

11227



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

"DETECCION DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II ATI
EN TUMORES MALIGNOS DE MAMA Y SU
CORRELACION CLINICA PATOLOGICA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DRA. ALEJANDRA ARMENGOL ALONSO



MEXICO D. F.

SEPTIEMBRE 2005

0348763



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRAN

**"Detección del receptor de Angiotensina II AT1
en tumores malignos de mama y su correlación clínico
patológica"**

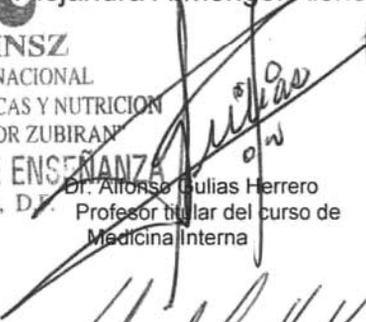
TESIS

Que para obtener el título de especialista en medicina interna
presenta:

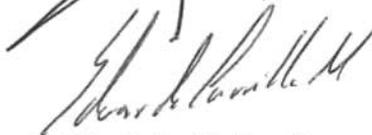
Dra. Alejandra Armengol Alonso


INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
DR. SALVADOR ZUBIRAN
DIRECCION DE ENSEÑANZA


Dr. Luis F. Useaanga Domínguez
Director de Enseñanza.


Dr. Alfonso Guilius Herrero
Profesor titular del curso de
Medicina Interna


Dr. Oscar Arrieta Rodríguez
Asesor de Tesis.


Dr. Eduardo Carrillo Maravilla
Asesor de Tesis.

Dedicatoria

A Ignacio, a mis padres y a todos aquellos que han contribuido a mi formación como médico.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alejandro Arango Alonso

FECHA: 30/09/05

FIRMA: Alejandro Arango Alonso

Contenido

- I Resumen
- II Antecedentes
- III Justificación
- IV Hipótesis
- IV Objetivo general y específicos
- V Pacientes y métodos
- VI Resultados
- VII Discusión
- VIII Tablas y figuras.
- IX Bibliografía

Resumen

ANTECEDENTES. El cáncer de mama es uno de los principales problemas médicos a nivel mundial cuya incidencia ha ido en aumento en los últimos años. A pesar del avance científico en el conocimiento de la biología de esta neoplasia, es importante determinar otros marcadores moleculares con valor pronóstico y potenciales blancos terapéuticos. Angiotensina II (ANG II) es el principal péptido efector del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. ANGII tiene múltiples efectos fisiológicos a nivel sistémico y local, y es conocida como un regulador de la proliferación e hipertrofia de células de músculo liso vascular y cardíaco. Recientes estudios han demostrado que ANG II es también un factor angiogénico en modelos experimentales no tumorales. El receptor AT1 está asociado con proliferación celular y el receptor AT2, con apoptosis. Se demostró que células de glioma maligno expresan el receptor AT1 y AT2. Adicionalmente, se ha demostrado que el bloqueo selectivo de AT1 inhibe el crecimiento tumoral, la proliferación celular y la angiogénesis *in vivo*; además de inducir apoptosis. Estudios de los subtipos de receptores de ANG II en el adenocarcinoma de mama en ratones han mostrado una alta expresión de AT1; sin embargo, no se ha estudiado la frecuencia de expresión de estos receptores en cáncer de mama, ni su papel pronóstico.

OBJETIVOS. Determinar la presencia del receptor AT1 en cáncer de mama humano, resecado por mastectomía radical modificada o cirugía conservadora;

asociar su presencia con el grado de malignidad, vascularización, proliferación celular, presencia de receptores de estrógenos y progesterona, así como sobrevida libre de enfermedad (SLE).

MATERIAL Y MÉTODOS. Entre 2000 y 2004 se recolectaron 83 tumores malignos de mama provenientes de pacientes sometidas a cirugía, todos diagnosticados como carcinoma canalicular de mama. Se excluyeron pacientes tratadas previamente con quimioterapia o radioterapia neoadyuvante. El tejido se mantuvo congelado a -70°C hasta su procesamiento. Se realizó análisis histopatológico de las muestras así como determinación del receptor AT1 por RT-PCR e inmunohistoquímica. Adicionalmente, se incluyeron tumores de mama preservados en parafina con panel inmunohistoquímico completo para realizar determinación de AT1 por inmunohistoquímica. También se incluyeron 7 biopsias de mama sin diagnóstico de malignidad (fibromas).

RESULTADOS. Se encontró expresión de AT1 en 66% de los tumores analizados.; contrario al 0% de los tumores benignos ($p=0.01$) No existieron diferencias entre la expresión de AT1 y edad, estadio patológico ó grado de diferenciación. Los tumores con expresión estrogénica tienen una mayor expresión de receptores AT1 ($p=0.024$). Las recaídas por cáncer de mama fueron mayores en pacientes con expresión de AT1 (85.7%) comparado con aquellas mujeres con AT1 negativo (14.2%). Los factores asociados a sobrevida libre de enfermedad (SLE) fueron el estadio patológico ($p=0.03$) , el grado de diferenciación ($p=0.05$) y la expresión del receptor AT1 ($p=0.0012$).

CONCLUSIONES. Existe una alta expresión de receptores AT1 en cáncer de mama. Los receptores AT1 podrían participar en los mecanismos de proliferación celular en cáncer de mama y probablemente jugar un papel importante en su fisiopatología, por lo que es un potencial blanco terapéutico. Además la presencia de receptor AT1 podría ser un marcador pronóstico de sobrevida.

ANTECEDENTES

Cáncer de Mama

El cáncer de mama es uno de los principales problemas médicos a nivel mundial, su incidencia ha ido en aumento en los últimos años. Es cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en las mujeres de los Estados Unidos de Norteamérica, implicando 211 300 casos nuevos y 39 800 muertes en el 2003 (Jemal A, 2003). El riesgo de una mujer para desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida se estima de 1 en 8. En México ocupa el segundo lugar en frecuencia de todas las neoplasias malignas con un 16.1% (9563 casos), ocupando el segundo lugar con un 6.9% en la mortalidad por cáncer en mujeres (Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas 1999, Dirección General de epidemiología, Secretaría de Salud). En los últimos 30 años, se han realizado importantes avances en la comprensión de la biología de este tipo de neoplasia (Hortobagyi 1998).

