

Tesis Doctoral

Análisis de compuestos naturales candidatos a fármacos por su actividad antitumoral, antiinflamatoria o antiangiogénica

Javier Alejandro García-Vilas García

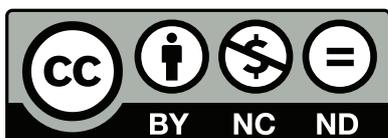
Málaga, marzo de 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Javier Alejandro García-Vilas García

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES y ANA RODRÍGUEZ QUESADA, ambos
catedrático de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Málaga.

CERTIFICAN

Que D. Javier A. García-Vilas García, Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección conjunta en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga del trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral que lleva por título “Análisis de compuestos naturales candidatos a fármaco por su actividad antitumoral, antiinflamatoria o antiangiogénica.”

Una vez revisado el trabajo, estimamos que este reúne contenido científico suficiente y las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Para que conste a efecto de lo establecido en el Real Decreto 56/2005, regulador de los estudios de Tercer Ciclo-Doctorado, AUTORIZAMOS la presentación de Tesis Doctoral en la Universidad de Málaga.

Miguel Ángel Medina Torres

Ana Rodríguez Quesada

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto Po8-CTS-03759 (Junta de Andalucía) “Un enfoque transdisciplinar aplicado a la búsqueda de nuevos fármacos inhibidores de la angiogénesis”, CVI-6585, P12-CTS-1507 y fondos del grupo BIO-267 (Junta de Andalucía y FEDER), por el proyecto PS09/02216 (Ministerio de Ciencia e Innovación, ISCIII y FEDER). CIBER de Enfermedades Raras, iniciativa del ISCIII.

ÍNDICE

Preámbulo

Resumen

Summary

Introducción

1. El cáncer y sus “señales distintivas”
 - 1.2 Heterogeneidad y complejidad del cáncer
 - 1.3 Terapias frente al cáncer
2. Inflamación
 - 2.1 Mediadores del proceso inflamatorio
 - 2.2 Células que intervienen en la inflamación asociada al tumor
 - 2.3 La inflamación como agente mutagénico
3. Angiogénesis
 - 3.1 Interruptor angiogénico
 - 3.2 Angiogénesis fisiológica frente a angiogénesis patológica
 - 3.3 Modelos celulares y métodos de investigación preclínica en angiogénesis
 - 3.4 Antiangiogénesis como terapia antitumoral
 - 3.5 Mecanismos de resistencia a las distintas terapias antiangiogénicas
4. Bibliografía utilizada en esta sección

Hipótesis y Objetivos

Hypothesis and Aims

Materiales y Métodos

1. Medio de cultivos y reactivos
2. Animales de experimentación
3. Cultivos celulares
 - 3.1 Células endoteliales
 - 3.1.1 Células endoteliales de aorta bovina (BAEC)
 - 3.1.2 Células endoteliales aisladas de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC)
 - 3.2 Células endoteliales humanas inmortalizadas
 - 3.2.1 Células endoteliales humanas microvasculares (HMEC)
 - 3.2.2 Células endoteliales humanas macrovasculares (RF-24)
 - 3.3 Células tumorales

4. Ensayos *in vitro*
 - 4.1 Ensayo de citotoxicidad
 - 4.2 Morfogénesis de tubos con células endoteliales
 - 4.3 Ensayo de migración celular
 - 4.4 Ensayo de invasión
 - 4.5 Ensayos zimográficos para la detección de actividad proteasa
 - 4.6 Análisis del ciclo celular.
 - 4.7 Ensayo de adhesión a proteínas de la matriz extracelular.
 - 4.8 Ensayo clonogénico
 - 4.9 PCR semicuantitativa
 - 4.10 qPCR
 - 4.11 Western blot
 - 4.12 SuperArray GE-Array Q series Human Endothelial Cell Biology Gene Array
 - 4.13 Human Antibody L-series 507 Cytokine Array
 - 4.14 MCP-1 Human Biotrak Easy ELISA Kit
 - 4.15 HTScan Met Kinase Assay Kit
 5. Ensayo del anillos aórticos en rata
 6. Ensayos *in vivo*
 - 6.1 Ensayo de implantación subcutánea de Matrigel en ratón
 - 6.2 Ensayo sobre la membrana corioalantoidea de pollo
 - 6.3 Ensayo de formación de vasos intersegmentales en el pez cebra (*Danio rerio*)
- Bibliografía utilizada en esta sección

Resultados

Artículo 1 | 4-Methylumbelliferone Inhibits Angiogenesis *in Vitro* and *in Vivo*.

