



Universidad de Cantabria
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología y Farmacología
Santander

Trabajo de Fin de Grado
Angiogénesis y Cáncer de Mama
Angiogenesis and Breast Cancer

Alumna: Marina Álvarez Fernández

Directora
Alicia Verónica González Cabeza (Profesora e investigadora, UC)

Curso académico, 2018-2019

AGRADECIMIENTOS.

Para la realización de esta revisión bibliográfica he contado con la ayuda inigualable de una investigadora experta en la materia, a la que quería por ello, en primer lugar, dar las gracias por su tiempo, su dedicación, sus consejos y su conocimiento, los cuales han sido de gran ayuda para permitirme elaborar este trabajo, al mismo tiempo que he podido profundizar en este campo de investigación.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a mi familia por su apoyo incondicional e incansable a lo largo de estos seis años, ayudándome a alcanzar mis objetivos

Santander, 27 de Mayo de 2019.

ÍNDICE.

1. RESUMEN.
2. INTRODUCCIÓN.
 - 2.1. Angiogénesis.
 - 2.1.1 Factores reguladores.
 - 2.1.2 Importancia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en los procesos angiogénicos.
 - 2.1.3 Papel de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) en los procesos angiogénicos.
 - 2.2. Cáncer de mama.
 - 2.2.1 Fisiopatología, patogenia y epidemiología del cáncer de mama.
 - 2.1.1. Factores de riesgo del cáncer de mama.
 - 2.1.2. Programa de cribado del cáncer de mama.
 - 2.1.3. Factores que condicionan mal pronóstico en el cáncer de mama.
3. OBJETIVOS.
4. METODOLOGÍA.
5. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA.
 - 5.1. Papel de la angiogénesis en los procesos neoplásicos.
 - 5.1.1. Importancia de VEGF en la patogénesis neoplásica.
 - 5.1.2. Angiogénesis en el pronóstico del cáncer.
 - 5.2. Angiogénesis y cáncer de mama.
 - 5.3. Rol de la melatonina en la regulación de la angiogénesis en el cáncer de mama.
 - 5.3.1. Mecanismos generales de acción de la melatonina.
 - 5.3.2. Acciones generales de la melatonina.
 - 5.3.3. Acciones de la melatonina en la patogenia del cáncer de mama.
 - 5.3.3.1. ¿Cómo regula la melatonina en la síntesis local de estrógenos en el cáncer de mama?
 - 5.3.3.2. Papel de la melatonina en la producción local de estrógenos en las células endoteliales peritumorales.
 - 5.4. Impacto de los mi-ARN en la angiogénesis del cáncer de mama.
 - 5.5. Terapias antiangiogénicas en el cáncer de mama.
 - 5.5.1. Objetivos terapéuticos generales.
 - 5.5.2. Técnicas terapéuticas actuales.
 - 5.5.3. Melatonina como terapia antiangiogénica en el cáncer de mama.
 - 5.5.4. Andrografólido como nueva terapia antiangiogénica en el cáncer de mama.
6. CONCLUSIONES.
7. BIBLIOGRAFÍA.

RESUMEN:

El cáncer de mama es la neoplasia que más comúnmente afecta a las mujeres de todo el mundo, pudiendo verse influido por diferentes factores riesgo y teniendo grados de agresividad variables en función del tipo de receptores que expresen sus células. Uno de los mecanismos más estudiados y que tiene un papel relevante en la patogénesis y desarrollo de dicha enfermedad es la angiogénesis. Mediante este proceso, los tejidos tumorales mamarios son capaces de proliferar, creciendo y adquiriendo propiedades invasivas y migratorias, facilitando la diseminación neoplásica hacia otras localizaciones. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) interactuando con su receptor VEGFR, se trata del agente angiogénico fundamental para el desarrollo de los procesos de neovascularización, pudiendo verse estimulado por diferentes factores como pueden ser determinadas citoquinas o las situaciones de hipoxia. Moléculas tales como la melatonina o los miARN actúan contrarrestando las acciones angiogénicas de VEGF necesarias para la correcta carcinogénesis, por lo que inhibirían los procesos multiplicativos, la diseminación, el crecimiento y la migración celular maligna en los tumores mamarios. Debido a ello, diferentes líneas de trabajo están fijando sus objetivos en el empleo de moléculas anti-angiogénicas para asociarlas a las terapias convencionales con fines terapéuticos.

Palabras clave: Angiogénesis; cáncer de mama; terapias anti-angiogénicas en el cáncer de mama; VEGF; melatonina; mi-ARN; Bevacizumab; andrografólido.

SUMMARY:

Breast cancer is the neoplasm that most commonly affects women worldwide, being able to be influenced by different risk factors and having several degrees of aggressiveness depending on the type of hormone receptors that are expressed by their cells. One of the most studied mechanisms that has a relevant role in the pathogenesis and development of this disease is angiogenesis. Through this process, mammary tumor tissues are able to proliferate, growing and acquiring invasive and migratory properties, facilitating neoplastic dissemination to other locations. Vascular endothelial growth factor (VEGF) interacting with its receptor VEGFR, is the fundamental angiogenic agent necessary for the development of neovascularization processes, which can be stimulated by different factors such as certain cytokines or hypoxia situations. Molecules such as melatonin or miRNAs act by counteracting the angiogenic actions of VEGF necessary for correct carcinogenesis, thus inhibiting multiplicative processes, spread, growth and malignant cell migration in mammary tumors. Due to this, different lines of work are setting their objectives

in the use of anti-angiogenic molecules to associate them with conventional therapies in order to achieve therapeutic purposes.

Key words: Angiogenesis; breast cancer; anti-angiogenic therapies in breast cancer; VEGF; melatonin; mi-RNA; Bevacizumab; andrographolide.

2.- INTRODUCCIÓN:

2.1- ANGIOGÉNESIS.

El término “angiogénesis” se emplea para referirse a la formación de nuevos vasos sanguíneos ^(1,2). Se trata de un proceso fundamental para la creación de una nueva red vascular necesaria para suministrar nutrientes, oxígeno y células inmunes, así como para eliminar los productos de desecho ⁽²⁾. El proceso de angiogénesis está constituido por dos fases diferenciadas:

1. Vasculogénesis: formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales diferenciadas que proliferan al mismo tiempo que el crecimiento corporal.
2. Angiogénesis: formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes. Esta fase, a diferencia de la anterior, puede estar presente a lo largo de toda la vida ⁽¹⁾.

De manera fisiológica, la angiogénesis está presente en el endometrio durante el ciclo reproductivo de la mujer en edad fértil, en el ovario y formando parte del desarrollo de la placenta. Es un proceso esencial para la actividad reproductiva y reparadora de los tejidos ⁽¹⁾. No obstante, de manera patológica, está relacionada con la aparición tanto de enfermedades neoplásicas como no neoplásicas ^(1,2,3).

El crecimiento tumoral y la diseminación metastásica son procesos dependientes de la angiogénesis, la cual está potenciada por señales químicas provenientes de las células tumorales que se encuentran en fase de rápido crecimiento. En ausencia de soporte vascular, los tumores pueden sufrir procesos necróticos e incluso apoptóticos. Es por ello que la creación de nuevos vasos sanguíneos es considerada un factor destacable en la progresión del cáncer ⁽²⁾. La afectación del sistema vascular debido al crecimiento tumoral comprende el proceso de angiogénesis, e induce situaciones de hipercoagulabilidad sistémica junto con un estado protrombótico ⁽¹⁾. El sistema hemostático, también conocido como cascada de coagulación, realiza funciones de coordinación del cese de la pérdida de sangre de los vasos dañados, regulando con ello la adherencia de las plaquetas y la formación de fibrina. En ausencia de patología, este sistema está inactivo en adultos debido al equilibrio entre las proteínas pro y anticoagulantes presentes en el torrente sanguíneo. A través de diferentes investigaciones y

publicaciones científicas, se ha hecho cada vez más evidente que el sistema de coagulación de la sangre representa una herramienta reguladora clave implicada en el desarrollo vascular. Cuando se produce una lesión tisular, como es en el caso de los tumores, la permeabilidad del vaso dañado aumenta, lo que da como resultado la extravasación de fibrinógeno y fibronectina y la formación del coágulo de fibrina que actúa como un substrato de unión temporal para las células endoteliales. La resolución del trombo venoso implica la formación de canales vasculares dentro del mismo, así como de nuevos vasos sanguíneos, lo que facilita la restauración normal del flujo sanguíneo. Estos eventos conllevan a la migración de las células endoteliales en proliferación hacia la malla de fibrina para reparar la pared del vaso y en la adhesión y expansión de dichas células, lo que sugiere que tanto los procesos de angiogénesis como los sistemas reguladores de la coagulación están estrechamente interconectados ^(1,2).

La neovascularización es un proceso caracterizado por cuatro fases diferentes:

1. La membrana basal de los tejidos sufre un daño local. A consecuencia de ello, se produce su destrucción llegando a una situación de hipoxia.
2. Las células endoteliales son activadas por factores angiogénicos migratorios.
3. Las células endoteliales proliferan y se estabilizan.
4. Los factores angiogénicos continúan estimulando el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos ⁽²⁾.

La angiogénesis es un proceso regulado a través de un estrecho balance entre los diferentes factores activadores e inhibidores de la misma (*Figura 1*). Así, en aquellas situaciones en las que los tejidos tumorales requieren mayores aportes metabólicos de nutrientes y oxígeno, los factores estimuladores de la creación de nuevos vasos sanguíneos se estimulan y liberan para favorecer los procesos angiogénicos. Sin embargo, esto solo no es suficiente, ya que se necesita que, al mismo tiempo que los factores estimuladores se activan, los factores inhibidores se bloqueen para obtener como resultado la formación de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos.

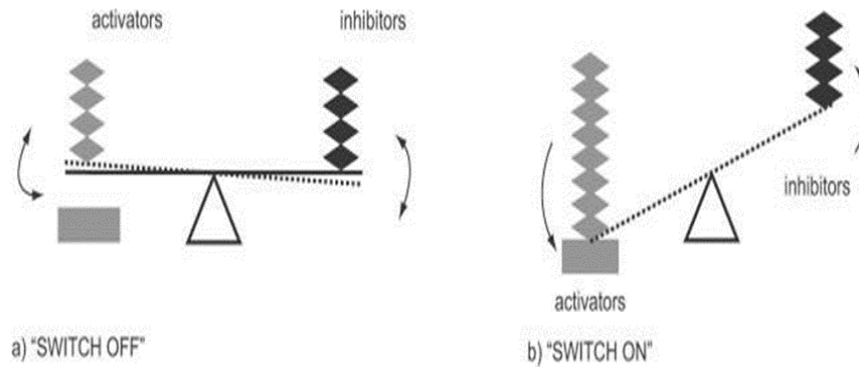


Figura 1.- Representación del balance y activación de la angiogénesis. En condiciones normales, los factores activadores e inhibidores permanecen en situación de equilibrio (a). En procesos patológicos, se produce la estimulación de los factores activadores a la vez que se inactivan los factores inhibidores (b). Tomada de Angiogenesis in Cancer. Vascular Health and Risk Management. September 2006 ⁽²⁾.

2.1.1. Factores reguladores de la angiogénesis.

El proceso de angiogénesis se produce por un desequilibrio local entre los factores activadores y los inhibidores de la misma ^(1,2). Esto se produce por tres mecanismos diferentes:

1. Sobreexpresión de uno o varios factores activadores de la angiogénesis.
2. Movilización de proteínas activadoras de la matriz extracelular.
3. Combinación de ambos procesos ⁽¹⁾.

Dentro de los factores reguladores positivos podemos encontrarnos con cinco moléculas fundamentales que intervienen favoreciendo positivamente los procesos angiogénicos:

Factor de transformación β (TGF β): se trata de un factor de crecimiento que ejerce acciones inhibitorias sobre la proliferación de las células endoteliales *in vitro*. No obstante, la inyección local de TGF β *in vivo* estimula la creación de nuevos vasos sanguíneos.

Factor de crecimiento placentario (PGF): esta molécula actúa compitiendo por los sitios de unión de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGR) y los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). En consecuencia, permite que estas moléculas permanezcan más tiempo en los tejidos e induzcan un incremento del efecto estimulador de la angiogénesis.

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF): mediante la estimulación paracrina de esta molécula se incrementa la síntesis y producción de factores angiogénicos

por los macrófagos presentes en el tejido conectivo. De igual manera, se puede favorecer la proliferación de las células endoteliales. FGF incrementa el índice de actividad mitótica a través de la estimulación de la proliferación de las células tumorales y endoteliales vasculares presentes en las áreas más vascularizadas del tumor, perpetuando los procesos angiogénicos ⁽¹⁾.

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF): se considera el factor estimulador de la angiogénesis más importante ⁽¹⁾, especialmente sus isoformas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅. Ambas isoformas realizan sus acciones uniéndose al receptor 2 de VEGF (VEGFR-2), el cual es considerado como el principal receptor de las rutas de señalización de VEGF en los procesos angiogénicos ^(2,3). En la mayor parte de las ocasiones, actúa de manera conjunta con otros factores como el factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF). Se ha demostrado que VEGF se expresa de manera abundante en aquellos tumores que provienen de células epiteliales. También se ha relacionado su presencia con diferentes procesos, tales como la isquemia miocárdica o las enfermedades retinianas, en las cuales los niveles de VEGF se elevan como consecuencia de la estimulación que suponen las situaciones de isquemia e hipoxia tisular. Se ha visto que en los tejidos neoplásicos la síntesis de este factor se ve favorecida por las propias células tumorales. (Figura 2 representando las diferentes moléculas que componen la familia de VEGF).

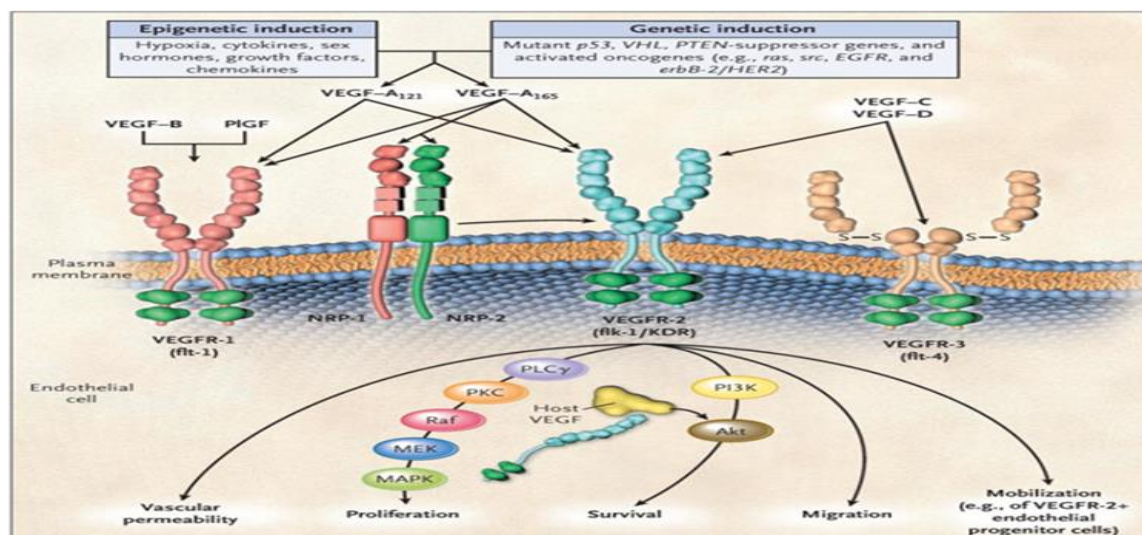


Figura 2.- Representación esquemática de la familia de moléculas y receptores de VEGF. Tomada de Tumor Angiogenesis. New England Journal of Medicine. August 2015 ⁽³⁾.

Factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF): como previamente se ha mencionado, dicho factor actúa generalmente en asociación con VEGF. En los tumores gástricos y en los carcinomas hepatocelulares, ambos tumores de origen epitelial, la fuente principal de

producción de este factor de crecimiento son las células infiltrantes. Debido a esto, es comprensible su papel en la división, migración celular y degradación de la matriz extracelular de los tejidos cancerosos ⁽¹⁾.

Por su parte, los factores inhibidores llevan a cabo su acción a través de dos mecanismos:

1. Inhibición de la proliferación celular.
2. Inhibición de la quimiotaxis ⁽¹⁾.

Los inhibidores endógenos de la angiogénesis incluyen metabolitos hormonales y moléculas moduladoras de la apoptosis. Algunos de estos factores inhibidores son: factor 4 plaquetario, Trombospodina-1 producida por fibroblastos normales, los inhibidores de metaloproteinasas, Prolactina, Angiostatina y Melatonina ^(1,2).

2.1.2-Importancia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en los procesos angiogénicos.

La regulación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es necesaria y determinante para la neovascularización en numerosos tejidos, tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas ^(2,3,4). VEGF es un elemento esencial para el mantenimiento de los procesos fisiológicos de la homeostasis vascular y se ha demostrado que ejerce un papel determinante en los mecanismos moleculares implicados en el crecimiento tumoral y metastásico, así como en la retinopatía asociada con diferentes grados de ceguera, incluyendo la degeneración macular asociada a la edad y la retinopatía diabética e hipertensiva. VEGF actúa en los tejidos favoreciendo la permeabilidad vascular y con ello los procesos de angiogénesis.

VEGF posee múltiples isoformas, creadas mediante procesos de spllicing alternativo o escisión proteolítica. El gen *VEGFA* se traduce en una serie de isoformas de unión, siendo las más relevantes VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. De entre ellas, la más frecuentemente expresada en los tejidos es VEGF₁₆₅, siendo a su vez la isoforma más relevante a nivel fisiológico. Estas isoformas se diferencian entre ellas en sus propiedades bioquímicas, en sus afinidades por los receptores de VEGF y los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) que expresan en su superficie, los cuales producen diversos efectos en el crecimiento de los vasos sanguíneos. En condiciones normales en ausencia de patología, las isoformas de VEGF se unen cada una de ellas de distinta forma a los proteoglicanos de heparán sulfato presentes en la matriz extracelular. En esta matriz también se produce la expresión de moléculas que actúan como inhibidores de VEGF, como por ejemplo VEGFR1. Estos inhibidores se encargan de regular el establecimiento de procesos involucrados en los fenómenos de

quiescencia vascular. VEGF₁₂₁ tiene muy poca afinidad por la heparina, mientras que VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ presentan cada una de ellas dos dominios de unión a heparina, codificados por los exones 6 y 7, lo que les permite expresar las proteínas en la matriz extracelular o en la superficie celular. VEGF₁₆₅ tiene tan solo un único dominio de unión a heparina, codificado por el exón 7, lo que le permite ser una isoforma con capacidad de difusión a través de las membranas celulares y al mismo tiempo expresar proteínas en la matriz extracelular. Es por ello por lo que se considera la más relevante desde un punto de vista fisiológico. Como consecuencia directa de las peculiaridades de cada isoforma, se origina un espectro de patrones de angiogénesis con importantes implicaciones funcionales en los tejidos ⁽⁴⁾.

