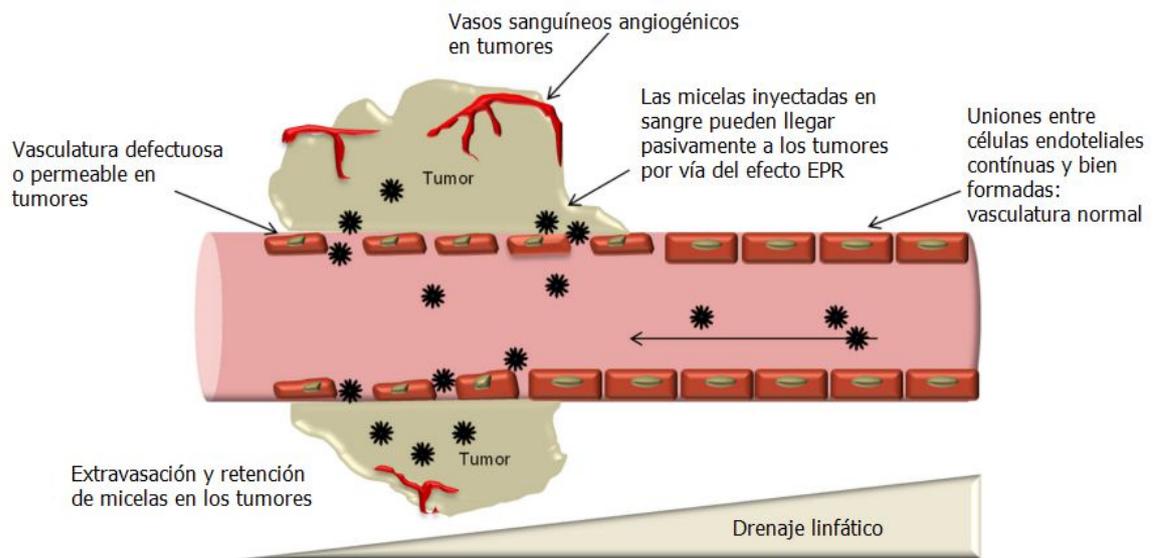
A pesar de los esfuerzos por desarrollar una administración no-invasiva de los agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer (como por ejemplo oral, pulmonar, nasal o transdérmica (Garbuzenko et al., 2010; Liechty et al., 2011), la mayoría de las nanopartículas se administran sistémicamente en los tumores sólidos, requiriendo un posterior transporte al lugar del tumor.

#### 3.2.1 Abordaje activo-pasivo

Los nanodispositivos son complejos, y es necesario comprender su estructura y propiedades físicas y químicas para acoplar o encapsular los agentes terapéuticos. La mayoría de los sistemas de

distribución de fármacos utilizan el llamado abordaje **pasivo**, con la excepción de los anticuerpos y sus fragmentos, que utilizan un abordaje **activo**, usando un péptido o un anticuerpo que se une específicamente a una molécula selectivamente expresada por las células cancerígenas diana.

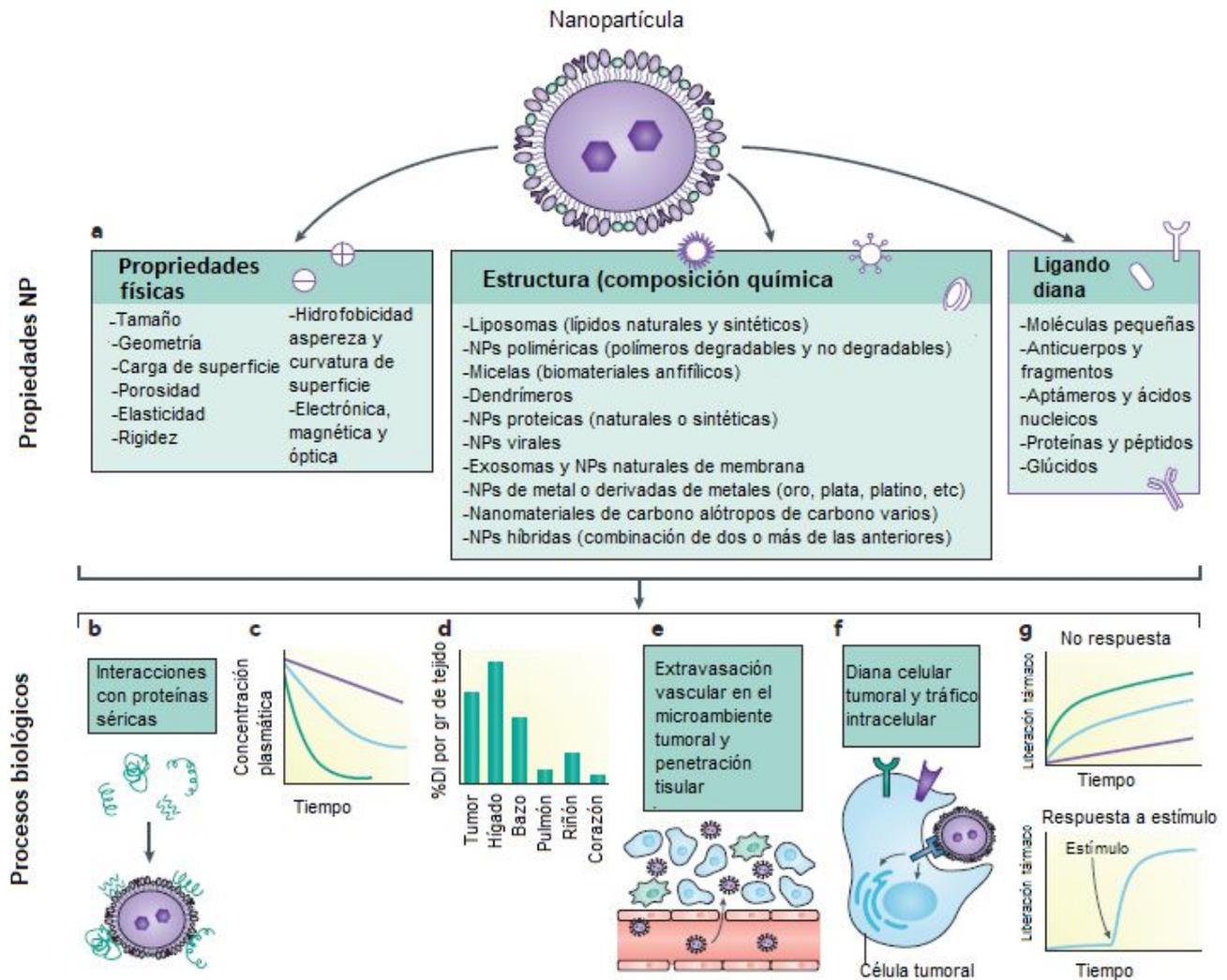
El abordaje pasivo hace referencia a la extravasación sustancial del fármaco asociado a una partícula nanométrica en el intersticio del entorno tumoral, aprovechando el aumento local de permeabilidad vascular y la disminución de la eficacia del drenaje linfático, y provocando que los nanomateriales extravasados sean retenidos dentro del lugar tumoral por periodos de tiempo prolongados (**Figura 11**). Este fenómeno, conocido como efecto EPR “enhanced permeability and retention effect” constituye actualmente la estrategia más importante para mejorar la distribución de agentes terapéuticos de bajo peso molecular a los tumores (Matsumura & Maeda, 1986; Arrieta et al., 2014).



