



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**“BASES MOLECULARES DE LA  
ANGIOGÉNESIS TUMORAL: PAPEL DEL  
VEGF”**

Autor: Esther Jimeno García

D.N.I.:70265157L

Tutor: Carmen de Juan Chocano

Convocatoria: Junio 2016

## RESUMEN

El proceso angiogénico consiste en la formación de vasos a partir de una red vascular primaria. La angiogenesis engloba el proceso de migración y proliferación de las células endoteliales, la formación de estructuras tubulares que se unirán y madurarán dando lugar a una red tubular estable. La angiogénesis es un proceso complejo que está implicado tanto en procesos fisiológicos como patológicos. En los procesos patológicos puede influir por un exceso o por un defecto, una de las patologías donde se sitúa como factor clave es en el desarrollo tumoral. Es por tanto fundamental conocer qué produce la angiogenesis en los procesos tumorales, así como el desarrollo del mismo. En la actualidad se sitúa a el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores como los principales implicados en la regulación de la formación de los vasos sanguíneos.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos a partir de una red vascular preexistente (primaria). Es un proceso con múltiples fases en las que se engloba la migración y proliferación de las células endoteliales (ECs), la formación y organización de los grupos celulares en estructuras tubulares que madurarán formando estructuras estables.

Es necesario que se formen estas redes vasculares para conseguir que todas las células en crecimiento tengan un suministro de oxígeno y nutrientes así como un sistema de eliminación de productos del catabolismo y un sistema de diseminación por la circulación sanguínea.

La formación de esta red vascular se lleva a cabo por diferentes mecanismos:

1. Linfangiogénesis o formación de nuevos vasos linfáticos.
2. Arteriogénesis o formación de nuevas arterias.
3. Vasculogénesis, consiste en la formación de novo de los vasos sanguíneos. Este proceso ocurre en el periodo embrionario principalmente a partir de células progenitoras multipotentes (1)(2). En la etapa adulta la vasculogénesis es un proceso en reposo (3)

4. Angiogénesis. Se encarga de la formación de la red secundaria a partir de la primaria formada mediante el proceso de vasculogénesis. Se puede producir por estímulos hormonales, como ocurre en la menstruación, embarazo o también puede aparecer en el proceso de curación de heridas. Por lo general la angiogénesis es un proceso que está en reposo en el adulto. (3) (4) (5)

Las células implicadas en la formación de los procesos vasculares son:

- 1) Precursores de las células endoteliales: son células no diferenciadas que se sintetizan en la médula ósea. Estas células viajan a los puntos donde se está produciendo el proceso angiogénico, una vez en el foco donde se está produciendo el brote estas células maduran dando lugar a células endoteliales. (3)
- 2) Células endoteliales: son células poliédricas, nucleadas que se encuentran recubriendo los vasos sanguíneos. Son capaces de sintetizar numerosas sustancias (óxido nítrico, endotelina-1, prostaglandinas...), que pueden tener acción autocrina o paracrina, regulando de esta manera distintos procesos.
- 3) Células perivasculares o murales: son las células encargadas de rodear las células endoteliales. (3)
  - a. Pericitos: Son células murales multipotenciales, derivan del mesodermo (son células mesenquimáticas). Se pueden encontrar en la zona adyacente y alrededor del endotelio. Morfológicamente son células alargadas que se disponen alrededor y a lo largo de las células endoteliales; están rodeados por una membrana basal y emiten prolongaciones. Entre sus funciones se encuentra: ser soporte estructural de la pared capilar, síntesis de la membrana basal vascular, regulación del crecimiento de nuevos capilares, regulación de la permeabilidad vascular y contracción vascular. Los pericitos son capaces de reducir la proliferación endotelial durante el proceso de angiogénesis y disminuyen la dependencia a las señales que activan el proceso. (3) (6) (7)
  - b. Células del músculo liso: su unión con los pericitos permite aportar estabilidad al vaso sanguíneo. (3)

El proceso angiogénico puede producirse en condiciones fisiológicas y patológicas. En situación fisiológica aparece en etapas tempranas en el proceso embrionario y en el crecimiento del esqueleto. En la fase adulta aparece sobre todo en las mujeres por estímulos hormonales como ocurre en la menstruación y en el embarazo. También tiene un papel importante en la curación de heridas. La angiogénesis fisiológica se caracteriza por ser un proceso autolimitado en el tiempo y generalmente de tipo focal. (7)