El pronóstico de esta entidad depende de múltiples factores como es el estadio; la edad; el grado de diferenciación; proliferación celular; sobreexpresión de diferentes genes, como HER2/*neu* y ciclina E (Keyomarsi K, 2002); y ausencia de receptores hormonales, particularmente el receptor de estrógenos y progesterona. Estos marcadores no sólo son predictores de respuesta al tratamiento e indicadores de supervivencia libre de enfermedad y global, sino que también es el fundamento de modalidades terapéuticas como el uso de anticuerpos contra el factor de crecimiento epidérmico en pacientes con presencia de HER2/*neu*

(Slamon D. J., 2001) o el tratamiento adyuvante o paliativo hormonal con bloqueadores de receptores de estrógenos como tamoxifeno; de ahí que la detección de estos receptores se ha convertido en un estándar en el manejo de pacientes con cáncer de mama (Colditz, 1995; Jordan, 2000.)

A pesar del avance científico hasta ahora obtenido, el cáncer de mama continua siendo un problema de salud pública a nivel mundial, con alta mortalidad; por lo que es importante determinar otros marcadores moleculares pronóstico y blancos terapéuticos potenciales.

Angiotensina II y sus receptores

La angiotensina II (ANG II) es el principal péptido efector del sistema renina-angiotensina, que es generado por la activación de angiotensina I a través de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA). La ANG II tiene múltiples efectos fisiológicos; regulación del tono vascular, secreción hormonal, crecimiento de tejido y actividad neuronal. Sus efectos pueden ser a nivel sistémico o local, favoreciendo el crecimiento y diferenciación celular, a través de cuatro tipos de receptores, de los cuales el tipo 1 (AT1) y el tipo 2 (AT2) son los más importantes.

La ANG II fue descrita inicialmente como un péptido vasoconstrictor, pero recientes estudios han demostrado que la ANG II es también un factor de crecimiento. Los niveles de ANG II modulan la contracción, el crecimiento celular, la apoptosis (Bascands, 2001) y su diferenciación, e influye en la migración celular

y en el depósito de la matriz extracelular, además de tener propiedades proinflamatorias, y estimular la producción de otros factores del crecimiento (Escobar 2004) tales como: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidermoide (EGF), factor de crecimiento transformante β (TGF β), IGF-1, factor de crecimiento fibroblástico básico (BFGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Stroth, 1999, Hitoshi, 2002), la angiopoyetina I y el factor activador de plaquetas (PAF); vasoconstrictores (ejemplo: ET-1) y transactivación de receptores de factores de crecimiento (ejemplo: receptor del factor de crecimiento epidermal y el receptor de factor de crecimiento ligado a insulina) (Fujiyama, 2001). Por otro lado, la inducción de la expresión de varios proto-oncogenes en células vasculares de músculo liso de humanos y ratas, incluyendo c-fos, c-jun, c-myc, erg-1, VL-30, y el proto-oncogén activador del complejo de la proteína 1. (Touyz, 2002, Kumar, 2002). Actualmente la ANG II también es conocida como un regulador de la proliferación e hipertrofia de células de músculo liso vascular, actuando como un modulador bifuncional de apoptosis a través de sus receptores AT1 (antiapoptótico) o AT2 (proapoptótico). Los efectos de la ANG II son consecuencia de su interacción con receptores específicos localizados en la superficie de la membrana de las células diana, denominados AT1 y AT2. **Figura 1a.**

La estimulación del receptor AT1 produce efectos cardiovasculares, proliferación celular, apoptosis, y efectos proinflamatorios. Su activación puede controlar el crecimiento de las células del músculo liso vascular a través de la proliferación o

inhibición de apoptosis. Clásicamente el receptor AT1 tiene un efecto antiapoptótico, contrario a AT2. **Tabla 1.**

El receptor AT2 es expresado en tejidos fetales, y disminuye rápidamente después del nacimiento (Touyz, 2002) y juega un papel importante en su crecimiento y desarrollo. En el adulto, se localiza en células adrenales, cerebro, miometrio y células endoteliales (Dzau, 2001, Touyz, 2002). Es re-expresado en condiciones patológicas como hipertrofia miocárdica, así como tras la administración de IECA y BAT1 (Dzau, 2001). La estimulación de los receptores AT2 produce: efectos vasculares como vasodilatación arteriolar cerebral y efectos sobre la proliferación, diferenciación y apoptosis (Wolf, 2002, Walsh 2001). **Tabla 1.**

Angiotensina II y Angiogénesis

Diversos estudios llevaron a la hipótesis de que la ANG II está involucrada en la regulación de la neoformación de vasos sanguíneos. En experimentos de ligadura de la arteria aórtica, se demostró que la administración de ANG II exógena en ratas nefrectomizadas aumentaba la recuperación del flujo sanguíneo en músculo de miembros pélvicos (Fernández, 1985). Además, es capaz de estimular la angiogénesis en la córnea de conejo a partir de circulación colateral (Kaliszewski, 1988; Fernández, 1986). El efecto angiogénico de la ANG II fue demostrado posteriormente en otros modelos de angiogénesis al aumentar la densidad vascular en músculo cremasteriano en ratas (Munzenmaier, 1996), membrana

corioamniótica del embrión de pollo, granuloma esponjoso subcutáneo (Tamarat, 2002) y en implantes de esponja en ratones (Andrade, 1996).

La ANG II tiene diversos mecanismos que pueden incrementar el proceso angiogénico. Primero, la ANG II puede influir en la reacción angiogénica por incremento del FGF, VEGF y PDGF. Segundo, la ANG II puede modular la formación de nuevos vasos por regulación de la producción y activación de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) (Tamarat, 2002). Tercero, la ANG II tiene efectos quimiotácticos sobre monocitos, activación de macrófagos (Achard, 2001) y aumento en la expresión de la proteína ciclooxigenasa-2 (COX-2). Todo esto es importante puesto que la inflamación es considerada generalmente como una respuesta fundamental estimulante para la angiogénesis.

Angiotensina y cáncer

El crecimiento y metástasis de tumores dependen de su habilidad para inducir crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Los tumores inducen angiogénesis a través de la producción de factores pro-angiogénicos por las células tumorales. Es por esto que la ANG II se ha considerado como una molécula altamente involucrada en la patogénesis de cáncer, debido a su importante papel en la angiogénesis. La asociación entre la presencia de angiotensina y cáncer fue sugerida en un estudio retrospectivo basado en 5207 pacientes donde se observó disminución de la incidencia de cáncer en 1559 pacientes que recibían IECA, sugiriendo la participación de ANG II en la proliferación tumoral (Lever, 1998).

Otros estudios han demostrado que los IECA reducen no solo la mortalidad de enfermedades cardiovasculares sino también el riesgo de muerte relacionado con tumores, disminuyendo el riesgo de cáncer en general y en particular del cáncer de mama (Koh, 2003) y del tracto reproductivo femenino (Friis, 2001).