**Figura 11.** Efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR effect) y distribución pasiva. Los nanotransportadores se pueden extravasar a los tumores a través de los espacios entre las células endoteliales, y se acumulan allí debido al pobre drenaje linfático (Jhaveri & Torchilin, 2014).

El efecto EPR varía sustancialmente en diferentes pacientes y grupos tumorales, e incluso en el mismo paciente o tipo tumoral a lo largo del tiempo. Algunos estudios clínicos preliminares han sugerido el valor de una estratificación en subpoblaciones de los pacientes enfermos de cáncer en base a su probabilidad de acumular nanopartículas a través del efecto EPR (Arrieta et al., 2014), lo cual implica que marcadores predictivos para EPR podrían tener un papel sustancial en el éxito clínico de las nanoterapias del cáncer.

Sin embargo, la interpretación de que el EPR sea únicamente debido a la vasculatura permeable del tumor y al pobre drenaje linfático está de alguna forma hipersimplificada, ya que multitud de procesos biológicos pueden influir en la distribución sistémica de las nanopartículas, como su interacción con proteínas, la circulación sanguínea, la extravasación en el microambiente perivascular del tumor e interacción con el mismo, o la penetración en el tejido tumoral e internalización en las células tumorales. Además, las propiedades de las nanopartículas como por ejemplo el tamaño, la geometría, la carga superficial, elasticidad, rigidez, porosidad, composición o ligando diana, pueden influenciar estos procesos biológicos (Shi et al., 2017) (Figura 12).



**Figura 12.** Principales características de las nanopartículas. Las NPs pueden estar hechas de diferentes materiales y pueden ser modificadas con ligandos de diferente densidad de superficie (a). Las propiedades de las NPs afectan al proceso biológico envuelto en la distribución a los tejidos tumorales incluyendo la interacción con proteínas séricas (b), circulación sanguínea (c), biodistribución (d), extravasación al microambiente perivascular del tumor (e), y abordaje de las células tumorales y tráfico intracelular (f). Las NPs también pueden ser diseñadas para controlar el perfil de liberación de su carga (g). DI, dosis inyectada. (Shi et al., 2017)

### 3.2.2 Propiedades de las nanopartículas

El reducido tamaño de las nanopartículas les permite traspasar las membranas celulares, evitar la detección por el sistema retículo-endotelial, y prevenir así su degradación. Ha sido demostrado que el tamaño óptimo para los sistemas de distribución de fármaco es entre 5 y 100 nm (Jurj et al., 2017). Las nanopartículas pequeñas aumentan su acumulación y penetran en los tejidos tumorales a través del efecto EPR, evitando la eliminación por el bazo. Sin embargo, partículas muy pequeñas (menores

de 5nm), podrían ser eliminadas rápidamente por filtración renal, y se verían limitadas su capacidad de carga y de liberación controlada (Shi et al., 2017).

Además, su gran área de superficie favorece la carga del agente terapéutico, haciéndolas idóneas para fines médicos (Thanh & Green, 2010).

Para mejorar o reducir el tiempo de circulación, puede modificarse la superficie y carga de las nanopartículas; la carga positiva se relaciona con un aumento de la tasa de internalización inespecífica y un tiempo de circulación más corto cuando se compara con cargas neutras y negativas (Baetke et al., 2015).

Se ha comprobado que hay una relación entre el tiempo de circulación medio de la sangre y la eficacia con la que las nanopartículas se extravasan pasivamente desde la microvasculatura hasta la matriz extracelular del tumor. En tejidos con una adecuada circulación y partículas que se extravasan eficazmente, una vida media corta de circulación es suficiente para obtener una acumulación adecuada en el tumor. Por el contrario, en tejidos pobremente perfundidos o en el caso de emplear partículas con una baja eficacia de extravasación, será probablemente necesaria una vida media de circulación más larga para obtener el resultado deseado (Shi et al., 2017).

### *3.2.3 Funcionalización de las nanopartículas en la distribución quimioterapéutica*

Un factor importante que limita el tiempo de circulación es la interacción no-específica entre las nanopartículas y diversas proteínas séricas, que pueden provocar la opsonización y reconocimiento por el sistema mononuclear fagocítico. Entre los diversos métodos desarrollados para incrementar el tiempo de circulación de las nanopartículas, el más utilizado es el recubrimiento de las nanopartículas con polietilenglicol (PEG), un biopolímero hidrofílico utilizado en un amplio rango de aplicaciones nanomédicas debido a su estructura flexible, no-reactividad, baja toxicidad y solubilidad en agua y disolventes polares y no polares. Posee grupos hidroxilo terminales que quedan unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas formando un revestimiento protector, que inhibe la unión de proteínas séricas al nanomaterial, incrementando el tiempo de circulación del mismo, previniendo la agregación de partículas y protegiéndolos de la degradación por el sistema mononuclear fagocítico (Jurj et al., 2017).

Como es el caso del implante de polietilenglicol, las nanopartículas que encapsulan el agente terapéutico pueden ser funcionalizadas con otros ligandos específicos que se dirijan a moléculas concretas de las células cancerígenas diana, como amino, ácido carboxílico, carbonilo p-nitrofenilo, tiol, maleimida, aldehído u otros ligandos que puedan acoplarse a la superficie, moléculas pequeñas, dendrímeros, biomoléculas y polímeros (Mout, Moyano, Rana, & Rotello, 2012). Además, pueden ser marcadas con diferentes tipos de radioisótopos para poder monitorizar la biodistribución de éstas y la acumulación en el tumor a partir de técnicas no-invasivas, como tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), tomografía computarizada (CT) y tomografía por emisión de positrones (PET) (Arrieta et al., 2014).

Al igual que las nanopartículas funcionalizadas con ligandos cargados positivamente presentan una internalización más alta en las células en comparación con las cargadas con ligandos negativos y neutros (Mout et al., 2012), las funcionalizadas con oligonucleótidos han ofrecido nuevas oportunidades en el diagnóstico molecular, como la detección de ácidos nucleicos (de gran utilidad especialmente en el diagnóstico de cáncer y enfermedades infecciosas). Las nanopartículas pueden ser también recubiertas con proteínas y anticuerpos que se unan a la superficie de los receptores, como las cubiertas por herceptina, una pequeña molécula que tiene como diana los receptores Her-

2, asegurando una útil herramienta para dirigirse a partículas en la realización de técnicas de imagen y terapia fototérmica.

### 3.3 Sistemas de distribución utilizados en la investigación del cáncer

A continuación, se describirán los principales sistemas de transporte en el tratamiento del cáncer, cada uno con sus propias ventajas e inconvenientes.

#### 3.3.1 *Sistemas virales*

Los vectores virales son virus (adenovirus, retrovirus o lentivirus) a los que se cambia el material genético por un gen de interés, haciendo que sean capaces de incrementar la expresión de genes o inhibir la producción de una proteína diana en células específicas (He et al., 2010). Sus principales inconvenientes, que hacen que tengan un uso limitado, son su bajo tamaño transgénico, alto coste, inmunogenicidad, oncogenicidad, toxicidad y dificultades en su producción a gran escala. Además, sólo pueden transportar material genético, pero no proteínas ni fármacos (Yang, 2015).

Los retrovirus, por ejemplo, pueden ser usados en la distribución de miRNA a células somáticas y germinales en fase de mitosis, infectándolas e integrando su carga en el DNA de la célula diana únicamente durante la fase de división. Este tipo de vectores virales pertenecen a la familia de los virus RNA, y su tamaño está entre 7 y 11 kb (Yang, 2015).

