



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-ANGIOGÉNICO
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR
LEVADURAS EN ALIMENTOS FERMENTADOS
Y SUS METABOLITOS



María Labrador Granados



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

TRABAJO FIN DE GRADO. GRADO EN FARMACIA
EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-ANGIOGÉNICO DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR LEVADURAS EN ALIMENTOS
FERMENTADOS Y SUS METABOLITOS

- María Labrador Granados -

Presentación: septiembre 2018, Facultad de Farmacia, Sevilla.

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina legal.

Tutora: Ana Belén Cerezo López

Proyecto de carácter experimental

Resumen

La angiogénesis en el adulto tiene un papel esencial en la patogénesis de las dos principales causas de muerte en el mundo: el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, favoreciendo tanto el desarrollo del tumor como el desarrollo y desestabilización de la placa de ateroma. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es el principal factor pro-angiogénico. Por tanto, la inhibición de VEGF es un mecanismo molecular plausible que demuestra una causa-efecto directa en la disminución del riesgo cardiovascular y de cáncer.

Ciertos compuestos bioactivos presentes en alimentos fermentados derivados del metabolismo de las levaduras y sus metabolitos, como los indólicos 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) y ácido 3-indolacético (3-IAA) y el polifenol hidroxitirosol (HT), han demostrado poseer actividad anti-VEGF. Así, el presente trabajo tiene por objetivo evaluar su efecto anti-angiogénico incluyendo su efecto inhibitorio en la migración de células endoteliales (fase de inicio de la angiogénesis), así como los posibles mecanismos de acción involucrados. Para ello, se utilizaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y se emplearon técnicas de western blot, ELISA y análisis de imagen.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran por primera vez que el 5-HTOL inhibe la migración de células endoteliales (50% a 1mM). Además, nuestros resultados indican que el efecto anti-angiogénico del 3-IAA y el 5-HTOL no está mediado por la inhibición de la principal proteína responsable de la proliferación celular, PLC γ -1. Los datos aquí presentados sugieren que la interacción del HT con componentes de la membrana celular podría ser propuesta como posible mecanismo molecular que explique su actividad anti-angiogénica. En conclusión, nuestros datos confirman el papel anti-angiogénico de estos compuestos y aportan nuevas evidencias que respaldan el interés de su estudio para su futura explotación como agentes anti-VEGF.

Palabras claves

anti-angiogénico / VEGF / ácido 3-indolacético / 5-hidroxitriptofol / hidroxitirosol

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1— La angiogénesis	5
1.2— Factores reguladores de la angiogénesis	6
1.3— Receptores de VEGF	7
1.4— Papel de la angiogénesis en el cáncer y las enfermedades cardiovasculares	8
1.5— Compuestos bioactivos presentes en alimentos fermentados y sus metabolitos con actividad anti-VEGF	9
1.5.1 Ácido 3-indolacético (3-IAA)	9
1.5.2 5-hidroxitriptofol (5-HTOL)	11
1.5.3 Hidroxitirosol (HT)	12
1.5.4 Efecto anti-angiogénico del ácido 3-indolacético, 5-hidroxitriptofol e hidroxitirosol	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1— Cultivo celular	15
3.2— Compuestos en estudio	16
3.3— Inhibición de la migración. Ensayo de Wound-healing.....	16
3.4— Ensayos para evaluar el efecto del 3-IAA y 5-HTOL sobre la cascada de señalización intracelular estimulada por VEGF.....	17
3.4.1 Recuento de proteínas mediante el ensayo del ácido bicinónico (BCA essay)..	18
3.4.2 Análisis de Western Blot para PLC γ -1, Akt e eNOS.....	19
3.5— Ensayos para evaluar el efecto de la combinación del 3-IAA y 5-HTOL sobre la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF	19
3.5.1 Técnica de inmunoensayo ELISA para la determinación de p-VEGFR-2.....	20
3.6— Ensayos para determinar el mecanismo de acción anti-angiogénico del hidroxitirosol.	20
3.7— Análisis estadístico	21

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1— Efecto anti-angiogénico del 5-hidroxitriptofol: inhibición de la migración celular	22
4.2 —Efectos del 5-hidroxitriptofol y el ácido 3-indolacético sobre la cascada de señalización intracelular inducida por VEGF	24
4.3— Efectos de la combinación del 3-IAA y 5-HTOL sobre la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF	27
4.4— Hidroxitirosol: posible mecanismo de acción molecular en la inhibición de la angiogénesis	27
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fisiológico de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes (Gerritsen, 2008). La angiogénesis ocurre tanto en tejido embrionario como adulto. En el feto, contribuye al crecimiento y maduración de órganos durante el desarrollo; en el adulto, constituye un evento menos frecuente implicado en la inflamación, cicatrización y en diversas fases del ciclo menstrual reproductivo (ovulación, regeneración del endometrio, formación de la placenta) (Alliegro, 2007).

De entre los distintos tipos de células que forman los diferentes vasos sanguíneos, son las células endoteliales - constituyentes de la capa más interna, el endotelio - las que juegan un rol central en este proceso (Alliegro, 2007). El comportamiento de las mismas y su implicación en la activación del proceso de la angiogénesis -“angiogenic switch”- está determinado por la respuesta a diferentes moléculas de señalización pro- y anti-angiogénicas (Carmeliet, 2000; Gerritsen, 2008). Condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, pH ácido, hipoglucemia, estrés mecánico, daño tisular, estímulos inmunes o inflamatorios y tumores están relacionadas con un aumento de la secreción y difusión de factores reguladores de la proliferación endotelial (Guyton, Hall, 2006; Gerritsen, 2008). La hipoxia es uno de los desencadenantes más importantes: la insuficiente oxigenación de los tejidos conlleva un aumento de la transcripción del factor inducible de hipoxia (HIF) que regula la expresión de distintos genes y factores de crecimiento implicados en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que aseguren un suministro de oxígeno adecuado a los requerimientos tisulares (Gerritsen, 2008).

La unión de estos factores reguladores a receptores específicos en la superficie de las células endoteliales desencadena la activación endotelial y la producción de enzimas proteolíticas, como uroquinasa activador del plasminógeno (uPA) o metaloproteinasas (MMPs), que degradan la membrana basal del capilar contemporáneamente al fenómeno de la vasodilatación (mediado en gran extensión por el óxido nítrico NO) resultando en un aumento de la permeabilidad endotelial y desestabilización de los vasos y favoreciendo la extrasvasación, migración y proliferación de las células endoteliales en la dirección del estímulo (Carmeliet, 2000). En su avance, las células que están formando estos nuevos cordones sufren de nuevo una diferenciación: cambian de forma y se ensamblan entre sí formando el lumen del nuevo tubo capilar. Los vasos se van fusionando y estabilizando mediante el reclutamiento de células de soporte como perocitos y células de la musculatura lisa hacia la formación de estructuras correctas y maduración de la red endotelial, fenómeno conocido como remodelamiento vascular. Finalmente, el flujo sanguíneo se restablece y comienza a circular por esta nueva región vascularizada.

1.2 Factores reguladores de la angiogénesis

La angiogénesis se conoce como un proceso complejo regulado por una extensa variedad de factores estimuladores e inhibidores que, en condiciones fisiológicas normales, están en equilibrio (Tabla 1). La descompensación del balance neto por prevalencia de factores proliferativos es la causa de la activación de la angiogénesis (Gerritsen, 2008).

Moduladores de la angiogénesis

Estimuladores	Inhibidores
Angiogenina	Angioarrestina
Angiopoyetina	Angiostatina
Del-1	Antitrombina anti-angiogénica III
VEGF derivado de la glándula endocrina (EG-VEGF)	Arrestina
Factores de Crecimiento Fibroblástico	Canstatina
Folistatina	Endostatina
Factores de Crecimiento de Hepatocitos	GRO-beta (quimiocina CXCL2)
Leptina	Interferón alfa
Midkina	Interleucina 12
Factor de Crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Factor derivado del pigmento epitelial
Factor de Crecimiento de Células Endoteliales derivado de plaquetas (PD-EGF)	Factor plaquetario 4 Estaniocalcina-1 Trombospondina
Pleiotropina	Inhibidor tisular de metaloproteinasas Tumstatina
Proliferina	tRNA sintetasa Vasculoestatina Vasoinhibina
Factores de Crecimiento Transformante (TGF α , TGF β)	Inhibidor del crecimiento endotelial vascular
Factores de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	Estatina vascular endotelial

Tabla 1. Relación de los principales moduladores de la angiogénesis entre los que se incluyen factores de crecimiento, proteasas, inhibidores de proteasas, citoquinas, quimioquinas y otras sustancias endógenas. (Gerritsen, 2008)

Entre las moléculas pro-angiogénicas más importantes destaca el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), anteriormente conocido como factor de la permeabilidad vascular (Ferrara, Davis-Smyth, 1997). VEGF juega un papel crucial en la regulación de la angiogénesis mediante el control de la proliferación, permeabilidad, migración celular y producción de otras sustancias vasoactivas (Yancopoulos et al., 2000). VEGF pertenece a una familia de factores de crecimiento polipeptídicos codificados por distintos genes (VEGF-A, -B, -C, -D, PlGF) y, a su vez, relacionados con la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) (Cebe- Suárez et al., 2005). VEGF-A ha sido el mejor caracterizado dentro del grupo y reconocido como el estimulador más potente de la angiogénesis (Ferrara, Adamis, 2016). Los mecanismos proteolíticos y “de corte y empalme” postranscripcionales que ocurren durante la maduración del ARN dan lugar a una gran familia de isoformas (VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₂₀₅...) (Giles, 2001) que varían en biodisponibilidad, propiedades de enlace y señalización y, en consecuencia, con funciones muy diversas: responsables de la complejidad de la señalización inducida por VEGF (Robinson, Stringer, 2001). Entre ellos, VEGF₁₆₅ es la especie molecular predominante.

1.3 Receptores de VEGF

La actividad de los polipéptidos VEGF (glucoproteínas unidas a un dímero de cisteína) está mediada a través de receptores tirosina-quinasa (RTKs): VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4); que se expresan en la superficie de distintos tipos de células (Giles, 2001). Estos consisten en siete dominios inmunoglobulínicos extracelulares, un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana regulador y un dominio tirosina-quinasa intracelular (Cebe-Suárez et al., 2005). La dimerización de estos receptores, inducida por la unión de VEGF al mismo, desencadena cambios estructurales responsables de la activación de los dominios intracelulares tirosina-quinasa y la consiguiente autofosforilación de los residuos de tirosina. Los receptores, una vez fosforilados, activan nuevas proteínas implicadas en distintas rutas de señalización intracelular que coordinan todo el desarrollo vascular.