Uno de los miembros fundamentales de la familia de citocinas VEGF lo constituye VEGF-A, junto con otros tales como VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el Factor de crecimiento derivado de la placenta (PlGF). VEGF-A participa en los procesos de angiogénesis encargándose del control de los mecanismos de expansión del lecho vascular existente, mediante la creación de nuevos vasos sanguíneos ^(2,3,4,5).

La tasa de secreción de VEGF constituye un factor crítico en los fenómenos angiogénicos inducidos por VEGF. No obstante, una vez secretada dicha molécula, numerosos procesos son capaces de regular su actividad *in vivo*. Ejemplos de esto pueden ser la córnea, donde la actividad del VEGF es reprimida por la co-secreción del receptor soluble de VEGF tipo 1 (sVEGFR1), evitando de esta forma que se alcancen niveles muy elevados de las concentraciones de VEGF. Numerosos procesos pueden afectar a la disponibilidad y actividad local de VEGF: el secuestro de VEGF por moléculas estacionarias en la matriz extracelular o en las superficies celulares, la inhibición o activación de VEGF por otras moléculas solubles, la liberación enzimática de la matriz extracelular y de portadores solubles o la pérdida de moléculas de VEGF mediante procesos de aclaramiento o degradación celular ⁽⁴⁾.

VEGF-A ha sido identificado como un factor clave en la inmunosupresión inducida por los tumores: dicha isoforma se encarga de fomentar la proliferación de las células inmunosupresoras tumorales presentes en los tejidos afectados por la invasión celular neoplásica, produciendo el reclutamiento de linfocitos T efectores en los tejidos tumorales y promoviendo el agotamiento de dichos linfocitos, consiguiendo de esta manera reducir la inmunidad celular del organismo y por tanto mermar su capacidad de defensa frente al tumor ^(5,6). VEGF también puede inducir la proliferación de Treg así como inhibir la actividad de las Teffs en los tejidos tumorales. Al actuar modificando la angiogénesis neoplásica, VEGF es capaz de alterar el equilibrio existente entre Treg/Teff, constituyendo un factor que impulsa los mecanismos de progresión tumoral. Otra de las moléculas críticas es TGF- β , que interviene en los procesos de

proliferación celular: se trata de una molécula necesaria para la estimulación de Treg en las células CD4+ indiferenciadas, siendo también una molécula de señalización importante para el mantenimiento de la función de las Treg en el entorno tumoral. Al mismo tiempo, puede actuar inhibiendo la activación y la diferenciación de las células inmunes innatas y adaptativas, incluidas las Natural Killer (NK), los linfocitos T y las células dendríticas ⁽⁶⁾.

Las moléculas angiogénicas VEGF y TGF- β producidas por los tejidos tumorales son consideradas como los controladores moleculares principales de la respuesta de las Treg. La inhibición de dichas células es capaz de modular el microambiente tumoral, favoreciendo la actuación de las Tregs y en consecuencia reprimiendo el crecimiento y la progresión neoplásica tisular ^(5,6).

2.1.3-Papel de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en los procesos angiogénicos.

En condiciones normales, en gran variedad de tejidos se producen metabolitos del ácido araquidónico, tales como las prostaglandinas y tromboxanos, así como numerosos productos de la lipoxigenasa. Dichas moléculas desempeñan funciones tisulares de gran importancia ya que actúan como potentes mediadores de las vías de transducción de señales que modulan la adhesión, el crecimiento y la diferenciación celular. La ciclooxigenasa (COX) se trata de una enzima que cataliza la conversión del ácido araquidónico hacia prostaglandinas. Se han identificado dos isoformas de dicha enzima, COX-1 y COX-2, las cuales llevan a cabo funciones diferentes: mientras que COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayor parte de los tejidos y se encarga de mantener la correcta homeostasis tisular, COX-2 es indetectable en situaciones de normalidad, induciéndose su incremento en respuesta a numerosos estímulos tales como la elevación de niveles hormonales, citoquinas y factores de crecimiento.

Tanto la sobreexpresión de COX-2 como concentraciones elevadas de prostaglandinas se han asociado comúnmente al padecimiento de enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide y diferentes tipos de neoplasias humanas entre las que se incluyen tumores de colon, cabeza y cuello, pulmones, hígado, próstata, estómago y mama. Se ha comprobado que las prostaglandinas intervienen en el mantenimiento de la patogénesis neoplásica, mediando en mecanismos de proliferación y apoptosis celular, así como modulando el sistema inmune y la angiogénesis ⁽⁷⁾. Como previamente hemos referido en esta revisión, en los procesos inflamatorios crónicos y en particular en el cáncer, la formación de nuevos vasos sanguíneos es fundamental para perpetuar el estado inflamatorio de los tejidos y transportar células inflamatorias, así como proporcionar un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes que las células neoplásicas necesitan para proliferar ^(1,2,3,7).

Mediante el estudio publicado por *Costa et al* en junio de 2002, se ha demostrado que las concentraciones elevadas de la prostaglandina E2, el principal producto de COX-2, están presentes en los tejidos neoplásicos mamarios de humanos y en modelos experimentales de tumores mamarios murinos. Estas prostaglandinas desempeñarían funciones cruciales en las neoplasias mamarias a través del control del crecimiento celular y los procesos de diseminación a distancia, así como modulando la respuesta inmune frente al cáncer.

En el estudio al que anteriormente nos hemos referido, se evaluó la expresión de COX-2 en los tejidos neoplásicos mamarios de 46 pacientes de edades comprendidas entre 28 y 77 años afectadas de carcinoma primario ductal invasivo. La expresión tisular de COX-2 fue analizada mediante técnicas de Western Blot en 19 de las muestras que presentaban carcinoma mamario ductal invasivo y en 2 de las muestras de tejido mamario normal emparejadas. Como resultado, se pudo constatar la presencia de sobreexpresión de COX-2 en 8 de las 19 muestras procesadas. Además, en todos los casos en los que COX-2 fue detectada mediante Western Blot, la inmunohistoquímica también fue positiva para la COX-2 (*Figura 3*). En contraposición a estos hallazgos, en los tejidos mamarios normales no se detectó expresión de COX-2.

Debido a tales resultados, se puede concluir que la expresión elevada de COX-2 parece estar asociada con los procesos de angiogénesis, metástasis y apoptosis celular en los tumores mamarios humanos. Sin embargo, son necesarios más estudios con series más largas de pacientes para confirmar dicha asociación ⁽⁷⁾.

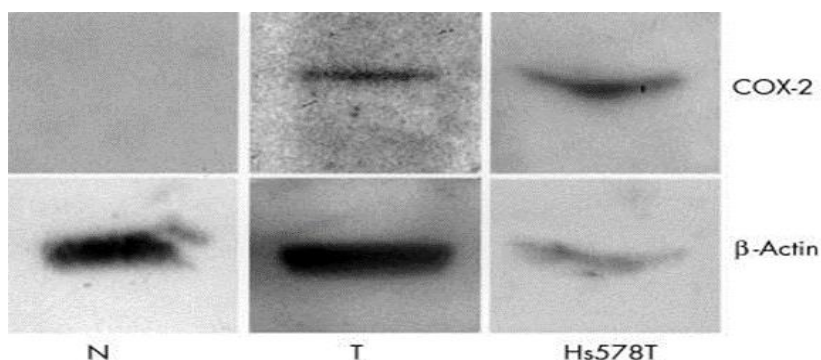


Figura 3.- Representación del análisis mediante técnicas de Western Blot en muestras de tejido normal mamario (N) y en tejido tumoral de mama (T). La línea celular de cáncer de mama Hs578T se usó como control positivo para la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Se aprecia la presencia de una banda de intensidad baja para COX-2 en el tejido tumoral, en oposición a la ausencia de dicha banda de COX-2 en el tejido mamario normal. Tomada de Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. June 2002 ⁽⁷⁾.

2.2- CÁNCER DE MAMA:

2.2.1-Fisiopatología, patogenia y epidemiología del cáncer de mama.

El cáncer de mama se define como una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios, considerándose una enfermedad clonal, en la que, partiendo de una célula individual, mediante una serie de mutaciones somáticas o de línea germinal, adquiere la capacidad de dividirse de manera descontrolada y exagerada, haciendo que se reproduzca hasta formar un tumor ^(8,9,10,11).

En el año 2008 se diagnosticaron aproximadamente 1.380.000 casos nuevos de cáncer de mama en el mundo. En la actualidad es el tumor más frecuente en la población femenina tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo.

Respecto a la incidencia del cáncer de mama en España, los registros publicados en Enero de 2018 recogieron que en 2017 los nuevos casos estimados de cáncer en España habían sido 228.482 y para 2035 se estima que habrá 315.413 nuevos casos de cáncer. La incidencia en España es baja, siendo menor que la de Estados Unidos y Canadá, Reino Unido, Países Bajos, Bélgica, Alemania, Francia y Suiza. En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65. Se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es de, aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres ⁽¹²⁾.

Se sabe que, con relación a los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se desarrollan los cánceres, tanto las lesiones genómicas como la inestabilidad de los nucleótidos contribuyen de manera relevante al aumento de las probabilidades de que las células dañadas se transformen en células cancerosas. La producción y perpetuación de dichos trastornos a nivel molecular constituye el inicio de los procesos cancerosos, por lo que los agentes o procedimientos que actúan debilitando la conformación y estructura normal del DNA celular participan activamente en la iniciación de las neoplasias. Una diversa variedad de elementos son capaces de atacar el genoma y perturbar con ello la estabilidad molecular, propiciando el aumento de la probabilidad de desarrollar mutaciones y la consiguiente transformación cancerosa. Algunos de ellos pueden ser: el daño del DNA inducido por la radiación ionizante, los contaminantes ambientales o la exposición mantenida a metales pesados ⁽⁸⁾.

La mayoría de los cánceres de mama se caracterizan por tratarse de tumores epiteliales, desarrollados a partir de poblaciones celulares presentes en los conductos o en los lobulillos mamarios. Con menor frecuencia pueden ser cánceres no epiteliales del estroma ^(8,9). El tipo tisular en el que surgen las

lesiones tumorales mamarias determina el posterior comportamiento neoplásico, así como la susceptibilidad del cáncer a las distintas terapias. En el estudio realizado por Cozzo *et al* 2018, se ha determinado que, tanto el crecimiento como la diseminación metastásica de los tumores en general, entre los que se incluyen las neoplasias mamarias, necesitan la correcta interacción entre las células cancerosas y los tejidos adyacentes. Debido a las características de la propia naturaleza del tejido adiposo, numerosos tipos de tumores sólidos se desarrollan en las proximidades de los adipocitos y de los componentes vasculares y estromales asociados al panículo adiposo, como son los fibroblastos, las células endoteliales, las células inmunes adaptativas y componentes de las rutas de señalización extracelular y de la matriz. También es de destacar que el tejido adiposo realiza funciones endocrinas, secretando numerosas hormonas como la leptina, las gonadotrofinas o la aromatasa, enzima de crucial relevancia en la patogénesis del cáncer de mama ya que se encarga de catalizar la biosíntesis de estrógenos, regulando la conversión de androstenediona en estrona y la testosterona en estradiol. La gran relevancia que tiene esta consecuencia de aumento de producción estrogénica se debe a que un alto porcentaje de los cánceres de mama son estrógeno-dependientes, por lo que la acción reguladora de la aromatasa y el consecuente aumento de la concentración de estrógenos en los tejidos mamarios resultaría perjudicial, perpetuando y facilitando la progresión de la patogénesis tumoral.

La aromatasa se localiza en el retículo endoplásmico de las células productoras de estrógenos, entre las que se incluyen las células de la granulosa ovárica, el sincitiotrofoblasto constituyente de la placenta, las células de Leyding testiculares, el cerebro, los fibroblastos de la piel y el tejido adiposo. Mientras los niveles más altos de aromatasa se localizan en las células de la granulosa ovárica durante la etapa fértil, el tejido adiposo constituye la principal fuente de producción de aromatasa tras la menopausia. Es por ello que el exceso de adiposidad presente en la población obesa se correlaciona con un aumento del riesgo de desarrollo de cánceres e influye negativamente en el pronóstico de los mismos. El exceso de tejido adiposo es capaz de modificar el microambiente tumoral, mediante la inducción de fibrosis y angiogénesis, incrementando la población de células madre y la expansión de células inmunes proinflamatorias. Esto desemboca en una mayor facilidad para el desarrollo tumoral mamario ⁽¹¹⁾.

El cáncer de mama puede comenzar a desarrollarse en tres partes diferenciadas, como son los conductos, los lóbulos productores de leche y los tejidos conectivos:

- Conductos mamarios: dan lugar al carcinoma ductal, siendo el tipo más común de cáncer de mama. Se desarrolla a partir del revestimiento de un conducto mamario, en el interior de la estructura glandular. Este tipo

tumoral puede permanecer confinado dentro de los conductos, comportándose como un cáncer no invasivo (ductal in situ) o, por el contrario, diseminarse fuera (carcinoma ductal invasivo).

- Lóbulos productores de leche: se origina en los lóbulos mamarios, pudiendo extenderse por fuera de ellos, siendo entonces un carcinoma lobular invasivo.
- Tejidos conectivos: de manera infrecuente, el tumor mamario puede originarse en el tejido conectivo, comportándose como un sarcoma. Ejemplos de estos tipos neoplásicos son el tumor filoides y el angiosarcoma ⁽¹³⁾.

Por tanto, podemos encontrarnos con tres tipos diferentes de cáncer de mama en función de su localización:

1. Carcinoma in situ, pudiendo subdividirse a su vez en carcinoma ductal in situ (CDIS) y carcinoma lobulillar in situ (CLIS).
2. Carcinoma invasor.
3. Cáncer de mama inflamatorio ^(8,9).

También debemos mencionar la enfermedad de Paget del pezón. Dicha patología consiste en la presencia de un carcinoma mamario ductal in situ que se extiende por el interior de la piel suprayacente al pezón y a la aréola mamaria, manifestándose clínicamente como una lesión cutánea, pudiendo ser de características eccematosas o psoriasiformes, entre otras posibilidades. En la superficie de la epidermis podemos encontrarnos con la presencia de células malignas denominadas células de Paget. Las personas afectas de esta enfermedad a menudo padecen un proceso neoplásico subyacente, ya sea un cáncer in situ o invasor.

El cáncer de mama se trata de un tumor que invade localmente los tejidos y que se disemina a través de los ganglios linfáticos regionales, la circulación sanguínea o ambos. Las metástasis de dicho cáncer pueden diseminarse hacia prácticamente cualquier parte del cuerpo, siendo los órganos más frecuentemente afectados los pulmones, el hígado, el cerebro, huesos y piel ⁽⁸⁾.

Los receptores hormonales presentes en algunos tipos de cáncer de mama actúan promoviendo la replicación nuclear del DNA y la división celular. Otros tipos de tumores mamarios presentan el receptor HER2, siendo un marcador de mal pronóstico ⁽⁸⁾. Podemos diferenciar cuatro grupos de tumores mamarios en función de la presencia o ausencia de los receptores que expresan:

- Grupo 1 o Luminal A: se trata de un grupo compuesto por tumores que son positivos tanto para el receptor de estrógenos ER como para el receptor de progesterona PR. Sin embargo, son negativos para el factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2). Los pacientes afectados de este tipo tumoral podrían ser beneficiarios de tratamientos hormonales junto a quimioterapia.
- Grupo 2 o Luminal B: incluye tumores ER positivos, PR negativos y HER-2 positivos. Los pacientes con este tipo de cáncer mamario pueden ser subsidiarios de quimioterapia combinada con tratamiento hormonal, así como con tratamiento dirigido específicamente contra HER-2.
- Grupo 3 o HER-2 positivo: está formado por tumores ER negativos, PR negativos, pero HER-2 positivos. Este grupo clínico tiene probabilidades de beneficiarse de modalidades terapéuticas que combinan quimioterapia con tratamiento dirigido frente a HER-2.
- Grupo 4 o tipo basal: se denomina cáncer de mama triple negativo e incluye tumores con los tres tipos de receptores negativos: ER, PR y HER-2. La línea de tratamiento que se emplea en estos casos es únicamente la quimioterapia ^(9,11).

2.2.2- Factores de riesgo de cáncer de mama.

Múltiples elementos son considerados en la actualidad como factores implicados en la aparición y desarrollo del cáncer de mama. Algunos de ellos son controlables, tales como el peso, el ejercicio físico o la toma de anticonceptivos orales, mientras que otros son no modificables, entre los que se encuentran los antecedentes familiares y personales o la edad ^(13,14,16,17).

Factores de riesgo modificables:

- Peso: el sobrepeso, en especial en mujeres postmenopáusicas, supone un incremento del riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia. El tejido graso es la principal fuente productora de estrógenos del cuerpo humano en el periodo postmenopáusico, por lo que se establece que, a mayor concentración de panículo adiposo, mayor producción estrogénica, pudiendo aumentar potencialmente el riesgo de padecer cáncer de mama.
- Dieta: al igual que en muchos otros tipos de tumores, también la dieta se ha relacionado con el padecimiento de neoplasias mamarias. A pesar de que aún no se ha concretado con exactitud qué alimentos serían los responsables de ello, diversos estudios recomiendan evitar las carnes rojas y procesadas, así como las grasas animales, ya que pueden contener en su composición elementos tales como hormonas, pesticidas

y factores de crecimiento que condicionarían una mayor facilidad para el desarrollo de cánceres de mama.

- Ejercicio físico: al practicar ejercicio físico, los niveles de grasas circulantes disminuirían o bien tendrían una reorganización más favorable que conseguiría reducir el riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria. La Sociedad Americana contra el Cáncer recomienda la práctica de ejercicio 5 días a la semana durante un total de 45-60 minutos por día.
- Consumo de alcohol: el alcohol puede afectar directamente a la función renal que interviene en la regulación del control de los niveles de estrógenos circulantes en sangre, lo que condicionaría un aumento del riesgo.
- Exposición a estrógenos: la exposición mantenida y prolongada a los estrógenos estimula el crecimiento de las células mamarias, conllevando a un mayor riesgo de desarrollo de cánceres de mama. Por ello, el uso de terapias hormonales sustitutivas ya sea mediante estrógenos solos o de manera combinada (estrógenos junto con progesterona) durante periodos superiores a 10 años podrían resultar en una elevación del riesgo a priori para desarrollar neoplasias mamarias ⁽¹⁵⁾.
- Uso de anticonceptivos orales: el uso de la contracepción hormonal femenina (AC) se inició a principios de los años 60 con los anticonceptivos orales de primera generación. El método más utilizado es el anticonceptivo oral (ACO) combinado, que contiene estrógenos y progestágenos. Otros tipos contienen solo progestágenos, que pueden ser orales (APO) o inyectables (API). Las dosis de esteroides sexuales se han reducido de manera importante en los últimos 40 años. Previamente a la década de los 90, el componente estrogénico consistía en una combinación sinérgica de etinilestradiol con mestranol. Actualmente, etinilestradiol es utilizado en todas las preparaciones modernas, conteniendo de 15 a 35 µg o menos de estrógenos ⁽¹⁴⁾. Diversos estudios han observado un aumento del riesgo de desarrollo de cáncer de mama en mujeres que han tomado anticonceptivos orales durante periodos superiores a 5 años y que han empezado con su uso a edades tempranas (antes de los 20 años). Además, se ha demostrado que la magnitud del incremento de riesgo es similar entre las distintas generaciones de anticonceptivos orales ⁽¹⁵⁾. Así mismo, mujeres portadoras de mutaciones en los genes breast cancer 1 (BRCA1) o breast cancer 2 (BRCA2), junto con mujeres con historia familiar de cáncer de mama u ovario presentan una mayor susceptibilidad de riesgo inducido por el uso continuado de anticonceptivos orales ^(15,17).