Los lentivirus incorporan el material genético extraño dentro del genoma del huésped. Son capaces de afectar tanto a células en división como a aquellas que no se están dividiendo mediante la infección de células postmitóticas y diferenciadas (Yang, 2015).

Por último, los adenovirus contienen una doble cadena de DNA y son específicos para la distribución de miRNA. Al igual que los lentivirus, los adenovirus pueden infectar tanto a las células en división como a las que no lo están (Yang, 2015).

#### 3.3.2 *Nanopartículas inorgánicas*

##### Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) consisten en una serie de capas de grafeno enrolladas sobre sí mismas formando un cilindro. La pared de los nanotubos puede estar formada por una o varias capas de láminas de grafeno. Cuando se enrolla una única capa, forma un nanotúbulo de carbono de una sola pared, mientras que al enrollarse más de una lámina se forman nanotubos multipared (Kushwaha et al., 2013). Este nanomaterial es capaz de inmovilizar agentes terapéuticos como fármacos, proteínas, DNA y anticuerpos tanto en la pared externa, como encapsularlos dentro de los nanotúbulos reduciendo la citotoxicidad para los tejidos sanos (Jurj et al., 2017). Debido a su estructura en forma de tubo, este material es captado eficazmente y translocado al citoplasma de las células diana causando toxicidad. Sus aplicaciones están limitadas por el hecho de que los CNTs son naturalmente hidrofóbicos e insolubles en agua, y se acumulan en los órganos internos con una baja tasa de degradación (Gherman et al., 2015). Para eliminar los efectos secundarios y facilitar su uso en aplicaciones médicas, se usan varias técnicas de funcionalización, como adsorción e interacciones electrostáticas y covalentes (Farahani et al., 2016) como ya hemos visto en el apartado anterior.

##### Nanopartículas de oro (AuNPs)

Sus aplicaciones terapéuticas incluyen el desarrollo de sistemas de distribución dirigida de fármacos,

hipertermia, medicina regenerativa o radioterapia. En ellas está focalizada la investigación biomédica debido a sus propiedades físico-químicas como la forma, el área de superficie, la capacidad de transporte y la biocompatibilidad (Ghosh et al., 2013).

Entre las ventajas más destacadas de estas estructuras se encuentran su baja toxicidad para las células no tumorales (Berce et al., 2016), el incremento de la vida media, el fácil control de su tamaño, la mejora de su química de superficie (Ekin et al., 2014), el incremento de sus efectos terapéuticos, el aumento en la acumulación del fármaco dentro de las células cancerígenas y el aumento de los efectos farmacocinéticos y la biodistribución (Tomuleasa et al., 2012).

Las nanopartículas de oro pueden ser conjugadas con pequeñas hebras de RNA como miRNA y siRNA, o un amplio rango de pequeñas moléculas o anticuerpos monoclonales. Las partículas cargadas con RNA tienen como diana la célula cancerígena, y provocan en ella un silenciamiento génico, como demostraron Crew y colaboradores (2012). Las nanopartículas conjugadas con anticuerpos monoclonales pueden actuar mediante diversos mecanismos, desde el simple bloqueo de receptores antigénicos en las células efectoras hasta la acción citotóxica sobre las células que expresan el antígeno correspondiente (Berce et al., 2016).

Las nanopartículas basadas en metales nobles, en particular el oro, tienen un inmenso potencial además de para el tratamiento del cáncer, para el diagnóstico, debido a la capacidad de su superficie para dispersar y absorber la luz (Kang et al., 2010). El-Sayed y su grupo (2005) utilizaron nanopartículas de oro cargadas con o sin anticuerpos anti-EGFR. Ambos tipos de nanopartículas fueron incubadas con queratinocitos humanos no malignos y células epiteliales malignas. Se observó que la dispersión de imágenes y el espectro de absorción registrado por las nanopartículas de oro conjugadas con anticuerpos anti-EGFR que se dirigían a las células no tumorales era diferente de los que se dirigían a células malignas, mostrando una técnica potencial para el diagnóstico de cáncer oral (El-Sayed et al., 2005).

Aunque las NPs de oro tienen un gran potencial para el tratamiento y diagnóstico del cáncer, hay que tener en cuenta que tienen una baja eficacia de encapsulación, pobre estabilidad en el almacenamiento y lento escape endosómico, por lo que el uso de estas nanopartículas podría estar limitado (Ghosh et al., 2013).

#### Nanopartículas de hierro (hipertermia)

El óxido de hierro, un componente que se encuentra de forma natural en una gran variedad de minerales, e incluso forma parte de nuestro cuerpo, ha adquirido actualmente gran relevancia debido a su enorme potencial en el campo de la biomedicina.

A las ventajas ya mencionadas de las nanopartículas, se le añade la particularidad de que el hierro es fácilmente metabolizable dentro del cuerpo humano y de que puede ser magnético. Este hecho hace que estas nanopartículas se puedan dirigir por dentro del cuerpo mediante un imán y puedan ser utilizadas como generadoras de calor, destruyendo, de esta forma, los tejidos malignos desde dentro hacia fuera (Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid).

La hipertermia (HT) local, es una terapia que calienta selectivamente el tumor hasta alcanzar una temperatura de tratamiento adecuada (39~45 °C) por un dispositivo de calentamiento físico, que puede matar células cancerígenas, pero no daña en teoría a las células no tumorales. Esto determina buenos resultados funcionales y estéticos, en especial cuando se aplica en cánceres de cabeza y cuello (caracterizados por su localización relativamente superficial, lo cual facilita la aplicación de la técnica) (Iliakis et al., 2014).

El mecanismo de hipertermia local incluye principalmente los siguientes aspectos:

- Efectos directos de muerte celular. En general aplicar calor a las células puede cambiar la permeabilidad de la membrana celular y alterar su actividad enzimática y la estructura celular, induciendo finalmente la apoptosis. Las células en la fase de síntesis (fase S), son las que sufren el impacto térmico más seriamente, debido al daño de la estructura de la cromatina y la inactivación de proteínas de replicación (Iliakis et al., 2014).
- Efecto antineoplásico coordinado con radioterapia y quimioterapia. El calentamiento tras la irradiación es capaz de reducir significativamente la dosis de radiación utilizada, ya que la HT es un potente sensibilizante a la radiación (Fujiwara et al., 1990). Esto es debido a que el calentamiento moderado aumenta la permeabilidad vascular y a que se inhibe la reparación del DNA.

En relación con la quimioterapia, el aumento de permeabilidad de los vasos facilita la distribución de los agentes anticancerígenos en el tumor, y se altera además el metabolismo del fármaco potenciándose su efecto citotóxico (Iliakis et al., 2014).

- Hipoxia. La HT local podría contribuir a modificar la perfusión de los vasos tumorales y la presión parcial de O<sub>2</sub>, a través de la activación de HIF-1 y otras dianas como VEGF y la quinasa piruvato deshidrogenasa (PDK1), y modificando las vías de señalización del metabolismo de las células tumorales (Moon et al., 2010).
- Otra característica de la HT es que es capaz de regular el sistema inmune antitumoral. La HT altera la visibilidad de los tumores por las células inmunes a base de incrementar su potencial citotóxico (Toraya-Brown et al., 2014).

Las aplicaciones clínicas de la HT en el cáncer de cabeza y cuello se centran en la terapia fototérmica y en la hipertermia basada en nanopartículas.