De manera experimental el Sistema Renina-Angiotensina se ha asociado con la proliferación tumoral de neoplasias cerebrales (Rivera 2001). Se han encontrado receptores de ANG II en superficies celulares y citoplasma de tumores humanos como hepatocarcinoma (Yoshihi 2002^a, Yoshihi 2002^b), carcinoma renal (Hii 1998, Miyahima 2002), melanoma (Egami, 2003), carcinoma colorectal (Takeda 2001), sarcoma (Fujimoto, 2001), y cáncer de páncreas (Ohta, 2003). En el laboratorio de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se demostró la presencia del receptor AT1 y AT2 en células de glioblastoma experimental en modelo murino, y se demostró que el bloqueo de AT1 por losartán, disminuye el tamaño tumoral, la proliferación celular, la densidad vascular, así como síntesis de factores de crecimiento e induce apoptosis dependiente de angiotensina (Rivera 2001, Arrieta 2004, Escobar 2004)

Angiotensina y cáncer de mama

Estudios de los subtipos de receptores de ANG II en el adenocarcinoma de mama inducido con medroxiprogesterona en ratones han mostrado una alta expresión del receptor de AT1 en los tumores ductales en contraste con los adenocarcinomas lobulillares, mientras que el receptor AT2 se encontró en tejido conectivo

peritumoral. Adicionalmente, se mostró que la ECA se expresó en todos los adenocarcinomas, principalmente en los ductales (Guerra, 1993). Sin embargo no hay estudios que analicen la expresión del receptor AT1 en pacientes con cáncer de mama ni su asociación con el pronóstico de sobrevida.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diferentes anormalidades moleculares se han asociado con el desarrollo de cáncer de mama invasivo y se han correlacionado con su potencial metastásico como HER-2, ciclina D, receptores de estrógeno y progesterona. Gracias al descubrimiento de estos receptores, el tratamiento con bloqueadores de estrógenos ha modificado significativamente el pronóstico del cáncer de mama. El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de los receptores para ANG II (AT1) por medio de RT-PCR en tumores de cáncer de mama y correlacionar su expresión con factores clínicos e histopatológicos, así como la sobrevida libre de enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud muy relevante en nuestro país y a nivel mundial. Considerando las opciones terapéuticas hasta hoy existentes, es de vital importancia buscar nuevas y mejores alternativas para el tratamiento de esta patología. La angiotensina II tiene diversos efectos, entre ellos angiogénesis e inducción de apoptosis. En trabajos previos se demostró que el bloqueo del receptor AT1 en glioblastomas experimentales disminuyó el tamaño tumoral, la proliferación celular y la angiogénesis. El receptor AT1 de angiotensina pudiera representar un blanco terapéutico contra el cáncer de mama.

HIPÓTESIS

1. La detección del receptor de ANG II AT1 por RT-PCR en tumores malignos de mama humanos se correlaciona con el grado de malignidad, densidad vascular, proliferación celular, presencia de receptores para estrógenos y pronóstico adverso.

OBJETIVOS

Generales

1. Determinar la presencia de los receptores AT1 en tumores humanos de mama.

Específicos

1. Correlacionar la presencia del receptor AT1 con el grado de malignidad, vascularización, proliferación celular, presencia de receptores de estrógenos y progesterona y sobrevida libre de enfermedad en tumores malignos de mama humanos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Detección de los receptores de Angiotensina II en tumores de mama.

Entre el 2000 y 2004 se recolectaron 83 tumores malignos de mama provenientes de pacientes sometidos a cirugía en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Fueron diagnosticados por el departamento de patología como carcinoma canalicular de mama. Se excluyeron las pacientes tratadas previamente con quimioterapia o radioterapia neoadyuvante. Como control se utilizaron 7 muestras de tejido mamario no

neoplásico maligno (fibromas) obtenidas de pacientes sometidas a biopsia por sospecha de malignidad. Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su procesamiento. Todas las pacientes fueron registradas en una base de datos a partir del expediente clínico, donde se recopilaron los datos más relevantes de la historia clínica y la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes. Adicionalmente, se incluyeron tumores de mama preservados en parafina con panel inmunohistoquímico completo para realizar determinación de AT1 por inmunohistoquímica.

Análisis histopatológico.

Las biopsias fueron re-diagnosticadas en las biopsias teñidas en hematoxilina-eosina por dos patólogos ciegos al estudio y se determinó el grado de diferenciación por SBR (Scarff-Bloom-Richardson). Se realizó conteo de mitosis en 30 campos a un aumento de 40x, en zonas tomadas al azar en la periferia del tumor (zonas sin necrosis). Se re-valoró la presencia de receptores para HER-2, estrógenos y progesterona realizados de rutina en el departamento de patología.

Determinación del receptor AT1 Y AT2 por RT-PCR.

Un fragmento de cada tumor se homogenizó y procesó para realizar la búsqueda del receptor AT1 por medio de extracción de RNA y la reacción de

cadena de polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) (Chamcynski, 1987; Iwai, 1992). Se extrajo el RNA total y se procesó por electroforesis sobre geles de agarosa conteniendo formaldehído, posteriormente se visualizó con luz ultravioleta usando la tinción de bromuro de etidio. La técnica de RT-PCR se realizó con RNA total (Parking Elmer, USA) y la secuencia de oligonucleótidos correspondiente a segmentos de oligonucleótidos diseñados por el programa DNASTat para la secuencia de los receptores AT1.

Gen	Secuencias Primer para RT-PCR	Tamaño del fragmento amplificado
AT1	Sentido 5'-CTT TTC CTG GAT TCC CCA C-3' Antisentido 5'CTT CTT GGT BBA TGA GCT TAC-3'	304 pb

El perfil de amplificación para PCR consistió en la desnaturalización a 95° C por 30 s, y alineamiento de la secuencia de oligonucleótidos a 60°C por 60 s y extensión a 72°C por 90s (28 ciclos) usando 5 microgramos de RNA total. Los productos de RT-PCR se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5%.

El RNA se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente usando el método de capilaridad. Las bandas se prehibridizaron durante una hora a 46 °C con solución de hibridación y posteriormente se incubaron toda la noche con oligonucleótidos marcados para AT1 y GAPDH usando la misma solución de hibridación, posteriormente se lavaron en 1x, 0.2x y 0.1 ssc conteniendo 0.1% SDS a temperatura ambiente con agitación. Las señales fueron detectadas por autorradiografía y cuantificadas por densitometría.

Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados en promedio y error estándar. La comparación entre pacientes con receptores negativos y positivos se realizó con las pruebas t de Student y Chi-cuadrada. El análisis de sobrevida se realizó con análisis de Kaplan Maier y log rank. La significancia estadística se consideró con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se revisaron 90 expedientes en total, la edad promedio fue de 54.7 años con un rango de edad de 22 a 92 años. La mayor parte de las mujeres fueron postmenopáusicas 58.4% y 41.6% premenopáusicas. Un 22.5% tuvieron antecedente de haber recibido terapia hormonal (estrógenos y/o progestágenos) alguna vez en su vida. Las pacientes tuvieron antecedentes heredo familiares positivos para cáncer de mama en familiares de primera línea en un 21.3%. Antecedente de tabaquismo en un 29.2% de las pacientes. En la **Tabla 2** se muestran las características de las pacientes.