En condiciones patológicas puede ocurrir por:

- Defecto: en este caso hay un aumento de la inhibición del proceso angiogénico, provocado por una disminución de las señales que activan la angiogénesis o por un aumento de las señales inhibitorias. Algunos ejemplos son: las úlceras, isquemia cerebral y de miocardio.
- Por exceso: en este caso se produce lo contrario, las señales de activación angiogénica están potenciadas con respecto a las inhibitorias. Algunos ejemplos son la neovascularización, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis y el cáncer. (8)

Al contrario de lo que ocurre con la angiogénesis fisiológica la patológica puede durar años (7). Los vasos que aparecen cuando hay un exceso de angiogénesis presentan una estructura y función diferente a la de los vasos normales tanto en su arquitectura como en el flujo sanguíneo que son capaces de llevar. Presentan una vasculatura muy desorganizada, los vasos son tortuosos y dilatados, con un diámetro desigual, excesiva ramificaciones y derivaciones. Se pueden apreciar fenestraciones endoteliales, vesículas y poros transcelulares. Esto produce que el flujo en el tumor sea caótico y variable. (8)

Como ya se ha comentado uno de los procesos donde se ve alterado el mecanismo angiogénico es en los tumores. Los tumores se caracterizan por presentar células con un crecimiento descontrolado y podemos distinguir varias fases en el proceso de formación del tumor (7)(9):

- 1) Acumulación progresiva de mutaciones: una célula sana pasa a ser tumoral cuando durante un tiempo prolongado se ha producido una acumulación de mutaciones. Se ha observado que una sola mutación no es suficiente para que se produzca una célula tumoral.

- 2) La célula tumoral crece de forma descontrolada y no responde a las señales inhibitoras del crecimiento.
- 3) La evasión de la muerte programada (apoptosis).
- 4) Aumento de la replicación del ADN; proliferación celular.
- 5) Adquisición de capacidad invasiva
- 6) Angiogénesis.
- 7) Metástasis.

La angiogénesis no es la responsable de iniciar el proceso de malignización pero es necesaria para que se produzca el proceso de crecimiento del tumor y la metástasis.

El primero en hablar del concepto de angiogénesis y su importancia en los procesos tumorales fue Judah Folkman en 1971 que describió que podía existir una relación clara entre el crecimiento de las células tumorales y el crecimiento de nuevas redes vasculares. Apreció que en los procesos tumorales había una activación de la proliferación endotelial y que esta tenía implicación en el aumento del crecimiento tumoral. Propuso que tenía que ser el propio tumor el que enviará señales para que se creara la nueva red vascular a partir de la vasculatura preexistente. Además afirmó que el tumor era más dependiente de esta red vascular de lo que se creía previamente, de manera que sin esta red vascular el tumor no podría sobrepasar un tamaño de aproximadamente 2 mm. Esta afirmación ha sido confirmada por los médicos forenses que describen en las autopsias la presencia de tumores en estado de latencia, con un tamaño inferior o igual a 2 mm, debido a que no se generó esta red vascular que permitiera el crecimiento de las células. Se vio que la mitosis de las células tumorales aumentaba y disminuía según la distancia a estos capilares vasculares.

J. Folkman propuso por primera vez la existencia de un factor de angiogénesis tumoral (TAF) que es un mitógeno estimulado por las células endoteliales y que es capaz de generar un rápido crecimiento de los vasos. Por tanto si los niveles de TAF disminuyen el crecimiento de la red vascular disminuye. Si se forma esta red vascular el tumor tendría el oxígeno y los nutrientes necesarios para crecer y una vía de eliminación de sus productos de desecho, lo que permitiría un crecimiento. A nivel terapéutico se presentaba como un posible punto clave para la inhibición del proceso tumoral. Propuso para ello el término “anti-angiogenesis” con la que se evitaría que el tumor llegue a formar estas redes vasculares consiguiendo por tanto eludir los procesos de crecimiento y metástasis. El uso de la terapia antiangiogénica produciría unos vasos más vulnerables y sensibles y el tratamiento combinado con quimioterapia se

potenciaría. Además planteó no solo una vía novedosa en el tratamiento de los tumores, sino un gran interrogante acerca de todos los procesos que llevan a la producción de la angiogénesis, ya que no conocía ni las vías ni los factores implicados en el mismo. (1)

A partir de esto, numerosos esfuerzos fueron encaminados a intentar comprender los mecanismos moleculares de la angiogénesis, así como a desarrollar terapias antiangiogénicas.