- La terapia fototérmica emplea la asistencia de agentes fototérmicos capaces de absorber la luz para tratar tumores por calor (inducido por luz). Dichos agentes convierten la radiación luminosa de ciertas longitudes de onda en calor, provocando necrosis de las células tumorales (Wang et al., 2013). Es posible localizar la radiación láser en el lugar deseado, mejorando la acumulación de agentes fototérmicos y disminuyendo la comorbilidad de tejidos adyacentes.
- Los métodos convencionales de hipertermia no permiten diferenciar entre la diana y el tejido normal que lo rodea, y este calentamiento de tejido no selectivo puede desencadenar serios efectos adversos. En este contexto, la incorporación de nanomateriales a la técnica (Yang et al., 2012) hacen que la especificidad por células tumorales aumente.

Los principales nanomateriales utilizados son las nanopartículas de óxido de hierro, aunque para la terapia fototérmica también se utilizan las nanopartículas de oro.

A pesar de todas sus ventajas en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, en la actualidad la hipertermia sufre de numerosas limitaciones, como el control preciso de la dosis térmica, la concentración del tratamiento en la diana deseada o la diferenciación entre células sanas y cancerígenas. Sin embargo, la introducción a la técnica de nuevos nanomateriales terapéuticos permitirá solventar muchos de sus problemas, lo cual significaría un claro avance para esta técnica (Yang et al. 2012).

### 3.3.3 Sistemas lipídicos

#### Liposomas

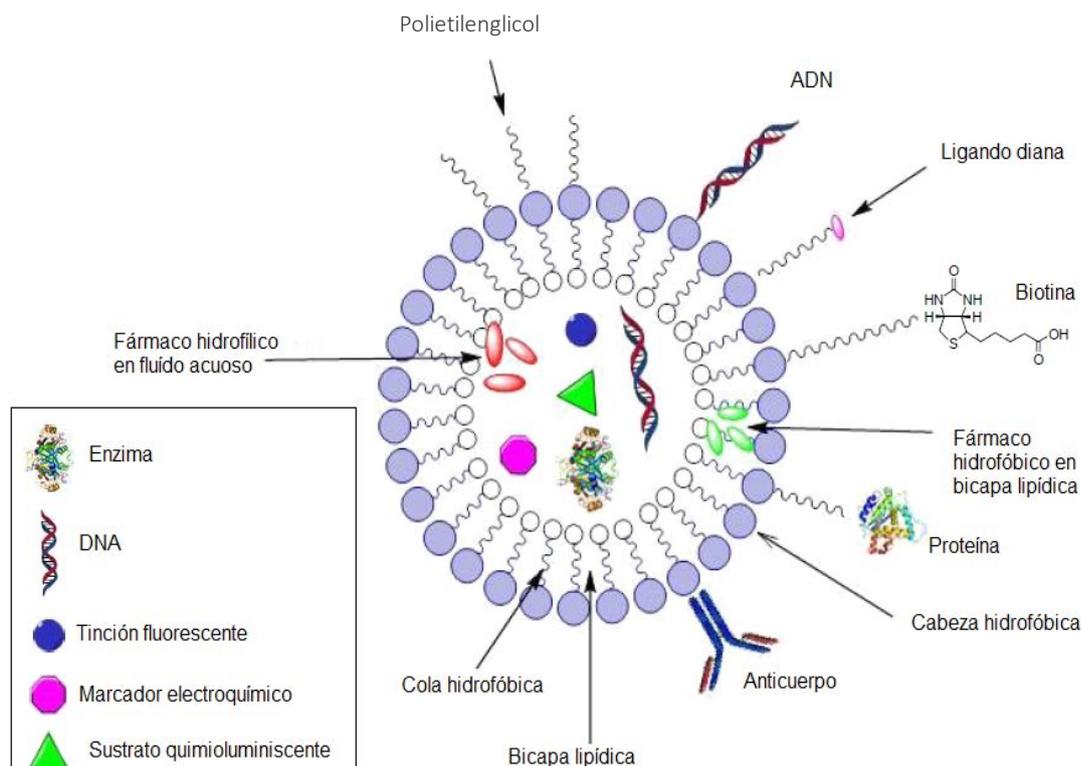
Los liposomas encabezan la lista de los sistemas de transporte desarrollados hasta el momento (Seguin et al., 2013). Son estructuras coloidales esféricas formadas por una bicapa lipídica que engloba un compartimento acuoso (**Figura 13**), y son capaces de transportar una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos, tanto hidrofóbicos (incorporados en el interior de la bicapa lipídica) como hidrofílicos (incorporados al núcleo acuoso) (Seguin et al., 2013).

Estos transportadores son atractivos para el diseño de fármacos por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad y por ser capaces de encapsular múltiples componentes. Aunque han sido aprobados por múltiples ensayos clínicos, los liposomas tienen algunas desventajas como la baja eficacia de encapsulación, pobre estabilidad de almacenaje, fácil oxidación de fosfolípidos y tiempo reducido de liberación (Shin et al., 2015).

La estabilidad de estas nanoestructuras depende, entre otros factores, de la estabilidad coloidal, que en estructuras hidrófobas depende de la carga eléctrica de sus micelas, mientras que en estructuras hidrófilas depende del grado de hidratación de sus micelas. De verse reducida dicha estabilidad, los liposomas forman partículas de gran tamaño y su eficacia como sistema de transporte se ve reducida (Tao et al., 2014).

Debido a la presencia de estímulos específicos presentes en el lugar del tumor, los liposomas pueden ser capaces de alcanzar las células tumorales y liberar el agente quimioterapéutico que transportan. Myocet y Caelyx (Doxil en Estados Unidos) fueron los primeros en ser aprobados. La diferencia entre ambos radica en que el primero contiene la doxorubicina en liposomas sin cubierta, mientras que en el segundo está confinada en liposomas con la superficie modificada con PEG, para reducir el reconocimiento rápido por el sistema retículo endotelial e incrementar así el tiempo de circulación (Drummond et al., 1999). Sin embargo, a día de hoy, la principal justificación de la aprobación de estas estructuras ha sido su habilidad para atenuar la toxicidad relacionada con el fármaco (como cardiomiopatía, depresión medular, alopecia o náuseas), más que para mejorar la eficacia antitumoral. Doxil es el primer nanotransportador aprobado por la FDA y se usa en el tratamiento del sarcoma de Kaposi mediado por VIH, en el cáncer de mama metastásico y en el cáncer de ovario (Lee et al., 2015).

En un estudio llevado por el grupo de Calixto, se evaluó la potencial actividad antitumoral de liposomas PEGilados cargados de cisplatino en cuatro pacientes con carcinoma escamoso de la cavidad oral. Los resultados mostraron que los efectos inhibitorios del crecimiento de las nanopartículas cargadas de cisplatino fueron significativamente menores que los del cisplatino libre. Sin embargo, las cascadas de las caspasas 3 y 7, las cuales son activadas por el estímulo del cisplatino, inducían una liberación del citocromo c por la mitocondria y llevaban inevitablemente a la apoptosis de las células cancerígenas. Otro dato importante obtenido de este estudio revelaba que la nefrotoxicidad, un efecto adverso crucial del tratamiento con cisplatino, era mucho menor cuando éste iba cargado en nanopartículas que cuando se administraba libre. Por ello, se puede concluir que estas nanopartículas son tan eficaces como el cisplatino libre en el carcinoma oral de células escamosas, pero con mucha menor toxicidad renal (Calixto et al., 2014).