En cuanto al estadio clínico del tumor , se encontraron 18 pacientes (21.5%) en T0-T1, la mayor parte 40 pacientes (47.6%) en T2 y 26 pacientes (30.9%) en T3 y T4. En cuanto a nódulos 78 pacientes (92.8%) se encontró en N0-N1, 4 pacientes (4.8%) en N2 y 2 pacientes (2.4%) en N3. La mayor parte de las pacientes se le asignó un estadio TNM clínico II en 55 pacientes (65.5%), el resto en estadio I en 13 pacientes (15.5%), estadio III en 16 pacientes (18.9%).

Tabla 2

Todas las pacientes recibieron algún tipo de tratamiento quirúrgico (lumpectomía simple vs MRM (mastectomía radical modificada tipo madden, así como exploración ganglionar y/o ganglio centinela). Cincuenta y cuatro pacientes

(61.4%) fueron sometidas a MRM contra 34 pacientes (38.6%) cirugía conservadora. **Tabla 3**

Ninguna paciente recibió quimioterapia o radioterapia neoadyuvante, 55 de las pacientes (64%) recibieron quimioterapia adyuvante (FEC, paclitaxel) y 31 pacientes (36%) no recibieron quimioterapia. En 40 pacientes (46.5%) se administró radioterapia y en 46 pacientes (53.5%) no se administró radioterapia. Recibieron terapia hormonal con tamoxifeno 45 pacientes (52.3%).

Se encontraron recaídas (local o sistémica) en 23 pacientes (26.4%). Fallecieron por progresión de la enfermedad 14 pacientes (15.6%) con 75 pacientes vivas (83.3%) al final de este estudio. **Tabla 3**. La sobrevida libre de enfermedad a los 2,3 y 5 años fue de 89, 82 y 62% respectivamente, con una media de 82.9 ± 5 meses.. **Figura 1b**

Se encontró expresión de AT1 en 66% de las 83 pacientes analizadas. Ninguno de los tumores benignos presentó expresión de AT1 ($p=0.01$) **Tabla 4**. En la **tabla 4** se muestran la asociación de SLE y recurrencia (local o sistémica) con variables clínicas y patológicas. Los factores que fueron asociados a SLE son el estadio de la enfermedad clínico ($p=0.11$) y patológico ($p=0.03$) (**Figuras 2A y 2B**), así como con la escala de SBR (bien diferenciado vs pobremente diferenciado) ($p=0.05$) (**Figura 2C**).

Los pacientes con antecedentes de uso de inhibidores de AT1 tuvieron una recurrencia de 24% vs 43% en aquellos que no los recibieron. Sin embargo no fueron estadísticamente significativos en la SLE. ($p=0.2$) **(Figura 3)** Las pacientes con expresión de AT1 tuvieron una SLE a 5 años de 33% con una media de 46 ± 4.7 meses, contrario a las pacientes con expresión negativa de AT1 que tuvieron una SLE a 5 años de 86% con una media 81 ± 5 ($p=0.0012$) **Figura 4**

DISCUSIÓN

La angiogénesis es un proceso indispensable en el crecimiento y desarrollo de una neoplasia. El efecto angiogénico de la ANG II puede influenciar la carcinogénesis o el crecimiento de diversas neoplasias. El sistema renina-angiotensina-aldosterona ha sido asociado con la estimulación del crecimiento de múltiples neoplasias. En varios estudios los receptores de angiotensina han sido encontrados en la superficie celular e intracitoplasmáticos de tumores humanos como son cáncer de mama, gliomas malignos, hepatocarcinomas, carcinoma renal, melanoma, cáncer de páncreas y sarcomas.

Se ha encontrado que varios polimorfismos del gen de la ECA están asociados a mayor riesgo de cáncer de mama, así mismo, se ha observado la presencia de AT2 en tejido conectivo peritumoral de mama por Inmunohistoquímica. En la línea celular de cáncer de mama humano, MCF-7, la ANG II incrementa la expresión de la integrina β_1 , una molécula de adhesión que se ha encontrado en el cáncer de mama y que juega un rol importante en el crecimiento celular y su diferenciación (Berry, 2000). De manera adicional, en la línea celular MCF-7 existe expresión de los receptores AT1 y AT2, y la angiotensina tiene un efecto proliferativo dosis dependiente asociado al receptor AT1 mediado por la activación de la Na^+/K^+ ATPasa (Muscella, 2002). La expresión y estimulación del receptor AT1 en mama tuvo en nuestros pacientes un efecto negativo en la sobrevida probablemente mediado por un aumento en la angiogénesis e incremento en la proliferación celular.

En otro estudio utilizando cultivos de células mamarias normales y de células de carcinoma intraductal invasor, se midió la expresión de AT1 mRNA y sus niveles fueron mayores en las células de carcinoma. Este aumento correlaciona con nuestra observación de ausencia del receptor en tejido mamario no neoplásico pero si en tejido de carcinoma. En cultivos la angiotensina incrementó las concentraciones de calcio intracelular de una manera dosis-dependiente a través de AT1 principalmente en las células malignas, quizá debido a una mayor expresión de este receptor encontrando capacidad funcional del receptor.

Por otro lado, la angiotensina estimula la proliferación celular a través de la Protein-quinasa C (PKC) α y β 1/2 y a través de las cinasas de fosforilación de regulación extracelular 1 y 2, inducidas por el factor de crecimiento endotelial, una citosina involucrada con la invasividad neoplásica. Nuestros hallazgos relacionan un mayor grado histológico es decir pobre diferenciación celular con una SLE menor en comparación con los tumores bien diferenciados, lo que podría explicar que a mayor expresión del receptor de AT1 se aumenta la proliferación celular maligna e invasividad y con esto un peor pronóstico de sobrevida para las pacientes.

En un estudio in vitro la proliferación celular inducida por angiotensina fue inhibida por losartán, Gö6976 (inhibidor de PKC) y AG1478 (inhibidor del receptor tirosina-quinasa del factor de crecimiento endotelial). De esta manera, AT1 al parecer regula

las vías de señalización mitogénica mediante dos mecanismos simultáneos: activación de PKC y activación del receptor del factor de crecimiento de células endoteliales. (Greco, 2002; Greco, 2003).

En una línea celular de carcinoma mamario ductal humano, el captopril disminuye significativamente la expresión de los receptores de estrógenos e incrementa la expresión de los receptores de progesterona, inhibiendo la proliferación celular de una manera dosis dependiente, los resultados sugieren que el captopril tiene una actividad citostática no mediada por el receptor a estrógenos (Small, 1997).