Manuscrito 1 |

Manuscrito 2 |

Artículo 2 | The brominated compound aerophysinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells

Manuscrito 3 |

Discusión

Bibliografía utilizada en esta sección

Conclusiones

Conclusions

ACRÓNIMOS

Algunos de los acrónimos utilizados a lo largo del texto corresponden con expresiones en inglés. En esos casos, se especifica únicamente la traducción al español de estas expresiones, siempre y cuando esta exista.

ACE	Enzima activa convertidora de angiotensina
acLDL	Lipoproteínas de baja densidad acetiladas
Akt	Protooncogen c-Akt
ALDOA	Aldolasa
Ang-1	Angiopietina 1
Ang-2	Angiopietina 2
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
Bax	Regulador de apoptosis Bax
Bcl-2	Regulador de apoptosis Bcl-2
c-Met	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
c-Myc	Protooncogen c-Myc
CA	Anhidrasa carbónica
CD-35	Receptor del complemento tipo 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CXCL8	Interleucina 8
CXCR4	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4
DAPK	Proteína cinasa 1 asociada a muerte
Dll4	Proteína r tipo delta
DNA	Ácido desoxirribunucleico
E2F1	Factor de transcripción E2F1
EGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial
EGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial
EMT	Transición epitelio-mesénquima
FasL	Miembro 6 de la superfamilia de ligando del factor de necrosis tumoral
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GLUT1	Transportador de glucosa 1
HeLa	Células de adenocarcinoma de cérvix
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1 α	Factor de hipoxia α
HL-60	Células de leucemia promielocítica aguda
HMEC	Células endoteliales microvasculares humanas inmortalizadas
HT-1080	Células de fibrosarcoma
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-11	Interleucina 11

IL-23	Interleucina 23
IL-24	Interleucina 24
IL-27	Interleucina 27
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPA	Ácido lisofosfatídico
Mad2	Proteína control del ensamblaje del huso mitótico MDA2A
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MCT-2	Transportador de monocarboxilato 2
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MMP-1	Metaloproteasa de matriz extracelular 1
MMP-2	Metaloproteasa de matriz extracelular 2
MMP-3	Metaloproteasa de matriz extracelular 3
MMP-9	Metaloproteasa de matriz extracelular 9
MT1MMP	Metaloproteasa de matriz unida a membrana tipo 1
mTOR	mTOR serina/treonina cinasa
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear κ B
NOS	Óxido nítrico sintasa
Notch	Proteína homóloga Notch locus neurogénico
NRP-1	Neuropilina 1
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno 1
PARP	Polimerasa poli[ADP-ribosa]
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión celular endotelial de plaquetas
PF-4	Factor plaquetario 4
PGE-2	Prostaglandina E2
PGI-2	Prostaglandina I2
PGK	Fosfoglicerato 3 quinasa
PI3K	Fosfotidilinositol 3 quinasa
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PLGF	Factor de crecimiento plaquetrio
POT1	Proteína 1 de protección de telómeros
PS	Fosfatidilserina
Raf	Protooncogen c-Raf
Ras	GTPasa Ras
Rb	Proteína del retinoblastoma
RF-24	Células endoteliales macrovasculares humanas inmortalizadas
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S1P	Esfingosina 1 fosfato
SLC1A5	Transportador de aminoácidos neutros
STAT3	Transductor de la señal y activador de la transcripción 3
TAMs	Macrófagos asociados al tumor
TF	Factor del tejido
TGF	Factor de crecimiento tisular
Tie-2	Receptor de la angiopoyetina 1
TIMP-2	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 2