Factores de riesgo no modificables:

- Sexo: el sexo femenino es el principal factor de riesgo no modificable relacionado con el desarrollo de las neoplasias mamarias. Si bien es sabido que los hombres pueden padecer este tipo de tumores, las células mamarias femeninas están en permanente cambio y crecimiento, fundamentalmente debido a las acciones hormonales derivadas de los estrógenos y la progesterona. Esto se traduce en una elevación notoria del riesgo de desarrollo de cáncer de mama.
- Edad: el envejecimiento constituye el segundo factor de riesgo más relevante. Durante la tercera década de la vida, el riesgo asociado con este tipo tumoral se sitúa en torno al 0,44% (1 de cada 227 mujeres). En edades cercanas a los 60 años se produce una elevación significativa del riesgo, situándose alrededor del 4% (1 de cada 28 mujeres).
- Antecedentes familiares de cáncer de mama: se ha observado una asociación existente entre tener familiares de línea directa (madres, hijas, hermanas) afectadas de cáncer de mama u ovario con un riesgo incrementado de desarrollar esta enfermedad neoplásica.
- Antecedentes personales de cáncer de mama: hay un riesgo significativamente mayor de reaparición de cáncer de mama, ya sea en la misma glándula mamaria o en la contralateral, en comparación con aquellas mujeres que no han tenido cáncer previamente ^(13,16).
- Raza: se ha constatado que las mujeres de raza blanca están más predispuestas genéticamente para el desarrollo de cáncer de mama respecto a las mujeres afroamericanas, asiáticas y nativas norteamericanas.
- Terapia de radiación en el tórax: diversos estudios han descrito una relación directa entre la terapia de radiación torácica en edades tempranas como tratamiento de otras neoplasias y el aumento significativo del riesgo de padecer tumor mamario.
- Alteraciones de las células mamarias: estas pueden ser desde la proliferación celular (hiperplasia) hasta la presencia de células atípicas demostrada a través de la biopsia del tejido sospechoso de malignidad ⁽¹⁶⁾.
- Exposición a los estrógenos: la menstruación precoz (antes de los 12 años), la menopausia tardía (posterior a los 55 años) o la exposición estrogénica en el ambiente son factores que se han relacionado comúnmente con el incremento del riesgo de cáncer de mama.
- Embarazo y lactancia: el embarazo, al constituir un periodo del cese de los ciclos ovulatorios junto con la lactancia parecen reducir el riesgo potencial de desarrollo de cáncer mamario.

- Exposición al dietilestilbestrol (DES): este fármaco, empleado durante el periodo comprendido entre 1940 y 1960 con el objetivo de evitar abortos espontáneos, se ha comprobado que condiciona una elevación del riesgo de padecer neoplasias mamarias ^(13,17).

2.2.3- Programas de cribado del cáncer de mama.

Debido a la alta incidencia y prevalencia que tiene esta enfermedad neoplásica, existen programas destinados a su detección precoz, empleando para ello diferentes métodos diagnósticos muy sensibles que tratan de diagnosticar al mayor número posible de personas con dicha patología tumoral.

El cribado del cáncer de mama en España posee un nivel de evidencia I y un grado de recomendación A (Nivel de evidencia I: Al menos un ensayo clínico controlado y aleatorizado diseñado de forma apropiada. Grado de recomendación A: Extremadamente recomendable. Buena evidencia de que la medida es eficaz y los beneficios superan ampliamente a los perjuicios.) En nuestro país, a todas las mujeres que tienen edades comprendidas entre los 50 y los 69 años se les invita a participar en este tipo de programas, realizándose una mamografía bilateral en dos proyecciones bianualmente ^(9,18).

Las modalidades de cribado incluyen:

- Mamografía (incluyendo digital y tridimensional).
- Examen clínico mamario (ECM) por profesionales de la salud.
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en pacientes de alto riesgo.
- Autoexamen mamario (AEM) mensual ⁽⁹⁾.

2.2.4- Factores que condicionan mal pronóstico en el cáncer de mama.

Es sabido que el pronóstico del cáncer de mama está condicionado por la presencia de una serie de factores que se asocian con un mayor grado de agresividad tumoral y con la peor respuesta a los tratamientos disponibles, resultando en un pronóstico desfavorable de esta enfermedad. Los factores más conocidos son los siguientes:

- Juventud: aquellos pacientes diagnosticados de cáncer de mama en edades comprendidas entre los 20 y los 30 años suelen tener un peor pronóstico de dicha enfermedad.

- Tumor primario grande: los tumores de mayores dimensiones tienen probabilidades incrementadas de cursar con afectación ganglionar. Así mismo, el mayor tamaño tumoral se asocia con el peor pronóstico de las neoplasias, independientemente del estado de los ganglios.
- Tumor de alto grado: los pacientes afectados de tumores mamarios pobremente diferenciados suelen tener peor pronóstico por comportarse la enfermedad de manera más agresiva.
- Ausencia de receptores de estrógenos y progesterona: diversos estudios han documentado la posibilidad de que aquellos tumores con receptores hormonales negativos se relacionen con un pronóstico más desfavorable de la enfermedad. Además, las neoplasias ausentes de receptores estrogénicos no se beneficiarían de la hormonoterapia, limitando así las posibilidades terapéuticas.
- Sobreexpresión de la proteína HER-2: dicha proteína favorece el crecimiento y la proliferación tumoral, condicionando la presencia de células tumorales con mayor potencial de agresividad.
- Presencia de genes BRCA: los pacientes que expresan genes BRCA1 y BRCA2 parecen relacionarse con un peor pronóstico tumoral en comparación con aquellos pacientes que no expresan dichos genes. No obstante, la presencia de genes BRCA2 parece estar relacionada con un grado de agresividad tumoral ligeramente inferior en comparación con la expresión de genes BRCA1 ⁽⁹⁾.

3.- OBJETIVOS.

Con la realización de esta revisión bibliográfica se trata de documentar la importancia que tiene en la patogenia y desarrollo del cáncer en general y en las neoplasias mamarias en particular, los procesos angiogénicos que condicionan la creación de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos tumorales. Se intenta establecer la relación existente entre diferentes moléculas, como la melatonina o los mi-ARN con los procesos de neovascularización y su empleo como terapias anti-angiogénicas en el cáncer de mama.

4.- METODOLOGÍA.

Se llevó a cabo una búsqueda electrónica de revisiones publicadas en revistas científicas de importancia médica, así como de artículos en la base de datos Medline. Como palabras clave se utilizaron: “angiogénesis” AND “breast cancer” AND/OR “anti-angiogenic therapies” AND/OR “VEGF” AND/OR “melatonin” AND “Bevacizumab” AND/OR “andrographolid”. La búsqueda fue acotada limitando el tipo de artículo a: Clinical Trial, Guideline, Meta-Analysis y Systematic Reviews.

Se examinó su relevancia científica contando con el asesoramiento de una experta en la materia.

5.- ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA.

5.1- PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN LOS PROCESOS NEOPLÁSICOS.

Los vasos sanguíneos son un componente fundamental del estroma tumoral ⁽¹⁾. Es por ello que la angiogénesis se considera un factor predictor del pronóstico en numerosos procesos cancerosos, así como un paso necesario para mantener la homeostasia en los tejidos ^(1,2,3). Sin un soporte vascular adecuado, los tejidos tumorales presentan una capacidad muy restringida para crecer ^(1,3). Debido a ello, se asume que existe una relación lineal entre el número y la densidad de los vasos sanguíneos con el grado de invasión metastásica tumoral, el tipo histológico y, por ende, con el grado de malignización tumoral.

Dentro de los procesos tumorales, en relación con la neovascularización podemos hablar de dos fases: la fase prevascular y la fase angiogénica. La primera fase comprende las lesiones asintomáticas y clínicamente indetectables en las cuales la formación de vasos sanguíneos es escasa. Se caracteriza por micrometástasis, ya que los fenómenos de división celular y de apoptosis son capaces de permanecer en equilibrio. En la segunda fase, por el contrario, el tumor adquiere su fenotipo angiogénico por lo que aumenta considerablemente su grado de malignidad y su capacidad metastásica ⁽¹⁾

5.1.1-Importancia de VEGF en la patogénesis neoplásica.

El agente angiogénico más importante en los tejidos neoplásicos es VEGF ^(2,3). VEGF actúa uniéndose a su receptor VEGFR-2 ⁽³⁾. Niveles elevados de dicho receptor están presentes en las células endoteliales de tejidos tumorales, así como en el estroma adyacente e inducen los fenómenos de neovascularización ^(2,3).

Diversos estudios han demostrado la presencia de VEGF en la mayor parte de las diferentes neoplasias humanas. Se ha podido concluir además que el aumento de su expresión se correlaciona con un pronóstico más desfavorable ⁽³⁾.

Numerosos factores pueden inducir la expresión de esta molécula, tales como un pH bajo, determinadas citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, hormonas sexuales y quimiocinas ^(2,3). Otras causas implicadas en la sobreexpresión de VEGF pueden ser la inducción de diferentes cambios en la

configuración genética molecular como la activación de diferentes oncogenes o la pérdida o inactivación de una gran variedad de genes supresores de tumores ⁽³⁾. La unión de VEGF a su receptor VEGF-2 estimula la activación de diversas proteínas que transmiten una señal al interior del núcleo de las células endoteliales, dando como resultado la liberación de genes implicados en la proliferación y migración de las células endoteliales a la vez que promueve la supervivencia y permeabilidad vascular ^(2,3). Un ejemplo representativo de esto consiste en la unión de VEGF a su receptor VEGFR-2 que desencadena la dimerización del receptor y acto seguido la activación intracelular de la vía PLCγ-Raf quinasa- MEK- proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y el posterior comienzo de los procesos de síntesis de ADN y proliferación celular. Por su parte, la activación de la vía de fosfatidilinositol 3' - quinasa – Akt promueve el aumento de la supervivencia célula endotelial ⁽³⁾.

Mención especial merece la hipoxia, la cual a través de su receptor HIF-α es capaz de inducir la expresión de VEGF y de FGF de manera notoria, por lo que es considerada como uno de los estimuladores de la respuesta angiogénica de mayor relevancia en una gran variedad de tipos tumorales. La mayor parte de los cánceres humanos expresan seis o más proteínas angiogénicas distintas. Es por ello que varios estudios en fase preclínica han conseguido demostrar que la supresión prolongada de una única vía proangiogénica (por ejemplo, VEGF) puede conducir a un aumento de la expresión proteica de otras proteínas estimuladoras de la angiogénesis como FGF. Este fenómeno se conoce como 'escape tumoral', para diferenciarlo de los procesos de resistencia adquirida a la quimioterapia citotóxica.

Las células tumorales son capaces de nutrirse a partir de los nuevos vasos sanguíneos formados en los tejidos neoplásicos al tener una producción elevada de VEGF y posteriormente secretarlo al tejido circundante. Cuando las células tumorales se encuentran con las células endoteliales, las primeras se unen a los receptores que las células endoteliales presentan en su superficie externa. La unión de VEGF a su receptor desencadena la activación de proteínas de transmisión que difunden una señal hacia el interior del núcleo de las células endoteliales. Esta señal nuclear estimula la producción de diferentes productos necesarios para perpetuar el crecimiento de las células endoteliales por un grupo de genes presentes en el interior del núcleo celular. ⁽²⁾

Las células endoteliales una vez activadas por VEGF tienen la capacidad de producir metaloproteinasas de matriz que actúan rompiendo la matriz extracelular. Gracias a ello, las células endoteliales pueden migrar y empezar a dividirse. Poco a poco van organizándose para terminar formando tubos huecos que se convierten en una red de vasos sanguíneos. Los nuevos vasos formados de esta manera necesitan estabilizarse o madurar, para lo que requieren la ayuda de la Angiopoyetina-1 (que actúa como agonista), Angiopoyetina-2 (que

actúa como antagonista) y su receptor Tie-2 ⁽²⁾. Ang-1 es una molécula que actúa como un factor anti-permeabilidad, protegiendo contra la fuga excesiva de plasma en los tejidos dañados, contribuyendo a la estabilización de los vasos sanguíneos preexistentes además de favorecer la maduración de los vasos recién formados mediante el reclutamiento de pericitos y de componentes moleculares del Sistema Mononuclear Fagocítico. Por el contrario, Ang-2 podría intervenir en los mecanismos implicados en la angiogénesis, ya que se ha comprobado que esta molécula tiene la capacidad de bloquear al receptor Tie-2, promoviendo la creación de nuevos vasos sanguíneos en presencia de VEGF. Debido a ello, Ang-2 es expresada preferentemente en aquellos tejidos donde la remodelación angiogénica y vascular es necesaria, permitiendo la diseminación, migración y desarrollo de las células endoteliales, facilitando los mecanismos de crecimiento y proliferación tumoral ^(2,3,18).

La unión de VEGF-C a su receptor VEGFR-3 actúa mediando la limfangiogénesis ^(2,3), mientras que VEGF165 es capaz de unirse a los receptores de neuropilina, los cuales pueden funcionar como correceptores junto con VEGFR-2 interviniendo en la regulación de la angiogénesis ^(2,3).

Otra vía recientemente descubierta relacionada con la angiogénesis es la formada por el ligando Notch-deltalike. Se ha visto que los receptores de esta ruta de señalización se expresan en varios tipos celulares implicados en la diferenciación y proliferación, por lo que son esenciales para el desarrollo vascular de los tejidos. La angiogénesis estimulada por VEGF promueve la regulación del ligando Notch-deltalike en las células endoteliales de los vasos sanguíneos en desarrollo, en particular el Dll4. Esto conlleva a que Dll4 funcione a través de un mecanismo de feedback negativo, previniendo un exceso de angiogénesis crónica ⁽³⁾.

Otro mecanismo que es capaz de inhibir la angiogénesis es la vasohibina, una proteína presente en las células endoteliales activadas que se libera en presencia de estimuladores de la neovascularización tales como VEGF. Es por ello que, la vasohibina, es considerada como un factor responsable de la regulación de varios factores endógenos implicados en la inhibición de los procesos angiogénicos, como la angiostatina, la endostatina, la trombospondina-1 o la tumstatina ^(2,3).

Finalmente, debemos mencionar la relación existente entre los procesos angiogénicos y las células circulantes derivadas de la médula ósea. Muchos tipos celulares diferentes tienen la capacidad de desplazarse desde la médula ósea y constituir sitios en los que se lleve a cabo la formación de nuevos vasos sanguíneos, en los que se amplifique y mantengan los fenómenos responsables del proceso angiogénico. Dentro de estos tipos celulares se incluyen diversas poblaciones de células hematopoyéticas (CD45+), muchas de las cuales pueden ser bien monocitos o células mieloides que expresan marcadores característicos

de las células endoteliales, como la cadherina vascular endotelial (VE-cadherina), receptores de VEGF como son VEGFR-1 y VEGFR-2 y tie-2.

Además, se ha observado la existencia de una población celular procedente de la médula ósea no hematopoyética (CD45-) formada por las células progenitoras endoteliales circulantes, que realizan sus funciones mediante mecanismos paracrinós, tales como la secreción local de VEGF. Diferentes estudios han postulado la probabilidad de que dichos progenitores endoteliales se fusionen con la pared del vaso sanguíneo recién formado en crecimiento, donde se diferenciarían en células endoteliales maduras. La contribución de los progenitores endoteliales circulantes desempeñaría un papel crucial en los estadios iniciales del desarrollo tumoral. No obstante, esta población celular iría disminuyendo progresivamente a medida que los progenitores endoteliales van siendo sustituidos por células endoteliales maduras. El escaso número de células progenitoras endoteliales en los vasos sanguíneos de reciente formación podría tener una repercusión importante sobre los procesos de promoción del crecimiento tumoral, tales como la progresión de las lesiones metastásicas microscópicas hacia lesiones macroscópicas.

Los neutrófilos y los macrófagos también pueden contribuir activamente a los procesos angiogénicos, ya que tienen propiedades estimuladoras de la creación vascular sanguínea (*Figura 4*). En estudios preclínicos recientemente publicados, se ha visto que los neutrófilos podrían contribuir a los procesos de inducción angiogénica tumorales ⁽³⁾.

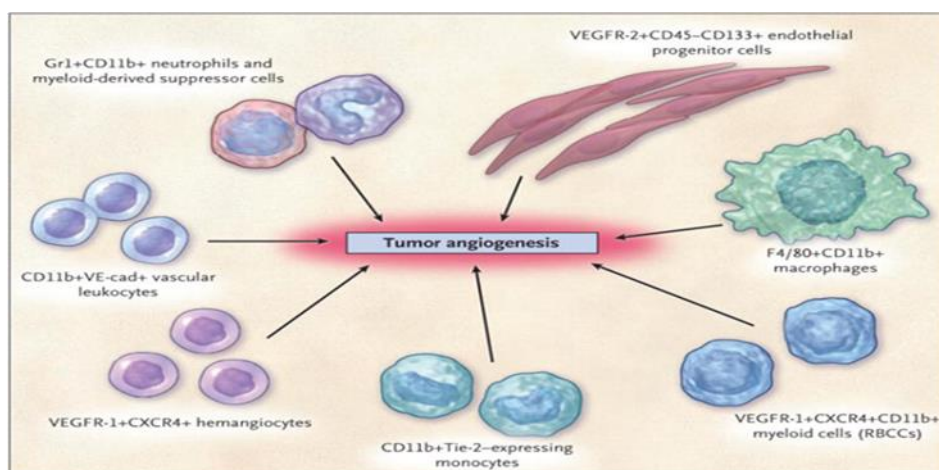


Figura 4.- Esquema representativo del conjunto de células circulantes derivadas de la médula ósea. Tomada de Tumor Angiogenesis. New England Journal of Medicine. August 2015 ⁽³⁾.

5.1.2- Angiogénesis en el pronóstico del cáncer.