En este estudio encontramos relación estadísticamente significativa entre la presencia de receptores de ANG II y la expresión de receptores hormonales estrogénicos pero no progestágenos. Los tumores con expresión estrogénica tienen una mayor expresión de receptores AT1 ($p=0.024$).

Todos estos hechos sugieren que el sistema renina-angiotensina participa en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre aquellas pacientes que tomaban inhibidor de ECA y las que no lo tomaban. El efecto antineoplásico de la inhibición de la angiotensina II no es claro, es posible que la inhibición de la ANG II estimule un desequilibrio AT1/AT2 que favorezca la estimulación de AT2 y esto produzca apoptosis. En este estudio encontramos que existe una alta expresión de receptores AT1 en cáncer de mama. Los receptores AT1 y AT2 podrían participar en los mecanismos de proliferación celular en cáncer de mama y probablemente jugar un papel importante en su fisiopatología. En estudios previos se ha

demostrado que existe una alta expresión del receptor AT1 en tumores murinos de mama inducidos por medroxiprogesterona, y que existe además un alta expresión en tumores ductales en contraste con adenocarcinomas lobulillares. El receptor AT2 ha sido encontrado en tejido conectivo peritumoral. Tahmasebi ha demostrado la presencia de receptor AT1 en 28 de 30 muestras de tejido de carcinoma ductal in situ y carcinoma ductal infiltrante detectado por inmunohistoquímica.

En otro estudio la inmunohistoquímica para AT1 fue negativa en 25 muestras de carcinoma invasor, positiva en 31 de 33 muestras de tejido hiperplásico y también positivas 18 de 23 en muestras de carcinoma in situ, esto sugiere que la expresión de AT1 podría contribuir en el desarrollo de tejido premaligno. (De Paepe 2002) Por el contrario nosotros encontramos que ninguno de los tumores benignos que se tomaron como controles expresaron el receptor AT1.

No se había demostrado previamente la relación de la expresión del receptor AT1 en tejido tumoral con el pronóstico clínico; en este estudio se encontró de forma estadísticamente significativa que aquellas pacientes que expresan AT1 tienen una menor sobrevida libre de enfermedad en comparación con las pacientes que no expresan el receptor de AT1.

En conclusión es bien conocido que la angiogénesis juega un papel imprescindible en el desarrollo de tumores sólidos para proveerles oxígeno y nutrientes

esenciales, por lo tanto constituye un blanco terapéutico atractivo. Existen múltiples fármacos útiles para inhibir angiogénesis que asociadas a un agente citotóxico pudieran incrementar la respuesta antitumoral y con esto mejorar la sobrevida.

El tratamiento con inhibidores de la ECA y bloqueadores de receptores ANGII podría disminuir la producción de factores de crecimiento en neoplasias malignas de mama con receptores positivos representando una terapia adyuvante y sinergista a los efectos de la quimioterapia además de que podría constituir un marcador de estratificación pronóstica. Es necesario realizar un número mayor de estudios para poder diferenciar el papel de la ANG II en la fisiopatología del cáncer de mama.

Tabla 1

	AT1	AT2
VASOS	Vasoconstricción arteriovenosa	Vasodilatación arteriolar cerebral
CORAZÓN	<p>Aumento de la contractilidad y frecuencia cardíaca</p> <p>Aumento de las demandas miocárdicas de oxígeno</p> <p>Vasoconstricción coronaria</p>	
ACCIONES TRÓFICAS	<p>Aumento de la síntesis de proteína y DNA.</p> <p>Hipertrofia, hiperplasia y remodelado cardiovascular.</p> <p>Estimula la angiogénesis</p>	<p>Diferenciación y crecimiento celular</p> <p>Inhibe la angiogénesis</p> <p>Activa las colagenasas cardíacas</p> <p>Antiproliferación y Apoptosis</p>
ACCIONES CENTRALES	<p>Aumento del tono simpático</p> <p>Liberación de vasopresina, ACTH, prolactina y LH.</p>	<p>Dilatación arteriolar cerebral</p> <p>Liberación de prostaglandinas</p> <p>Aumento de la conductancia de K</p> <p>Secreción de LH y somatostatina</p> <p>Actividad motora e información sensitiva.</p>
ACCIONES RENALES	<p>Vasoconstricción</p> <p>Contracción y proliferación mesangial</p> <p>Aumento de la reabsorción tubular proximal de Na</p> <p>Aumento de la excreción renal de K</p> <p>Aumento de la síntesis de prostaglandinas</p> <p>Inhibición de la secreción de renina</p>	<p>Aumento de la reabsorción tubular proximal de Na</p>

Tabla 2

Características de pacientes(n=90)

Características	no.	(%)
Edad	54.7	(22-92 años)
Hormonoterapia previa	20	(22.5%)
No Hormonoterapia	69	(77.5%)
AHF Ca de mama	19	(21.3%)
Sin AHF Ca de mama	70	(78.7%)
Tabaquismo	26	(29.2%)
No Tabaquismo	63	(70.8%)
Tumor		
T0-T1	18	(21.5%)
T2	40	(47.6%)
T3-T4	26	(30.9%)
Nódulos		
N0-N1	78	(92.8%)
N2	4	(4.8%)
N3	2	(2.4%)
Estadio clínico		
I	13	(15.5%)
II	55	(65.5%)
III	16	(18.9%)

Tabla 3 Porcentaje de recurrencia

Tratamiento	no. (%)
Cirugía MRM	54 (61.4%)
Cirugía conservadora	34 (38.6%)
Quimioterapia	55 (64.1 %)
No Quimioterapia	31 (36.3%)
Radioterapia	40 (46.5%)
No radioterapia	46 (53.5%)
Tamoxifeno	45 (52.3%)
No tamoxifeno	41 (47.7%)
Recaída	23 (26.4%)
No recaída	64 (73.6%)
Muertes	14 (15.6%)
Vivas	75 (83.3%)