TIMP-3	Inhibidor tisular de metaloproteinasa 3
TM	Trombomodulina
TNF	Factor de necrosis tumoral
tPA	Activador de plasminogeno tisular
TRAIL	Miembro 10 de la superfamilia de ligando del factor de necrosis tumoral
TSP-1	Trombospondina 1
TXA2	Tromboxano 2
VCAM-1	Proteína 1 de adhesión de células vasculares
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGF-C	Factor de crecimiento del endotelio vascular C
VEGF-D	Factor de crecimiento del endotelio vascular D
VEGFR-2	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR-3	Receptor 3 del factor de crecimiento del endotelio vascular
VHL	Factor de von Hipel Lindau
Wnt	Proteína Wnt

PREÁMBULO

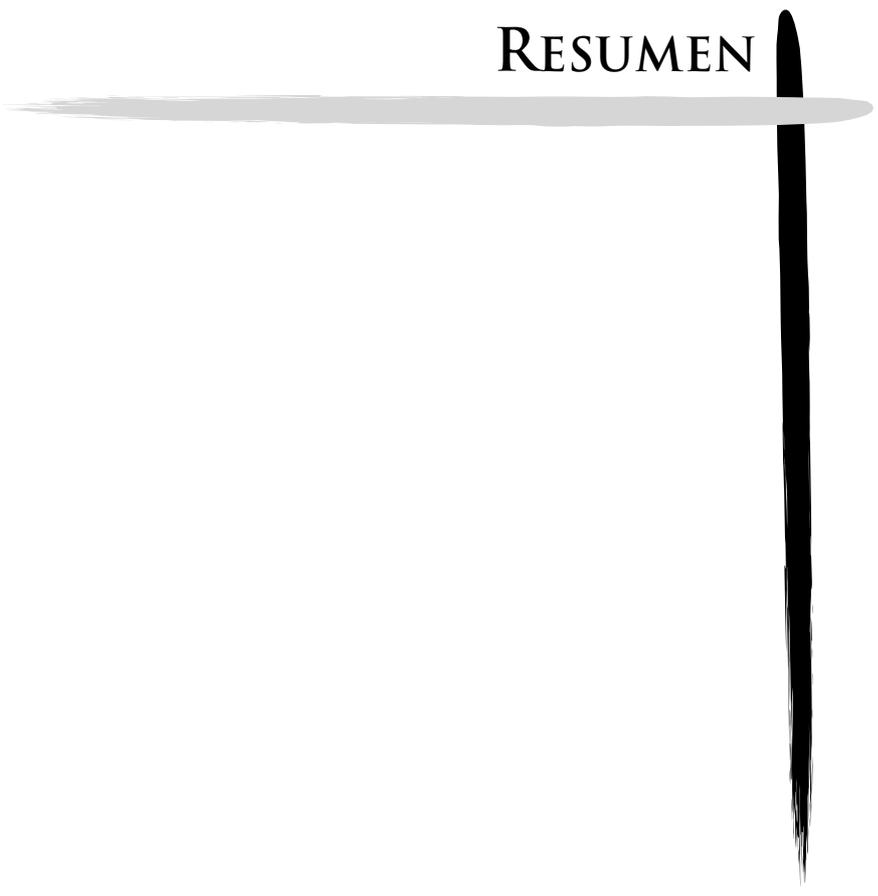
La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de la principal línea de investigación de nuestro grupo, centrada en la identificación y caracterización de nuevos compuestos antitumorales, antiinflamatorios o antiangiogénicos.

Durante la realización del trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se ha evaluado el potencial de dos productos naturales para inhibir la angiogénesis. La caracterización de la actividad antiangiogénica de estos compuestos se ha llevado a cabo mediante el uso de una batería experimental que comprende una amplia variedad de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, disponibles en nuestro laboratorio.

El trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral ha contribuido a consolidar, ampliar y optimizar la aplicación de nuestra línea de investigación para el descubrimiento y la caracterización de nuevas moléculas candidatas a fármacos. En particular, se ha profundizado en la caracterización de las actividades biológicas de dos compuestos procedentes de fuentes naturales cuya actividad inhibidora de la angiogénesis ha sido descrita previamente por nuestro grupo. Para ello, se han identificado algunos procesos biológicos y dianas moleculares concretas sobre las que actúan dichos compuestos.

Finalmente, se ha iniciado una nueva aproximación experimental para el análisis de efectos sinérgicos de combinaciones pareadas de compuestos con conocida capacidad antitumoral o antiangiogénica.

RESUMEN



La versión original de la introducción de esta tesis contiene imágenes sujeta a derechos de copyright.

El término cáncer, enfermedad neoplásica o enfermedad tumoral, integra a una gran diversidad de condiciones patológicas con muy distintas etiologías, desarrollo y pronóstico. En la evolución de un tumor o progresión tumoral pueden distinguirse tres fases:

1. Transformación neoplásica.
2. Progresión tumoral *in situ* dependiente de angiogénesis.
3. Invasión y metástasis.

Cada una de estas etapas supone la acumulación de “fallos” en los diversos y sofisticados sistemas de regulación del organismo. Estos “fallos” consisten básicamente en la acumulación de mutaciones en genes cuyos productos juegan un importante papel en dichos sistemas de regulación. No todas las enfermedades neoplásicas pasan por estas tres fases.

Hanahan & Weinberg identificaron la existencia de varias características comunes (a las que denominaron *Hallmarks of cancer*, o sea, “señales distintivas del cáncer”) a todas las enfermedades neoplásicas clínicamente relevantes:

1. Mutaciones e inestabilidad genómica.
2. Potencial replicativo ilimitado.
3. Estado de proliferación mantenida.
4. Evasión de las señales supresoras de crecimiento.
5. Evasión de la apoptosis
6. Reprogramación del metabolismo.
7. Evasión de la destrucción del sistema inmune.
8. Inflamación como promotor tumoral.
9. Angiogénesis mantenida.
10. Invasión de tejidos y metástasis.

Cada una de las “señales distintivas del cáncer” son etapas relevantes para el desarrollo de los cánceres sólidos, de manera que son potenciales dianas terapéuticas para impedir la evolución de la patología. En ese sentido se han buscado moléculas capaces de inhibir los mecanismos por los que tienen lugar las “señales distintivas del cáncer”.

En la presente Tesis Doctoral se ha prestado especial atención al proceso inflamatorio y al proceso angiogénico, ya que son dos de las “señales distintivas del cáncer” con especial relevancia en el desarrollo del tumor.

La inflamación puede actuar directamente como agente genotóxico, favoreciendo la aparición de mutaciones, al mismo tiempo que rompe el control del ciclo celular, permitiendo la división celular con daños en el DNA replicado, y disminuyendo la entrada en apoptosis. Una de las características principales de la inflamación relacionada con el cáncer es la infiltración de células sanguíneas de la línea blanca, esencialmente los macrófagos asociados al tumor (TAM), que van a secretar mediadores para favorecer la inflamación.

La conexión entre las distintas citocinas inflamatorias puede afectar la supervivencia, el crecimiento, las mutaciones, la proliferación, la diferenciación y el movimiento celular, tanto de células tumorales, como de células del estroma. Las células inmunes pueden actuar como fuente para la generación de mutaciones desestabilizando el genoma de las células tumorales mediante diversos mecanismos: induciendo daños en el DNA directa o indirectamente, eliminando los puntos de control del ciclo celular (lo que incrementa las segregaciones anormales de los cromosomas y las aneuploidías) o afectando a los sistemas de reparación del DNA. Las mutaciones o silenciamientos epigenéticos sobre los mecanismos de reparación del DNA se asocian con el incremento de la inestabilidad génica debido a la presencia de microsatélites, lo que favorece la tasa de errores durante la replicación del DNA. Otra de las circunstancias que afecta al mal funcionamiento de los mecanismos de reparación del DNA es la presencia de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno generados por las células inflamatorias activadas.