**Figura 13.** Estructura de un liposoma. Los liposomas son transportadores de fármacos coloidales que consisten en una bicapa fosfolipídica que encierra un núcleo acuoso. Los componentes hidrofílicos pueden transportarse en el núcleo acuoso, mientras que los componentes lipofílicos pueden incorporarse entre las bicapas lipídicas. En la superficie de los liposomas, pueden anclarse diferentes partículas que se dirigen a las células de interés. Para evitar la respuesta inmune, la superficie de los liposomas se carga con un polímero llamado glicol polietileno. De este modo se protege la carga, que podrá ser distribuida a las células diana (Jurj et al., 2017).

### Sistemas híbridos

Constituyen una mezcla entre liposomas y polímeros. Los componentes implicados en el diseño del sistema híbrido presentan características interesantes para su uso potencial en la terapia del cáncer. El núcleo del sistema híbrido consiste en un polímero biodegradable hidrofóbico que permite la encapsulación de fármacos hidrosolubles y una liberación continua. Para incrementar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo y evitar la respuesta del sistema inmune, el sistema híbrido está cubierto por una cubierta hidrofílica. Entre el núcleo hidrofóbico y la parte hidrofílica, el sistema tiene una monocapa lipídica que previene la difusión de fármacos encapsulados y reduce la penetración de agua en las nanopartículas (Prabhu et al, 2015).

Hu y colaboradores (2010) han sintetizado un sistema de distribución dirigida basado en nanoestructuras conjugando el anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) con un polímero lipídico, que tiene como diana las células pancreáticas cancerígenas con el antígeno CEA hiperexpresado. Estas nanopartículas híbridas se componen de un núcleo polimérico y una cubierta externa basada en PEG. El estudio *in vitro* demostró un efecto aumentado del agente quimioterapéutico cuando era transportado por nanopartículas dirigidas en comparación a cuando era transportado por nanopartículas no dirigidas (Hu et al., 2010).

Los sistemas híbridos diseñados a partir de metales nobles son agentes anticancerígenos prometedores para ser usados en métodos diagnósticos y terapéuticos.

#### 3.3.4 Sistemas poliméricos

## Dendrímeros

Los dendrímeros son sistemas sintéticos poliméricos novedosos que han visto mejoradas sus propiedades físicas y químicas debido a su característica estructura tridimensional. Poseen un tamaño, forma y peso molecular bien definidos y son emergentes en el campo de la nanomedicina debido a su alta solubilidad, polivalencia y biocompatibilidad (Pandita et al., 2014).

Los compartimentos en el interior de las estructuras dendríticas pueden ser modificados para incorporar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos. Los grupos terminales pueden ser modificados para acoplar anticuerpos y sustancias bioactivas al mismo tiempo que se evita la miscibilidad, reactividad y solubilidad (Tripathy & Das, 2013).

Tienen la capacidad de interactuar con las membranas, orgánulos celulares y proteínas. Además, los dendrímeros con superficie catiónica tienden a interactuar con la bicapa lipídica, facilitando el aumento de la permeabilidad y la consiguiente distribución intracelular de los agentes (Jurj et al., 2017). Sin embargo, en el caso de los dendrímeros catiónicos con alta densidad de carga, la interacción con la membrana podría resultar en una disrupción de su integridad y la salida de importantes componentes intracelulares que terminarían causando muerte celular y toxicidad (Kesharwani et al., 2014). Dicha toxicidad asociada a los dendrímeros catiónicos se puede prevenir modificándolos con moléculas neutras (Kesharwani et al., 2014).

Los dendrímeros, que pueden ser funcionalizados con varios dominios diana como ácido fólico, péptidos, anticuerpos monoclonales o grupos glucídicos (Pandita et al., 2014). La presencia de múltiples grupos terminales de superficie en los dendrímeros permite la conjugación de fármacos y realizar modificaciones para optimizar la biodistribución, establecer la dosis terapéutica o la liberación controlada de fármaco desde el interior, mediante escisión química o enzimática (Tripathy & Das, 2013).

Sulfikkarali y colaboradores (2013) investigaron los efectos antitumorales en la cavidad bucal de las nanopartículas (copolímeros de acrilato) cargadas con naringenina (NARNPs). La naringenina (NAR) tiene una acción farmacológica prometedora, sin embargo, presenta una baja biodisponibilidad oral, lo que constituye un importante obstáculo. Los resultados del estudio revelaron que las NARNPs tienen efectos antitumorales mayores que la NAR libre. Este hecho puede que sea debido a que las nanopartículas cargadas con NAR pueden llegar a los lugares del tumor mediante el efecto EPR, debido al hecho que la vasculatura del tejido tumoral es porosa con un endotelio permeable. De este modo se consigue incrementar y mantener las concentraciones del fármaco dentro de las células a lo largo del tiempo, lo cual conlleva una mayor eficacia antitumoral comparado con la NAR libre (Sulfikkarali et al., 2013).

## Nanopartículas de albúmina

Las primeras nanopartículas poliméricas diseñadas para el tratamiento del cáncer fueron las elaboradas a base de albúmina. Damascelli y colaboradores (2003) evaluaron la efectividad de la infusión arterial de paclitaxel incorporado en nanopartículas basadas en albúmina humana, para ser usado como quimioterapia de inducción antes del tratamiento definitivo del cáncer de lengua avanzado. Las nanopartículas de albúmina son formulaciones atractivas porque incorporan una significativa cantidad de fármaco en la matriz de la partícula debido a los múltiples sitios de unión al fármaco que presentan.

Por otro lado, el paclitaxel causa severas reacciones alérgicas cuando es administrado de forma intravenosa. Damasceli et al (2003) demostraron que la infusión arterial de paclitaxel en

nanopartículas de albúmina es reproducible y efectiva, evitando las reacciones alérgicas provocadas por las formulaciones comerciales disponibles.

Otro ejemplo de las posibles aplicaciones de los polímeros en este ámbito lo pusieron de manifiesto Yu y colaboradores (2008), que evaluaron los efectos anticancerígenos de nanopartículas PEGiladas (copolímeros de poli-b-Polibenzil-L-Glutamato) cargadas con timidina kinasa del virus herpes simple (HSV-TK). HSV-TK es un buen gen inductor de la apoptosis, pero su transferencia en el tumor es crítica. Sin embargo, los resultados del estudio demostraron que las nanopartículas cargadas con el gen poseen una cápsula, protegiendo así el DNA, y una eficacia mayor de transferencia del gen, liberando el DNA gradualmente. Todo ello sugiere que puedan servir en futuras aplicaciones clínicas como transportadores de genes (Day et al., 2008).

#### 4. CONCLUSIONES

El tratamiento de HNSCC se ajusta continuamente al conocimiento científico. Encontrar marcadores capaces de predecir la respuesta a los protocolos de quimiorradiación, y de este modo personalizar el tratamiento individual de cada paciente es fundamental.

Por otro lado, al haberse observado que los tumores relacionados con el HPV tienen un pronóstico más favorable en comparación con los tumores HPV negativos en estadio similar, se ha sugerido la necesidad de emplear modalidades de tratamiento menos intensas, con el objetivo de disminuir la morbilidad asociada al tratamiento.

La introducción de la terapia anti-EGFR es la primera de las modalidades de tratamiento biológicas en verse aplicada en la clínica, y hace primordial el desarrollo de métodos efectivos para seleccionar los tumores sensibles a anti-EGFR.