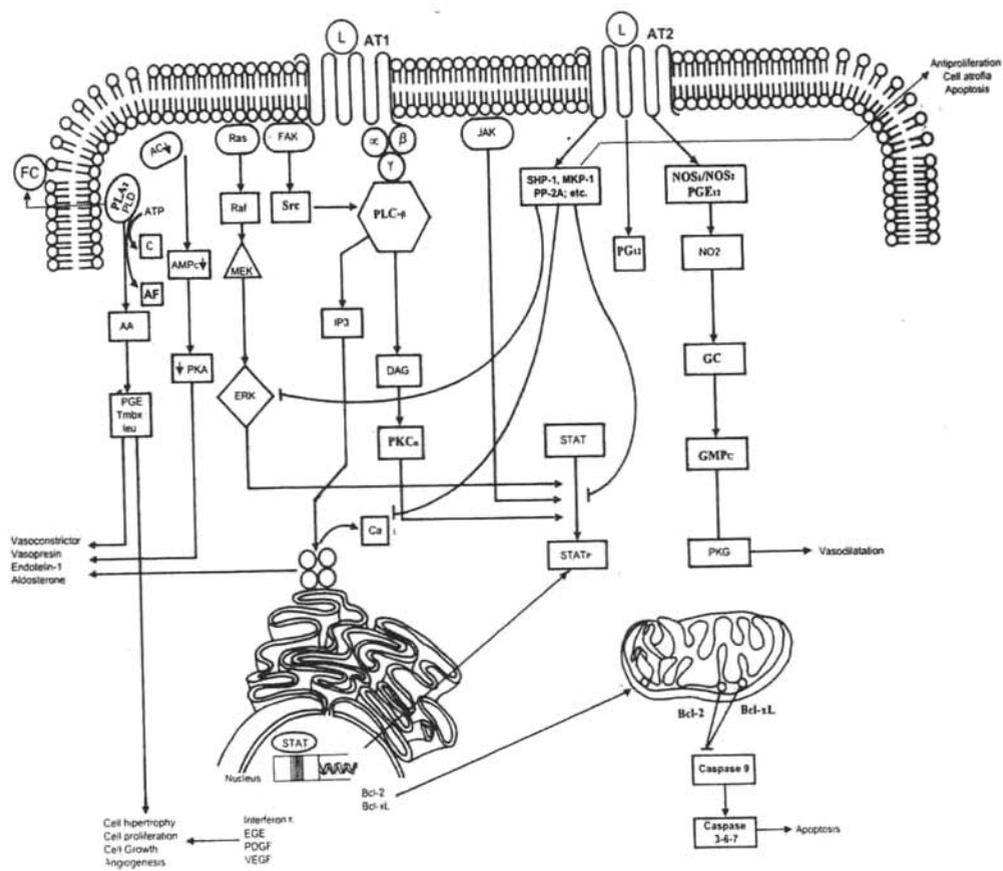
Tabla 4

Características	AT1	AT1	p
	Negativo (%)	Positivo (%)	
Edad <54 años	48%	48%	0.56
>54 años	50%	50%	
R-estrogénicos -	61%	38 %	0.02
R estrogénicos +	25 %	75%	
SBR bien diferenciado	39%	60. %	0.44
SBR mal diferenciado	60%	40%	
Etapa patológica			0.46
I	50%	50%	
II	50%	50%	
III	22%	39%	
Tumores benignos	100%	0	0.01
Tumores malignos	44%	55%	
Recaída	14%	85%	0.002
No recaída	62%	37%	

Tabla 5

Características	SLE	Recurrencia a 5 años	p
Edad <54 años	82 ± 6	43%	0.97
>54 años	73 ± 6	36%	
AFH	78 ± 5	35%	0.34
No AFH	73 ± 10	57%	
Premenopáusica	82 ± 8	40%	0.90
Menopausia	69 ± 5	46%	
Hormonoterapia	78 ± 7	45%	0.80
No Hormonoterapia	83 ± 6	35%	
Tabaquismo	79 ± 5	32%	0.10
No Tabaquismo	77 ± 8	54%	
Estadio clínico			0.11
I	113 ± 2	13%	
II	86 ± 6	46%	
III	54 ± 10	60%	
Estadio patológico			0.03
I	95 ± 6	12%	
II	84 ± 6	46%	
III	57 ± 8	69%	
Inhibidor de ECA	77 ± 6	24%	0.20
No inhibidor de ECA	78 ± 6	43%	
SBR bien diferenciado	90 ± 8	14%	0.10
SBR Mal diferenciado	72 ± 7	66%	
Receptores estrogénicos +	53 ± 4	60%	0.20
-	76 ± 6	44%	
Receptores progesterona +	50 ± 5	20%	0.36
-	69 ± 7	50%	
Cirugía conservadora	74 ± 5	42%	0.11
Cirugía MRM	76 ± 6	63%	