Se ha demostrado a través de diversos estudios que los factores estimuladores de la angiogénesis están implicados de manera importante en el crecimiento y diseminación de tumores ^(1,2,3). Se ha descrito una correlación lineal significativa entre la expresión de VEGF y el pronóstico desfavorable en tumores colorrectales, mamarios, faríngeos y mesoteliomas. Estos hallazgos nos orientan a que los niveles elevados de moléculas angiogénicas son un reflejo del grado de agresividad y de la capacidad de diseminación e invasión de tales tipos tumorales ^(1,2). La cuantificación de la angiogénesis nos permitiría predecir el riesgo de diseminación, el riesgo de recurrencia tumoral, la involución de las lesiones y la diferenciación de procesos neoformativos de diversa índole ⁽¹⁾, lo que se traduciría en el reconocimiento de pacientes de alto riesgo y mal pronóstico ⁽²⁾.

5.2 ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE MAMA.

Al igual que en la gran mayoría de neoplasias, la angiogénesis ha demostrado ser un proceso necesario y fundamental en la progresión del cáncer de mama. Por ello, terapias actuales para tratar este tipo de tumores se basan en bloquear VEGF y por tanto su acción pro-angiogénica para así evitar la progresión de la enfermedad. ^(20,21).

Diversos estudios clínicos realizados sobre una muestra de pacientes afectados de cáncer de mama en estadios precoces demostraron que la expresión de niveles elevados de VEGF se podía asociar con una supervivencia libre de enfermedad más corta, tanto en el grupo de pacientes con afectación neoplásica linfática como en el grupo sin ella. Además, la presencia del factor HER-2 en las neoplasias mamarias induce la sobreexpresión de VEGF, sugiriendo con ello que la inducción de los fenómenos angiogénicos que tienen lugar en este tipo de tumores podría contribuir a su letalidad ^(9,20,21).

Tal y como se recoge en el diagrama inferior (*figura 5*), hay diversas moléculas implicadas en la secreción paracrina de VEGF. Angiopoyetina-1 uniéndose con su receptor Tie-2 son los responsables de estabilizar los nuevos vasos sanguíneos formados. Recientemente se ha descrito la presencia del receptor Tie-2 en los tejidos mamarios tumorales, demostrándose así el papel crucial que juega esta molécula en el desarrollo y progresión de dicha neoplasia ^(3,20).

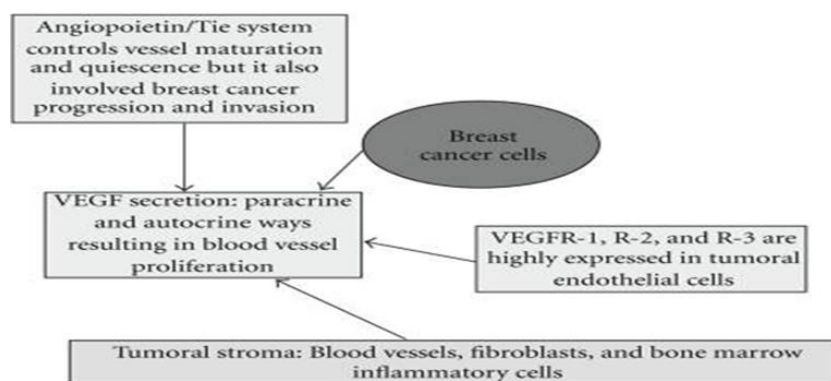


Figura 5.- Representación esquemática de los factores moleculares que intervienen en la secreción paracrina y autocrina de VEGF en los tejidos mamarios tumorales. Tomada de Angiogenesis and Breast Cancer. Journal of Oncology. September 2010 ⁽²⁰⁾.

Los hallazgos encontrados en nuevas líneas de investigación indican que la diseminación de los tumores sólidos a través de los nuevos vasos sanguíneos, y en especial en el cáncer de mama, podría estar regulado además de por VEGFR-2, por un receptor implicado en la limfangiogénesis, VEGFC-3. La sobreexpresión de ambos receptores está presente tanto en los conductos sanguíneos de los tejidos tumorales mamarios como en los linfáticos ⁽²⁰⁾.

A pesar de que la expresión de VEGF en las estructuras glandulares mamarias normales es significativamente menor que en las tumorales, no se ha podido demostrar una clara evidencia de que la expresión de VEGF tenga una correlación con la densidad microvascular encontrada en los tejidos neoplásicos ^(20,21,22). No obstante, en el carcinoma invasivo ductal la expresión de VEGF y de su mRNA se encuentra significativamente aumentada con respecto a los niveles presentes en el carcinoma invasivo lobular ^(20,22,23).

Esto se trata de un hallazgo relevante, descubierto gracias al estudio realizado por Vicava *et al* 2004, que investigó la relación existente entre la expresión de VEGF y la vascularización del carcinoma lobular invasivo (n=10), frente al carcinoma ductal invasivo (n=28) y el carcinoma ductal puro in situ (n=33). La expresión de los niveles de VEGF se estudió mediante técnica de inmunohistoquímica y la del ARNm de VEGF mediante hibridación in situ. Para cuantificar la densidad vascular presente en los tejidos tumorales mamarios, se evaluaron las secciones teñidas con el factor de Von Willebrand. Los resultados obtenidos concluyeron que se obtuvieron tanto niveles superiores de la expresión proteica de VEGF, como de su ARNm en el carcinoma ductal invasivo en comparación con el carcinoma lobular invasivo, siendo ambos hallazgos estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Por su parte, tanto VEGF (coeficiente de correlación lineal = 0.32, $p < 0,05$) como su ARNm (coeficiente de correlación lineal 0.56, $p < 0,05$) se correlacionaron con la densidad vascular en el carcinoma

ductal invasivo. Sin embargo, a pesar de que, en el carcinoma lobular invasivo, la densidad vascular no se pudo correlacionar con el ARNm de VEGF (coeficiente de correlación 0.15, $p > 0,05$), se encontró una relación inversa entre la densidad vascular y VEGF en este tipo tumoral (coeficiente de correlación -0.57, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad vascular entre los dos tipos de carcinoma invasivo, lo que sugiere que VEGF es una molécula clave para el desarrollo de los procesos de angiogénesis en el carcinoma ductal invasivo, pero que son necesarios otros factores angiogénicos que actúen potenciando estos mecanismos en el carcinoma lobular invasivo. Aunque la proteína VEGF se expresaba con frecuencia en el carcinoma ductal in situ, no se encontró relación entre VEGF y los dos patrones de angiogénesis descritos anteriormente en este tipo tumoral (20,22).

La activación de las células estromales caracteriza muchas enfermedades malignas, entre las que se incluyen los cánceres de mama. Se han descrito relaciones entre la angiogénesis y los niveles hormonales en este tipo de neoplasias. En el estudio realizado por *Pinto et al 2010*, se procedió a aislar en ratones una línea celular del estroma glandular mamario reactivo llamada BJ3Z. Esta línea celular se caracteriza por tener aumentada la expresión de actina del músculo liso junto con el factor-1 derivado de las células estromales, desempeñando acciones favorecedoras del desarrollo tumoral. *In vivo* se vio que las células BJ3Z actuaban facilitando la angiogénesis y la proliferación neoplásica en los tumores sólidos mamarios que presentaban receptores estrogénicos positivos ER. Además, se demostró que los efectores promotores del crecimiento de las células BJ3Z eran equivalentes a los producidos por el estradiol, aumentando también el desarrollo de células luminales mamarias adyacentes a los tejidos tumorales. En contraposición a estos hallazgos, se pudo concluir a través de los resultados obtenidos, que las células BJ3Z no alteraban el crecimiento celular en los cánceres mamarios carentes de receptores estrogénicos (ER negativos). Otro punto crucial en el que interviene esta línea celular es en la secreción de VEGF en las neoplasias mamarias, actuando en el estroma tumoral a través de la estimulación de las células epiteliales malignas con receptores ER, lo que se correlaciona con mayor grado de malignidad. Además, las mutaciones del gen BRCA-1 a través de su interacción con ER- α favorecerían el proceso de carcinogénesis a través de la regulación hormonal de las células epiteliales mamarias, lo que repercutiría directamente en la regulación funcional de VEGF, que daría como resultado el crecimiento anormal y la angiogénesis tumoral (20,24,25).

Como ya se ha comentado previamente, los nuevos vasos formados en los procesos neoplásicos en general, y en cáncer de mama en particular, son frágiles

e inestables por lo que necesitan determinadas moléculas para su estabilización y para evitar el colapso y la destrucción ⁽²⁾. Actualmente se considera que la presencia de vasos sanguíneos de microdensidad y marcadores linfáticos detectados en sangre son factores que condicionan pronóstico desfavorable en la supervivencia a largo plazo del cáncer de mama ^(20,26).

Cuando se realiza el estudio de las lesiones tumorales en las neoplasias mamarias, puede observarse que en los estados preinvasivos los procesos de angiogénesis están presentes incluso antes que cualquier alteración significativa en el microambiente histológico. La combinación fenotípica característica formada por la sobreexpresión de VEGF en las células epiteliales cancerosas mamarias junto con la disminución de los niveles de actina-CD34 en las células estromales es el patrón más frecuentemente encontrado en el carcinoma ductal in situ (CDIS) de intermedio y alto grado. Se postula que tales hallazgos podrían ayudar a predecir la progresión de las lesiones localizadas hacia carcinomas invasivos, así como ser útiles para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el empleo simultáneo de factores anti-angiogénicos combinados con factores que selectivamente destruyen componentes del estroma tumoral ^(20, 27).

Otra molécula que se ha visto implicada en la angiogénesis del cáncer mamario es la endotelina ET-1. Investigaciones han demostrado que se encuentra significativamente sobreexpresada en este tipo de tumores, por lo que desempeñaría un papel primordial en la regulación de la neovascularización de las neoplasias de mama. ET-1 actúa uniéndose a sus receptores ETAR y ETBR incrementando como consecuencia directa la actividad de VEGF y por ello favoreciendo la creación de una red vascular patológica en los tejidos ^(3,20,28).

Bajo determinadas circunstancias los macrófagos también podrían afectar al microambiente tumoral facilitando la expresión y por tanto la actividad de VEGF y consiguiendo con ello la progresión de la red microvascular en los tejidos mamarios tumorales ^(3,20,29). Los niveles elevados de macrófagos guardan una relación directa con el índice mitótico en el carcinoma mamario ductal. Esto, en asociación con niveles elevados de VEGF actuaría sinérgicamente favoreciendo la angiogénesis y por tanto la progresión neoplásica ^(20,27). No obstante, tal correlación no se ha conseguido demostrar en el carcinoma mamario lobular ⁽²⁰⁾.

Como se explicaba al comienzo del apartado, dentro de las moléculas que intervienen en la regulación de la angiogénesis estimulando de forma paracrina la liberación de VEGF en los procesos tumorales es la Angiopoyetina-1 y su receptor Tie-2 ^(3,20). Angiopoyetina-2 también se encuentra fuertemente relacionada con la expresión de VEGF en el carcinoma mamario, ya que se ha descrito la presencia de gran cantidad de vasos sanguíneos neoformados en los tejidos tumorales que expresan altos niveles de VEGF y de Angiopoyetina-2.

Por último, se ha documentado una nueva función del receptor Tie-2 en el desarrollo del cáncer de mama interviniendo en la invasión metastática a hueso a través de su papel en la osteoclastogénesis ^(3,20,30). Las metástasis óseas son un fenómeno bastante frecuente en la mayor parte de los pacientes que padecen de cáncer de mama en estadios avanzados. A menudo, dichas metástasis son incurables, asociándose a destrucción ósea y a altas tasas de mortalidad. Se ha visto que el receptor tirosina quinasa Tie-2 presenta un aumento de su expresión en los tejidos neoplásicos mamarios humanos, interviniendo en la regulación de la angiogénesis tumoral. Los osteoclastos derivan de las células progenitoras hematopoyéticas y Tie-2 está presente en dichas células, siendo importante en la hematopoyesis y en la osteoclastogénesis. Los osteoclastos expresan receptores endoteliales específicos, entre los que se encuentran VEGFR y Tie-2, por lo que ambos receptores son cruciales en los procesos de osteoclastogénesis y mantenimiento de las funciones medulares óseas. La neutralización de Tie-2 en los tejidos neoplásicos mamarios actuaría sobre el microambiente tumoral mediante la inhibición de los procesos de angiogénesis, inflamación y metástasis ósea osteolítica, siendo una nueva estrategia terapéutica y consiguiendo, de este modo, frenar la progresión del cáncer de mama mediante la reducción de la formación ósea y de nuevos vasos sanguíneos ⁽³⁰⁾.

5.3.- ROL DE LA MELATONINA EN LA REGULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL CÁNCER DE MAMA.

La melatonina es una hormona sintetizada en la glándula pineal, cuya liberación se ve favorecida en situaciones de ausencia de luz. En condiciones normales se secreta durante la noche ^(30,31). Inicialmente, la presencia de esta indolamina se relacionó con los tumores mamarios malignos endocrino-dependientes ⁽³⁰⁾.

5.3.1- Mecanismos generales de acción de la melatonina.

La melatonina realiza sus acciones sobre el cuerpo humano actuando a través de diferentes rutas moleculares. La principal vía de actuación de esta hormona es mediante la activación de dos tipos de receptores específicos de membrana: receptor de alta afinidad ML1 y receptor de baja afinidad ML2 o también llamado MT3.

Cuando la melatonina se une a los receptores ML1, los cuales son receptores acoplados a proteínas G, se produce la inhibición de la adenilato ciclasa en las células diana. Por su parte, la unión de melatonina a los receptores ML2 condiciona la hidrólisis de los fosfoinosítidos. Este segundo tipo de receptores

se ha visto que se encuentra expresado en numerosas áreas del córtex cerebral. Respecto al receptor ML1 se puede dividir a su vez en dos subtipos diferentes: Mel 1a y Mel 1b. Mel 1a se localiza en el cromosoma humano 4 y está compuesto por 351 aminoácidos. Se encuentra ampliamente distribuido en una gran variedad de estructuras cerebrales, tales como la pars tuberalis de la hipófisis anterior, el córtex cerebral, el tálamo, la sustancia negra, el núcleo accumbens, la amígdala, el hipocampo, el cerebelo, la córnea, la retina o el hipotálamo, lugar de suma relevancia ya que es el punto anatómico de regulación del ritmo circadiano. Mel 1b se localiza en el cromosoma humano 11 y está compuesto por 363 aminoácidos. A diferencia del anterior, tiene una distribución más acotada, encontrándose fundamentalmente en la retina y de menor medida en el hipocampo, córtex cerebral, núcleo periventricular y cerebelo.

De igual manera, la melatonina también interviene a nivel intracelular uniéndose a la calmodulina citosólica y a dos receptores de la familia de los retinoides nucleares.

Como previamente hemos explicado, los receptores de la melatonina están presentes a nivel central. Sin embargo, también se encuentran a nivel de los tejidos periféricos, como pueden ser el corazón y las arterias, la glándula adrenal, los riñones, hígado, vesícula biliar, adipocitos, ovarios, útero, mama, próstata y piel. Incluso se han detectado receptores de melatonina localizados en los linfocitos T y B ⁽³¹⁾.

5.3.2- Acciones generales de la melatonina.

Una de las acciones que desempeña esta indolamina es actuar sobre la regulación de los ritmos circadianos, tales como los ciclos de sueño-vigilia humanos, los ritmos neuroendocrinos o los ciclos de variación de la temperatura corporal a lo largo del día mediante su unión a los receptores MT1 y MT2. Cuando se produce una disregulación de los ritmos circadianos, tanto el comportamiento como el estado de ánimo, el desarrollo corporal, las funciones intelectuales e incluso la estatura se ven alterados de manera importante. Es por ello que se concluye, después de haber realizado diversos estudios *in vivo* en modelos animales, que el mantenimiento adecuado de los ritmos circadianos es fundamental para el correcto neurodesarrollo y que su ausencia o alteración es capaz de suprimir la neurogénesis.

La melatonina ejerce acciones paracrinas y autocrinas, regulando la correcta formación placentaria, desempeñando un papel en la reproducción humana. La melatonina actúa sobre el desarrollo fetal, interviniendo de manera directa en la formación adecuada de la estructura placentaria, el desarrollo glial y neuronal,

desempeñando también acciones ontogénicas en el establecimiento de los ritmos diurnos y en la sincronización del reloj biológico fetal ^(30,31).

5.3.3- Acciones de la melatonina en la patogenia del cáncer de mama.

La melatonina es considerada como una de las moléculas pertenecientes al grupo de factores reguladores que se encargan del control del ciclo proliferativo y la pérdida celular, siendo el único regulador cronobiótico y hormonal conocido del crecimiento celular tumoral. Cuando los niveles circulantes de melatonina se encuentran en rango fisiológico, dicha indolamina desempeña acciones citostáticas *in vitro* inhibiendo los procesos de proliferación celular neoplásica ejerciendo sus acciones específicamente sobre el ciclo celular. Cuando sus concentraciones están en rango farmacológico, la melatonina adquiere propiedades citotóxicas deteniendo la actividad proliferativa de las poblaciones celulares neoplásicas. Tanto si se encuentra en rango fisiológico como en farmacológico, esta hormona actúa como agente diferenciador en determinados tumores, disminuyendo su invasividad y su capacidad metastásica, a través de la alteración de las moléculas de adhesión y el mantenimiento de las uniones intracelulares tipo gap presentes en los tejidos cancerosos. A su vez, en otro tipo de neoplasias, la melatonina, bien actuando de manera aislada o en combinación con otros agentes, es capaz de inducir los fenómenos de apoptosis celular ⁽³¹⁾.

Actualmente se sabe que la melatonina es un importante agente oncostático capaz de interactuar con numerosos procesos neoplásicos, en especial con los tumores mamarios cuyo crecimiento depende de los estrógenos, reduciendo su proliferación y desarrollo ^(32,33,34). La hipótesis inicialmente formulada por *Cohen et al 1978* introdujo la idea de que una menor función de la glándula pineal suponía la reducción de los niveles existentes de melatonina, lo que resultaría en un estado relativo de hiperestrogenismo, que predispondría al desarrollo posterior del cáncer de mama.

Los efectos oncostáticos de la melatonina en aquellos tumores dependientes de hormonas, como es el caso de las neoplasias mamarias, se explican a través de la interacción de forma indirecta con los mecanismos neuroendocrinos reguladores, como es el bloqueo del eje neuroendocrino reproductivo y la consiguiente reducción de los niveles de estrógenos, los cuales serían los responsables del crecimiento anormal de la glándula mamaria. La realización previa de diversos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han concluido que esta hormona desempeña un papel clave en las rutas de señalización estrogénica actuando a tres niveles: disminuyendo los niveles plasmáticos de estrógenos que son sintetizados en las gónadas a través de su interacción con el eje reproductivo de la hipófisis, interrumpiendo la activación de los receptores de estradiol comportándose como un modulador selectivo de los receptores de

estrógenos y actuando como un modulador selectivo de enzimas estrogénicas por medio de la regulación de enzimas implicadas en la síntesis de estrógenos a nivel de otros tejidos ⁽³²⁾.