Además, debería prestarse una mayor atención al tratamiento de los “*fields*” precancerosos para prevenir recurrencias locales y segundos tumores primarios.

La identificación de las aberraciones genéticas, epigenéticas y metabólicas junto con las técnicas más tradicionales de diagnóstico, estadificación y pronóstico servirán para determinar la estrategia individual de tratamiento. La terapia dirigida aumentará la demanda de biomarcadores más predictivos además de HPV, EGFR y la mutación de TP53. Es probable que estos marcadores necesiten ser combinados con el estadiaje convencional, el tabaco y otros factores clínicos para el desarrollo de un tratamiento óptimo personalizado.

Dentro de las nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento del cáncer, en concreto del HNSCC, tiene un papel especialmente importante la nanomedicina. Como ya se ha visto, su objetivo principal es reemplazar los fármacos quimioterapéuticos altamente invasivos o no específicos con agentes dirigidos con potencial en la detección, diagnóstico, distribución dirigida y liberación controlada de la carga terapéutica. Para mejorar la estabilidad de las moléculas terapéuticas y disminuir la inmunogenicidad no específica, son requeridas modificaciones químicas de la superficie. Además, las modificaciones bioquímicas ofrecen también un gran potencial, incrementando la potencia y disminuyendo los efectos fuera de la célula diana.

Los ejemplos de ensayos clínicos con resultado favorable que han sido citados a lo largo del trabajo dan una idea de los potenciales beneficios que la nanomedicina podría tener al ser aplicada en el ámbito clínico.

Se puede concluir que, en un futuro cercano, oncólogos y pacientes se beneficiarán de las ventajas de la nanotecnología, que permitirá mejorar los resultados terapéuticos a coste reducido. Por el momento los estudios clínicos en el campo de la nanotecnología se han centrado en el cáncer oral, pero se prevé la aplicación de esta técnica en otros ámbitos como la odontología, con nuevos métodos tanto de identificación del cáncer como de personalización del perfil terapéutico de cada paciente (Hull, Farrell, & Grodzinski, 2014).

Como la mayoría de los avances científicos que han revolucionado la medicina en las últimas décadas, la nanomedicina aplicada al tratamiento del cáncer necesita madurar antes de alcanzar su pleno impacto. Son necesarios más estudios para llevar los conceptos de nanotecnología a la práctica clínica, y para determinar las dosis adecuadas y la liberación ideal desde estos sistemas para el tratamiento de los diferentes cánceres, cada uno con sus particulares mecanismos moleculares y celulares.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Agüeros, M., Ruiz-Gatón, L., Vauthier, C., Bouchemal, K., Espuelas, S., Ponchel, G., & Irache, J. M. (2009). Combined hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(4), 405–413.
- Adair, T.H., Montani, J.P. (2010) *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
- Ahn, H. K., Jung, M., Sym, S. J., Shin, D. B., Kang, S. M., Kyung, S. Y., et al. (2014). A phase II trial of Cremorphor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(2), 277–282.
- Ajnai, G., Chiu, A., Kan, T., Cheng, C. C., Tsai, T. H., & Chang, J. (2014). Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Taiwan)*, 6(6), 172-178.
- American Joint Committee on Cancer: <https://cancerstaging.org/Pages/default.aspx>
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-tân, P. F., et al. (2011). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(1), 24–35.
- Angosto, M. C., Número, A. De, Real, D., & Nacional, A. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Académica de Número de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 69(1), 36–64.
- Arrieta, O., Medina, L. A., Estrada-Lobato, E., Ramírez-Tirado, L. A., Mendoza-García, V. O., & De La Garza-Salazar, J. (2014). High liposomal doxorubicin tumour tissue distribution, as determined by radiopharmaceutical labelling with <sup>99m</sup>Tc-LD, is associated with the response and survival of patients with unresectable pleural mesothelioma treated with a combination of liposomal doxorubicin and cisplatin. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(1), 211–215.
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy*, 19, 67–88.
- Baetke, S. C., Lammers, T., & Kiessling, F. (2015). Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *British Journal of Radiology*, 88 (1054).
- Barenholz, Y. (2012). Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160(2), 117–134.
- Berce, C., Lucan, C., Petrushev, B., Boca, S., Miclean, M., Sarpataki, O., et al. (2016). *In vivo* assessment of bone marrow toxicity by gold nanoparticle-based bioconjugates in CrL:CD1(ICR) mice. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4261–4273.
- Berx, G., & Roy, F. Van. (2009). Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1, 27.
- Biocancer Research Journal: <https://www.biomedcentral.com/>
- Blasco, M. A., Svider, P. F., Raza, S. N., Jacobs, J. R., Folbe, A. J., Saraf, P., et al. (2017). Systemic therapy for head and neck squamous cell carcinoma: Historical perspectives and recent breakthroughs. *The Laryngoscope*, 127, 2565–2569.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., et al. (2006). Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 567–578.
- Bossi, P., Miceli, R., Locati, L. D., Ferrari, D., Vecchio, S., Moretti, G., et al. (2017). A randomized, phase 2 study of cetuximab plus cisplatin with or without paclitaxel for the first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Annals of Oncology*, 28(11), 2820–2826.
- Brockstein, B. E. (2011). Management of recurrent head and neck cancer: Recent progress and future directions. *Drugs*, 71(12), 1551–1559.

- Burtness, B., Goldwasser, M. A., Flood, W., Mattar, B., & Forastiere, A. A. (2005). Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(34), 8646–8654.
- Califano, J., Van Der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., et al. (1996). Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. *Cancer Research*, *1*, 2488–2493.
- Calixto, G., Fonseca-Santos, B., Chorilli, M., & Bernegossi, J. (2014). Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. *International Journal of Nanomedicine*, *9*(1), 3719.
- Carrard, V., & Van Der Waal, I. (2017). A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. *Medicina Oral Patología Oral Y Cirugía Bucal*, *23*(1), 59-64.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Publishing Group*, *4*, 118–132.
- Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Paula Curado, M., Ferlay, J., Franceschi, S., et al. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(36), 4550–4559.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). TGF- $\beta$  signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*: *6*(10), 1521–1533.
- Cohen, J., Chen, Z., Lu, S.-L., Yang, X. P., Arun, P., Ehsanian, R., et al. (2009). Attenuated Transforming Growth Factor Signaling Promotes Nuclear Factor-B Activation in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, *69*(8), 3415–3424.
- Colevas, A. D. (2006). Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(17), 2644–2652.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, *30*(7), 1073–1081.
- Coster, J. R., Foote, R. L., Olsen, K. D., Jack, S. M., Schaid, D. J., & Desanto, L. W. (1992). Cervical nodal metastasis of squamous cell carcinoma of unknown origin: indications for withholding radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, *23*(4), 743–749.
- Crew, E., Rahman, S., Razzak-jaffar, A., Mott, D., Kamundi, M., Yu, G., et al. (2012). MicroRNA Conjugated Gold Nanoparticles and Cell Transfection, *84*(1), 26–29.
- Damascelli, B., Patelli, G. L., Lanocita, R., Di Tolla, G., Frigerio, L. F., Marchiano, A., et al. (2003). A novel intraarterial chemotherapy using paclitaxel in albumin nanoparticles to treat advanced squamous cell carcinoma of the tongue: preliminary findings. *American Journal of Roentgenology*, *181*(1), 253–260.
- Davidson, B. J., Spiro, R. H., Patel, S., Patel, K., & Shah, J. P. (1994). Cervical metastases of occult origin: The impact of combined modality therapy. *The American Journal of Surgery*, *168*(5), 395–399.
- Day, G. L., Blot, W. J., McLaughlin, Austin, D. F., Greenberg, R. S., Soumitra, et al. (2008). PEG-PBLG nanoparticle-mediated HSV-TK/GCV gene therapy for oral squamous cell carcinoma. *Nanomedicine*, *3*(6), 813-821.
- Day, G. L., Blot, W. J., Shore, R. E., Schoenberg, J. B., Kohler, B. A., Greenberg, R. S., et al. (1994). Second cancers following oral and pharyngeal cancer: patients' characteristics and survival patterns. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, *30*(6), 381–386.
- Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D. B., & Papahadjopoulos, D. (1999). Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacological Reviews*, *51*(4), 691-743.
- Dyson, N., Howley, P.M., Múnger, K., Harlow, E. (1989). The Human Papilloma Virus-16E7 Oncoprotein is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science*, *243*, 934–936.