## OBJETIVOS

Para la realización de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica sobre los siguientes conceptos:

- Angiogenesis tumoral: definición, células implicadas en el proceso de formación de los vasos; antecedentes históricos e importancia del proceso angiogénico.
- Factores activadores del proceso de angiogenesis tumoral, realizando el estudio detallado de VEGF y sus receptores.
- Factores desencadenantes de la angiogenesis tumoral: hipoxia y HIF.

## METODOLOGÍA

Este trabajo se centra en la recopilación de información acerca de los mecanismos moleculares que se producen en el proceso de angiogenesis tumoral, los principales mediadores implicados y la regulación de los mismos.

La búsqueda bibliográfica ha sido realizada a través de PubMed, con un marco temporal de 2010 a la actualidad.

Los criterios de búsqueda seguidos han sido los propios objetivos del trabajo, usando como palabras clave angiogenesis, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) y el factor inducible por hipoxia (HIF).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se está formando un tumor se pueden distinguir dos etapas, una primera etapa en la que el tumor se encuentra en una fase avascular que corresponde a pequeños tumores que están latentes, en un estado de transición entre la proliferación y la apoptosis. Los tumores que se encuentran en estado de latencia tienen un tamaño entorno a los 2mm. La segunda fase sería una fase vascular donde se puede observar un tumor vascularizado, en crecimiento y con un tamaño superior a 5-10mm. Una vez que el tumor se encuentra en esta fase vascular también aumenta el riesgo de que aparezca metástasis. Es la angiogénesis por tanto el punto clave para pasar de un tumor avascular de pequeño tamaño a un tumor en fase vascular que es capaz de proliferar. Se cree que los tumores avasculares o latentes aunque lleven tiempo en esta fase pueden ser capaces de generar señales que activen la angiogénesis pasando a ser vasculares. Las células tumorales al igual que las normales necesitan un aporte de nutrientes y oxígeno para que se produzca el crecimiento, siendo imprescindible la vascularización para conseguir estos requerimientos. (3)(10)(8)

### Regulación de la angiogénesis:

El proceso de angiogenesis está controlado por factores pro-angiogénicos que producen una activación de la misma (“*switch on*”) y por factores anti-angiogénicos que la inhiben (“*switch off*”). Este control de la angiogenesis es conocido como hipótesis de la balanza. Por tanto en los procesos en los que se genera una red vascular será necesario que los factores pro-angiogénicos sean superiores a los anti-angiogénicos. Un exceso de factores pro-angiogénicos conllevaría un crecimiento desmesurado de la red vascular mientras que un aumento en los factores anti-angiogénicos produciría zonas de isquemia donde no llega la red vascular (3)(4)(8)

FACTORES PRO-ANGIOGÉNICOS	FACTORES ANTI-ANGIOGÉNICOS
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	Angiostatina
Factor de crecimiento de fibroblastos	Vasostatina
Factor de necrosis tumoral	Endostatina
Factor de crecimiento epidérmico	Angiorestina
Factor de crecimiento de hepatocitos	Anti-trombina
Angiopoetina-1 y 2	Calreticulina
Interleucina-1 $\beta$ ,8	PEX
Activador de plasminógeno urocinasa	Trombospondina-1,2
BV8	Semaforina 3F
Integrinas	Interferon-alfa,beta y gamma
Metaloproteasas de la matriz	IL-10, IL-4,IL-12 e IL-18
Factor de crecimiento insulínico tipo 1	Prolactina
Factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1)	Meth1 y 2
mTOR	Inhibidores tisulares metaloproteinasas
VE-cadherina	Factor inhibidor de cartílago
	Angiopoyetina
	sNRP
	sFLT-1
	Fragmento SPARC