Así, VEGFR-1 se expresa en varios tipos de células hematopoyéticas como monocitos y macrófagos, regulando la vasculogénesis normal en el embrión (Cebe-Suárez et al., 2005). A pesar de la alta afinidad por VEGF-A, media débilmente los efectos mitogénicos en células endoteliales (Park et al., 1999). VEGFR-3, por su parte, se expresa casi exclusivamente en las células de los vasos linfáticos donde promueve la linfoangiogénesis. Finalmente, VEGFR-2 que se expresa en células endoteliales es el principal receptor mediador de las funciones biológicas de VEGF-A en la angiogénesis (Cebe-Suárez et al., 2005).

A través de VEGFR-2, VEGF-A estimula las distintas fases de la angiogénesis: la migración, proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como, la permeabilidad vascular y la vasodilatación, gracias a una compleja regulación intracelular que implica un gran número de moléculas endógenas en la transducción de la señalización angiogénica (Figura 1).

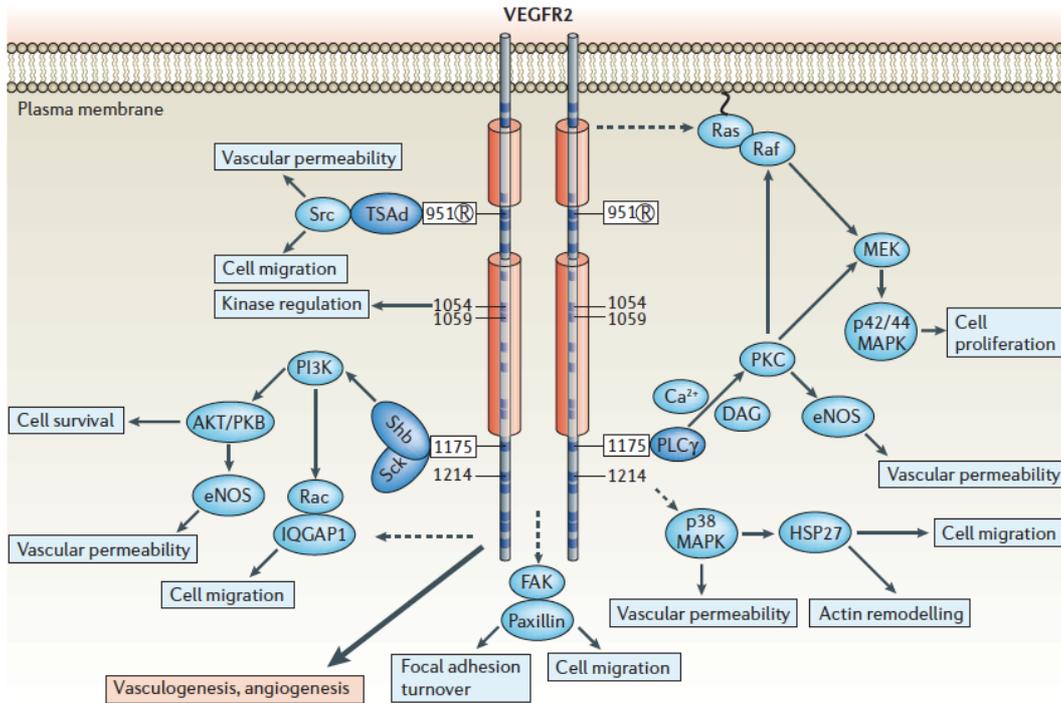


Figura 1. Esquema representativo de la cascada de señalización intracelular inducida por VEGF a través del receptor VEGFR2. Detalle de las diferentes rutas, así como los sitios de fosforilación, proteínas y segundos mensajeros implicadas en la transducción de la compleja respuesta angiogénica en las distintas fases del proceso angiogénico. (Olsson et al., 2006)

Las vías más estudiadas engloban la fosfolipasa γ PLC γ -1- ERK1/2, crucial para el desarrollo vascular; PI3K-Akt, imprescindibles para la supervivencia y regulación de la vasomoción y la función barrera y Src y otras GTPasas, involucradas tanto en la morfología y migración celular como en las uniones intercelulares (Simons, 2016).

1.4 Papel de la angiogénesis en el cáncer y las enfermedades cardiovasculares

Si bien la angiogénesis es un proceso fisiológico, en el adulto tiene un papel esencial en la patogénesis de las dos principales causas de muerte en el mundo como son el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (16% y 31% de muertes en 2015, respectivamente)(WHO, 2017; WHO, 2018).

En todo proceso de cáncer y enfermedad cardiovascular existe un componente de formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que favorece tanto el desarrollo del tumor, como el desarrollo y desestabilización de la placa de ateroma (Celetti et al., 2001; Bergers, Benjamin, 2003). Asimismo, se ha demostrado que VEGF promueve la progresión de la placa de ateroma (Celetti et al., 2001; Khurana et al., 2005) y la angiogénesis tumoral (Senger et al., 1993).

Debido a que VEGF es el principal factor pro-angiogénico, la inhibición de VEGF es un mecanismo molecular plausible que demuestra una causa-efecto directa en la disminución del riesgo cardiovascular y de cáncer. Prueba del rol crucial de VEGF en la angiogénesis es el hecho de que ciertos fármacos frente al cáncer son moléculas anti-VEGF: como es el caso de bevacizumab (Avastin®), anticuerpo monoclonal que se une específicamente a VEGF inhibiendo su acción), actualmente el más utilizado en el tratamiento del cáncer de colon, pulmón, mama, riñón e hígado (Ferrara, Adamis, 2016; Roviello et al., 2017). Otros fármacos también utilizados son inhibidores de RTKs como Sorafenib o Sunitinib, entre otros (Giles, 2001; Olsson et al., 2016). Sin embargo, debido al uso prolongado de las terapias anti-VEGF se han descrito serios efectos adversos como hipertensión (Li, Kroetz, 2018; Touyz et al., 2018) debido a que, al inhibir la cascada de señalización de VEGF, se inhibe también la activación de proteínas como eNOS responsables de la producción de óxido nítrico implicado en la vasodilatación.

1.5 Compuestos bioactivos presentes en alimentos fermentados y sus metabolitos con actividad anti-VEGF

Ciertos compuestos bioactivos presentes en los alimentos como ciertos polifenoles y compuestos indólicos han demostrado recientemente poseer actividad anti-VEGF (Lamy et al., 2014; Moyle et al., 2015; Cerezo et al., 2015; Cerezo et al., 2017). En este trabajo nos centraremos en ciertos compuestos que se producen como resultado del metabolismo de las levaduras en los alimentos fermentados y sus metabolitos, como son el ácido 3-indolacético, el 5-hidroxitriptofol y el hidroxitirosol.

1.5.1 Ácido 3-indolacético

La estructura química del ácido 3-indolacético (3-IAA) consiste en un núcleo indólico sustituido con un grupo carboximetílico (Figura 2). El 3-IAA es un metabolito del triptófano que se produce tanto en el organismo humano por acción de la microbiota intestinal a partir del L-Trp asimilado en la dieta (Zhu et al., 2011; O'Mahony et al., 2015), como en plantas y en alimentos fermentados a través del metabolismo de las levaduras. En el organismo humano se obtiene por desaminación oxidativa del triptófano, o bien, a través de la triptamina que resulta de la descarboxilación del triptófano.

3-IAA es, además, una importante fitohormona: la auxina más abundante en el reino vegetal, que desempeña un papel crucial en distintos procesos durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Parthasarathy et al., 2018) y ha sido identificada en distintas especies de uva (Çakir et al., 2013), pimienta (Waseem et al., 2018), tomate (Audran-Delalande et al., 2012) y cítricos (Xie et al., 2015), entre otros. Durante la fermentación alcohólica por acción de las levaduras, el 3-IAA se sintetiza a través de la ruta de Ehrlich (Mas et al., 2014) (Figura 2), estando así presente en el vino (1.7-83.8 µg/L) (Fernández-Cruz et al., 2017).

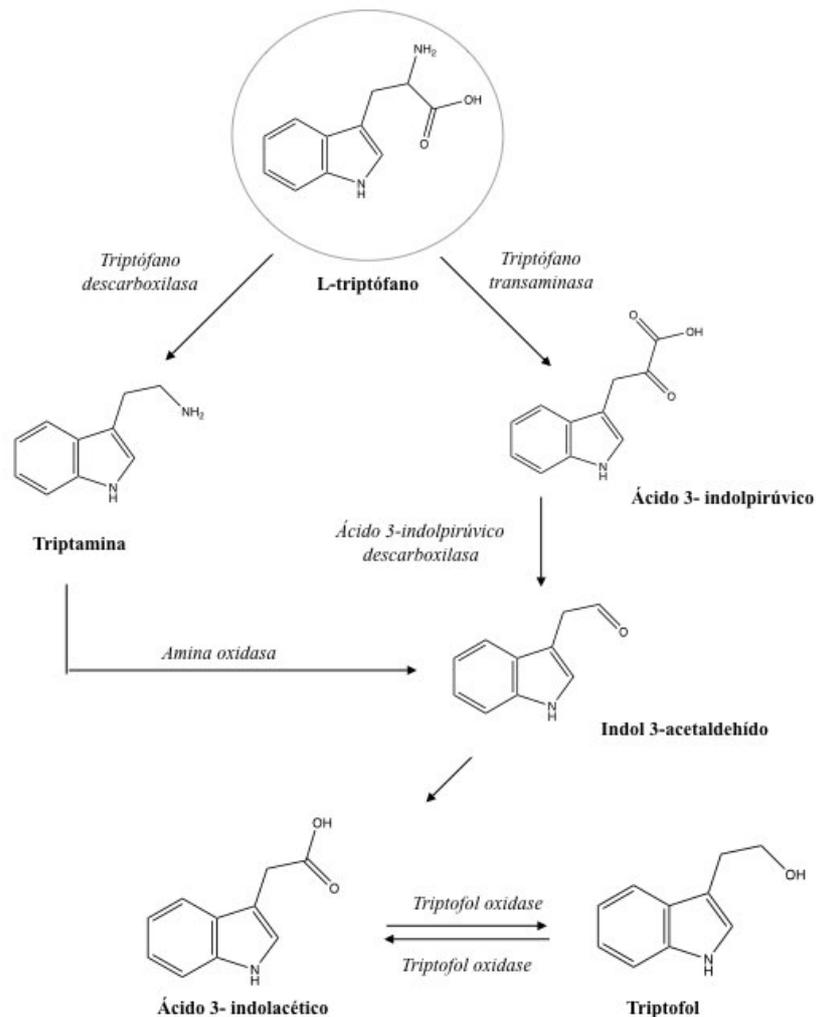


Figura 2. Síntesis del 3-IAA por la ruta de Ehrlich en levaduras (Fernández-Cruz et al., 2017)

1.5.2 5-hidroxitriptofol

El 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) es un metabolito humano de la serotonina (Reddy, Jagota, 2015). Alternativamente a la conversión en melatonina, la serotonina puede ser transformada por una enzima MAO en ácido 5-hidroxiindolacético y, a partir de este último, en 5-HTOL cuya estructura mantiene el anillo indólico sustituido con un grupo hidroxilo (Figura 3).