La melatonina, a través del control de citoquinas implicadas en el metabolismo tumoral, reduce la biosíntesis de estrógenos, fibroblastos y células endoteliales peritumorales en las neoplasias de mama ⁽³⁴⁾. Otro de los papeles que desempeña está en relación con su unión a receptores como MT-1 y MT-2, a receptores intranucleares o promoviendo la estimulación de la calmodulina. Todo ello le permite actuar sobre el metabolismo, microambiente y expresión genética tumoral, obteniendo como resultado final la detención del crecimiento y la angiogénesis en las neoplasias, así como la inhibición de la invasión metastásica ⁽³²⁾.

5.3.4.1- ¿Cómo regula la melatonina la síntesis local de estrógenos en el cáncer de mama?

En el cáncer de mama en general y particularmente en aquel que afecta a las mujeres postmenopáusicas, los estrógenos se sintetizan en los tejidos neoplásicos como resultado de la transformación a partir de los precursores androgénicos derivados de las glándulas suprarrenales o bien a partir de estrógenos biológicamente inactivos (*Figura 6*). En las neoplasias mamarias hay una sobreproducción estrogénica debido a que las células epiteliales cancerosas contienen todos los elementos enzimáticos necesarios para su síntesis ⁽³²⁾. Una de las rutas cruciales relacionada con la producción de estrógenos en este tipo tumoral es la vía de la aromatasa, encargada de transformar los andrógenos en estrógenos ^(11,32,35). La aromatasa se trata de un complejo enzimático formado por dos compuestos esenciales: la aromatasa citocromo P450 (P450arom) y la NADPH-citocromo p450 reductasa (reductasa) ⁽³⁵⁾. Se encarga de catalizar la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos ^(11,35), por lo que influye de manera relevante en el equilibrio fisiológico existente en condiciones normales entre las hormonas esteroideas sexuales ⁽³⁵⁾.

El gen que codifica la aromatasa se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 y está constituido por una región codificante que ocupa una posición más centrométrica y una región más telomérica con varias zonas promotoras. El promotor específico de las gónadas es el II. Otros tres promotores de gran relevancia serían el I.3 (expresado en el tejido adiposo y cáncer de mama), el I.4 (presente en el tejido adiposo) y el I.6 (expresado en hueso) ⁽¹¹⁾. En los tumores mamarios, tanto la expresión como la actividad de la aromatasa se encuentran significativamente elevadas.

La segunda ruta implicada en la formación de estrógenos en las neoplasias de mama es la vía de la sulfatasa, enzima perteneciente a la clase de las esterasas que cataliza la transformación de sulfatos de estrógenos hacia estronas y estradiol. Finalmente, el tercer paso que constituye la esteroidogénesis en los tejidos periféricos es la transformación de estrona en estradiol activado, gracias a la acción de la 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenasa tipo 1 (17 β -HSD1), un grupo de alcohol oxidorreductasas que catalizan la reducción de 17-cetosteroides y la deshidrogenación de 17 β -hidroxiesteroides en la esteroidogénesis y que intervienen el metabolismo de los esteroides. En los tumores mamarios, también se observa la presencia de la sulfotransferasa de estrógenos en los tejidos, la cual se encarga de llevar a cabo la transformación de los estrógenos en sulfatos de estrógenos ⁽³²⁾.

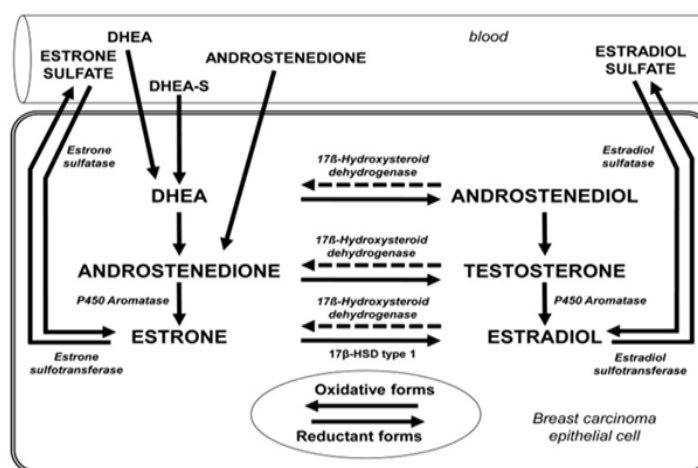


Figura 6.- Mecanismos enzimáticos implicados en la producción local de estrógenos en los tejidos tumorales mamarios. Tomada de Cos et al: Melatonin Modulation of Paracrine Interactions in Breast Cancer. Oncology letters. August 2014 ⁽³²⁾.

En los tejidos mamarios neoplásicos se puede demostrar la sobreexpresión tanto de aromatasa ^(11,32) como de sulfatasa y de 17 β -HSD1, en contraposición a lo que ocurre con la expresión de la sulfotransferasa de estrógenos, la cual está disminuida, lo que daría como resultado la acumulación de 17 β -estradiol en los tejidos mamarios cancerosos (Figura 7). En estas circunstancias, la melatonina actuaría llevando a cabo una doble acción de reducción tanto de la expresión como de la actividad de aromatasa, de sulfatasa y de 17 β -HSD1, a la vez que incrementaría las concentraciones de la sulfotransferasa de estrógenos. Se puede concluir de esto que la melatonina interviene de manera beneficiosa en los cánceres de mama, modificando la actividad y la expresión enzimática de aquellos elementos encargados de la síntesis local de estrógenos, propiciando un ambiente hormonal similar al existente en los tejidos mamarios normales,

protegiendo, por tanto, a las glándulas y tejidos mamarios del exceso estrogénico y de los efectos de estos ⁽³²⁾.

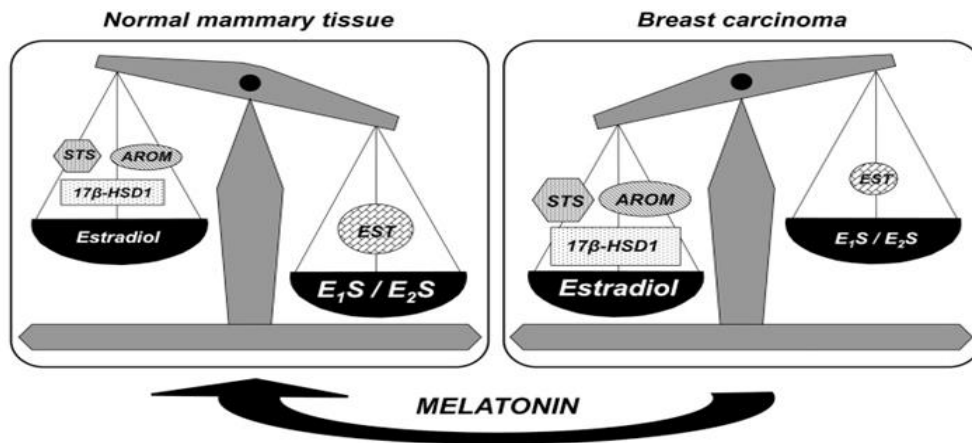


Figura 7.- Esquema representativo de las enzimas implicadas en la síntesis local de estrógenos en los tejidos mamarios normales y en los tejidos mamarios neoplásicos. Tomada de Tomada de Cos et al: Melatonin Modulation of Paracrine Interactions in Breast Cancer. Oncology letters. August 2014 ⁽³²⁾.

En situaciones de normalidad, el tejido adiposo mamario es capaz de mantener niveles bajos de aromatasa gracias al promotor I.4, presente en el tejido adiposo. Ante la presencia de cáncer mamario, tanto en las células epiteliales malignas como en los fibroblastos, la expresión de aromatasa alcanza rangos muy superiores a la situación basal debido a la activación de los promotores II y I.3, regulados a través del Adenosín monofosfato cíclico (AMPC).

Uno de los factores reguladores de la aromatasa lo constituye la prostaglandina E2 (PGE2) la cual lleva a cabo sus mecanismos de acción interviniendo sobre los promotores II y I.3 ⁽³²⁾. La formación de PGE2 deriva de la actividad de la ciclooxigenasa, como previamente hemos explicado. Uno de los mecanismos mediante los cuales la melatonina es capaz de modificar las funciones que la aromatasa desempeña en los tejidos neoplásicos es a través de la reducción de la expresión de las enzimas COX-1 y COX-2, cuya disminución ocasionaría niveles inferiores de PGE2. Una menor concentración de PGE2 derivaría en la atenuación de los niveles de AMPC, lo que conllevaría a menores niveles de los promotores I.3 y II y, por tanto, la reducción de la expresión de aromatasa ^(7,32).

5.3.4.2- Papel de la melatonina en la producción local de estrógenos en las células endoteliales peritumorales.

Las células endoteliales se caracterizan por ser un elemento celular imprescindible en el microambiente tumoral, desempeñando un papel decisivo en el desarrollo y progresión de las neoplasias de mama mediante el control de la angiogénesis ^(29,31,32). Estas células proporcionan el soporte estructural necesario que los tejidos tumorales necesitan para crecer y llevar a cabo sus procesos de formación de nuevos vasos sanguíneos ⁽³³⁾. Las células endoteliales constituyen en los tejidos neoplásicos una fuente productora de estrógenos mediante la expresión de aromatasa. Esto es debido a que en los tumores mamarios se pueden observar niveles elevados del promotor I.7 de la aromatasa ⁽¹⁰⁾, el cual se asocia con la activación celular endotelial en las neoplasias mamarias. La consecuencia directa que se deriva de este exceso enzimático de aromatasa a través de la activación de los promotores I.3, II y I.7 es la síntesis aumentada de estrógenos en las células epiteliales malignas, lo que junto con la expresión de fibroblastos adiposos pobremente diferenciados y las células endoteliales adyacentes se perpetúan los fenómenos de progresión y desarrollo tumoral en los tejidos mamarios ⁽³²⁾.

VEGF es secretado en gran cantidad por las células neoplásicas mamarias y es un factor pro-angiogénico esencial para mantener la expansión de las neoplasias. Se postula que VEGF participaría en la regulación de las rutas tanto paracrinas como autocrinas promoviendo la proliferación, el desarrollo y la diseminación de las células endoteliales ^(32,33,34).

Diversos estudios han tratado de explicar el papel de la melatonina en la regulación de este factor angiogénico. Para ello han empleado células humanas provenientes de cánceres de mama (MCF-7), cultivadas junto con células endoteliales obtenidas de venas umbilicales humanas (HUVECs). Al añadir VEGF a esta combinación se ha comprobado que estimula la proliferación celular, mientras que la melatonina contrarresta este efecto ^(32,33,34,36). La adición de melatonina al cocultivo compuesto por la asociación de HUVECs y MCF-7 dio como resultado la disminución considerable de los niveles proteicos de ANG-1, ANG-2, de VEGF, así como la reducción de la expresión génica del mRNA tumoral. La melatonina es capaz de reducir la expresión del mRNA de VEGF en las células tumorales mamarias humanas además de los niveles de VEGF en las células epiteliales malignas ^(32,33,34). Al mismo tiempo, produce la estimulación de la expresión del mRNA del receptor Tie-2 en HUVECs ⁽³⁶⁾. Los cocultivos formados por la asociación de células epiteliales mamarias malignas y células endoteliales constituyen un método adecuado para estimular *in vitro* la interacción paracrina que tiene lugar entre estas células en los tumores mamarios ⁽³²⁾. La presencia de células epiteliales malignas en los cocultivos con HUVECs tiene la habilidad de estimular el crecimiento endotelial y por ello

incrementar los niveles de VEGF. La melatonina es capaz de contrarrestar estos efectos estimuladores proliferativos que tienen lugar sobre los cocultivos de células endoteliales y sobre los niveles proteicos de VEGF, disminuyendo con ello los factores pro-angiogénicos y los procesos proliferativos vasculares (32,33,36).

Con el esquema inferior (*figura 8*), se resumen las acciones paracrinas de la melatonina en las células epiteliales. Esta hormona desempeñaría una acción importante en la reducción de la proliferación, la diseminación, la migración celular endotelial y la formación tubular a través de la disminución de la expresión de VEGF y PGE₂. PGE₂ sería estimulada por VEGF, lo que desencadenaría la angiogénesis, mientras que la melatonina realizaría una acción antagónica, reduciendo la expresión de las enzimas de la ciclo-oxigenasa, por lo que tanto PGE₂ como la angiogénesis se verían frenadas. Además, la melatonina interviene en la actividad de la aromatasa, inhibiendo su expresión en las células endoteliales gracias a la regulación de un promotor específico de aromatasa localizado en la región I.7. Esto ocasionaría la restricción de la producción local de estrógenos. Todo ello sería crucial para detener la proliferación y diseminación tumoral, ya que, por un lado, la inhibición de los fenómenos angiogénicos se correlaciona directamente con un menor desarrollo tumoral, mientras que la reducción de los niveles de estrógenos también tendría importantes consecuencias beneficiosas: debido a que los cánceres de mama son un tipo de tumores estrógeno-dependientes, su progresión se vería frenada. Además, diferentes estudios afirman que los niveles elevados de estrógenos favorecen los procesos angiogénicos, por lo que la reducción de su síntesis facilitaría la detección de los procesos de formación de nuevos vasos sanguíneos y como consecuencia, el desarrollo y progresión tumoral mamario (32).

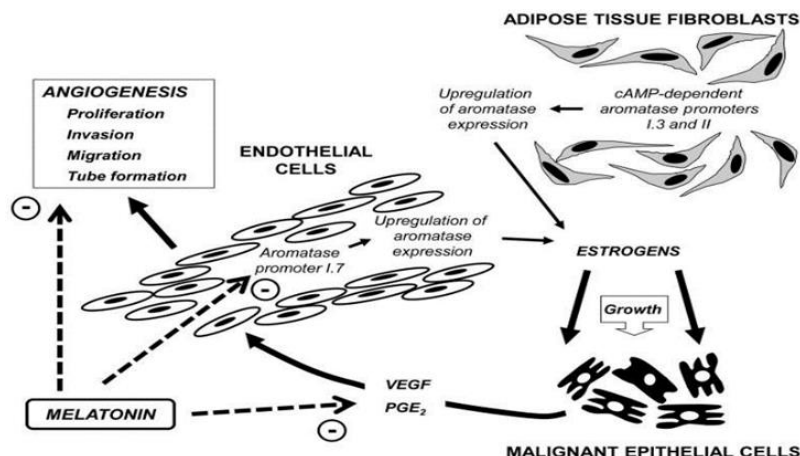


Figura 8.- Papel de la melatonina en las interacciones paracrinas que ocurren entre las células epiteliales malignas y las células endoteliales proximales en los tejidos tumorales del cáncer de mama. Tomada de Cos et al: Melatonin Modulation of Paracrine Interactions in Breast Cancer. Oncology letters. August 2014 (32).

Todos estos hallazgos parecen indicar que la melatonina desempeñaría un papel relevante en las relaciones paracrinas existentes entre las células epiteliales malignas y las células endoteliales proximales a través de la supresión de la expresión de VEGF en las células tumorales de las neoplasias mamarias, lo que llevaría a la disminución de los niveles de VEGF en las células endoteliales adyacentes ^(32,33,34). Menores niveles de VEGF serían importantes para lograr la reducción del número de células endoteliales malignas productoras de estrógenos y para frenar la angiogénesis tumoral. ^(32,33). La melatonina y el estradiol desempeñan acciones antagónicas en las células endoteliales: mientras que la primera inhibe la proliferación, el estradiol la estimula. Debido a ello, se puede concluir que la melatonina desempeña un doble papel: por un lado, actúa disminuyendo los niveles de estradiol, el cual estimula la proliferación celular maligna y por otro, disminuyendo los factores angiogénicos y por tanto frenando la creación de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos neoplásicos ^(34,36). Se ha demostrado que la melatonina reduce el número de células endoteliales que invaden los tejidos a través de la membrana basal en respuesta a la estimulación por VEGF. Esta migración celular es esencial para el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Otro paso fundamental estimulado por VEGF para el correcto desarrollo de la angiogénesis es la creación de redes tubulares compuestas por células endoteliales. La melatonina interviene en este proceso interrumpiendo la creación de dichas estructuras e impidiendo la formación de los túbulos en las células previamente estimulada por VEGF. Las células mamarias cancerosas están modificadas de tal manera que son angiogénicamente activas por lo que son capaces de promover la creación longitudinal de los túbulos en las células HUVECs. Este efecto proliferativo es neutralizado mediante la adición, tanto de anticuerpos anti-VEGF como de melatonina, lo que sugiere que la acción supresora de la melatonina sobre formación de estructuras capilares estimulada por las células MCF-7 se produciría como resultado de la inhibición de la actividad de VEGF ^(32,34). La melatonina desintegraría la red capilar preformada en los tejidos tumorales ⁽³⁴⁾.

Finalmente, podemos concluir a través de la información obtenida de los diferentes estudios, cuatro puntos clave sobre el papel de la melatonina en la regulación de los procesos angiogénicos en las neoplasias:

1. La melatonina es capaz de inhibir la proliferación, la invasión y la migración de las células endoteliales en los tejidos tumorales lesionados, lo que resultaría útil y beneficioso para frenar el avance de los diferentes tipos de cáncer.

2. La melatonina interrumpe la formación de la red vascular tubular estimulada por VEGF, a la vez que contrarresta los efectos de esta molécula.
3. La melatonina interfiere con la actividad angiogénica de las células MCF-7, oponiéndose a su acción.
4. La melatonina desintegra la red capilar preformada en los tejidos neoplásicos lesionados ⁽³⁰⁾.

La melatonina simultáneamente coordina la disminución de la liberación de las angiopoyetinas junto con la reducción de factores pro-angiogénicos. Todos estos hallazgos sugieren la posibilidad de integrar la melatonina como parte de la terapia anticancerosa debido a su potencial antiangiogénico, el cual resultaría beneficioso ya que está directamente relacionado con la invasividad y proliferación tumoral ^(30,32,34,36).

5.4.- IMPACTO DE LOS miARN EN LA ANGIOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA.

Los microARN (miARN) son pequeñas secuencias de ARN no codificante compuestas por 19 a 25 nucleótidos que desempeñan una función decisiva en el control post-transcripcional de la expresión genética. Recientes estudios científicos han demostrado la intervención de los miARN en múltiples actividades biológicas necesarias para el desarrollo tumoral, tales como el control de la proliferación celular, la apoptosis, la diseminación, la migración y la angiogénesis. La expresión aberrante de miARN en los tejidos neoplásicos se ha observado en numerosos tipos de cánceres de mama humanos, los cuales están relacionados con una progresión más rápida y agresiva de la enfermedad ^(37,38). Se ha documentado el papel supresor tumoral de miR-34a, miR-502 y miR-22 en los cánceres de mama, mientras que miR-32 y miR-191 funcionan como oncogenes en estas neoplasias y también en las laríngeas ⁽³⁸⁾.