Tabla 1 (7) (8)(9)

El principal factor pro-angiogénico es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este factor fue caracterizado en 1983 por Senger et al., que identificaron un polipéptido al que llamaron factor de permeabilidad vascular (VPF) (11), porque parecía ser el responsable del aumento de permeabilidad en la vasculatura del tumor. Posteriormente en 1989, Ferrara y Henzel (12) informaron del aislamiento de un mitógeno endotelial potente, al que llamaron factor de crecimiento endotelial vascular. La caracterización de ambas moléculas demostró que se trataba de la misma proteína y se adoptó el nombre de VEGF (7).



### Fases del proceso angiogénico:

El tumor en fase avascular produce una serie de factores que conllevan la movilización de los precursores de las células endoteliales desde la médula ósea y la activación de las células endoteliales. Los factores desencadenantes de esta activación son la hipoxia y la secreción de factores pro-angiogénicos que hacen que las células endoteliales expresen receptores para estas proteínas pro-angiogénicas, y esta unión ligando-receptor es la responsable de la activación de las células endoteliales. Cuando se activan las células endoteliales se producen diferentes uniones célula-célula (VE-cadherina, ZO-1 y otros) y la membrana basal sufre procesos de remodelación principalmente por la acción de las metaloproteasas de la matriz (MMPs). Las MMPs degradan la matriz y permiten la movilización de factores proangiogénicos del estroma. Por tanto lo primero que ocurre es un desprendimiento de los pericitos, al que le sigue un proceso de dilatación y una mayor permeabilidad vascular que permite que los factores pro-angiogénicos interactúen con sus receptores.

Una vez que se han desprendido los pericitos, las células endoteliales migran al espacio perivascular, a continuación proliferan en fila, formándose así una columna de migración. Las células endoteliales se van uniendo unas a otras formando el lumen del nuevo vaso. Por último se produce la formación y fijación de pericitos. Una vez formado el brote se fusiona con otros brotes vecinos consiguiendo un sistema de circulación cerrado, se cree que en esta unión juegan un papel importante los macrófagos asociados al tumor (TAM).

La célula que guía el proceso de formación del vaso se conoce como célula punta, es la encargada de guiar la proliferación en el sentido de las señales pro-angiogénicas y las células endoteliales que van formando el nuevo vaso se conocen como células del tallo. Cuando dos células puntas de brotes distintos se encuentran próximas se produce la fusión de los mismos.

Una vez que se ha formado el nuevo vaso, las células endoteliales pasan a ser células quiescentes de la falange, depósitos en la membrana basal, se establecen como barrera y están recubiertas por pericitos maduros. Las células permanecen en este estado hasta que vuelven a ser estimuladas por quimiocinas secretadas por una célula hipóxica por estímulos angiogénicos (5) (13) (14).

Es por tanto un punto crítico en la angiogénesis tumoral la comunicación entre el tumor y las células endoteliales. (15)

## VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

El principal regulador de la angiogenesis y que actúa como factor proangiogénico es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

La familia VEGF presenta funciones como actividad mitógena, efectos sobre la médula ósea y la hematopoyesis que incluyen la formación de colonias reforzadas por subconjuntos de células maduras progenitoras de granulocitos-macrófagos, aumento de la producción de las células tipo B, e induce la formación de células mieloides inmaduras. Presenta gran influencia en la permeabilidad vascular, diferenciación endotelial, proliferación, migración y formación del vaso. También se ve implicado en el proceso de apoptosis de las células endoteliales.(7)

La familia VEGF es una familia de proteínas constituida por cinco miembros (14):

- VEGF-A: es el miembro principal de esta familia de proteínas, de manera que cuando se habla de VEGF se está hablando de este factor. VEGF-A es codificado por un solo gen organizado en ocho exones separados por siete intrones con 14 kbases de longitud. Es una glicoproteína homodimérica de 45 KDa. El pre-RNAm está diferenciado, lo que origina dos familias hermanas de proteínas, además cada familia cuenta con múltiples isoformas cada una con un número diferente de aminoácidos debido al mecanismo de procesamiento alternativo que se produce en los exones 6, 7 y 8.