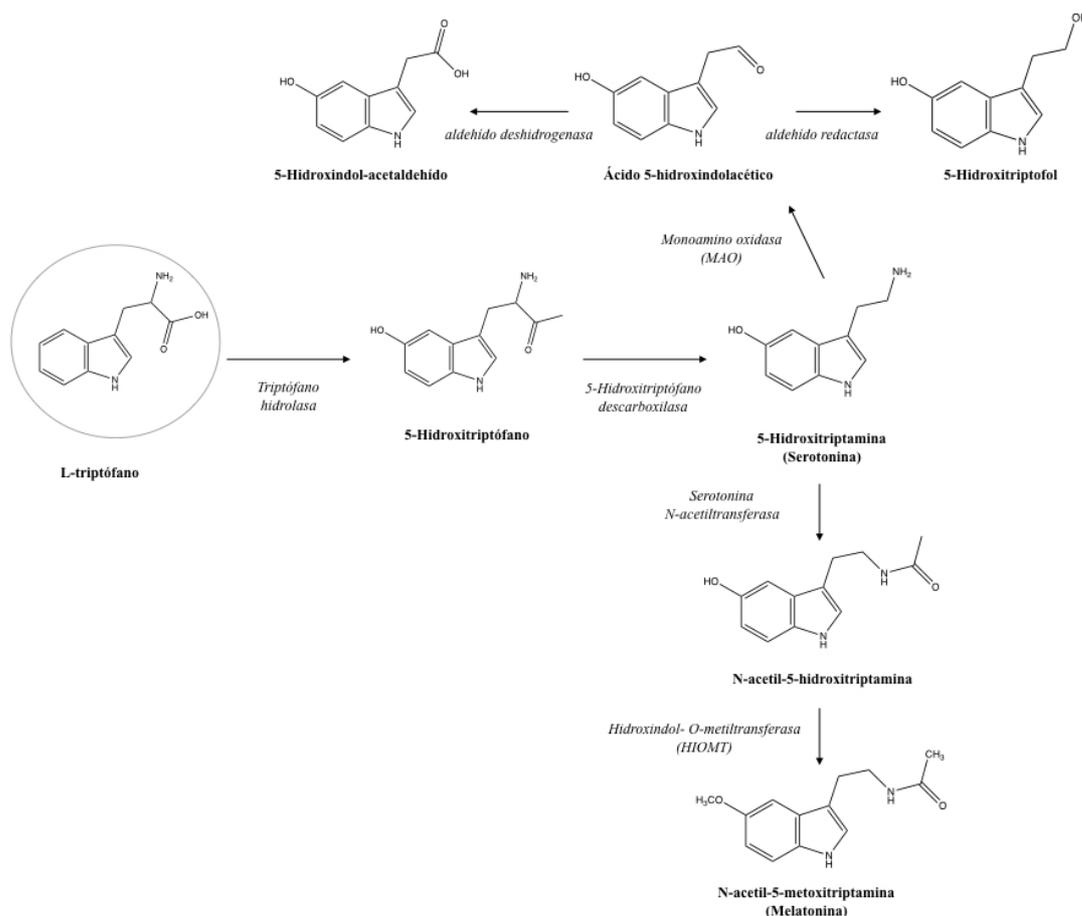


Figura 3. Ruta de síntesis del 5-HTOL (Krishnaswamy et al., 2014)

El 5-HTOL no se ha identificado en alimentos pero su excreción se ha demostrado que aumenta tras el consumo de alimentos ricos en serotonina como el plátano (25µg/g pulpa) (Helander et al., 1992), el vino (3mg /L) (Wang et al. 2014) y la cerveza (3-24 mg/L) (Kirschbaum et al., 1999).

1.5.3 Hidroxitirosol

El hidroxitirosol (HT) o 3,4'-dihidrofeniletanol es un compuesto ortodifenólico con dos grupos hidroxilos adyacentes al anillo aromático responsables de su capacidad antioxidante (Vissers et al., 2004) (Figura 4). De hecho, es uno de los antioxidantes más potentes presentes en el aceite de oliva (Goldsmith et al., 2018) derivado de la oleuropeína - compuesto glucosídico del éster de ácido elenólico e hidroxitirosol y principal polifenol presente en las hojas y frutos de la especie vegetal *Olea europea* (Vissers et al., 2004). El HT se obtiene tras la pérdida de la molécula de glucosa y la hidrólisis de la oleuropeína a un derivado menos polar, durante la maduración de las aceitunas y en la producción del aceite de oliva.

No exclusivo del aceite de oliva, el HT se produce también en el vino a través del metabolismo de las levaduras durante el proceso de vinificación (Álvarez-Fernández et al., 2018). En este caso, su ruta biosintética es diversa y se conoce como metabolito secundario de la transformación del aminoácido aromático tirosina durante la fermentación alcohólica (Garrido, Borges, 2013; Álvarez-Fernández et al., 2018) (Figura 4).

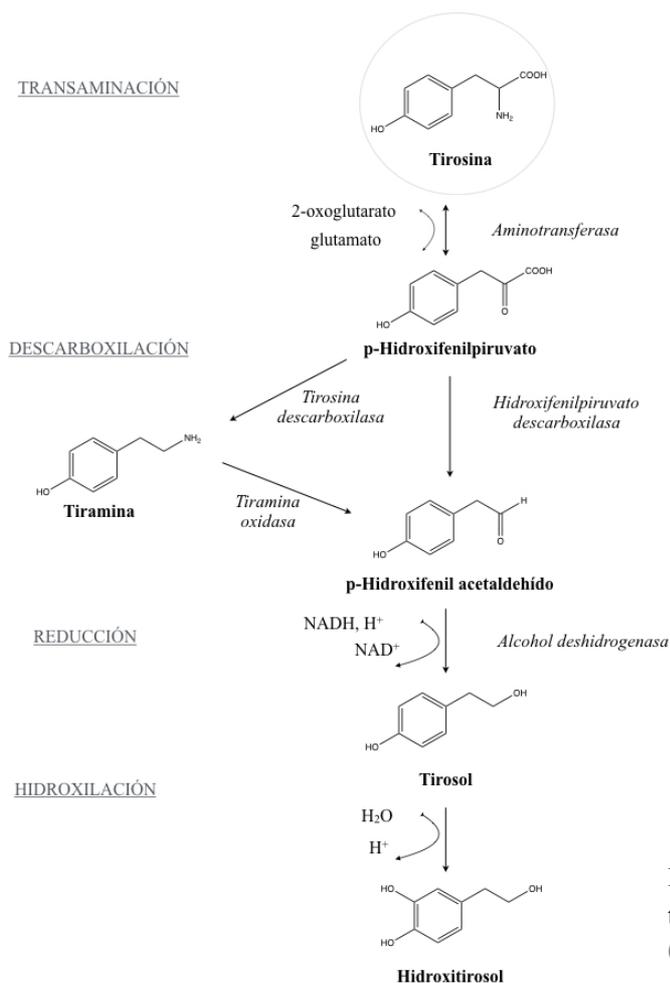


Figura 4. Síntesis del HT a través de la ruta de Ehrlich (Álvarez-Fernández et al., 2018)

Cabe destacar que el HT del aceite de oliva posee una declaración de propiedades saludables autorizada por la Comisión Europea, en base a la opinión científica positiva del papel de expertos de la EFSA (European Food Safety Authority) sobre su efecto protector frente a la oxidación de las partículas de LDL y al mantenimiento de niveles adecuados de colesterol HDL (referido a un consumo de 5mg HT/ 20g de aceite de oliva) (EFSA, 2011; Reglamento EU 432/2012).

1.5.4 Efecto anti-angiogénico del ácido 3-indolacético, 5-hidroxitriptofol e hidroxitirosol

Recientemente, el ácido 3-indolacético, el 5-hidroxitriptofol y el hidroxitirosol han revelado inhibir la activación de VEGFR-2 inducida por VEGF en células endoteliales y, en consecuencia, inhibir la angiogénesis (Cerezo et al., 2017; Lamy et al., 2014). Entre los compuestos indólicos, el 3-IAA resultó ser el inhibidor más potente (valor IC_{50} de 970.4 μ M) seguido del 5-HTOL (0.1 mM) con un porcentaje de inhibición del 35% (Cerezo et al., 2017). Estos autores demostraron que el posible mecanismo de acción molecular que puede explicar la actividad de estos compuestos consiste en la interacción entre los compuestos indólicos y componentes de la membrana celular endotelial (probablemente VEGFR-2) de tal manera que se impide la unión de VEGF a su receptor 2 y la consiguiente fosforilación del mismo (Cerezo et al., 2017).

En consonancia con ello, como a través de VEGFR-2 VEGF media la proliferación, permeabilidad, migración y supervivencia de las células endoteliales (Holmes et al., 2007), las investigaciones en este campo están orientadas al estudio de su efecto anti-angiogénico en las distintas fases de la angiogénesis. En relación con su capacidad de inhibir la fosforilación de VEGFR-2, 3-IAA ha demostrado inhibir la migración de células HUVEC en presencia de VEGF en un 99% (Cerezo et al., 2017). Estos datos corroboran el carácter anti-angiogénico del 3-IAA.

Respecto al 5-HTOL, existen resultados que confirman su efecto antiproliferativo en líneas celulares tumorales de sarcoma o coriocarcinoma y en líneas celulares de macrófagos (Sze et al., 1993). Sin embargo, se desconoce su efecto en las distintas fases de la angiogénesis en células endoteliales.

Por otro lado, además de la evaluación de los efectos celulares de estas moléculas, otros estudios van orientados a comprender la cascada intracelular activada por VEGF por la que median sus efectos anti-angiogénicos.