Todas las células del organismo requieren del aporte de nutrientes, oxígeno y de la retirada de sustancias de desecho generadas durante el metabolismo celular, que se llevan a cabo por el sistema circulatorio. Se ha establecido que la difusión del oxígeno y de los nutrientes no llega más allá de unos 200 μm de distancia desde los vasos sanguíneos. Por ello, los tumores en crecimiento que se encuentran alejados del torrente sanguíneo, y por lo tanto, se encuentran bajo condiciones de hipoxia, al adquirir entre 1 a 2 milímetros de diámetro necesitan vascularizarse mediante angiogénesis para cubrir las necesidades metabólicas.

Las moléculas activadoras de la señal angiogénica son principalmente ligandos de receptores con actividad tirosín quinasa, como VEGF-A, FGFs, PDGF, EGF y PIGF. Bajo estos estímulos fisiológicos se establece un intercambio de información entre distintos tipos celulares mediante la liberación de sustancias, tales como interleucinas, citocinas, mediadores lipídicos, hormonas, proteasas, factores de crecimientos y neuropéptidos, que van a provocar que se produzcan las modificaciones necesarias, tanto en las células endoteliales como en el microambiente que lo rodea, para que la células endoteliales se activen y se inicie el proceso angiogénico. Las células endoteliales no solamente reciben señales de proliferación (denominadas señales proangiogénicas), sino también otras que les indican que permanezcan en quiescencia (denominadas señales antiangiogénicas). Ante tal situación, es el resultado del balance entre las señales proangiogénicas y antiangiogénicas el que determinará la conexión o desconexión del denominado “*interruptor angiogénico*”.

En la presente Tesis Doctoral, se han realizado diversas investigaciones que han generado un cuerpo de resultados que ha generado dos artículos de investigación ya publicados, dos manuscritos en vías de publicación y un manuscrito preliminar. Estos artículos y manuscritos se presentan en la sección Resultados.

A continuación, se procede a presentar una breve sinopsis del contexto y los resultados fundamentales aportados por cada uno de ellos.

Artículo 1 | 4-Methylumbelliferone Inhibits Angiogenesis *in Vitro* and *in Vivo*.
[Publicado en *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 4063-4071,
2013].

Artículo sujeto a copyright de *Journal of Agricultural and food Chemistry*

Manuscrito 1 |

Esta información no se hace pública aquí porque está en vías de publicación sujeta a derechos de copyright.

Manuscrito 2 |

Esta información no se hace pública aquí porque está en vías de publicación sujeta a derechos de copyright.

Artículo 2 | The brominated compound aeroplisinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. [Publicado en *PLoS ONE* 8: e55203, 2013].

Las esponjas marinas son organismos sésiles carentes de defensas estructurales, de manera que su mecanismo de defensa frente a depredadores y parásitos consiste en la síntesis y liberación de metabolitos secundarios. Entre los metabolitos secundarios que sintetiza la esponja *Aplysina aerophoba* se encuentra la aeroplisinina-1 (Apl-1), una molécula que contiene bromo y que fue caracterizada como un potente agente antiangiogénico por nuestro grupo. En efecto, estudios previos de nuestro grupo de investigación revelaron que la Apl-1 inhibe reacciones esenciales en las rutas de proliferación, migración, formación de estructuras tubulares y disminuye la actividad de las metaloproteinasas liberadas por las células endoteliales para remodelar la matriz extracelular, tanto en células endoteliales de la aorta bovina (BAEC) como en células endoteliales del cordón umbilical humano (HUVEC)

En el presente trabajo volvemos a verificar la actividad antiangiogénica de la Apl-1, en esta ocasión sobre células endoteliales microvasculares (HMEC) y macrovasculares (RF-24) inmortalizadas, además de elucidar que la Apl-1 presenta actividad antiinflamatoria al interferir en la producción de diversas citocinas y proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria, tanto en monocitos como en células HUVEC. El tratamiento de células HUVEC con Apl-1 disminuye la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), la interleucina 1 α (IL-1 α), la metaloproteínasa de matriz extracelular 1 (MMP-1) y la ciclooxygenasa 2 (COX-2). El tratamiento de monocitos humanos (THP-1) con Apl-1 inhibió la proliferación celular y disminuyó la transcripción de los genes que codifican para MCP-1 y COX-2.