El procesamiento alternativo en el exón 8, que codifica los dominios de unión a heparina, conduce a la formación de dos subexones: el subexón 8a y el 8b. Estos dos subexones dan lugar a dos subfamilias a su vez, la familia VEGF<sub>xxx</sub> engloba aquellas proteínas que tienen un efecto pro-angiogénico, mientras que VEGF<sub>xxx</sub>b va englobar las proteínas que presentan una acción anti-angiogénica. Las proteínas de la familia VEGF<sub>xxx</sub>b se van a unir al receptor de VEGF de una manera competitiva pero no consiguen que se active, presentando así esa acción anti-angiogénica.

Dentro de estas familias se han identificado distintas isoformas. La isoforma más abundante es VEGF<sub>165</sub>, aunque se han identificado otras isoformas como la 121,145, 183,189,206. VEGF<sub>165</sub> se une al receptor induciendo un cambio conformacional que produce:

- 1) Una rotación interna del dominio intracelular,

2) Que conlleva una dimerización del receptor y la recolocación del dominio quinasa por la rotación del dímero

3) Induce la autofosforilación.

Al contrario de lo que ocurre con la isoforma VEGF165, la isoforma VEGF165b no ejerce efecto pleno sobre la rotación y en consecuencia se consigue un bloqueo del ATP impidiendo que se una, se inactiva y no se produce una autofosforilación eficiente.

Se ha observado que la isoforma VEGF165 está aumentada en procesos tumorales mientras que VEGF165b está disminuida, favoreciendo el proceso angiogénico (2)(9)(7).

- VEGF-B: sus funciones aún no están muy definidas, se ha visto que tiene un papel importante en la captación de ácidos grasos en las células endoteliales, crítica en órganos con alto estrés metabólico como el corazón. (10)
- VEGF-C: es un potente factor de permeabilidad, aunque no llega a conseguir los niveles de permeabilización vascular que consigue VEGF-A. Se sintetiza como un dímero pre-peptido con tamaño de 61kDa por subunidad, que mediante la maduración proteolítica forma un homodímero de 21kDa. (2)
- VEGF-D: Compuesto linfangiogénico de menor potencia que el VEGF-C. Tanto VEGF-C como VEGF-D son compuestos necesarios para el desarrollo del sistema linfático, se cree que inducen la angiogénesis y aumentan la permeabilidad vascular. Los dos son sintetizados como pre-proteínas que deben ser procesadas a nivel post-traduccionales. Ambos se relacionan con las células neuroendócrinas (NE). (2)
- Factor de crecimiento plaquetario (PIGF): Podemos encontrar cuatro isoformas de este factor. Entre sus funciones destaca la estimulación del crecimiento de vasos y la maduración de los mismos, ya que presenta un efecto directo sobre las células endoteliales y murales. También es capaz de atraer a los macrófagos a los puntos donde se está produciendo un brote angiogénico o linfangiogénico e inhibe la diferenciación de las células dendríticas. Su papel en la estimulación angiogénica se debe a la producción de un aumento de las concentraciones de VEGF y a una potenciación de su acción, esto se traduce en una mejora de la capacidad de respuesta de las células endoteliales a los estímulos angiogénicos. (16)

### Receptor de VEGF (VEGFR):

El proceso de señalización se lleva a cabo por la interacción de las distintas proteínas de la familia VEGF con sus receptores específicos. Estos receptores presentan actividad tirosina quinasa y son: VEGFR1, VEGFR2 Y VEGFR3. Su estructura presenta en común siete dominios homólogos a inmunoglobulina (Ig) en su parte extracelular, una región transmembrana, un dominio yuxtamembranal y dominio intracelular de señalización tirosina quinasa interrumpido por un dominio quinasa de 69 aminoácidos y la región carboxi-terminal. Los primeros dominios homólogos a Ig constituyen la región de unión a ligando, mientras que las regiones del cuarto al séptimo dominio son esenciales para la dimerización del receptor.