En el caso de otros compuestos bioactivos como ciertos polifenoles presentes en alimentos (galato de epigallocatequina y tetrámeros de procianidinas) han demostrado no sólo inhibir la fosforilación de VEGFR-2 y, consecutivamente en la cascada, PLC γ -1 (principal mediador de la proliferación celular); sino también, activar eNOS via Akt, lo que podría evitar el efecto secundario hipertensor que presentan los fármacos anti-VEGF (Moyle et al., 2015). En relación a los derivados indólicos 3-IAA y 5-HTOL, se desconoce su efecto sobre estas especies moleculares y si, al igual que los polifenoles anteriores, exhiben también la ventaja mencionada frente a los fármacos anti-VEGF.

El hidroxitirosol ha demostrado su capacidad de inhibir distintas fases de la angiogénesis como la proliferación, migración y formación tubular en células endoteliales como consecuencia de la inhibición de la señalización de VEGFR-2 inducida por VEGF (al cabo de 24h; IC₅₀: [30 μ M]) (Lamy et al., 2014). Sin embargo, se desconoce la molécula diana de este compuesto y el mecanismo molecular que explique la inhibición de la señalización mediada por VEGF. Dada la naturaleza fenólica de este compuesto y ya que otros polifenoles (galato de epigallocatequina y tetrámeros de procianidinas) inhiben la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF por unión directa a la molécula de VEGF (Moyle et al., 2015), podría ser que el HT actuara del mismo modo.

El presente proyecto pretende dilucidar algunos de los interrogantes planteados en los estudios anteriormente descritos sobre los compuestos bioactivos 5-hidroxitriptofol, ácido 3-indolacético e hidroxitirosol y su actividad anti-angiogénica. Por ello, la hipótesis de este trabajo es que la determinación del efecto de los compuestos 5-hidroxitriptofol, ácido 3-indolacético e hidroxitirosol sobre el proceso de angiogénesis nos permitirá avanzar en la determinación de los compuestos derivados del metabolismo de las levaduras y sus metabolitos con mayor potencial anti-angiogénico y los posibles mecanismos de acción involucrados en el mismo.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es evaluar el efecto de distintos compuestos bioactivos y sus metabolitos como el 5-hidroxitriptofol, ácido 3-indolacético e hidroxitirosol sobre la inhibición del proceso de angiogénesis.

Para el desarrollo del mismo se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del 5-hidroxitriptofol sobre la fase de inicio del proceso angiogénico, en concreto sobre la inhibición de la migración de las células endoteliales.
- Determinar el efecto del 5-hidroxitriptofol y el ácido 3-indolacético sobre la modulación de la cascada de señalización intracelular mediada por VEGF (PLC γ -1, Akt, eNOS).
- Evaluar el efecto de la presencia simultánea del 5-hidroxitriptofol y el ácido 3-indolacético sobre la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2.
- Identificar el posible mecanismo de acción que pueda explicar el efecto anti-angiogénico del hidroxitirosol.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

Todos los experimentos se realizaron con células endoteliales HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) aisladas de la vena del cordón umbilical humano y ampliamente utilizadas para evaluar el proceso angiogénico. Tanto las células como los medios de cultivo empleados para su crecimiento [EGMTM-2: Endothelial cell growth medium-2, sin extracto de cerebro bovino BBE (bovine brain extract) y con hEGF, hidrocortisona, suero bovino fetal FBS (fetal bovine serum), VEGF, hFGF-B, R³-IGF-1, ácido ascórbico, heparina y GA-1000 (gentamicina - anfotericina B)] y para el tratamiento de las mismas [EBMTM-2: Endothelial cell basal medium-2 (sin suero ni factores de crecimiento)] fueron suministrados por los laboratorios Lonza (Slough, UK).

Las células HUVEC, entre pases 4 y 5, se cultivaron en placas de 6 pocillos (3500 células/cm²) en medio EGMTM-2 y bajo condiciones de 37°C y 5% CO₂. Estas células precisan un mínimo de 6 horas para adherirse a la base de la placa. Aproximadamente en el transcurso de 5 días, cambiando el medio días alternos, las células eran confluentes en un 90-100% y se trataron con los compuestos a analizar en medio EBMTM-2. El manejo de las células se llevó a cabo siempre en atmósfera estéril bajo campana de seguridad biológica tipo 2, cumpliendo con un protocolo riguroso de buena práctica para asegurar la no contaminación y el óptimo crecimiento de las mismas.

3.2 Compuestos en estudio

Se adquirieron los siguientes compuestos: ácido 3-indolacético del laboratorio Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) y 5-hidroxitriptofol e hidroxitirosol de Cayman Chemical (Ann. Arbor, MI, USA). Los stock se diluyeron en DMSO a las siguientes concentraciones: 1M para el ácido 3-indolacético y 5-hidroxitriptofol y concentraciones de 50mM y 1mM para el hidroxitirosol. Se conservaron a - 20°C.

3.3 Inhibición de la migración. Ensayo de Wound-healing

Con objeto de evaluar el efecto del 5-hidroxitriptofol en las fases iniciales de la angiogénesis se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la migración mediante el ensayo llamado Wound-healing (ensayo de la herida), siguiendo el protocolo previamente establecido para otros compuestos indólicos (Cerezo et al., 2017). Brevemente, se cultivaron las células HUVEC en pase 4 sobre placas μ -Dish de 50 mm (Ibidi, Martinsried, Germany) en medio EGMTM-2, a 37°C y 5% CO₂. Cuando las células alcanzaron el 100% de confluencia se lavaron con tampón fosfato salino PBS (phosphate buffered saline) y se realizó una herida atravesando el centro de la monocapa de células con ayuda de una punta de pipeta estéril de 200 μ l. Seguidamente, se lavaron con PBS dos veces para retirar las células muertas y se incubaron a 37°C en EBMTM-2 conteniendo 5-hidroxitriptofol (1mM) o DMSO por duplicado (todos con una concentración final de DMSO \leq 0,1%) durante 4 h antes de la estimulación con VEGF 25 ng/ml (VEGF₁₆₅ humano recombinante, R&D Systems, Minneapolis, MN,USA) (Figura 5).

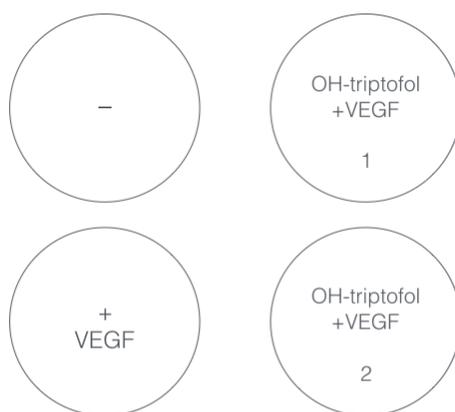


Figura 5. Diseño de las placas. Ensayo de Wound-healing.

Las heridas se fotografiaron al inicio y al final del tratamiento con VEGF (a las 0h y 24h, respectivamente) utilizando un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon, Tokyo, Japan). El tamaño inicial y final de las heridas se determinó usando el software Nis-Elements BR v.4.30.02 (Nikon, Tokyo, Japan) y la diferencia entre ellas se utilizó para determinar la distancia de migración mediante la fórmula:

$$(\text{tamaño inicial de la herida} - \text{tamaño final de la herida}) / 2$$

3.4 Ensayos para evaluar el efecto del ácido 3-indolacético y 5-hidroxitriptofol sobre la cascada de señalización intracelular estimulada por VEGF.

El efecto del ácido 3-indolacético y 5-hidroxitriptofol sobre la modulación de la cascada de señalización intracelular estimulada por VEGF se determinó utilizando las condiciones experimentales previamente descritas (Moyle et al., 2015) con ligeras modificaciones propuestas para compuestos indólicos (Cerezo et al., 2017), como se explica a continuación. El cultivo de las células HUVEC para este experimento se llevó a cabo en placas de 6 pocillos siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 3.1. Antes de comenzar el tratamiento, se diluyeron los patrones de ácido 3-indolacético (1M), 5-hidroxitriptofol (1M) en medio EBMTM-2, siendo la concentración final de los mismos 1mM (concentración final de DMSO ≤ 0,1%).

Tras ello, las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio EBMTM-2, conteniendo sólo DMSO (para los controles negativos y positivos) o la disolución 1mM de los compuestos en estudio (por cuadruplicado), durante 4 horas antes de ser estimuladas con VEGF 25 ng/ml durante 10 minutos en el caso de la determinación de p-PLC γ -1/PLC γ -1 y 60 minutos para p-Akt/Akt y p-eNOS/eNOS (Figura 6). Se llevaron a cabo dos experimentos independientes.

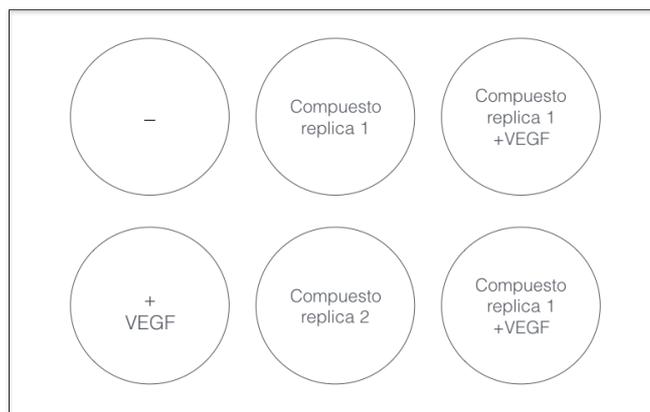


Figura 6. Diseño de las placas. Efectos sobre la cascada.

Seguidamente, las células se lavaron con PBS frío para parar las reacciones que se estuviesen dando en las células y se retiró todo el contenido líquido posible de los pocillos. Fuera de campana y sobre hielo, se añadió a cada pocillo 50 μ l de tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA buffer) al que se le añadieron benzonasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Molecular Biochemical, Barcelona, Spain).