- Ekin, A., Karatas, O. F., Culha, M., & Ozen, M. (2014). Designing a gold nanoparticle-based nanocarrier for microRNA transfection into the prostate and breast cancer cells. *The Journal of Gene Medicine*, 10(6), 610–618.
- El-Sayed, I. H., Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2005). Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Letters*, 5(5), 829–834.
- Farahani, B. V., Behbahani, G. R., & Javadi, N. (2016). Functionalized multi walled carbon nanotubes as a carrier for doxorubicin: Drug adsorption study and statistical optimization of drug loading by factorial design methodology. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(4), 694–705.
- Fujiwara K, Watanabe T. (1990). Effects of hyperthermia, radiotherapy and thermoradiotherapy on tumor microvascular permeability. *Acta Pathol Jpn.* (40),79- 84.
- Garbuzenko, O. B., Saad, M., Pozharov, V. P., Reuhl, K. R., Mainelis, G., & Minko, T. (2010). Inhibition of lung tumor growth by complex pulmonary delivery of drugs with oligonucleotides as suppressors of cellular resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10737–10742.
- Georgakopoulou, E. A., Ahtari, M. D., Ahtarlis, M., Foukas, P. G., & Kotsinas, A. (2012). Oral lichen planus as a preneoplastic inflammatory model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 8–10.
- Gherman, C., Tudo, M. C., Constantin, B., Flaviu, T., Stefan, R., Maria, B., et al. (2015). Pharmacokinetics Evaluation of Carbon Nanotubes Using FTIR Analysis and Histological Analysis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(4), 2865–2869.
- Ghosh, R., Singh, L. C., Shohet, J. M., & Gunaratne, P. H. (2013). A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells. *Biomaterials*, 34(3), 807–816.
- Gillison, M. L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S., & Viscidi, R. (2008). Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(6), 407–420.
- Goulart Filho, J. A. V., Nonaka, C. F. W., da Costa Miguel, M. C., de Almeida Freitas, R., & Galvão, H. C. (2009). Immunoexpression of cyclooxygenase-2 and p53 in oral squamous cell carcinoma. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 30(2), 89–94.
- Gradishar, W. J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., et al. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), 7794–7803.
- Grandis, J. R., & Tweardy, D. J. (1993). Elevated Levels of Transforming Growth Factor  $\alpha$  and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, 53(15), 3579–3584.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- He, C. X., Tabata, Y., & Gao, J. Q. (2010). Non-viral gene delivery carrier and its three-dimensional transfection system. *International Journal of Pharmaceutics*, 386(1–2), 232–242.
- Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., et al. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13549–13554.
- Hu, C.M., Kaushal, S., Tran Cao, H.S., Aryal, S., Sartor, M., Esener, S. et al. (2010) Half-antibody functionalized lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted drug delivery to carcinoembryonic antigen presenting pancreatic cancer cells. *Mol Pharm.* 7(3):914–920.
- Huntley, S. P., Davies, M., Matthews, J. B., Thomas, G., Marshall, J., Robinson, C. M., et al. (2004). Attenuated type II TGF- $\beta$  receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive

- phenotype that is associated with metastatic dissemination. *International Journal of Cancer*, 110(2), 170–176.
- Husain, N., & Neyaz, A. (2017). Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 7(3), 198–205.
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 341–354.
- Ikushima, H., & Miyazono, K. (2010). TGF  $\beta$  signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 10(6), 415–24.
- Iliakis G, Krieg T, Guan J, Wang Y , Leeper D. (2004). Evidence for an S-phase checkpoint regulating DNA replication after heat shock: a review. *Int J Hyperthermia*, 20:240-249.
- Impola, U., Uitto, V. J., Hietanen, J., Hakkinen, L., Zhang, L., Larjava, H., et al. (2004). Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *Journal of Pathology*, 202(1), 14–22.
- Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid: <http://www.icmm.csic.es/es/>
- Instituto Nacional del Cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/instituto>
- Jhaveri, A.M., Torchilin, V.P. (2014). Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology*, 77(5).
- Jacob, L.A., Chaudhuri, T., Lakshmaiah, K.C., Babu, K.G., Dasappa, L., Babu, M.C.S., Rudresha, A.H., Lokesh, K.N., Rajeev, L.K. (2016). Current status of systemic therapy for recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Indian Journal of Cancer*, 53(4), 471-477.
- Jain, K., Mehra, N. K., & Jain, N. K. (2014). Potentials and emerging trends in nanopharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 15(1), 97–106.
- Jurj, A., Braicu, C., Pop, L. A., Tomuleasa, C., Gherman, C. D., & Berindan-Neagoe, I. (2017). The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 2871–2890.
- Kamangar, F. (2016). Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *Journal of Clinical Oncology*, 24(14), 2137-2150.
- Kang, B., Mackey, M. A., & El-Sayed, M. A. (2010). Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *J Am Chem Soc*, 132(5), 1517–1519.
- Kang, H.-J., & Rosenwaks, Z. (2018). P53 and Reproduction. *Fertility and Sterility*, 109(1), 39–43.
- Kazerounian, S., Yee, K.O., Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell*, 65(5), 700–712.
- Kesharwani, P., Jain, K., & Jain, N. K. (2014). Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 268–307.
- Kruijtzter, C. M. F., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2002). Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: An overview. *Oncologist*, 7(6), 516–530.
- Kushwaha, S. K. S., Ghoshal, S., Rai, A. K., & Singh, S. (2013). Carbon nanotubes as a novel drug delivery system for anticancer therapy: A review. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 629–643.
- Kutler, D. I., Auerbach, A. D., Satagopan, J., Giampietro, P. F., Batish, S. D., Huvos, A. G., et al. (2003). High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 129(1), 106–112. <https://doi.org/10.1001/archotol.129.1.106>