Las características de los receptores vienen recogidas en la siguiente tabla (2)(4)(10):

<b>RECEPTOR</b>	<b>VEGFR1</b>	<b>VEGFR2</b>	<b>VEGFR3</b>
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	Tamaño: 180KDa  Por procesos de corte y empalme del RNAm se puede dar lugar a un receptor soluble que solo presenta seis dominios extracelulares.	Tamaño: 230KDa  También podemos encontrar un receptor soluble que solo presenta seis dominios extracelulares.	Tamaño: 180KDa
<b>DÓNDE SE ENCUENTRA EXPRESADO</b>	Células trofoblásticas, células mesenquiales renales, músculo liso vascular, células dendríticas, monocitos y macrófagos.	Células endoteliales	Células endoteliales linfáticas
<b>LIGANDOS</b>	VEGFA, PIGF1 y 2, VEGFB	VEGFA y VEGFC	VEGFC y VEGFD
<b>DOMINIO DE UNIÓN</b>	Bucle 2, pero 1 y 3 también son necesarios.	Bucle 2 y 3	Bucle 1 y 2
<b>FUNCIÓN</b>	Reclutamiento de células inmune, recambio de ácidos grasos e inhibición de la angiogénesis	Angiogénesis	Linfagiogénesis

Para que las acciones de estos ligandos se lleven a cabo es necesario que se produzca la dimerización del receptor, como ya se ha comentado anteriormente esta dimerización se produce por los dominios 4-7 del dominio homólogo a Ig. El proceso de dimerización conlleva la exposición del sitio de unión a ATP del dominio quinasa, seguido de la unión del ATP a su lugar de unión y por mecanismos de trans y autofosforilación se fosforila los residuos de tirosina.

Las posibles combinaciones de dímeros que se pueden formar son las siguientes:

- Homodímero VEGFR1-VEGFR1.
- Homodímero VEGFR2-VEGFR2.
- Homodímero VEGFR3-VEGFR3.
- Heterodímero VEGFR1-VEGFR2.
- Heterodímero VEGFR2-VEGFR3

Los receptores solubles de VEGFR1 y VEGFR2 también forman homodímeros entre ellos.

El mayor efecto angiogénico se produce por la interacción de VEGFA con el homodímero VEGFR2-VEGFR2. Esta unión ligando-receptor justifica las acciones que se le atribuyen a VEGF a nivel angiogénico:

- Permeabilidad vascular: VEGFA al unirse a su receptor VEGFR2 promueve la extravasación de proteínas, esto se consigue mediante la creación de poros transcelulares endoteliales y la apertura transitoria de las uniones endoteliales. La apertura de las uniones endoteliales célula-célula se cree que es debido a la fosforilación de las uniones VE-cadherina. Paralelamente se produce la activación de la enzima óxido sintasa endotelial (eNOS) sintetizando óxido nítrico que es un potente vasodilatador.(10)

Cuando VEGFA se une al heterodímero formado por VEGFR1/2 se regula los genes que codifican para MMPs, activador tisular de plasminógeno e integrina  $\beta 3$  de las células endoteliales. (10)

- Estimulación de la célula punta mediante la internalización del receptor y activación de la vía mitógena Ras/Raf/ ERK vía MAPK. Se cree que la rápida rotación del receptor y la señalización inmediata es esencial para que las células endoteliales sean capaces de responder con rapidez a los estímulos angiogénicos. (10)(13)

- Regulación de la formación del tallo en el proceso de formación del nuevo brote. En las células endoteliales que presentan VEGFR2 activado se ha observado un aumento en la expresión del ligando 4 Notch Delta (DLL4), DLL4 se une a los receptores que se encuentran en las células endoteliales vecinas y se produce una comunicación a través del dominio intracelular de Notch (NICD). NICD tiene una regulación negativa de la expresión de VEGFR2 sirviendo como control del proceso. (10)(13)
- Aumenta la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y A1, consiguiendo la supervivencia de las células endoteliales.

Se debe tener en cuenta que cuando el receptor (VEGFR2) se internaliza puede ser degradado o puede ser reciclado. Cuando VEGFR2 está internalizado en los endosomas continúa señalizando. Si se disminuye la degradación de VEGFR2 se está consiguiendo mantener la señal y por tanto las acciones de VEGFA.