Por último, con la ayuda de los raspadores de células se arañó el fondo de los pocillos en varias direcciones para ayudar a romper las células y recoger el lisado celular en eppendorfs de centrífuga individuales previamente rotulados. Se agitaron 3 veces durante 20 segundos con la ayuda del vortex y se centrifugaron a 13000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Inmediatamente después, se recogió el sobrenadante de cada muestra evitando tocar el pellet y se transfirieron a nuevos eppendorfs rotulados para el posterior análisis de Western blot. De estos últimos, se tomaron 5 μ l para el recuento de proteínas mediante el ensayo del ácido bicinonínico. Todas las proteínas se conservaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

3.4.1 Recuento de proteínas mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA essay)

La cuantificación de proteínas en las muestras se llevó a cabo mediante el ensayo del ácido bicinonínico. El ensayo de BCA es una prueba bioquímica basada en el cambio de color de la muestra, de verde a morado, en proporción a la concentración total de proteínas, medible mediante técnicas colorimétricas. El principio del método reside en el poder reductor de las proteínas - principalmente debido a los residuos aminoacídicos de cisteína, tirosina y triptófano presentes en estas moléculas - que reducen el cobre (Cu^{+2} a Cu^{+1}) en solución alcalina a 37°C, resultando la formación de un complejo púrpura con el ácido bicinonínico.

Para la recta de calibrado se prepararon estándares de albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés). Partiendo de 1ml de BSA stock (2mg/ml en agua), se realizaron diluciones seriadas en fosfato de sodio (NaPi buffer) en un rango de 100-1.600 μ g/ml, así como un blanco sólo con NaPi buffer. Las muestras de proteínas a cuantificar también se diluyeron 12 veces en NaPi buffer. Sobre una placa de 96 pocillos se añadieron 25 μ l de cada estándar y muestra por duplicado. Posteriormente, se mezclaron los reactivos A (solución de ácido bicinonínico) y B (solución de sulfato de Cooper III) en proporción 50:1 y se añadieron 200 μ l a cada pocillo. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 550 nm utilizando el lector de microplacas Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek instruments) y el software Gene5.

3.4.2 Análisis de Western Blot para fosfolipasa C gamma 1 (PLC γ -1), Akt y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)

Para los análisis de Western blot se usaron anticuerpos específicos para fosfo-PLC γ -1 (Tyr 783) y PLC γ -1; fosfo-Akt (Ser 473), Akt y fosfo-eNOS (Ser 1177), eNOS, así como anticuerpos anti-rabbit IgG-HRP, adquiridos de Cell Signalling Technology.

En base al recuento de proteínas realizado, se calcularon los volúmenes de los lisados de proteínas con los que llevar a cabo los análisis de Western blot para cargar en cada gel las mismas cantidades de proteínas de las distintas muestras (25 μ g de proteínas). Estos volúmenes se mezclaron con tampón NuPAGE lithium dodecyl sulfate (LDS) y NuPAGE DTT (Invitrogen, Loughborough, UK) y se calentaron a 70°C durante 10 min para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

A continuación, se sometieron a electroforesis cargadas junto al estándar de proteínas MagicMark[®]™ (PM 20-220 kDa) en geles de electroforesis NuPAGE 4%-12% bis-tris (Invitrogen), tras lo que se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0.2 μ m (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con suero de albúmina bovino (BSA) al 5% en tampón Tris-buffered saline TBS y Tween[®]20 (TBST) y se incubaron primero con anticuerpos anti p-PLC γ -1, p-Akt y p-eNOS y, en segundo lugar, con anti PLC γ -1, Akt e eNOS (todos en una proporción 1:1000) a 4°C durante toda la noche. Tras cada una de las incubaciones con anticuerpos, las membranas se incubaron 1h con anticuerpos anti-rabbit IgG-HRP (1:1000) disueltos en 5% BSA en TBST. Las bandas inmunoreactivas se detectaron usando el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, Hitchin, UK), compuesto por una solución estable de peróxido y una solución de luminol en proporción 1:1, y se visualizaron usando el equipo de imagen Amersham Imager 600 (GE Healthcare live sciences, Marlborough, MA, USA).

3.5 Ensayos para evaluar el efecto de la combinación del ácido 3-indolacético y 5-hidroxitriptofol sobre la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF

El efecto del tratamiento de células HUVEC con la combinación del ácido 3-indolacético y 5-hidroxitriptofol sobre la activación de VEGFR-2 inducida por VEGF, se determinó siguiendo la metodología previamente descrita para compuestos indólicos (Cerezo et al., 2017).

El cultivo de las células HUVEC y el tratamiento de las mismas se llevó a cabo procediendo de modo análogo al descrito en el experimento 3.4 con ligeras variaciones. En resumen, los controles contenían sólo DMSO ($\text{DMSO} \leq 0,1\%$) y el resto de los pocillos mezclas de ácido 3-indolacético y de 5-hidroxitriptofol (concentración final 1mM de ambos). Tras las 4 horas de incubación se estimuló con VEGF (25 ng/ml) el control positivo y los compuestos sólo durante 5 min.

Finalmente, el lisado de las células y la recogida de las proteínas se realizaron como describe el apartado anterior. Se realizó el ensayo BCA (epígrafe 3.4.1) para el recuento de proteínas y se concluyó con la determinación y cuantificación de la fosforilación de VEGFR-2 mediante técnica de inmunoensayo ELISA.

3.5.1 Técnica de inmunoensayo ELISA para la determinación de p-VEGFR-2

Utilizando el PathScan® Phospho-VEGFR-2 (Tyr1175) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling Technology®) y siguiendo el protocolo establecido, se detectaron los niveles de la proteína VEGFR-2 fosforilada en las muestras recogidas.

Partiendo del recuento de proteínas realizado, se calcularon los volúmenes necesarios para cargar una cantidad final de 30 µg de proteínas en cada pocillo que se diluyeron en agua miliQ y ELISA sample diluent, en proporción 1:1. En cada uno de los pocillos de la placa de ELISA se pipetearon 100 µl de cada muestra por duplicado y se incubaron durante toda la noche a 4°C, favoreciendo la unión de los antígenos (proteínas totales de VEGFR-2, fosforiladas y no) a los anticuerpos anti-VEGFR-2 adheridos a la base. Continuando con el proceso, se incubaron secuencialmente los pocillos con el anticuerpo primario (Detection Antibody), el anticuerpo secundario (HRP-Linked secondary antibody) y el sustrato (TMB Substrate), lavando entre cada uno de los pasos con ELISA Wash buffer.

Por último, se añadió la solución STOP y se determinó el cambio de color mediante lectura de la absorbancia a 450 nm con el lector de microplacas Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek instruments) y el software Gene5.

3.6 Ensayos para determinar el mecanismo de acción anti-angiogénico del hidroxitirosol

Las células HUVEC se cultivaron en placas de 6 pocillos, tal y como ha sido descrito en los apartados anteriores. En base a dos diseños experimentales propuestos para evaluar el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos sobre la inhibición de la fosforilación del VEGFR-2 mediada por VEGF (Moyle et al., 2015), las células se trataron como se describe a continuación:

1) hidroxitirosol (concentración final 50 μM y 1 μM) en medio EBMTM-2 mezclado con VEGF en los 5 minutos previos al tratamiento con las células a 37°C durante 5 minutos (evaluación de la interacción directa del hidroxitirosol con VEGF); 2) hidroxitirosol (concentración final 50 μM y 1 μM) en medio EBMTM-2 durante 4 h de tratamiento con las células y posterior estimulación con VEGF durante 5 minutos (evaluación de la interacción del hidroxitirosol con componentes de la membrana celular) (Figura 7).

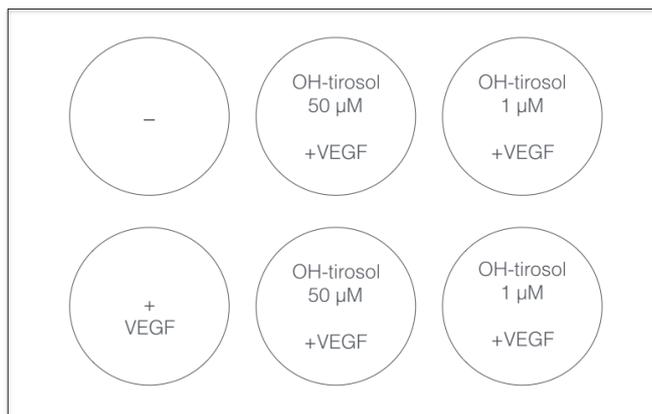


Figura 7. Diseño de la placa del tratamiento con hidroxitirosol.

Tras las incubaciones, se continuó con el lavado y lisado de las células por radioinmunoprecipitación y la recogida y recuento de proteínas, tal y como se realizó en los experimentos anteriores. La activación de VEGFR-2 se determinó mediante técnica de inmunoensayo ELISA (epígrafe 3.5.1).

3.7 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos utilizando el software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Las diferencias significativas entre las muestras se estimaron mediante la prueba estadística t de Student.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto anti-angiogénico del 5-hidroxitriptofol: inhibición de la migración celular

La migración de las células endoteliales es esencial para la formación de nuevos vasos durante la angiogénesis, correspondiendo a la fase de inicio de la misma (Álvarez-García et al., 2013). Por ello, se determinó por primera vez la capacidad del 5-hidroxitriptofol para inhibir la migración mediante el ensayo de Wound-healing en células endoteliales HUVEC. Los resultados demostraron que la estimulación de las células HUVEC con VEGF durante 24h cerraba la herida completamente (Figura 8). Sin embargo, el pretratamiento de las células con 5-hidroxitriptofol (1mM) antes de estimular con VEGF inhibió significativamente la distancia de migración de las células en un 50% después de 24h (Figura 8). Igualmente, otros compuestos indólicos derivados del metabolismo del triptófano como la melatonina y el ácido 3-indolacético han demostrado inhibir la migración de las células HUVEC, si bien los porcentajes de inhibición fueron mayores, 87% y 99% respectivamente (Cerezo et al., 2017). Por tanto, el ranking de inhibición de la migración de células endoteliales por estos compuestos indólicos sigue el siguiente orden: ácido 3-indolacético > melatonina > 5-hidroxitriptofol.

En el mismo estudio, fue demostrado un posible mecanismo por el que estos compuestos podrían interaccionar con los componentes de la membrana celular endotelial impidiendo que VEGF activase a su receptor VEGFR-2 (Cerezo et al., 2017), principal mediador de la proliferación, permeabilidad, migración y supervivencia en las células endoteliales (Holmes et al., 2007). Los porcentajes de inhibición de p-VEGFR-2 obtenidos fueron del 54% para el ácido 3-indolacético, del 30% para la melatonina y del 23% para el 5-hidroxitriptofol (Cerezo et al., 2017), siguiendo el mismo orden de actividad inhibitoria que en la inhibición de la migración celular. Por el contrario, estos valores de inhibición son comparativamente menores que los respectivos porcentajes de inhibición de la migración celular; lo que podría sugerir que, efectivamente, la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF no sea el único mecanismo posible que explique el efecto anti-angiogénico de estos derivados indólicos. De hecho, algunos autores han demostrado que la melatonina es capaz de inhibir la angiogénesis mediante la modulación de la expresión de proteínas intracelulares como p53 y Bax/Bcl-2, bloqueando el ciclo celular e induciendo la apoptosis celular (Cui et al., 2006) y por otro lado, reduciendo la proliferación celular a través de la cascada de proteínas intracelulares ERK1/2 / PI3K/ Akt/ PKC/ NF-kB mediado por receptores de melatonina MT1 y MT2 (Cui et al., 2008). De manera similar, el 5-hidroxitriptofol podría estar también modulando estas u otras proteínas pudiendo explicar así el 50% de inhibición de la migración celular.