Figura 1a



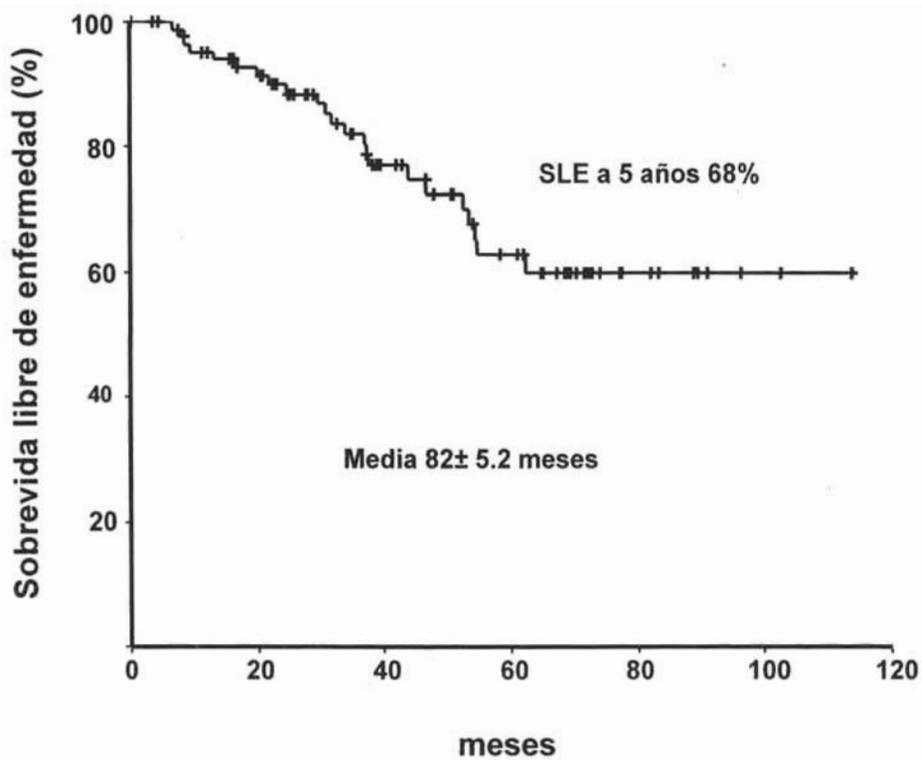


Figura 1b

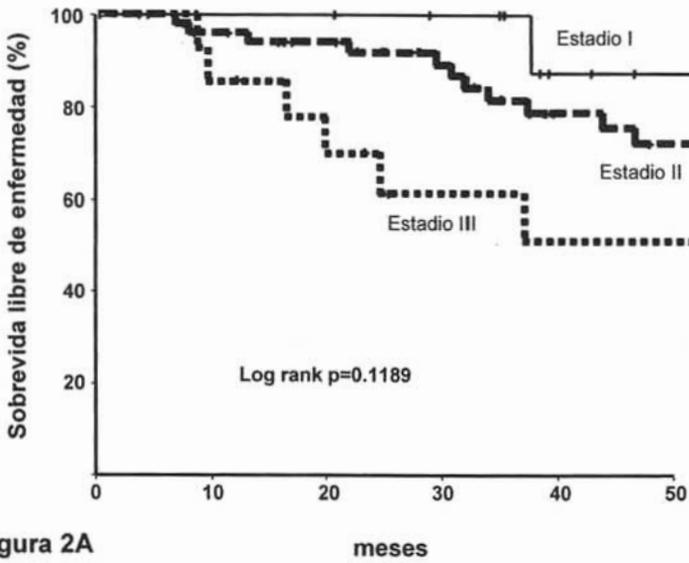


Figura 2A

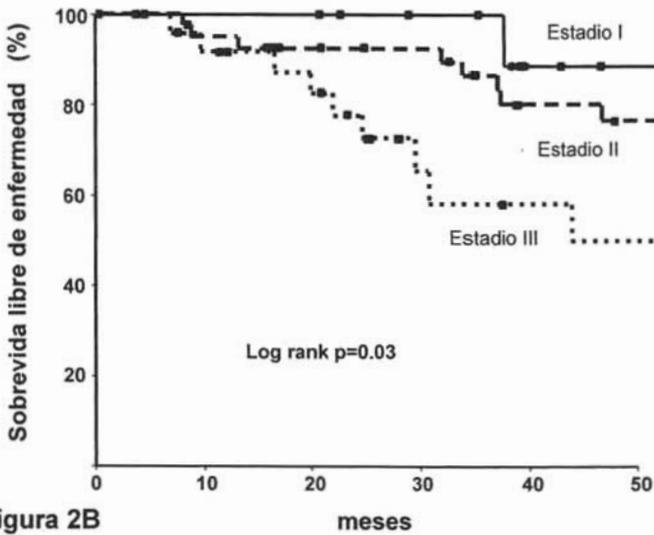


Figura 2B

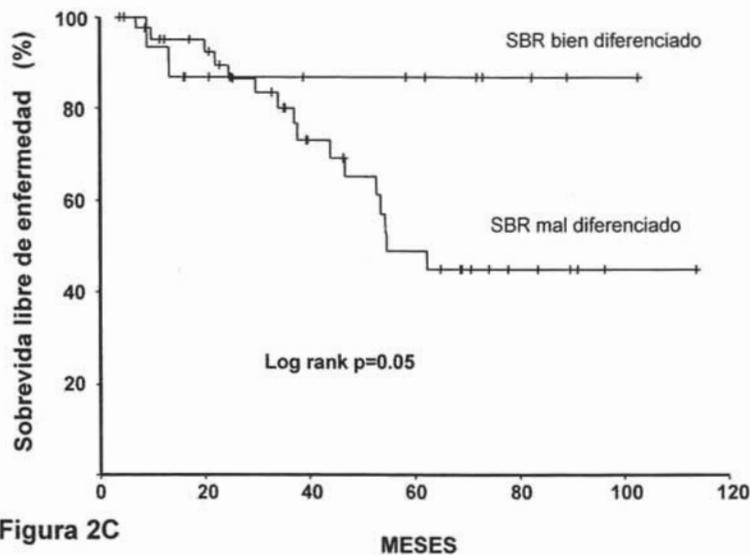


Figura 2C

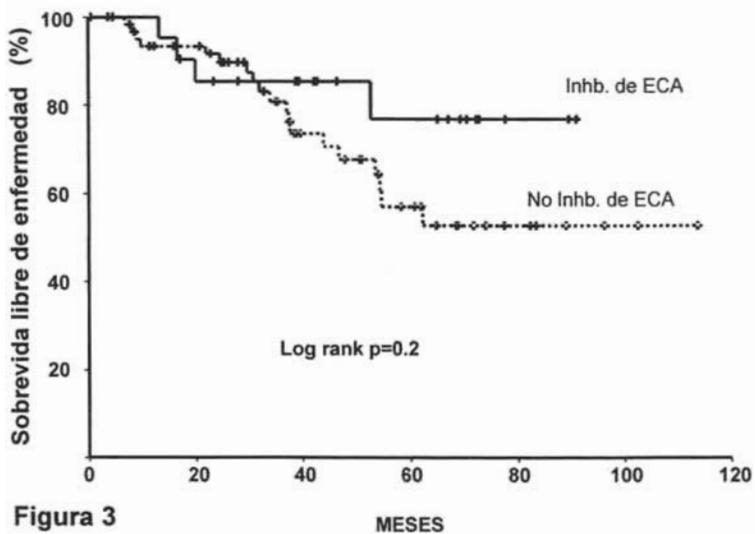


Figura 3

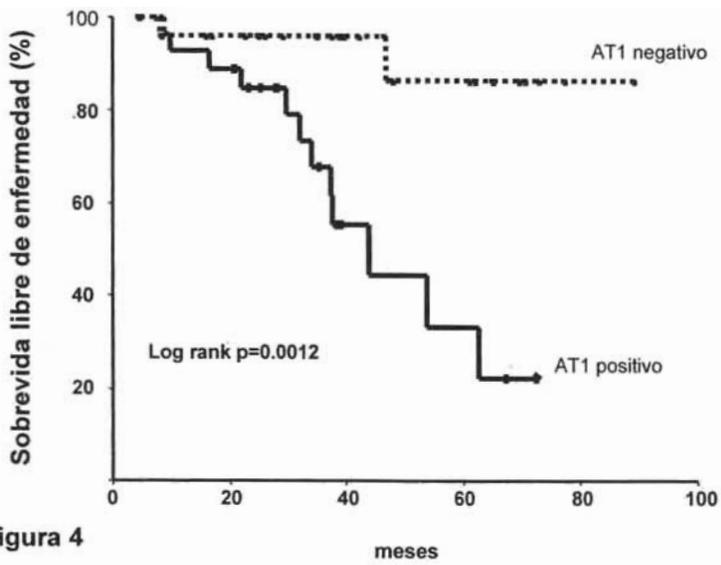


Figura 4

BIBLIOGRAFIA

Achard JM, Leborgne L, Tribouilloy C, Aldigier JC, Fournier A. Restenotic process and DD genotype after angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Lancet*. 2001 Sep 1;358(9283):757-8

Andrade SP, Cardoso CC, Machado RD, Beraldo WT. Angiotensin II induced angiogenesis in sponge implants in mice. *Int J Microcir Clin Exp* 1996; 16:302-7.