Mediante el análisis de la información disponible acerca de estas secuencias y comparándolo con los estudios previos, se ha llegado a la conclusión de que VEGF-A, la principal molécula pro-angiogénica tumoral, está relacionada con la expresión de miR-140-5p, de tal manera que miR-140-5p actuaría como un supresor tumoral en el cáncer de mama, inhibiendo a VEGF-A y por tanto consiguiendo frenar y disminuir la progresión metastásica y la angiogénesis ^(37,38). Se ha encontrado que miR-140-5p es capaz de inhibir la habilidad que tienen las células HUVECs de formar túbulos, necesarios para la creación de la red vascular tumoral ^(32,38). CD31 es una molécula de adhesión presente en las células endoteliales plaquetarias cuya estimulación favorece la creación de nuevos vasos sanguíneos. Cuando miR-140-5p se sobreexpresa en los tejidos tumorales, se inhibe la liberación de CD31. El aporte vascular adecuado es

fundamental para el correcto desarrollo, crecimiento e invasión tumoral, por lo que la acción de miR-140-5p bloqueando la angiogénesis sería un proceso relevante para combatir esta enfermedad ⁽³⁸⁾.

Para poder documentar de manera precisa el papel que desempeña la expresión de miR-140-5p en los tejidos tumorales del cáncer de mama, se han comparado los niveles de este miARN en dos grupos de pacientes: por una parte, se han seleccionado 40 casos con tumor mamario, mientras que como controles se escogieron 30 pacientes sin enfermedad y por tanto con tejidos no lesionados. Para procesar la información se extrajo el ARN de las muestras cancerosas y se analizó mediante una RT-PCR a tiempo real. Los datos obtenidos como producto de este procedimiento demostraron la existencia de niveles hasta cinco veces menores de miR-140-5p en las muestras obtenidas de tejidos lesionados en comparación con los tejidos sanos, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Así mismo, miR-140-5p se asoció con la progresión tumoral, ya que se informó que los niveles de esta molécula iban disminuyendo a medida que el estadio tumoral avanzaba del grado I al III. Otro de los descubrimientos realizados está en relación con la invasión metastásica linfática: la expresión de miR-140-5p fue inferior en los tejidos linfáticos con afectación metastásica tumoral en comparación con los tejidos tumorales no damnificados por esta invasión ⁽³²⁾. Además, los niveles encontrados de VEGF-A estaban en relación inversa con los de miR-140-5p en los tejidos de carcinomas mamarios ^(37,38).

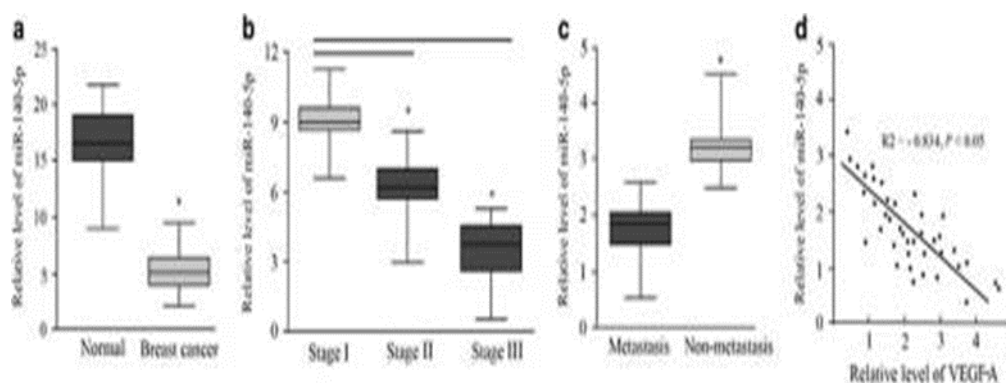


Figura 9.- Reducción de los niveles de miR-140-5p en las muestras clínicas de tumores mamarios. Tomada de MicroRNA-140-5p inhibits invasion and angiogenesis through targeting VEGF-A in breast cancer. Cancer Gene Ther. September 2017 ⁽³⁸⁾.

En el esquema superior (*figura 9*) se explica cómo se produce la regulación de los niveles de miR-140-5p en las diferentes muestras clínicas de cánceres de mama. En primer lugar (a), la expresión de miR-140-5p se encuentra disminuida

en los tejidos tumorales mamarios en comparación con los tejidos mamarios no afectados de enfermedad. En la segunda (b), se observa que miR-140-5p se expresa de manera diferente en aquellos tumores que se encuentran en estadios tempranos de la enfermedad (estadios I-II) en comparación con los tumores que están en estadios más avanzados (estadio III). En los estadios más incipientes del cáncer, los niveles de miR-140-5p están más elevados, mientras que cuando la neoplasia mamaria se encuentra clínicamente más avanzada, los niveles de dicho factor se reducen. En la tercera (c), se aprecia que miR-140-5p se expresa de forma distinta en los tumores con afectación metastásica de ganglios linfáticos en comparación con los tumores sin metástasis. Finalmente (d), se concluye que los patrones de expresión de VEGF con miR-140-5p muestran una correlación inversa estadísticamente significativa ⁽³⁸⁾.

Diversos estudios experimentales han demostrado que miR-140-5p actúa reduciendo la progresión celular en las neoplasias. La presencia de este miARN consigue inhibir la invasión y proliferación de grupos de células malignas, actuando a través del control de genes implicados en los procesos de división y progresión que favorecen la diseminación metastásica tumoral en las neoplasias mamarias ⁽³⁷⁾. miR-140-5p funcionaría como un gen supresor tumoral de los procesos de metástasis y angiogénesis en la mama ^(37,38).

Por tanto, los miARN desempeñarían funciones a nivel de la señalización post-transcripcional, regulando diversos genes implicados en el desarrollo del proceso tumoral, la diferenciación celular, la invasión metastásica y la angiogénesis ⁽³⁸⁾. Además, los miARN podrían actuar de dos maneras opuestas, bien como supresores tumorales o bien como oncogenes, a través del control de los genes que participan en los fenómenos de migración y creación de nuevos vasos sanguíneos presentes en las neoplasias ^(37,38).

En los tumores de mama avanzados y de alto grado de malignidad se observa que la expresión de miR-140-5p es inferior en comparación con los tumores localizados, lo que implica que los niveles elevados de miR-140-5p se asocian con mejor estadio clínico. La función de los microARN está estrechamente ligada a las células madre cancerosas: esta molécula funciona regulando los procesos de señalización de las células madre en el epitelio mamario no lesionado, pero también en los tejidos del carcinoma ductal in situ (CDIS). La ausencia de este miARN puede desembocar en la progresión y avance de las lesiones, aumentando las posibilidades de diferenciación celular y progresando a neoplasias más agresivas.

El índice mitótico expresado por medio de KI-67 es un importante indicador del grado de malignidad y proliferación tumoral, incluyendo en las lesiones de la mama. Diversos estudios han documentado la regulación inversa de KI-67

mediante miR-140-5p, por lo que la presencia del miARN conseguiría que el índice mitótico fuera inferior en comparación con su ausencia. Además, KI-67 está vinculado con el ciclo celular, al igual que también lo está miR-140-5p. La sobreexpresión de este microARN provocaría el crecimiento celular en fase G1 de la interfase, mientras que lo disminuiría en fase S, en la que se sintetizaría el ADN. Esto resultaría en un menor crecimiento celular, lo que sería beneficioso para detener la progresión tumoral.

Finalmente, se puede constatar la relevante importancia clínica de miR-140-5p en la patogenia del cáncer de mama, realizando funciones implicadas en la reducción de la viabilidad, la proliferación y la diseminación celular. Esta molécula es capaz de frenar la expresión del principal factor pro-angiogénico, inhibiendo con ello la formación de vasos sanguíneos patológicos y por tanto permitiendo detener la progresión de las neoplasias mamarias ⁽²⁾.

5.5.- TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS EN EL CÁNCER DE MAMA.

5.5.1- Objetivos terapéuticos generales.

Como se ha venido documentando a lo largo de la revisión, VEGF es el factor angiogénico más relevante, el cual se ha demostrado que desempeña un papel fundamental en la progresión y pronóstico del cáncer de mama. Esta molécula favorece la creación de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos dañados, induciendo la supervivencia de las células vasculares endoteliales, el crecimiento y la diseminación a través de su interacción con receptores específicos (VEGFR) ^(2,3,20,39).

Actualmente existen diversas líneas de trabajo que tratan de encontrar nuevas modalidades terapéuticas que actúen inhibiendo los procesos de angiogénesis que tan necesarios son para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo tumoral.

Los principios generales de la terapia anti-angiogénica serían los siguientes:

1. Los inhibidores de este proceso no deben causar fenómenos tales como la supresión medular de los pacientes tratados, síntomas gastrointestinales o pérdida de cabello. Se busca que produzcan menor toxicidad que los agentes quimioterápicos.
2. El efecto terapéutico deseado aparece en un periodo de tiempo comprendido entre varios meses y el año.
3. La resistencia individual de las personas a las drogas anti-angiogénicas no puede producir efectos adversos de creación de nuevos vasos sanguíneos.
4. La combinación de esta modalidad terapéutica junto con fármacos citotóxicos actúa sinérgicamente, siendo más efectiva.

5. Está fundamentalmente dirigida a pequeños grupos de células endoteliales vasculares, emigrantes o proliferantes ⁽¹⁾.

5.5.2- Técnicas terapéuticas actuales

A lo largo de los años y en especial a partir de la última década, se han realizado importantes avances relacionados con la creación y desarrollo de agentes terapéuticos que ejerzan acciones beneficiosas frenando el crecimiento y progresión neoplásica mediante la modulación de la angiogénesis tumoral. Es por ello que se han estado examinando diferentes mecanismos de la interacción de VEGF con su receptor y con las vías de señalización molecular con el objetivo de conseguir frenar las acciones angiogénicas y poder emplearlas como parte del tratamiento anticanceroso. Las diferentes técnicas de actuación sobre este factor de crecimiento vascular han sido las siguientes: el secuestro de ligandos, bloqueo de receptores externos, bloqueo de receptores internos (mediante inhibidores de tirosina quinasas) e inhibiendo el receptor VEGFR (*Figura 10*). De todos los diferentes agentes antiangiogénicos inhibidores de VEGF, Bevacizumab ha sido el más estudiado en diferentes tipos de neoplasias, incluyendo entre ellas el cáncer de mama ⁽³⁹⁾.

VEGF targeting	Drug name	Manufacturer	Status
Ligand sequestration	Bevacizumab (Avastin®)	Genentech	Approved for CRC, NSCLC, MBC, and GBM
	Aflibercept (AVE005)	Sanofi/Regeneron	Phase II
	HuMV833	PDL Biopharma Inc.	Phase I
	PI-88 (heparinase inhibitor)	Progen Industries Ltd.	Phase II
External receptor blocking	IMC-1121B (Ramucirumab)	ImClone Systems	Phase III
	IMC-18F1	ImClone Systems	Phase II
	CDP791	UCB (Celltech)	Phase II
Internal receptor blocking (TKIs)	Sunitinib (Sutent®)	Pfizer	Approved for RCC and GIST Discontinued for breast cancer
	Sorafenib (Nexavar®)	Bayer/Onyx	Approved for RCC and HCC
	Vandetanib (Zactima®)	Astra Zeneca	Phase III
	Vatalanib (PTK787/22584)	Novartis/Shering AG	Phase II
	Axitinib (AG-013736)	Pfizer	Phase II
	Motesanib (AMG-206)	Amgen	Phase II
Inhibition of VEGFR message	Pazopanib (GW786034)	GlaxoSmithKline	Approved for RCC
	Angioenzime	Sirna Therapeutics	

Figura 10.- Resumen de los diferentes métodos terapéuticos para inhibir a VEGF. Tomada de Bevacizumab Treatment for Advanced Breast Cancer. Oncologist. December 2011 ⁽³⁹⁾.

Desde el descubrimiento de Trastuzumab, se han desarrollado nuevos fármacos que intentan actuar sobre los mecanismos moleculares que intervienen en la fisiopatología del tumor mamario para, de este modo, conseguir detener su progresión e invasión. Actualmente, existen diferentes opciones terapéuticas específicas que incluyen, desde anticuerpos monoclonales tales como

Pertuzumab que une receptores de la superficie celular, hasta inhibidores de tirosin-kinasas como es el Lapatinib, que actúa inhibiendo la acción del factor de crecimiento epidérmico y por tanto frenando su acción ⁽¹⁹⁾.

En este contexto surge Bevacizumab, un derivado del anticuerpo monoclonal murino VEGF A4.6.1 el cual está compuesto por un 93% de secuencias proteicas humanas y un 7% de secuencias proteicas murinas ⁽³⁹⁾. Bevacizumab actúa a través del bloqueo de VEGFR y con ello se consigue suspender las acciones pro-angiogénicas y proliferativas que son derivadas de la unión de VEGF a su receptor ^(19,39,40). La realización de estudios experimentales demostró que dicho anticuerpo monoclonal era capaz de neutralizar todas las isoformas humanas de VEGF, deteniendo los fenómenos de migración y proliferación celular endotelial. En experimentos *in vivo* desarrollados sobre una gran variedad de tipos tumorales, entre los que se incluye el cáncer de mama, se vio que la adición de Bevacizumab a las muestras tumorales conllevaba a un crecimiento tisular neoplásico mucho más lento que en condiciones de normalidad, junto con una reducción considerable de la densidad vascular en algunos subtipos de carcinomas mamarios ⁽³⁹⁾.

VEGF se expresa en la mayoría de los tipos de células cancerosas y en ciertas células tumorales estromales, por lo que inhibir el mecanismo de acción de dicha molécula sería una línea de tratamiento altamente efectiva en determinados tumores sólidos entre los que se incluye el cáncer de mama. Desde finales de 1990 se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos basados en comprobar la eficacia del empleo de agentes dirigidos contra VEGF. Las investigaciones basadas en la demostración de los efectos beneficiosos de los agentes anti-angiogénicos comenzaron a dar sus frutos en 2005, con la publicación del primer informe de un ensayo clínico aleatorizado y prospectivo basado en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico con terapias anti-VEGF, que consiguió demostrar el beneficio de asociar a la quimioterapia convencional con Paclitaxel el anticuerpo monoclonal Bevacizumab ⁽²⁰⁾. No obstante, se deben evaluar de manera minuciosa las características fenotípicas de los tumores de mama debido a que la gran mayoría de ellos presentan una conformación molecular específica que les hace eludir los efectos terapéuticos beneficiosos de las terapias con anticuerpos monoclonales. Bevacizumab se emplea como parte del tratamiento de primera línea en los tumores de mama con fenotipo triple negativo altamente proliferativo que presentan gran sobreexpresión de moléculas angiogénicas que les dotan de gran capacidad de crecimiento y posibilidad metastásica ^(19,20,39,40).

Los inhibidores de tirosina quinasas son otra de las técnicas estudiadas por sus efectos antiangiogénicos tumorales. Las pequeñas moléculas de tirosina quinasas administradas por vía oral están diseñadas con el objetivo principal de actuar sobre la función catalítica intracelular de la familia VEGF y sus receptores,

así como sobre el factor de crecimiento plaquetario (PDGFR) y otros receptores de factores de crecimiento proangiogénicos expresados por las células endoteliales. Ejemplos de esto son Sunitinib malato y Sorafenib, los cuales son inhibidores de tirosina quinasas orales dirigidos frente a diferentes receptores de tirosina quinasas, como son VEGFR, PDGFR, el receptor del factor de células madre (c-KIT) y el receptor tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3). Estas técnicas terapéuticas han mostrado beneficios terapéuticos interesantes, pero mucho menos alentadores en comparación con los obtenidos con el empleo de Bevacizumab, bien cuando se agregan en asociación a los regímenes quimioterapéuticos estándar para el tratamiento del cáncer de mama o cuando se usan solos ⁽⁴⁰⁾.

El empleo de vacunas que incluyen minigenes se ha disparado en la última década y está compitiendo con las terapias con anticuerpos monoclonales. Recientemente se ha comprobado la eficacia de la vacuna con VEGFR-2 testada en modelos animales. Otras líneas de trabajo están centrando sus objetivos en una vacuna oral con minigenes de DNA dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular murino (FLK-1), considerado como el receptor más importante de la angiogénesis, protegido contra tumores de diferente origen en ratones BALB/c singénicos. Se ha comenzado a investigar una vacuna compuesta por ADN oral dirigido contra el gen FLK-1, que prevenga los procesos angiogénicos e inhiba el crecimiento tumoral gracias a la respuesta inmune mediada por los linfocitos T CD8. Dichos linfocitos tienen la capacidad de detectar y destruir de forma específica las células tumorales, mediante el reconocimiento de antígenos compuestos por 8-10 aminoácidos, los cuales son presentados a los receptores de células T (TCR) presentes en la superficie celular como complejos con moléculas de histocompatibilidad tipo 1 (MHC 1). Estos péptidos, conocidos como epítomos, se forman en el citosol celular después del procesamiento proteolítico de antígenos por parte del proteasoma de las células presentadoras de antígenos. Uno de los objetivos principales de estas vacunas es la inducción de respuestas antitumorales específicas, mediadas por los linfocitos T CD8 y dirigidas contra dichos epítomos, para lograr la erradicación tumoral y la prevención de su recurrencia. Estas vacunas con minigenes pueden inducir respuestas inmunes dirigidas únicamente frente a epítomos de antígenos específicos, evitando con ello la interferencia de epítomos de antígenos no relevantes (*Figura 11*). Es por ello que las vacunas con minigenes dirigidos frente a FLK-1 supondrían una alternativa terapéutica a tener en cuenta para el tratamiento del cáncer de mama, así como para su prevención ^(19,40).

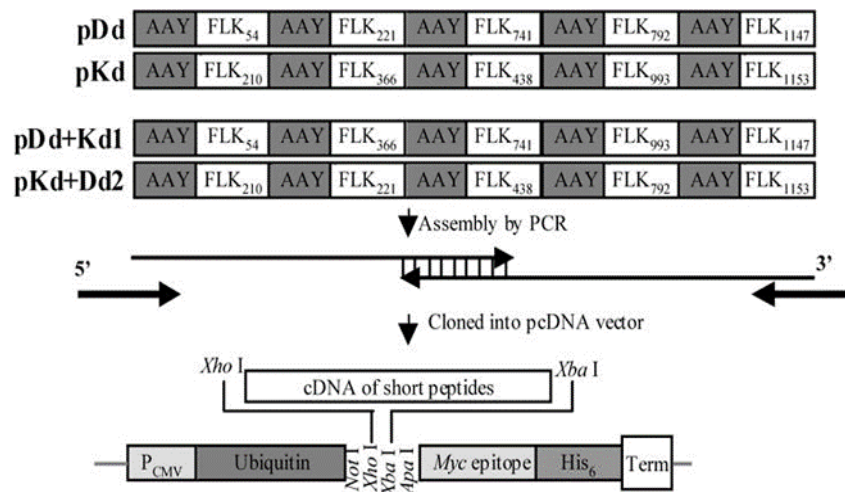


Figura 11.- Construcción y expresión de vacunas con minigenes de DNA dirigidos frente a FLK-1. Tomada de FLK-1-based minigene vaccines induce T cell-mediated suppression of angiogenesis and tumor protective immunity in syngeneic BALB/c mice. October 2007 ⁽⁴⁰⁾.