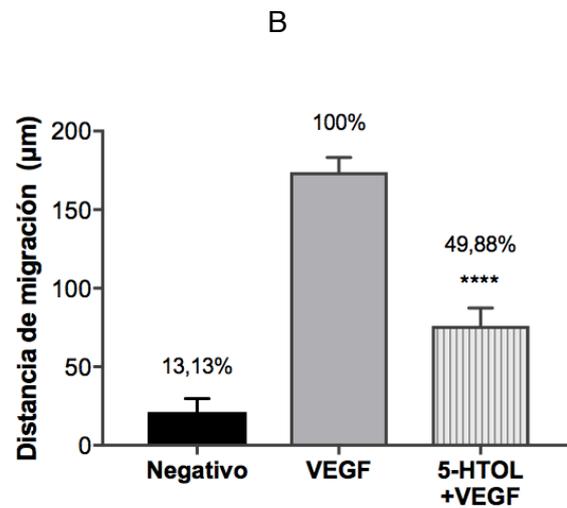
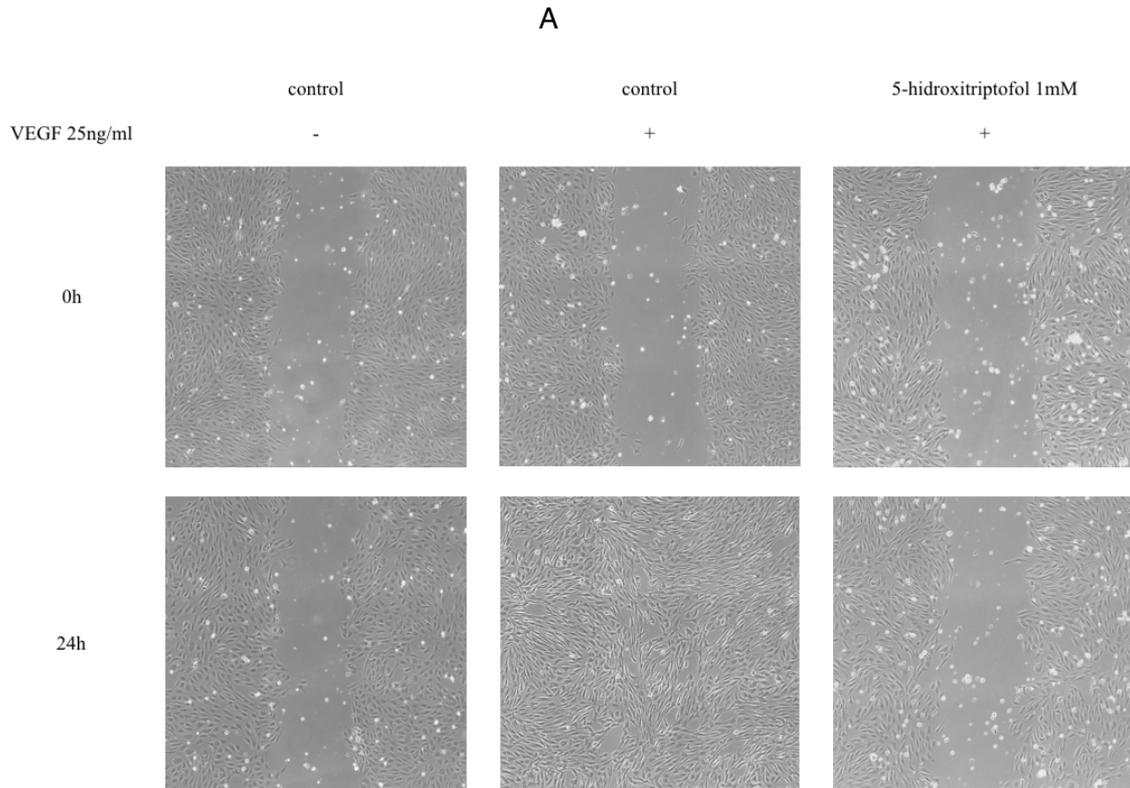


Figura 8. El 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) inhibe la migración de células HUVEC.

A- Se muestran fotografías del tamaño de la herida en tiempo 0 y 24 h: no estimulación con VEGF (foto izquierda), estimulación con VEGF (foto central) y pretratamiento 4h con hidroxitriptofol y estimulación con VEGF (foto derecha).

B- Las distancias de migración fueron medidas como se detalla en la sección de Materiales y métodos. Los datos están expresados como valor medio \pm SD de los dos experimentos. Los porcentajes de migración respecto al control positivo (VEGF) aparecen en la parte superior de las barras.

**** $\rho < 0.0001$

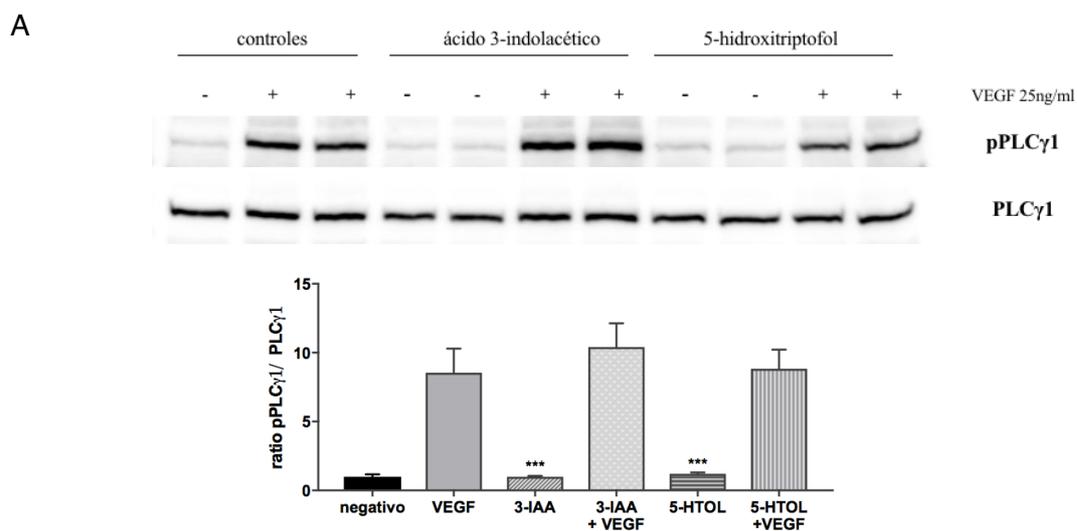
4.2 Efectos del 5-hidroxitriptofol y el ácido 3-indolacético sobre la cascada de señalización intracelular inducida por VEGF.

La activación de VEGFR-2 inducida por VEGF desencadena una compleja regulación intracelular que implica un gran número de moléculas endógenas en la transducción de la señalización angiogénica. El papel biológico de PLC γ -1, primer componente de la principal ruta de señalización utilizada por VEGFR-2 (Figura 1), ha sido descrito en la regulación tanto de la proliferación como de la migración celular (Takahashi et al., 2001; Wu et al., 2000; Simons et al., 2016). Es por ello que, en el presente trabajo se evalúa si la inhibición de la migración celular por el 5-hidroxitriptofol y el ácido 3-indolacético en células endoteliales está mediada a través de la inhibición de PLC γ -1, al igual que ocurre con otros compuestos bioactivos (Moyle et al., 2015).

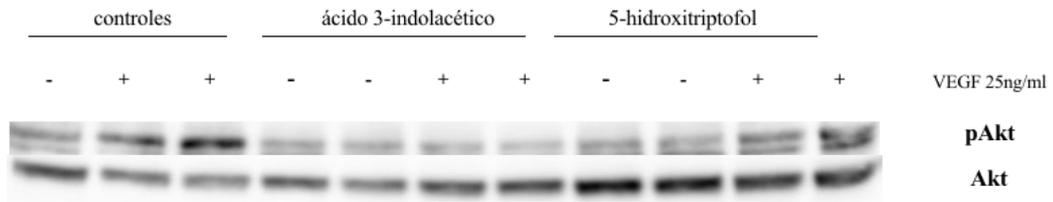
Los resultados demuestran que tras la estimulación con VEGF, PLC γ -1 se fosforila (Figura 9A). En presencia del ácido 3-indolacético (3-IAA) y 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) previa a la estimulación con VEGF, no se mostraron diferencias significativas en el ratio de p-PLC γ -1/PLC γ -1 con respecto al control positivo sólo con VEGF (Figura 9A), a diferencia de lo que cabría esperar ya que tanto 3-IAA como 5-HTOL han demostrado inhibir la fosforilación de VEGFR-2 (54% y 23% a 1mM) (Cerezo et al., 2017). Por tanto, los presentes resultados apuntan a que la inhibición del 3-IAA y del 5-HTOL sobre la angiogénesis (inhibición del 87% y 50% de la migración a 1mM, respectivamente) no está mediada a través de la inhibición de una de las principales proteínas responsable de la proliferación y migración celular PLC γ -1 (Figura 9A). Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente para otros bioactivos como ciertos compuestos fenólicos (galato de epigalocatequina y tetrámeros de procianidinas) que potencialmente inhiben la angiogénesis estimulada por VEGF y, a su vez, inhiben la activación de PLC γ -1 mediada por VEGF (Moyle et al., 2015). Nuestros resultados sugieren que en el caso del 3-IAA y el 5-HTOL deben estar involucradas otras rutas de señalización intracelular que expliquen su inhibición sobre la angiogénesis. Estas posibles rutas podrían ser: Shb-Sck-PI9K-Rac-IQGAPI, p38/MAPK-HSP27 y TSAAd/Src, todas ellas implicadas en la migración de las células endoteliales estimulada por VEGF (Figura 1) (Olsson et al., 2006). Dado que 3-IAA y 5-HTOL han demostrado que inhiben la fosforilación del VEGFR-2 en el residuo de Tyr1175 (Cerezo et al., 2017), la ruta más probable podría ser la que comprende Shb-Sck-PI3K-Rac-IQGAPI. No obstante, futuros trabajos serían necesarios para determinar qué vía en concreto es la involucrada.