Arrieta O, Guevara P, Escobar E, García Navarrete R, Pineda B, Sotelo J. Blockage of angiotensin II type I (AT1) receptor decrease the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma. *Br J Cancer* 2004 (In press)

Bascands JL, Birolami JP, Trolly M et al. Angiotensin II induces phenotype dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2001; 38:1294-9

Berry MG, Goode AW, Puddefoot GP, Carpenter R. Integrin $\beta 1$ upregulation in MCF-7 cancer cells by angiotensin II. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26:25-9.

Chamczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Analytical Biochem* 1987;162:152-9.

Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995; 332:1589-1593.

De Paepe B, Verstraeten VL, De Potter CR, Vakaet LA, Bullock GR. Growth stimulatory angiotensin II type 1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol* 2001;116:247-54.

De Paepe B, Verstraeten VL, De Potter CR, Bullock GR. Increased angiotensin II type 2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol* 2002;117:13-19.

Dzau V. A symposium: the relevance of tissue angiotensin-converting-enzyme: manifestation in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol* 2001b; 88:1-20.

Egami K, Morohara T, Shimada T et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 2003;112:67-75.

Escobar E, Rodríguez-Reyna TS, Arrieta O, Sotelo J. Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: Biologic and therapeutic implications in cancer. *Curren Vascular Pharmacol* 2004, in press.

Fernández LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. *J Lab Clin Med* 1985; 105:141-5

Fernández LA, Spencer DD, Kaczmar T JR. Angiotensin II decreases mortality rate in gerbil with unilateral carotid ligation. *Stroke* 1986;17:82-5.

Friis S, Sorensen HT, Mellekjaer L et al. Angiotensin convertin enzyme inhibitors and the risk of cancer: a population-based cohort study in Denmark. *Cancer* 2001;92:2462-70.

Fujimoto Y, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type1 receptor antagonist. FEBS. Letters 2001; 495:197-200.

Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y et al. Angiotensin AT1 and AT2 receptors differentially regulate angiopoietin-2 and Vascular Endothelial Growth Factor expression and angiogenesis by modulating Heparin Binding Epidermal Growth Factor (EGF) mediated EGF receptor transactivation. Circ Res 2001; 88: 22-9

Greco S, Elia MG, Muscella C, Sterolli C, Marsigliante S. AT1 angiotensin II receptor mediates intracellular calcium mobilization in normal and cancerous breast cells in primary culture. Cell Calcium 2002;32:1-10.

Greco S, Muscella A, Elia MG et al. Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. J Cell Physiol 2003;196:370-7.

Guerra FK, Ciufo GM, Elizalde PV, Charreau EH, Saavedra JM. Enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes and angiotensin converting enzyme in medroxyprogesterone-induced mouse mammary adenocarcinomas. Biochem Biophys Res Commun 1993;193:93-9.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods. 1989 May 12;119(2):203-10.

Hii SI, Nicol DL, Gotkey DC, Thompson LC, Breen MK, Jhonson JR. Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma. Br J Cancer 1998;77:880-3.

Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, et al. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 2002, Apr 1; 16 (7):846-58

Hortobagyi GN, Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med*, 1998; 339 (14):974-984.

Inwang ER, Puddefoot JR, Brown CL et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in human breast tissues. *Brit J Cancer* 1997;72:1279-83.

Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Letters* 1992;298:257-60.

Jemal A, et al. Cancer Statistics 2003. *CA Cancer J Clin* 2003, 53-26

Jordan VC. Tamoxifen: a personal retrospective. *Lancet Oncol*, 2000, Sep; 1(1): 43-49.

Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA et al. S. Cyclin E and Survival in Patients with Breast Cancer *N Engl J Med* 2002; 347:1566-1575, Nov 14, 2002

Koh WP, Yuan JM, Sun CL, van den Berg D, Seow A, Lee HP, Yu MC. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Res.* 2003 Feb 1;63(3):573-8.

Kumar V, Knowle D, Gavini N, Pulakat L. Identification of the region of AT2 receptor needed for inhibition of the AT1 receptor-mediated inositol 1,4,5-triphosphate generation. *FEBS Lett.* 2002 Dec 18;532(3):379-86.

Lever AF, Hole DJ, Gillis CR et al. Do inhibitors of angiotensin I converting enzyme protect against risk of cancer?. *Lancet* 1998; 352:179-84.

Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M. Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62:4176-9.

Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 1996; 27:760-5.

Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C, Marsigliante S. Angiotensin II stimulation of Na⁺/K⁺ATPase activity and cell growth by calcium-independent pathway in MCF-7 breast cancer cells. *J Endocrinol* 2002;173:315-23.

Ohta T, Amaya K, Yi S et al. Angiotensin converting enzyme independent, local angiotensin II generation in human pancreatic ductal cancer tissues. In *J Oncol* 2003;23:593-8.

Rivera E, Arrieta O, Guevara P, Duarte-Rojo A, Sotelo J. AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma. *Brit J Cancer* 2001; 85:1396-9.

Slamon D. J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-792.

Small W, Molteni A, Kim YT, Taylor JM, Chen Z, Ward WF. Captopril modulates hormone receptor concentration and inhibits proliferation of human mammary ductal carcinoma cells in culture. *Breast Cancer Res Tr* 1997; 44: 214-24.

Stroth U, Unger T. The renin-angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999; 33 Suppl1:21-8; discussion 41-3, Review.

Tahamasebi M, Puddefoot JR, Inwang ER, Goode AW, Carpenter R, Vinson GP. Transcription of the prorenin gene in normal and diseased breast. *Eur J Cancer* 1998;34:1777-82.

Takeda H, Kondo S. Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type 1 receptor expression. *Am J Pathol* 2001;158:1633-7.

Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI. Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor and inflammation related pathways. *Lab Invest* 2002; 82:747-56.

Touyz RM, Bery C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:1001-15

Walsh Da, Hu DE, Wharton J, Catravas JC, Blake Dr, Ping DT. Sequential development of angiotensin receptors and angiotensin I converting enzyme during angiogenesis in the rat subcutaneous sponge granuloma. *Brit J Pharmacol* 1997; 120: 1302-11

Wolf G, Harendza S, Schroeder R et al. Angiotensin II's antiproliferative effects mediated through AT2 receptors depend on down regulation of SM-20. *Lab Invest* 2002; 82:1305-17.

Yoshiji H, Yoshiji J, Ikenavaba Y et al. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats. *J Hepatol* 2002;37:22-30.

Yoshiji H, Yoshiji J, Ikenavaba Y et al. Suppression of the renin-angiotensin systems attenuates vascular endothelial growth factor mediated tumor

development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. In *J Oncol* 2002;20:1227-31.