Además de todos los receptores explicados anteriormente, algunos VEGFs también pueden unirse a co-receptores como las neuropilinas (NRPs). Los NRPs son también receptores glicoproteicos que no presentan actividad quinasa, que se encuentran ubicados en la superficie celular. Sus ligandos de unión son las semaforinas, PIGF-2, VEGF-A165, VEGF-B y VEGF-E. Se pueden distinguir dos tipos NRP-1 y NRP-2, NRP1 aparece principalmente en arterias y venas mientras que NRP2 aparece en vasos linfáticos.

NRP-1 contiene una cola intracitoplasmática corta y aumenta la unión del VEGF-A165 con el VEGFR-2, actuando como co-receptor. Potencian la estimulación de las células punta mediada por VEGFR-2. También participa en el aumento de la permeabilidad así como en la formación de las estructuras tridimensionales. (10)

Como se ha mencionado anteriormente NICD es el encargado de regular la transcripción y al igual que ocurría con los niveles de VEGFR-2 también produce una disminución de los niveles de NRP1, aunque aumenta los niveles de VEGFR-1. La afinidad de VEGFA por VEGFR1 es superior a la que presenta por VEGFR2, por eso todo el VEGFA que se una a VEGFR1 no se une a VEGFR2 produciendo una regulación negativa de la actividad del mismo. (2)(13)

Se cree que la regulación autocrina del proceso conlleva que el propio VEGF aumente la supervivencia de las células tumorales, aumentando así la invasividad y expresando receptores VEGFR1, VEGFR-2 y NRP-1. (7) (14)

### Regulación de la angiogénesis:

Las concentraciones de VEGF están reguladas por factores como (7)(8):

- Estrés metabólico como hipoxia y un bajo pH
- Mecanismos de estrés como puede ser la proliferación celular.
- Inducción por hormonas como la hormona estimulante del tiroides, la hormona adenocorticotropa, gonadotropinas y andrógenos.
- Respuesta inmune e inflamatoria.
- Mutaciones genéticas como por ejemplo la activación de un oncogen como H-ras, Myc, HER-2 y en los genes supresores como p53 o BVS .

La hipoxia es uno de los principales factores que regulan la síntesis de VEGF, la situación hipóxica aparece debido a que el tumor crece a zonas donde no hay una vascularización adecuada. Aunque en las células tumorales es menor el requerimiento de oxígeno sigue siendo necesario que haya una cantidad del mismo para que se produzca el crecimiento. (3) (7)

Si el oxígeno no es suministrado de forma correcta se expresan varios factores inducibles por hipoxia, en particular el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), así como otras moléculas como mTOR, quinasas asociadas a retículo endoplasmático y guanilatociclasas .

El factor HIF-1 puede ser inducido también por otros factores como: el factor de necrosis tumoral, interleucina-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y oncogenes.

HIF-1 es un heterodímero que contiene una subunidad expresada constitutivamente llamada HIF-1 $\beta$  y una subunidad que es inducible que es la que está verdaderamente regulada por los niveles de oxígeno, HIF- $\alpha$ . Tienen una región básica que permite la unión específica a la secuencia de ADN, que forma el elemento de respuesta a hipoxia (HRE). Presenta un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) que es el que regula la estabilidad de la proteína.

En respuesta a la hipoxia sus niveles de ARNm apenas se ven aumentados pero los niveles de proteína se elevan bruscamente. La regulación de este factor está relacionada principalmente con la degradación del oxígeno. En procesos de normoxia, HIF- $\alpha$  se degrada de forma rápida. La degradación de HIF-1 $\alpha$  se regula mediante procesos de hidroxilación, ubiquitinación, acetilación y fosforilación. Cuando existen condiciones de normoxia y es necesario que se degrade HIF-1 $\alpha$  se hidroxila mediante prolil-hidroxilasas (PHD) en el dominio ODDD, se produce su unión al complejo E3 ubiquitina-ligasa de Von Hippel-Lindau (VHL). La ubiquitinación de HIF es reconocidas por el proteosoma y degradado. Además, con la

hidroxilación de un residuo de asparragina en el dominio de transactivación carboxiterminal se impide que HIF-1 $\alpha$  ejerza su actividad. (5)(7).