La vasodilatación es otra de las funciones reguladas por VEGF vía VEGFR-2. El óxido nítrico (NO) es una especie molecular que ha demostrado ser un potente vasodilatador. Su producción es activada por la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) inducida por Akt (Figura 1). Por tanto, si se inhibe VEGF se puede inhibir eNOS y la producción de NO y causar efectos hipertensivos como ocurre con el uso prolongado de los actuales fármacos anti-VEGF. Por ello, se estudiaron los efectos del 3-IAA y 5-HTOL en la fosforilación de Akt e eNOS. Nuestros resultados demuestran que VEGF por sí solo activa tanto Akt como eNOS (Figura 9B, 9C). Por el contrario, el tratamiento con los compuestos 3-IAA y 5-HTOL disminuyó significativamente el ratio p-Akt/Akt y p-eNOS/eNOS (Figura 9B, 9C). Estos resultados contrastan con los descritos previamente para los polifenoles galato de epigallocatequina y tetrámeros de procianidinas que, a pesar de que inhiben la fosforilación de VEGFR-2 y PLC γ -1, activan eNOS a través de Akt lo que activaría la producción de óxido nítrico y podrían prevenir posibles efectos hipertensivos (Moyle et al., 2015). En consecuencia, el 3-IAA y 5-HTOL no presentarían la ventaja de estos compuestos fenólicos sino que, por el contrario, podrían presentar un efecto hipertensivo de igual manera que ocurre con los actuales fármacos anti-VEGF.

Estos resultados (inhibición de Akt e eNOS mediada por 3-IAA y 5-HTOL) apoyan la hipótesis de que la inhibición de estos compuestos sobre la angiogénesis esté mediada a través de la ruta: Shb-Sck-PI3K-Rac-IQGAPI, ya que Shb-Sck están también involucradas en la regulación de Akt e eNOS (Figura 1).

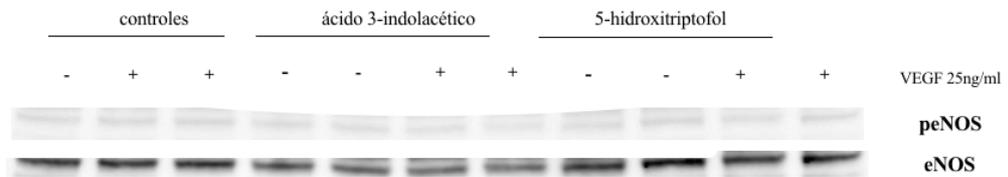


B



	Negativo	VEGF (25ng/ml)	IAA (1mM)	IAA (1mM) + VEGF	5-HTPOL (1mM)	5-HTPOL (1mM) + VEGF
ratio (p-AKT/AKT)	1.00 ± 0.37	1.63 ± 0.80	0.91 ± 0.11	0.61 ± 0.08	0.47 ± 0.14	1.06 ± 0.02

C



	Negativo	VEGF (25ng/ml)	IAA (1mM)	IAA (1mM) + VEGF	5-HTPOL (1mM)	5-HTPOL (1mM) + VEGF
ratio (p-eNOS/eNOS)	1.00 ± 0.79	1.32 ± 0.18	1.13 ± 0.13	0.86 ± 0.17*	0.84 ± 0.08**	0.72 ± 0.09**

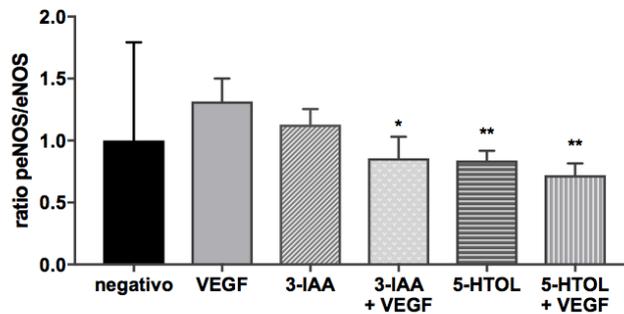


Figura 9. Células HUVEC tratadas con ácido 3-indolacético 1mM (3-IAA) y 5-hidroxitriptofol 1mM (5-HTOL) conteniendo o no VEGF (25ng/ml). Análisis de proteínas en Western-blot para PLC γ -1, Akt y eNOS.

A- Cortes de la membrana de Western blot incubada con anticuerpos anti PLC γ -1 y p-PLC γ -1. Representación gráfica del ratio p-PLC γ -1/PLC γ -1; valores comparados con el control positivo (VEGF).

B- Cortes de la membrana de Western blot incubada con anticuerpos anti Akt y p-Akt. Tabla que contiene los valores del ratio p-Akt/Akt; valores comparados con el control positivo (VEGF)

C- Cortes de la membrana de Western blot incubada con anticuerpos anti eNOS y p-eNOS. Tabla que contiene los valores del ratio p-eNOS/eNOS. Representación gráfica del ratio p-eNOS/eNOS; valores comparados con el control positivo (VEGF).

* $\rho < 0.05$ ** $\rho < 0.01$ *** $\rho < 0.001$

4.3 Efectos de la combinación simultánea del ácido 3-indolacético y 5-hidroxitriptofol sobre la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF.

Estos compuestos indólicos pueden encontrarse, simultáneamente, en el plasma. Por ello, se determinó el efecto combinado del ácido 3-indolacético (3-IAA) y 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) sobre la activación de VEGFR-2 inducida por VEGF en células HUVEC.

Los resultados reflejan que tras el tratamiento con concentraciones equivalentes de ambos compuestos y posterior estimulación con VEGF, la inhibición en la fosforilación de VEGFR-2 resultó no ser significativa (9%) (Figura 10) y ser mucho menor que los valores de inhibición obtenidos para los compuestos aislados 3-IAA (54%) y 5-HTOL (35%) a igual concentración (1mM) (Cerezo et al., 2017). De este modo, se observa que la asociación de ambos compuestos comporta un efecto antagonista entre ellos. Futuros ensayos serían necesarios para evaluar el efecto de otras combinaciones de compuestos indólicos que puedan describir algún efecto sinérgico o aditivo entre ellos.

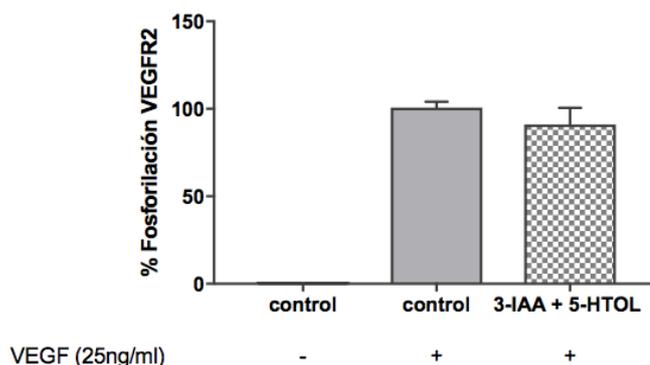


Figura 10. Células HUVEC tratadas con ácido 3-indolacético (3-IAA) y 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) a concentraciones iguales 1mM. Determinación de p-VEGFR-2, valores comparados con el control positivo (sólo VEGF).

4.4 Hidroxitirosol: posible mecanismo de acción molecular en la inhibición de la angiogénesis

El HT ha demostrado inhibir la fosforilación de VEGFR-2 inducida por VEGF (IC_{50} : 7-30 μ M, al cabo de 24 h) y, al mismo tiempo, inhibir la proliferación, migración celular y la formación tubular en células endoteliales HUVEC (Lamy et al., 2014). No obstante, se desconoce la molécula diana de este compuesto y el mecanismo molecular que explique su efecto en la señalización a través de VEGFR-2. Así, en el presente estudio se llevaron a cabo dos condiciones experimentales distintas para evaluar su posible mecanismo de acción.

Por un lado, se mezcló el hidroxitirosol y VEGF (25ng/ml) 5 minutos antes de tratar las células HUVEC para evaluar si interacciona directamente con VEGF, tal y como ocurre con otros compuestos fenólicos (Moyle et al., 2015). No obstante, ninguna de las dos concentraciones ensayadas de HT (50 μ M y 1 μ M) resultaron inhibir la activación de VEGFR-2 inducida por VEGF (Figura 11), descartando así la interacción directa del HT con VEGF como mecanismo que impida la activación de VEGFR-2.

En segundo lugar, las células se preincubaron con HT (a las mismas dos concentraciones 50 μ M y 1 μ M) durante 4h y posteriormente se estimularon con VEGF (25ng/ml) durante 5 min. En este caso, sólo el tratamiento con HT a 50 μ M consiguió inhibir significativamente en un 37%, la fosforilación de VEGFR-2 (Figura 11).

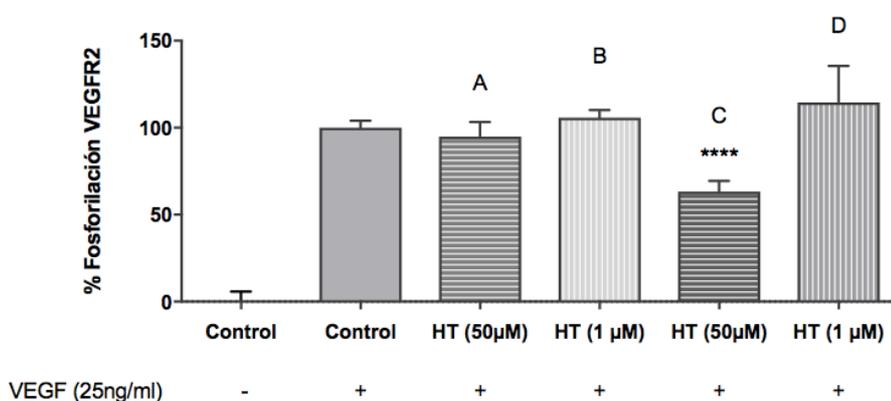


Figura 11. Células HUVEC tratadas con hidroxitirosol (HT) a 50 μ M y 1 μ M y VEGF (25ng/ml). Barras A y B corresponden al tratamiento durante 5 min de las células con hidroxitirosol y VEGF, mezclados en los 5 min previos. Barras C y D corresponden al tratamiento de las células con HT durante 4h y posterior estimulación con VEGF durante 5 minutos. Detección de p-VEGFR2 (Tyr1175) mediante inmunoensayo y determinación del porcentaje de estimulación comparando con el control positivo.
**** $p < 0.0001$

Con ello, se propone que un posible mecanismo de acción por el que el HT regula la angiogénesis sea por interacción con componentes de la membrana celular (VEGFR-2, neuropilin, etc...) de tal manera que se impida la unión de VEGF a su receptor VEGFR-2. Lamy et al. (2014) determinaron un IC_{50} de 30 μ M para la inhibición del HT sobre el VEGFR-2. Sin embargo, las condiciones experimentales fueron distintas ya que preestimularon las células HUVEC con el HT durante 24h. Teniendo en cuenta que la vida media del HT en plasma es de 2.43 h (Miro-Casas et al., 2003), nuestros resultados (pre-estimulación de 4h con HT) parecen ser más próximos a la situación real.