La quimioterapia metronómica, definida como la quimioterapia de baja tasa de dosis administrada en pulsos frecuentes a lo largo de un periodo de tiempo dilatado, es otra técnica empleada para frenar los procesos angiogénicos del cáncer de mama. Los regímenes convencionales de ciclofosfamida, metrotexato o 5-fluorouracilo han demostrado tener efectos antitumorales gracias a interferir con los procesos de neoangiogénesis en los tumores mamarios. El efecto antiangiogénico beneficioso obtenido mediante el uso de quimioterapia metronómica ha sido ampliamente estudiado a través de modelos preclínicos. Se presupone que las técnicas quimioterapéuticas de dosis densa se dirigen principalmente contra las células tumorales proliferativas, mientras que los objetivos fundamentales de las técnicas de quimioterapia metronómica son las células endoteliales responsables de los fenómenos de neovascularización patológica tumoral. Se ha observado que el nivel de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea (CEP) circulantes que contribuyen a los procesos de angiogénesis tumoral se ve reducida durante el tratamiento con quimioterapia metronómica, mientras que el recuento de CEP sufre un aumento durante los intervalos posteriores a la dosis máxima tolerada convencional. Se ha comprobado que la ciclofosfamida metronómica favorece el aumento de la trombospodina-1, el cual se trata de un factor antiangiogénico endógeno. Así mismo, se ha visto que la combinación de ciclofosfamida metronómica junto con metrotexato conlleva a la reducción del nivel sérico de VEGF en pacientes afectados de cáncer de mama. A pesar de que el empleo de técnicas terapéuticas basadas en quimioterapia metronómica con regímenes estándar de ciclofosfamida, metrotexato, fluoropirimidinas oral y agentes como el trastuzumab o el factor antagonista de ER se han estudiado en ensayos clínicos en Fase II en el cáncer de mama, la quimioterapia metronómica desempeña un

papel crucial como régimen asociado con agentes antiangiogénicos en el tratamiento de este tipo de neoplasias ⁽⁴⁰⁾.

Todos los promotores de la angiogénesis podrían ser bloqueados mediante el uso de terapias con factores anti-angiogénicos específicos. La producción del factor inducible de hipoxia tipo 1 (HIF-1) que desencadena la transcripción elevada de VEGF es uno de los objetivos principales de las terapias inhibitoras de la angiogénesis. Sin embargo, el bloqueo de estos promotores comprende un conjunto de mecanismos complejos y redundantes que aún no se conocen con exactitud ^(19,40).

5.5.3- Melatonina como terapia antiangiogénica en el cáncer de mama.

Mediante sus acciones paracrinas, la melatonina, a través de intervenir en la estimulación de la diferenciación de fibroblastos hacia adipocitos maduros, podría reducir la formación de colonias de fibroblastos indiferenciados que se localizan rodeando las células epiteliales malignas. Con ello, se favorecerían los procesos de adipogénesis, así como la disminución de la actividad de la enzima Aromatasa presente en dichos fibroblastos y células adiposas, lo que conllevaría a la reducción de la expresión de citoquinas anti-adipogénicas y, por último, a la de citoquinas inflamatorias en los tejidos tumorales mamarios.

Una de las funciones más conocidas de la melatonina es la acción que ejerce reduciendo la producción de PGE₂ en las células tumorales, condicionando la disminución de la expresión de la Aromatasa tanto en los propios tejidos tumorales, como en el tejido adiposo adyacente, mejorando la producción de IL-11 en las células cancerosas ⁽³²⁾. La melatonina a través de la reducción de la acción angiogénica de VEGF consigue reducir la proliferación de las células endoteliales, la invasión, la migración y la formación de las estructuras tubulares que conforman la nueva red vascular que se produce en los tejidos neoplásicos. Otro dato de especial interés es el hecho de que la presencia de melatonina en el microambiente tumoral conlleva a una producción disminuida de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen daño oxidativo en los tejidos ^(10,42). Debido a este hallazgo, se sugirió la hipótesis de que la melatonina podría ser útil como agente radioprotector y anticanceroso, ya que dicha indolamina es capaz de neutralizar de manera eficaz el radical hidroxilo (OH), que representa hasta el 70% del daño genómico inducido sobre las células expuestas a radiación de alta energía y que resulta devastador sobre los tejidos, alterando la configuración tridimensional del DNA y teniendo consecuencias negativas en términos de iniciación de la patogénesis neoplásica. Diversos estudios apoyan la idea de que la capacidad mediante la cual la melatonina protege el DNA nuclear del daño inducido por las especies ROS es gracias a su capacidad para ubicarse en el núcleo celular y preservar intactos a los nucleótidos del ambiente

perjudicial. Además de las acciones comentadas, la melatonina estimula la liberación de enzimas antioxidantes que eliminan los radicales libres e interviene en los mecanismos que llevan a cabo la reparación del DNA dañado. La confluencia de estas acciones limitaría la capacidad de destrucción del DNA y con ello los procesos de mutagénesis tumoral, reduciendo la probabilidad de desarrollo neoplásico.

La combinación de melatonina junto con una gran variedad de tratamientos anticancerosos mamarios, como la doxorrubicina, ejerce efectos sinérgicos en la destrucción de las poblaciones celulares cancerosas. Se han llevado a cabo diversos estudios para documentar esta relación positiva, combinando la melatonina junto con trióxido de arsénico, puromicina, ácido retinoico y somatostatina. Como resultado, se observó que la adición de melatonina a dichos compuestos favorecía los procesos de apoptosis en las células tumorales, impedía los fenómenos de crecimiento celular en el cáncer de mama MDA-MB-231 e igualmente potenciaba el efecto de los agentes anticancerosos reduciendo la viabilidad y el crecimiento celular tumoral en las neoplasias mamarias MCF-7. Así mismo, la combinación de melatonina con la vitamina D3 estimulaba la detención del crecimiento celular en las células humanas afectadas de cáncer mamario. La relación sinérgica más estudiada ha sido la existente entre la doxorrubicina y la melatonina. En este caso particular, se estudió si el receptor de potencial transitorio vanilloide 1 (TRPV1), el cual se trata de un canal permeable al calcio regulado por la melatonina y controlado por el estrés oxidativo, estaba implicado en los mecanismos de apoptosis celular mediados por la acción conjunta de la melatonina y doxorrubicina. Para ello, se midieron diferentes parámetros tales como los niveles intracelulares de especies ROS, la despolarización de la membrana mitocondrial, las actividades de caspasa 9 y caspasa 3 y el grado de apoptosis celular obtenido. Como resultado, se concluyó que la adición conjunta de los dos agentes (melatonina y doxorrubicina) obtenía efectos beneficiosos superiores en comparación con los efectos obtenidos con los dos agentes por separado, debido a que la melatonina potenciaba las acciones anticancerosas de la doxorrubicina debido a su papel regulador sobre el canal TRPV1, conllevando con ello niveles de apoptosis celular neoplásica mayores ⁽¹⁰⁾.

Es por todo ello que se puede afirmar que la melatonina es una hormona capaz de reducir el número de fibroblastos indiferenciados, inhibir los fenómenos angiogénicos y conseguir alcanzar concentraciones menores de estrógenos locales producidos en los tejidos mamarios como parte de los mecanismos tumorales normales. A la vez que desarrolla estas acciones, funciona como agente antioxidante y favorece la eliminación de los radicales libres. También se ha demostrado que actúa como agente protector del DNA celular. Debido a dichas acciones llevadas a cabo por esta hormona, podría ser contemplada como parte de la terapia anticancerosa en el tumor mamario, teniendo efectos

beneficiosos sobre la disminución de la proliferación y de la creación de nuevos vasos sanguíneos, así como sus acciones de inhibición enzimática sobre la Aromatasa ^(10,32,42).

5.5.4- Andrografólido como nueva terapia antiangiogénica en el cáncer de mama.

Debido a la gran incidencia y prevalencia que tiene el cáncer de mama sobre la población mayoritariamente femenina en todo el mundo, es urgente desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, así como agentes anticancerosos más efectivos que logren mejorar la calidad de vida y supervivencia de estos pacientes, con menores efectos secundarios. Actualmente, el manejo del cáncer de mama constituye todo un reto debido a la dificultad que supone el desarrollo de tratamientos individualizados. Esto, sumado a la resistencia que oponen las células mamarias cancerosas a los fármacos disponibles junto con la toxicidad limitante de dosis, también podría obstaculizar el efecto terapéutico de dichas técnicas e influir negativamente en el pronóstico de los pacientes ⁽⁴³⁾.

Uno de los hallazgos más relevantes que se ha producido recientemente en relación con el descubrimiento de terapias anticancerosas ha sido el potencial papel que juega la enzima COX-2 en la promoción y desarrollo de la patogénesis tumoral, especialmente en las neoplasias mamarias ^(31,41). Se ha visto que la sobreexpresión de COX-2 en el microambiente tumoral es capaz de estimular la proliferación, la angiogénesis, la invasividad tisular, los procesos metastáticos e incluso inhibir los fenómenos apoptóticos y la inmuno-vigilancia ^(7,31,41). Debido a todo ello se podría concluir que la búsqueda de agentes inhibidores de las vías de síntesis y expresión de COX-2 serían un método terapéutico adecuado para conseguir frenar la progresión del cáncer de mama ^(32,43).

Histona acetiltransferasa p300 (HAT o p300), se trata de una enzima codificada en humanos por el gen EP300, que puede desarrollar acciones como coactivador transcripcional. Esta enzima es capaz de regular diferentes procesos celulares tales como el crecimiento y la división, así como intervenir en la prevención del crecimiento celular tumoral. Además, se ha comprobado que los niveles de expresión de p300 son significativamente mayores en las células cancerosas en comparación con las células normales. Cabe también destacar el papel que desarrolla p300 en su relación con COX-2, actuando como un promotor de la activación de dicha enzima, por lo que la inhibición de p300 podría inhibir el efecto estimulante desencadenado por diferentes mediadores proinflamatorios sobre la expresión de COX-2.

Andrografólido o Andro, es una lactona diterpenoide que se ha venido usando recientemente como parte del tratamiento de diferentes neoplasias, produciendo

menores efectos adversos que con las terapias convencionales. Andro es una molécula que posee diferentes acciones biológicas que son beneficiosas para las personas, como puede ser la protección hepática, la protección frente al virus VIH-1, efectos antimalaria, y propiedades antibacterianas y antiinflamatorias. Diferentes ensayos clínicos han demostrado las acciones anticancerosas de dicha molécula, desempeñando acciones inhibitorias sobre el crecimiento tumoral mamario tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, bloquea a HIF-1 y su estimulación sobre la vía PI3K/AKT, favoreciendo la detención celular en fase G1 de interfase, contribuyendo a la apoptosis celular.

En el estudio clínico llevado a cabo por *Peng et al 2018* se evaluó la respuesta que producían las células cancerosas cuando eran sometidas a la influencia de Andro como parte de la terapia antineoplásica. Para llevar a cabo los distintos experimentos, se emplearon diferentes líneas celulares como MDA-MB-231, MCF-7, T4TD, MDA-MB-361 y BT549 procedentes de cánceres mamarios humanos. También se utilizaron HUVECs obtenidas a partir de venas umbilicales humanas.

En primer lugar, se evaluaron *in vitro* los efectos que Andro ejercía sobre la proliferación tumoral mamaria en varias líneas celulares. Los resultados que se obtuvieron sugerían, tal y como se refleja en el esquema 12-A de la figura inferior, que Andro conseguía inhibir de manera significativa la proliferación celular neoplásica en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7, T4TD, MDA-MB-361 y BT549, siendo MDA-MB-231 el grupo celular más sensible al tratamiento con Andro, en comparación con el resto de líneas celulares estudiadas (esquema 12-B). El papel de Andro sobre la proliferación celular tumoral también fue estudiado mediante el análisis con técnicas de citometría de flujo. Se pudo concluir que el empleo de esta lactona era capaz de suprimir de manera notoria la proliferación de dos líneas celulares neoplásicas mamarias: MDA-MB-231 y MCF-7, lo cual está reflejado en el esquema 12-C. Otro de los aspectos proliferativos estudiados fue la capacidad de formar colonias de los diferentes grupos celulares. Se pudo observar que la adición de Andro a las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 resultaba en una menor formación de colonias, en comparación con el resto de líneas celulares no tratadas con Andro (esquema 12-D). Como conclusión de los diferentes hallazgos obtenidos, se demostró que el empleo de Andro conseguía significativos efectos anti-proliferativos en los diferentes grupos de células cancerosas mamarias humanas.

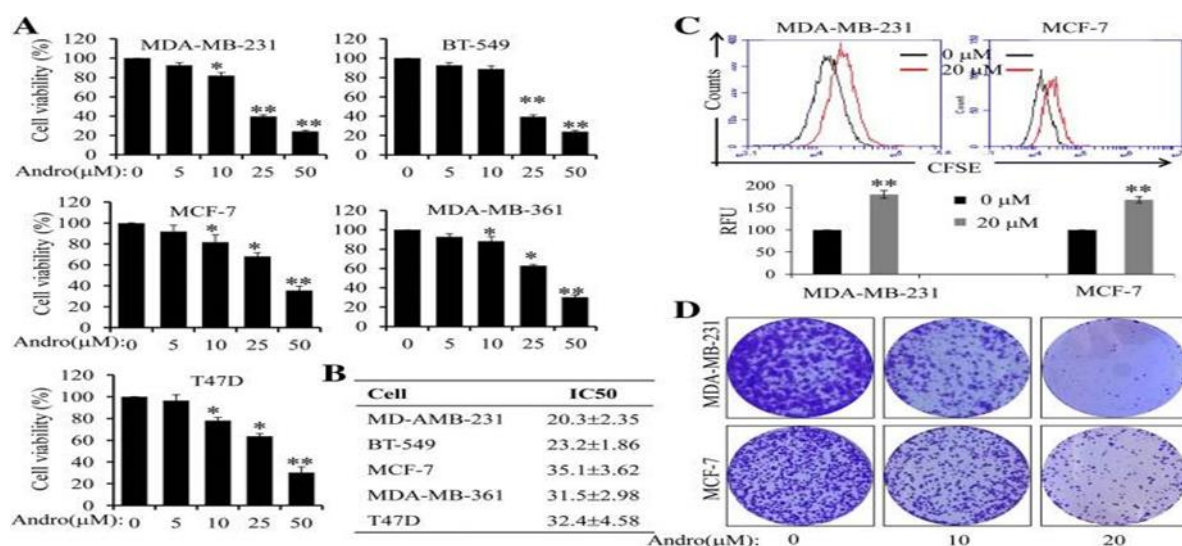


Figura 12.- Efectos del empleo de Andro sobre la proliferación celular en células tumorales mamarias humanas. Tomada de Peng et al. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2018. 37:248 ⁽⁴³⁾.

Como previamente se destacó al comienzo del apartado, la sobreexpresión de la enzima COX-2 se ha demostrado que es capaz de perpetuar la patogénesis tumoral, favoreciendo los procesos de proliferación e inhibición de la apoptosis celular en varios tipos de neoplasias ^(7,32,42). En este estudio clínico, para evaluar los efectos reguladores que Andro ejerce sobre la expresión de COX-2 en células tumorales humanas, se examinó, en primer lugar, los niveles de expresión de COX-2 presentes en las diferentes líneas celulares que conforman el estudio. Se pudo constatar que los niveles de esta enzima eran ligeramente superiores en el grupo celular MDA-MB-231 en comparación con el resto de líneas. El empleo de tratamiento con Andro sobre esta línea celular consiguió reducir, tanto la expresión proteica como los niveles de mRNA de COX-2 de manera dosis-dependiente (*Figura 13*). Dichos resultados sugieren la hipótesis de que Andro podría suprimir la transcripción de COX-2 a través de la inhibición de la unión de diferentes factores de transcripción a sus regiones promotoras. Para determinar con mayor exactitud el papel regulador que ejerce Andro sobre las rutas de señalización de COX-2, el grupo celular formado por MDA-MB-231 fue pretratado con un inhibidor selectivo de la enzima COX-2, Celecoxib (CB). Las técnicas terapéuticas basadas en el empleo único de Celecoxib o Andro mostraron diferentes efectos inhibitorios sobre la viabilidad celular, mientras que el empleo de ambos agentes en combinación no influyó de manera significativa sobre la viabilidad celular, en comparación con su empleo por separado. Tales resultados sugieren que los efectos beneficiosos inhibidores de la proliferación celular que Andro ejerce sobre las células mamarias tumorales están mediados a través de la regulación de la actividad de la señalización de COX-2 ⁽⁴²⁾.

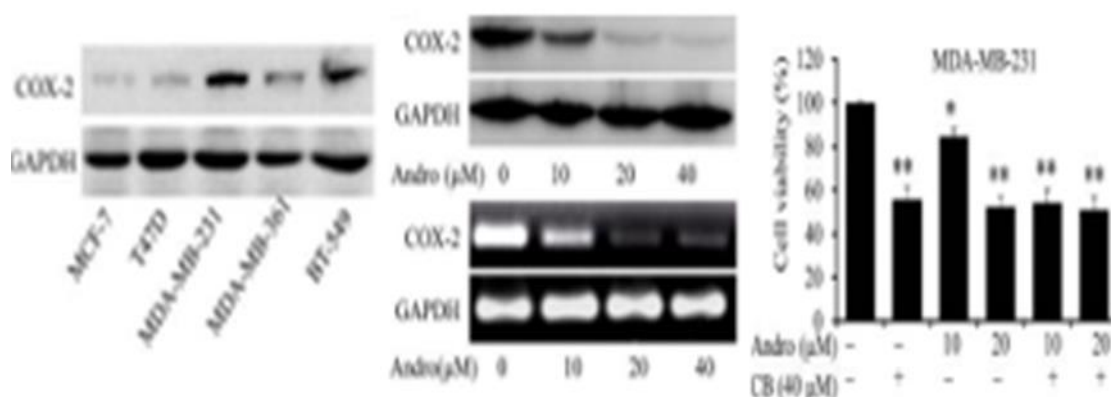


Figura 13.- Efectos del empleo de Andro sobre la expresión de COX-2 en las células mamarias tumorales humanas. El esquema de la izquierda representa los efectos del tratamiento con Andro en las diferentes líneas celulares. El esquema del centro refleja la supresión de COX-2 mediante Andro a través de la inhibición de la unión a diferentes factores de transcripción. El esquema de la derecha indica los resultados obtenidos mediante el tratamiento único con Andro o con Celecoxib. Tomada de Peng et al. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2018. 37:248 ⁽⁴³⁾.