En la situación de hipoxia lo que ocurre es que se estabiliza y se transloca al citoplasma del núcleo, donde dimeriza con HIF- $\beta$ , y el complejo se transforma en un complejo transcripcionalmente activo. Este complejo interactúa con HRE en los promotores de los genes diana, que produce que se transcriban los genes con la colaboración de los coactivadores.

Una vez que se ha ido produciendo la angiogénesis y por tanto la formación de nuevos vasos que sean capaces de llevar los nutrientes y el oxígeno, se conseguirá que la situación de hipoxia sea revertida y se pase a normoxia disminuyendo las señales angiogénicas. (13)



## CONCLUSIONES:

La angiogénesis es por tanto un factor determinante dentro del proceso de tumoración, determinando el paso de un tumor avascular sin apenas crecimiento a un tumor vascular con alta capacidad proliferativa y metastásica.

El principal factor implicado en la angiogenesis es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Su acción se ve regulada principalmente por la hipoxia y el factor inducido por hipoxia HIF, concretamente la subunidad  $1\alpha$  es la que lleva a cabo esta actividad.

Se ha comprobado que la aparición de altos niveles de VEGF en los pacientes con cáncer se asocia a pobres resultados clínicos, incluyendo la reducción de la supervivencia.

Todo esto nos plantea que una inhibición en los procesos que inducen la expresión de VEGF, una inhibición del propio VEGF o incluso un bloqueo de sus receptores, principalmente un bloqueo de VEGFR-2, pueden ser útiles para conseguir una disminución de la progresión tumoral y de los procesos de metástasis. Al constituir VEGF dos familias de proteínas, una proangiogénica y una angiogénica, podría la familia VEGFxxx<sub>b</sub>, concretamente la isoforma 165<sub>b</sub> ser un foco de resistencias.

Se debe tener en cuenta que el proceso angiogénico se basa en un balance entre los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos conocido como la hipótesis de la balanza, esto nos lleva a pensar que la inhibición de un factor pro-angiogénico puede ser compensado por la suma del resto de factores pro-angiogénicos.

Actualmente ya se están usando terapias anti-angiogénicas junto con otros tipos de quimioterapia en los procesos tumorales con resultados positivos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sherwood, L., Parris, E. and Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285 (21), pp. 1182-1186.
2. Martínez-Ezquerro, J. Herrera, LA. (2006) Angiogénesis:VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología 1*: 83-96.
3. Bergers, G. and Benjamin, L. (2003). Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), pp.401-410.
4. Roa, I. (2014) Conceptos básicos en angiogénesis tumoral. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 1(2): 129-138.
5. Garrido Martín., E. (2011). Estudio de la regulación transcripcional de ALK1, receptor tipo de TFG-beta, en la célula endotelial. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid.
6. Montiel-Eulefi, E., Barrientos Díaz, L., Leal, P., Roa, J., Risopatrón, J., Salazar, L., Romero, F. and Sánchez, R. (2011). Los Pericitos: Nuevos Enfoques en la Terapia Regenerativa, Patología Cerebrovascular y Cáncer. *Int. J. Morphol.*, 29(3), pp.769-781.
7. Amini, A., Masoumi Moghaddam, S., L. Morris, D. and H. Pourgholami, M. (2012). The Critical Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Tumor Angiogenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 12(1), pp.23-43.
8. Peter Carmeliet & Rakesh K. Jain (2000) Angiogénesis in cáncer and other diseases. *Nature* 407,249-257.
9. Biselli-Chicote, P., Oliveira, A., Pavarino, E. and Goloni-Bertollo, E. (2011). VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(3), pp.363-370.
10. Kottch, S., Claesson-Welsh, L. (2012) Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb perspective Medicine* Jul;2 (7) :a006502.
11. Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Harvey, S.; Dvorak, H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219 (4587), 983-985.
12. Ferrara, N., Henzel, W. J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 161 (2), 851-858.

13. Welte, J., Loges, S., Dimmeler, S. and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 123(8), pp.3190-3200.
14. Carmeliet, P. and Jain, R. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), pp.298-307.
15. Lopes-Bastos, BM., et al (2016) Tumor-Endothelial Cell Communications: Important and Indispensable Mediators of Tumor Angiogenesis. *Anticancer Research* 36:1119-1126.
16. Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B. and Carmeliet, P. (2008). FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), pp.942-956.