Por ello, serían necesarios futuros experimentos para determinar el IC₅₀ siguiendo las condiciones experimentales descritas en el presente trabajo. Aun así, comparado con los compuestos indólicos el hidroxitiroso parece tener mayor potencial anti-angiogénico debido a que exhibe porcentajes de inhibición de p-VEGFR-2 similares pero a concentraciones de tres órdenes de magnitud menores (Tabla 2).

Compuestos	Concentración	% inhibición de p-VEGFR-2	Referencia
Hidroxitiroso	50 μ M	37 %	(Cerezo et al., 2017)
Ácido 3-indolacético	1 mM	54 %	
Melatonina	1 mM	30 %	
5-Hidroxitriptofol	1 mM	23 %	
Serotonina	1 mM	30 %	

Tabla 2. Porcentajes de inhibición de p-VEGFR-2 de los compuestos hidroxitiroso, ácido 3-indolacético, melatonina, 5-hidroxitriptofol y serotonina a las concentraciones ensayadas.

Por último, el HT ha demostrado inhibir, en la cascada de señalización activada por VEGF a través de VEGFR-2, la fosforilación de proteínas ERK-1/2 y SAPK/JNK (Lamy et al., 2014). Sin embargo, su efecto sobre las proteínas PLC γ -1, Akt e eNOS no han sido evaluados hasta el momento y son, por lo tanto, objeto de futuros estudios.

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo podemos concluir que:

- El 5-hidroxitriptofol inhibe las fases tempranas de la angiogénesis mediante la inhibición de la migración de células endoteliales (50% a 1mM).
- El efecto anti-angiogénico del 3-IAA y el 5-HTOL no está mediado por la inhibición de la principal proteína responsable de la proliferación celular, PLC γ -1.
- El 3-IAA y 5-HTOL inhiben la activación de eNOS. Por tanto, podrían presentar un efecto hipertensivo de igual manera que ocurre con los actuales fármacos anti-VEGF.
- La combinación del ácido 3-indolacético y el 5-hidroxitriptofol en el tratamiento de células HUVEC presentan un efecto antagonista sobre la fosforilación de VEGFR-2, comparado con los efectos que presentan los compuestos por separado.
- Nuestros resultados sugieren que el posible mecanismo de acción que puede explicar la actividad anti-angiogénica del hidroxitirosol sea por interacción del mismo con componentes de la membrana celular de tal manera que se impida la unión de VEGF a su receptor VEGFR-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Alliegro M. Angiogenesis. En: Enna SJ, Bylund DB, editores. *xPharm: the comprehensive pharmacology reference. ed.* Elsevier; 2008. p.1-6
- Álvarez-Fernández MA, Fernández-Cruz E, Cantos-Villar E, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Determination of hydroxytyrosol produced by winemaking yeasts during alcoholic fermentation using a validated UHPLC-HRMS method. *Food Chem.* 2018; 242: 345-351.
- Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C, Cos S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvasc Res.* 2013; 87: 25-33.
- Audran-Delalande C, Bassa C, Mila I, Regad F, Zouine M, Bouzayen M. Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of the Aux/ IAA gene family in tomato. *Plant Cell Physiol.* 2012; 53: 659-672.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 401-410.
- Çakir B, Kiliçkaya O, Olcay AC. Genome-wide analysis of Aux /IAA genes in *Vitis vinifera*: Cloning and expression profiling of a grape Aux/IAA gene in response to phytohormone and abiotic stresses. *Acta Physiol Plant.* 2013; 35: 365- 377
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6(3): 389-395.
- Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 601-615.
- Celetti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med.* 2001; 7: 425-429.
- Cerezo AB, Winterbone MS, Moyle CWA, Needs PW, Kroon PA. Molecular structure-function relationship of dietary polyphenols for inhibiting VEGF-induced VEGFR-2 activity. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59: 2119-2131.
- Cerezo AB, Hornedo-Ortega R, Álvarez-Fernández MA, Troncoso AM, García- Parrilla MC. Inhibition of VEGF-induced VEGFR-2 activation and HUVEC migration by melatonin and other bioactive indolic compounds. *Nutrients.* 2017; 9 (249)
- Cui P, Luo Z, Zhang H, Su Y, Li A, Li H et al. Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *J Pineal Res.* 2006; 41: 358-362.
- Cui P, Yu M, Luo Z, Dai M, Han J, Xiu R et al. Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *J Pineal Res.* 2008; 44: 107- 114.

- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. 2011; 9(4): 2033.
- Fernández-Cruz E, Álvarez-Fernández MA, Valero E, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains. *Food Chem*. 2017; 17: 421-437.
- Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev*. 1997; 18 (1): 1-22.
- Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15: 385- 403.
- Garrido J, Borges F. Wine and grape polyphenols- A chemical perspective. *Food Res Int*. 2013; 54: 1844-1858.
- Gerritsen ME. Angiogenesis. En: Tuma RF, Durán WN, Ley K, editores. *Handbook of physiology microcirculation*. 2a ed. USA: Academic Press; 2008. p. 351-83.
- Giles FJ. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *Oncologist*. 2001; 6 (5): 32-39.
- Goldsmith CD, Bond DR, Jankowski H, Weidenhofer J, Stathopoulos CE, Roach PD et al. The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 1907-1917.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 11a ed. Phyladelphia: Elsevier; 2006.
- Helander A, Wikstrom T, Löwenmo C, Jacobsson G, Beck O. Urinary excretion of 5-hydroxyindole-3-acetic acid and 5-hydroxytryptophol after oral loading with serotonin. *Life Sci*. 1992; 50 :1207- 1213.
- Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*. 2007; 19: 2003- 2012.
- Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease a critical appraisal. *Circulation*. 2005; 112: 1813-1824.
- Kirschbaum J, Meier A, Brückner H. Determination of biogenic amines in fermented beverages and vinegars by pre-column derivatization with para-nitrobenzyloxycarbonyl chloride (PNZ-Cl) and reversed-phase LC. *Chromatographia*. 1999; 49:117.

- Krishnaswamy S, Hao Q, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-Glucuronosyltransferase 1A6. *Drug Metab Dispos.* 2014; 32 (8): 862-869.
- Lamy S, Ouanouki A, Béliveau, Desrosiers RR. Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Exp Cell Res.* 2014; 322: 89-98.
- Li M, Kroetz DL. Bevacizumab-induced hypertension: Clinical presentation and molecular understanding. *Pharmacol Ther.* 2018; 182: 152-160
- Mas A, Guillamon JM, Torija MJ, Beltran G, Cerezo AB, Troncoso AM et al. Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *BioMed Res. Int.* 2014; 2014.
- Miro-Casas E, Covas MI, Farre M, Fito M, Ortuño J, Weinbrenner T et al. Hydroxytyrosol disposition in human. *Clin Chem.* 2003; 49(6): 945-952.
- Moyle CWA, Cerezo AB, Winterbone MS, Hollands WJ, Alexeev Y, Needs PW et al. Potent inhibition of VEGFR-2 activation by tight binding of green tea epigallocatechin gallate and apple procyanidins to VEGF: Relevance to angiogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59: 401- 412.
- O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res.* 2015; 277: 32-38.
- Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling- in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 359- 371.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994; 269: 25646-25654
- Parthasarathy A, Cross PJ, Dobson RCJ, Adams LE, Savka MA, Hudson AO. A three-ring circus: metabolism of the three proteogenic aromatic amino acids and their role in the health of plants and animals. *Front Mol Biosci.* 2018; 5 (29)
- Reddy MY, Jagota A. Melatonin has differential effects on age-induced stoichiometric changes in daily chronomics of serotonin metabolism in SC of male Wistar rats. *Biogerontology.* 2015; 16: 285-302.
- Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.* 2001; 114: 853-865.
- Roviello G, Sobhani N, Generali D. Bevacizumab in small cell lung cancer. *Ann Transl Med.* 2017; 5(17): 361-363
- Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo K, Yeo T et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metast Rev.* 1993; 12 : 303-324.
- Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17: 611-625

- Sze SF, Ng TB, Liu WK. Antiproliferative effect of pineal indoles on cultured tumor cell lines. *J Pineal Res.* 1993; 14: 27-33-
- Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC γ -1 and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001; 20(11): 2768- 2778.
- The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) No. 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Off J Eur Union.* 2012; 136: 1-40
- Touyz RM, Herrmann S, Herrmann J. Vascular toxicities with VEGF inhibitor therapies- focus on hypertension and arterial thrombotic events. *J Am Soc Hypertens.* 2018; 12(6): 409-425
- Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58: 955-965.
- Wang Y-Q, Ye D-Q, Zhu B-Q, Wu G-F, Duan C-Q. Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect. *Food Chem.* 2014; 163: 6-15.
- Waseem M, Ahmad F, Habib S, Li Z. Genome-wide identification of the auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) gene family in pepper, its characterisation, and comprehensive expression profiling under environmental and phytohormones stress. *Nat Sci Rep.* 2018; 8: 12008.
- World and Health Organization. Cancer [en línea]. 2018. Disponible en: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [Consultado en agosto 2018]
- World and Health Organization. Cardiovascular diseases [en línea]. 2017. Disponible en: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Consultado en agosto 2018]
- Wu L, Mayo KD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA et al. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 2000; 275 (5): 5096-5103.
- Xie R, Pang S, Ma Y, Deng L, He S, Yi S et al. The ARF, AUX/ IAA and GH3 gene families in citrus: Genome-wide identification and expression analysis during fruitlet drop from abscission zone A. *Mol Genet Genom.* 2015; 290: 2089- 2105.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000; 407: 242-24
- Zhu W, Stevens AP, Dettmer K, Gottfried E, Hoves S, Kreutz M et al. Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 401: 3249- 3261.