Como es sabido, la sobreexpresión enzimática de COX-2 se relaciona con el incremento de los fenómenos favorecedores de la angiogénesis y podría emplearse como un marcador celular de la invasividad tumoral en los carcinomas mamarios ^(7,32,43). Se postula que Andro podría tener efectos terapéuticos beneficiosos sobre los procesos patológicos de formación de nuevos vasos sanguíneos, interviniendo en la supresión de la angiogénesis, frenando el crecimiento tumoral y la invasión tisular ⁽⁴³⁾. Una de las estrategias terapéuticas más efectivas para detener la progresión metastásica tumoral y suprimir el crecimiento de las neoplasias mamarias sería la inhibición de los procesos angiogénicos ^(32,43). En el estudio realizado por *Peng et al 2018* se intentó comprobar esta hipótesis mediante el empleo *in vitro* de HUVECs tratadas con Andro. Los resultados que se obtuvieron revelaron moderados efectos inhibitorios sobre la proliferación celular de las HUVECs así como ausencia de efectos citotóxicos a bajas concentraciones (figura 14-A). La presencia del factor VEGF induce la expresión de COX-2 en HUVECs mientras que Andro suprime dicha expresión inducida por VEGF en la línea celular a estudio (figura 14-B). También en este estudio se examinaron los efectos que Andro desempeña sobre la inhibición de la formación tubular inducida por VEGF en HUVECs a través del empleo de un ensayo de formación de túbulos de angiogénesis *in vitro* ⁽⁴³⁾. Al tratarse de la principal molécula estimuladora de la formación de nuevos vasos sanguíneos ^(1,2,3,19,32,43), VEGF actúa mejorando las estructuras capilares endoteliales en los grupos de células tumorales, en comparación con líneas

celulares no neoplásicas (figura 14-C). No obstante, este efecto favorecedor de la patogénesis tumoral podría ser bloqueado mediante el uso de Andro de forma dosis dependiente. Los diferentes resultados obtenidos parecen indicar que la presencia de dicha lactona dañaría de forma beneficiosa la formación tubular inducida por la presencia de VEGF en HUVECs, derivándose de ello una menor migración celular y crecimiento tumoral.

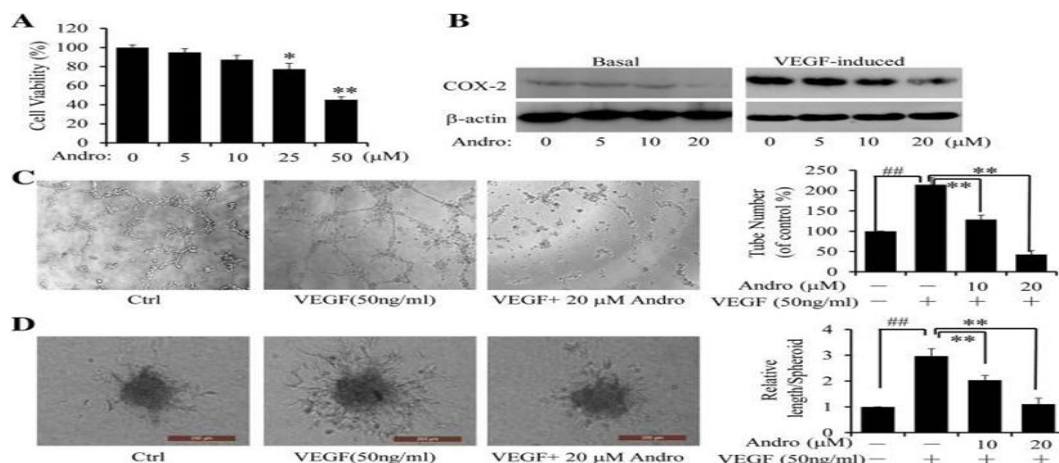


Figura 14.- Efectos del empleo de Andro sobre la angiogénesis inducida por VEGF. Tomada de Peng et al. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2018. 37:248 (43).

Para comprobar y establecer los efectos inhibidores de Andro sobre el crecimiento y los procesos angiogénicos tumorales *in vivo*, se estableció un modelo experimental empleando ratones con xenoinjertos de cáncer de mama humano. Al igual que ocurría en los modelos realizados *in vitro*, Andro consiguió reducir de manera relevante tanto el volumen como el peso tumoral, en comparación con el grupo control no tratado con esta lactona. Para la determinación precisa de los mecanismos moleculares mediante los cuales Andro ejerce sus acciones, a través del análisis con técnicas inmunohistoquímicas se determinó la expresión de los niveles de COX-2 en los xenoinjertos de dichos ratones. Los resultados obtenidos mostraron una tinción predominantemente positiva en los xenoinjertos de los ratones que conformaban el grupo control, mientras que las intensidades de tinción de los xenoinjertos de los ratones presentes en el grupo tratado con Andro fueron llamativamente más débiles. A esto se añade el hecho de que los hallazgos observados mediante las técnicas de análisis con Western Blot indicaban una supresión relevante de los niveles de expresión enzimática de COX-2 en los xenoinjertos tumorales que habían sido tratados con Andro.

Con el fin de evaluar los efectos que ejerce Andro sobre los fenómenos angiogénicos que intervienen en la patogenia tumoral, se estudió la densidad de los microvasos sanguíneos de nueva creación empleando para ello la tinción inmunológica de la molécula CD31 en los xenoinjertos tumorales con técnicas de Western Blot y análisis mediante inmunofluorescencia. Al igual que en el resto de los experimentos realizados, se vio que Andro ejercía efectos terapéuticos beneficiosos frenando los procesos patológicos tumorales, en este caso concreto, reduciendo el número de microvasos y la densidad de los mismos a la vez que reduciendo la expresión de los niveles de CD31 en las muestras tumorales tratadas con dicha molécula. Por los resultados obtenidos, se podría sugerir que Andro intervendría frenando el crecimiento tumoral al igual que los fenómenos estimuladores de la angiogénesis *in vivo* al igual que *in vitro*.

Como resultado del ensayo clínico al que hacemos referencia en este apartado, se observó que la presencia de Andro actúa sobre las células neoplásicas mamarias humanas desempeñando acciones inhibitorias sobre el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. La interacción de Andro sobre el microambiente tumoral es capaz de suprimir el crecimiento celular patológico a la vez que inducir los procesos de apoptosis mediante la disminución de la expresión de COX-2 así como la de su promotor en la línea celular formada por HUVECs ⁽⁴³⁾. Por ello, se pueden inhibir los mecanismos responsables de la angiogénesis en las células mamarias tumorales y con ello detener la supervivencia, migración, formación tubular y proliferación ^(32, 43).

Los procesos por los que Andro induce los fenómenos de toxicidad sobre las células mamarias tumorales estarían mediados a través de COX-2. En las células MCF-7 es capaz de inducir su apoptosis gracias a la reducción de la expresión de moléculas derivadas del metabolismo de COX-2.

Debido a que COX-2 es un importante regulador de los mecanismos angiogénicos que tienen lugar en la patogenia y desarrollo tumoral, si se inhiben sus acciones se podría conseguir la supresión de dichos fenómenos junto con el crecimiento celular, al mismo tiempo que inducir la apoptosis de las poblaciones celulares afectadas ^(4,39). Esto sugiere que Andro actuaría ejerciendo acciones beneficiosas mediante la supresión de la angiogénesis tumoral, disminuyendo la supervivencia de las células tumorales, dificultando los procesos de migración e invasión tisular, el crecimiento tumoral, la formación tubular y la diseminación metastásica ⁽⁴³⁾.

6.- CONCLUSIONES.

El cáncer de mama constituye la neoplasia que más frecuentemente afecta a las mujeres de todo el mundo, alcanzando cifras tanto de prevalencia como de incidencia muy elevadas. Por ello, entender sus mecanismos patogénicos es prioritario de cara a desarrollar estrategias preventivas y/o terapéuticas que nos permitan frenar la aparición de esta enfermedad, o bien detener su avance y agresividad una vez desarrollada.

Uno de los mecanismos centrales que interviene en la patogénesis tumoral es la angiogénesis, ya que participa en una multitud de procesos diferentes, tales como la progresión, el crecimiento o la invasión tumoral metastásica, todo ello permitiendo la perpetuación de las neoplasias en los diferentes órganos y tejidos e incrementando su potencial de malignidad. Una de las moléculas clave responsable de dichas acciones es VEGF junto con sus diferentes isoformas, las cuales bajo condiciones favorables creadas por el microambiente tumoral realizan acciones de neovascularización, facilitando el mantenimiento de los procesos fisiopatológicos cancerosos y el avance tumoral. Así mismo, COX-2 constituye otra molécula de gran trascendencia, ya que se encarga de la perpetuación del estado inflamatorio tisular característico de los tumores, incrementando el aporte de oxígeno y nutrientes y por tanto permitiendo a las poblaciones celulares neoplásicas el crecimiento y la progresión cancerosa.

Diversos estudios han comprobado la importancia que tiene la melatonina sobre la angiogénesis tumoral y en particular sobre el cáncer de mama: esta indolamina es capaz de disminuir la formación de fibroblastos indiferenciados presentes alrededor de las células epiteliales malignas en los tejidos mamarios neoplásicos, así como frenar la expresión de citoquinas como TNF- α , IL-6 e IL-11 producidas por las células mamarias tumorales. Otra de sus acciones más relevantes es la menor activación del promotor I.7, lo que se traduce en una menor expresión de aromatasa. Por tanto, la melatonina interviene en la patogénesis tumoral mamaria, consiguiendo reducir la activación celular endotelial, la migración tisular neoplásica, las concentraciones de estrógenos presentes en los tejidos mamarios y los fenómenos facilitadores de la angiogénesis como son la reducción de la formación tubular y la menor activación de VEGF. Estos hallazgos sugieren la hipótesis de que la melatonina podría tener un gran potencial como agente anticanceroso en el tratamiento de los tumores mamarios dependientes de estrógenos.

Otro punto a destacar en esta revisión es el papel de los Mi-ARN en la carcinogénesis mamaria, los cuales se ocupan del control del desarrollo tumoral, la diferenciación celular, la invasión metastásica o los fenómenos angiogénicos. Es particularmente destacable el papel de miR-140-5p, reduciendo la proliferación y el desarrollo celular, además de bloqueando la expresión del factor VEGF-A, lo que se traduce en la detención de la neovascularización tisular,

y, en consecuencia, en una menor progresión neoplásica en los tejidos mamarios. Es por ello que podría llegar a considerarse como un biomarcador tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de los tumores mamarios.

El empleo combinado de factores inhibidores de la angiogénesis junto con regímenes quimioterapéuticos clásicos en el tratamiento de los tumores de mama constituye una línea de investigación actual. La acción conjunta de ambas modalidades terapéuticas podría ofrecer mayores efectos beneficiosos, así como respuestas clínicas más eficaces, en comparación con la acción única de quimioterapia convencional. Una de las moléculas más recientemente descubiertas con efectos antiangiogénicos de gran importancia ha sido Andrografólido: esta lactona, mediante la supresión de la vía de señalización de VEGF junto con la reducción de la expresión de la molécula pro-angiogénica COX-2, reduciría los procesos de proliferación celular y angiogénesis en los tumores de mama. Sin embargo, aún se necesitan más ensayos clínicos que ayuden a determinar las características particulares de los pacientes y de los tumores, la dosis y los regímenes terapéuticos más adecuados de cara a optimizar estas nuevas estrategias terapéuticas y a confirmar sus potenciales efectos beneficiosos.

7.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Sánchez Socarrás V. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. *Revista Cubana Investigación Biomédica* 2001; 20 (3):223-30
2. Nishida N, Hirohisa Y, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health Risk Management* 2006 September; 2(3): 213–219.
3. Kerbel R.S, Ph.D. Tumor Angiogenesis. *New England Journal of Medicine* 2008 May 8; 358(19): 2039–2049.
4. Vempati1 P, Popel A, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 February; 25(1): 1–19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.11.002.
5. Lapeyre-Prost A, Terme M, Pernot S, Pointet AL, Voron T, Tartour E, Taieb J. Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer. *International Review Cell Molecular Biology.* 2017; 330:295-342. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.007. Epub 2016 December 26.
6. Courau T, Nehar-Belaid D, Florez L, Levacher B, Vazquez T, Brimaud F, Bellier B, Klatzmann D. TGF- β and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight.* 2016 Jun 16;1(9): e85974. doi: 10.1172/jci.insight.85974.
7. Costa C, Soares R, Reis-Filho J.S, Leitão D, Amendoeira I, Schmitt F.C. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *Journal of Clinical Pathology.* 2002 June; 55(6): 429–434.
8. Kosir M.A. Cáncer de mama. Manual MSD. Versión para profesionales.
9. Medline Plus. NIH: Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos. Cáncer de mama.
10. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF, Xu K. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017 Apr 17;18(4). pii: E843. doi: 10.3390/ijms18040843.
11. Cozzo A.J, Fuller A.M, and Makowski L. Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer. *Comprehensive Physiology*;8(1):237–282. doi:10.1002/cphy.c170008. February 2009.

12. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España en 2018. 29 de Enero de 2018
13. Mayo Clinic. Tipos de cáncer de mama: qué significa tu tipo. Artículo-20045654.
14. Leal J, Vargas F, Taladriz C. ¿Son los anticonceptivos orales un factor de riesgo para el cáncer de mama? Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología 2007; 72(2):89-95.
15. Caryn Rabin R. Aún hay vínculos entre el cáncer de mama y algunos anticonceptivos, señala un estudio. The New York Times. 11 de Diciembre de 2017.
16. Breast Cancer org. Factores de riesgo del cáncer de mama. 20 de Abril de 2017.
17. Gray J.M, Rasanayagam S, Engel C, Rizzo J. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. Environmental Health. 2017; 16: 94.
18. Chirivella-González I, Martínez-Martínez MT, Viala-Monleón A. Detección Precoz del Cáncer. Programas de Cribado. Manual SEOM de Prevención y Diagnóstico Precoz del Cáncer. Capítulo 16.
19. Longatto Filho A, Lopes J.M, Schmitt C, F. Angiogenesis and Breast Cancer. Journal of Oncology 2010; 2010: 576384.
20. Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. Breast Cancer. 2007;14(2):163-73.
21. Viacava P, Naccarato AG, Bocci G, Fanelli G, Aretini P, Lonobile A, Evangelista G, Montruccoli G, Bevilacqua G. Angiogenesis and VEGF expression in pre-invasive lesions of the human breast. The Journal of Pathology. 2004 October;204(2):140-6.
22. Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulsom R. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. The Journal of Pathology 1998 Aug;185(4):394-401.
23. Pinto MP, Badtke MM, Dudevoir ML, Harrell JC, Jacobsen BM, Horwitz KB. Vascular endothelial growth factor secreted by activated stroma enhances angiogenesis and hormone-independent growth of estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer Research 2010 Apr 1;70(7):2655-64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4373. Epub 2010 Mar 23.

24. Duarte M, Longatto Filho A, Schmitt F. Angiogenesis, haemostasis and cancer: New paradigms and old concerns. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* · December 2007. DOI: 10.1590/S1676-24442007000600009
25. Pavlakis K, Messini I, Vrekoussis T, Yiannou P, Keramopoulos D, Louvrou N, Liakakos T, Stathopoulos EN. The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer*. 2008 Apr 2; 8:88. doi: 10.1186/1471-2407-8-88.
26. Wülfing P, Kersting C, Tio J, Fischer RJ, Wülfing C, Poremba C, Diallo R, Böcker W, Kiesel L. Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004 Apr 1;10(7):2393-400.
27. Valković T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, Jonjić N. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. 2002 Jun;440(6):583-8. Epub 2001 May 16.
28. Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, Era S, Mori M. Angiopoietin 2 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: its relationship to the VEGF expression and microvessel density. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2006 Aug;98(3):261-6. Epub 2006 Mar 15.
29. Yongfen M, Xiubao R, Vaught D, Jin C, Donnelly, Conor E. Lynch C, Lin C. Tie2 signaling regulates osteoclastogenesis and osteolytic bone invasion of breast cancer. *Cancer Research*. 2010 April 1; 70(7): 2819–2828.
30. Menéndez-Menéndez J, Martínez-Campa C. Melatonin: An Anti-Tumor Agent in Hormone-Dependent Cancers. *International Journal of Endocrinology* 2018 October 2; 2018:3271948. doi: 10.1155/2018/3271948. eCollection 2018.
31. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*. 2017 April; 15(3): 434–443.
32. Cos S, Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C. Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial,

- endothelial and adipose cells in breast cancer (Review). *Oncology Letters*. 2014 August; 8(2): 487–492.
33. González-González A, González A, Alonso-González C, Menéndez-Menéndez J, Martínez-Campa C, Cos S. Complementary actions of melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells. *Oncology Reports*. 2018 Jan;39(1):433-441. doi: 10.3892/or.2017.6070. Epub 2017 November 2.
 34. Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*. 2013 May;54(4):373-80. doi: 10.1111/jpi.12007. Epub 2012 September 27
 35. Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases. *Reproduction*. 2001 May;121(5):685-95.
 36. Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvascular Research*. Volume 87, May 2013, Pages 25-33
 37. Kontomanolis EN, Fasoulakis Z, Papamanolis V, Koliantzaki S, Dimopoulos G, Kambas NJ. The impact of microRNAs in Breast Cancer Angiogenesis and Progression. *MicroRNA* 2018 October 17. doi: 10.2174/2211536607666181017122921.
 38. Lu Y, Qin T, Li J, Wang L, Zhang Q, Jiang Z, Mao J. MicroRNA-140-5p inhibits invasion and angiogenesis through targeting VEGF-A in breast cancer. *Cancer Gene Therapy*. 2017 September; 24(9): 386–392.
 39. Álvarez R, Guarneri V, Icli F, Johnston S, Khayat D, Loibl S, Martin M, Zielinski C, Conte P, Hortobagya G. Bevacizumab Treatment for Advanced Breast Cancer. *The Oncologist*. 2011 December; 16(12): 1684–1697.
 40. Fakhrejehani E, Toi M. Antiangiogenesis Therapy for Breast Cancer: An Update and Perspectives from Clinical Trials. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2014 March; 44(3): 197–207.
 41. Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Zhou H, Reisfeld R. FLK-1-based minigene vaccines induce T cell-mediated suppression of angiogenesis and tumor protective immunity in syngeneic BALB/c mice. *Vaccine*. 2007 February 9; 25(8): 1409–1415.

42. Cheng J, Yang HL, Gu CJ, Liu YK, Shao J, Zhu R, He YY, Zhu XY, Li MQ. Melatonin restricts the viability and angiogenesis of vascular endothelial cells by suppressing HIF-1 α /ROS/VEGF. *International Journal of Molecular Medicine*. 2018 Dec 10. doi: 10.3892/ijmm.2018.4021.
43. Peng Y, Wang Y, Tang N, Sun D, Lan Y, Yu Z, Zhao X, Feng L, Zhang B, Jin L, Yu F, Ma X, Lv C. Andrographolide inhibits breast cancer through suppressing COX-2 expression and angiogenesis via inactivation of p300 signaling and VEGF pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018 October 12;37(1):248. doi: 10.1186/s13046-018-0926-9.