- Lammers, T., Hennink, W. E., & Storm, G. (2008). Tumour-targeted nanomedicines: Principles and practice. *British Journal of Cancer*, 99(3), 392–397.
- Lee, B. S., Yip, A. T., Thach, A. V., Rodriguez, A. R., Deming, T. J., & Kamei, D. T. (2015). The targeted delivery of doxorubicin with transferrin-conjugated block copolypeptide vesicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 903–911.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 9–22.
- Liechty, W. B., Caldorera-moore, M., Phillips, M. A., Schoener, C., & Peppas, N. A. (2011). Advanced Molecular Design of Biopolymers for Chemotherapeutic Agents and Biological. *Journal of Controlled Release*, 155(2), 119–127.
- Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, a, Wen, Y., Kwong, K. Y., et al. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell Biology*, 3(9), 802–808.
- Loizzi, V., del Vecchio, V., Gargano, G., de Liso, M., Kardashi, A., Naglieri, E., Resta, L., Cicinelli, E., Cormio, G. (2017). Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1967.
- Lydiatt, W., Shah, J.P. (1995). Treatment of Cancer of the Head and Neck. *A Cancer journal for Clinicians*, 45, 352-368.
- Maggiorella, L., Barouch, G., Devaux, C., Pottier, A., Deutsch, E., Bourhis, J., et al. (2012). Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncology*, 8(9), 1167–1181.
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., et al. (2011). Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*, 103(2), 317–324.
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs. *Cancer Research*, 46(12), 6387–6392.
- Mccombe, A. (1989). Multiple synchronous carcinoma of the aero-digestive tract, *J Laryngol Otol*, 103(8), 794–795.
- Meerum Terwogt, J. M., Schellens, J. H. M., Ten Bokkel Huinink, W. W., & Beijnen, J. H. (1999). Clinical pharmacology of anticancer agents in relation to formulations and administration routes. *Cancer Treatment Reviews*, 25(2), 83–101.
- Mishra, A., Bharti, A. C., Varghese, P., Saluja, D., & Das, B. C. (2006). Differential expression and activation of NF-κB family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *International Journal of Cancer*, 119(12), 2840–2850.
- Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE, Danhier P, Gallez B, Batinic-Haberle I, Nien YC, Schroeder T, Dewhirst MW. (2010). NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. (107) 20477-20482.
- Mout, R., Moyano, D. F., Rana, S., & Rotello, V. M. (2012). Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2539-2544.
- Napier, S. S., & Speight, P. M. (2008). Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: An overview of the literature. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 37(1), 1–10.
- Pandita, D., Poonia, N., Kumar, S., Lather, V., & Madaan, K. (2014). Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(3), 139.
- Partridge, M., Pateromichelakis, S., Phillips, E., Emilion, G. G., A'Hern, R. P., & Langdon, J. D. (2000). A case-control study confirms that microsatellite assay can identify patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma within a field of cancerization. *Cancer Res*, 60(14), 3893–3898.
- Petrushev, B., Boca, S., Simon, T., Berce, C., Frinc, I., Dima, D. et al. (2015). Gold nanoparticles enhance the effect of

tyrosine kinase inhibitors in acute myeloid leukemia therapy, 11, 641-660.

- Pignon, J. P., Maître, A. le, Maillard, E., & Bourhis, J. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology*, 92(1), 4–14.
- Poeta, M. L., Manola, J., Goldwasser, M. A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J. A., et al. (2007). TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 357(25), 2552–2561.
- Prabhu, R.H., Patravale, V.B., Joshi, M.B. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights, *Int J Nanomedicine*, 10, 1001–1018.
- Raez, L. E., Papadopoulos, K., Ricart, A. D., Chiorean, E. G., Dipaola, R. S., Stein, M. N., et al. (2013). A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(2), 523–530.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63(6), 1129–1136.
- Seguin, J., Brullé, L., Boyer, R., Lu, Y. M., Romano, M. R., Touil, Y. S., et al. (2013). Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, 444(1–2), 146–154.
- Seiwert, T. Y., Burtness, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J. P., et al. (2016). Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*, 17(7), 956–965.
- Shah, J. P. (1990). Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. *The American Journal of Surgery*, 160(4), 405–409.
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20–37.
- Shin, G. H., Kim, J. T., & Park, H. J. (2015). Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 144-157.
- Smith, R. B., Sniezek, J. C., Weed, D. T., & Wax, M. K. (2007). Utilization of free tissue transfer in head and neck surgery. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 137(2), 182–191.
- Suh, Y., Amelio, I., Guerrero Urbano, T., & Tavassoli, M. (2014). Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death & Disease*, 5(1), 1018-12.
- Sulfikkarali, N., Krishnakumar, N., Manoharan, S., & Nirmal, R. M. (2013). Chemopreventive efficacy of naringenin-loaded nanoparticles in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced experimental oral carcinogenesis. *Pathology and Oncology Research*, 19(2), 287–296.
- Tabor, M. P., Braakhuis, B. J. M., Van Der Wal, J. E., Van Diest, P. J., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H., & Kummer, J. A. (2003). Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *Journal of Pathology*, 199(3), 354–360.
- Tabor, M. P., Brakenhoff, R. H., Houten, V. M. M. Van, Kummer, J. A., Snel, M. H. J., Snijders, et al. (2001). Persistence of Genetically Altered Fields in Head and Neck Cancer Patients: Biological and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research*, 7(6), 1523–1532.
- Tao, L., Faig, A., & Urich, K. E. (2014). Liposomal stabilization using a sugar-based , PEGylated amphiphilic macromolecule. *Journal of Colloid and Interface Science*, 431, 112–116.
- Thanh, N. T. K., & Green, L. A. W. (2010). Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 5(3), 213–230.

- Tomuleasa, C., Soritau, O., Orza, A., Ducea, M., Petrushev, B., Mosteanu, O., et al. (2012). Gold nanoparticles conjugated with cisplatin/doxorubicin/capecitabine lower the chemoresistance of hepatocellular carcinoma-derived cancer cells. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 21(2), 188–196.
- Toraya-Brown S, Sheen MR, Zhang P, Chen L, Baird JR, Demidenko E, Turk MJ, Hoopes PJ, Conejo-Garcia JR, Fiering S. (2014). Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8(+) T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors. *Nanomedicine*, (10), 1273-1285.
- Tripathy, S., & Das, M. K. (2013). Dendrimers and their Applications as Novel Drug Delivery Carriers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(9), 142–149.
- Van der Waal, I. (2010). Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncology*, 46(6), 423–425.
- Vélez-Cruz, R., & Johnson, D. G. (2017). The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1776.
- Vermorken, J. B. (2005). Head and neck cancer: Medical treatment in head and neck cancer. *Annals of Oncology*, (16) 258-264.
- Vikram, B., Strong, E. W., Shah, J. P., & Spiro, R. (1984). Failure in the neck following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head & Neck Surgery*, 6(3), 724–729.
- Wang Y, Black KC, Luehmann H, Li W, Zhang Y, Cai X, Wan D, Liu SY, Li M, Kim P, Li ZY, Wang LV, Liu Y, Xia Y. (2013). Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment. *ACS Nano*, (7) 2068-2077.
- Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., et al. (2006). Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 24(5), 736–747.
- Wertz, I. E., & Dixit, V. M. (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death and Differentiation*, 17(1), 14–24.
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep*, 64(5), 1020–1037.
- Yang, N. (2015). An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(4), 179-181.
- Yang K, Xu H, Cheng L, Sun C, Wang J, Liu Z. (2012). *In vitro* and *in vivo* near-infrared photothermal therapy of cancer using polypyrrole organic nanoparticles. *Adv Mater.* (24) 5586-5592.
- Yildiz, I., Shukla, S., & Steinmetz, N. F. (2011). Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 901–908.
- Yu, D., Wang, A., Huang, H., Chen, Y. (2008) PEG-PBLG nanoparticle-mediated HSV-TK/GCV gene therapy for oral squamous cell carcinoma. *Nanomedicine (Lond)*, 3(6), 813-821.
- Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 342–350.