Estos resultados abren nuevas expectativas en relación al potencial de acción farmacológica de la Apl-1 no solo con posible aplicación al cáncer y otras enfermedades en las que la angiogénesis está desregulada, sino también frente a enfermedades dependientes de inflamación.

Manuscrito 3 |

Esta información no se hace pública aquí porque está en vías de publicación sujeta a derechos de copyright.

SUMMARY



The concept *cancer*, *neoplastic disease* or *tumor disease*, includes a wide variety of pathological conditions with very different etiologies, development and prognosis. Tumor progression can be divided in three stages:

1. Neoplastic transformation.
2. *In situ* angiogenesis- dependent tumor progression.
3. Invasion and metastasis.

Each of these stages occurs through accumulation of mutations on genes coding for proteins with key roles in biological regulation. However, not all of the neoplastic diseases exhibit these three stages.

Hanahan & Weinberg identified several features that seem to be common to all clinically relevant neoplastic diseases. They are called the *hallmarks of cancer*:

1. Genome instability and mutations.
2. Limitless replicative potential.
3. Cell sufficiency in growth signals.
4. Insensitivity to growth signals.
5. Evading apoptosis.
6. Metabolic reprogramming.
7. Avoiding immune destruction.
8. Tumour promoting inflammation.
9. Sustained angiogenesis.
10. Tissue invasion and metastasis.

All the hallmarks of cancer are relevant stages for the development of solid cancer. Hence, they are potential therapeutic targets to treat and inhibit cancer. For this reason, the search for new molecules able to inhibit any of the hallmarks of cancer is a very active research field.

In the present Doctoral Thesis, we describe the effects of several natural compounds on two key hallmarks of cancer, namely, angiogenesis and inflammation.

Inflammation can behave as a genotoxic agent, favoring new mutations and breaking the control of cell cycle. As a consequence, cell division is allowed even in the case of cells with damaged DNA and apoptosis decreases. One of the key features of cancer-related inflammation is the infiltration of white blood cells, mainly tumor-associated macrophages (TAM), which secrete intermediaries to increase inflammatory response.

The links between different inflammatory cytokines can modulate cell survival, proliferation, mutation, differentiation, and mobility of both tumor and stromal cells. Immune cells can promote new mutations destabilizing tumor cell genome through several mechanisms: inducing damage of DNA, removing the checkpoints of cell cycle (thus increasing anormal chromosomal segregation and aneuploidies) or decreasing the efficiency of DNA repair systems. Mutations or epigenetic silencing of DNA repair mechanisms are associated with increased genomic instability on microsatelite sequence, allowing increased mistake rates during DNA replication. Another situation responsible of the wrong operation of DNA repair mechanisms is the presence of reactive oxygen and nitrogen species produced by activated inflammatory cells.

All cell types need oxygen and nutrient intake and they have to remove waste products of the celular metabolism. These functions are carried out by the circulatory system. Oxygen cannot diffuse farther than 200 μm from a blood vessel. For this reason, the inner core of growing tumors becomes hypoxic whrn tumor diameter grows beyond 1-2 mm. To follow their growth, these small tumors need to be irrigated by new blood vessels produced by angiogenesis.

Activator molecules of the angiogenic process are essential ligands of receptors with tyrosine kinase activity, as VEGF-A, FGFs, PDGF, EGF, and PIGF. These are physiological stimuli that promote an information exchange between different cell types through the release of substances such as interleukines,

cytokines, lipid mediators, hormones, proteases, growth factors, and neuropeptides, which provoke modifications in both endothelial cells and their microenvironment that, in turn, activate endothelial cells and allow the angiogenic process to begin. Endothelial cells can receive both pro-angiogenic signals and anti-angiogenic signals. The balance between these two antagonistic types of signals will determine the switching on or off of the so-called *angiogenic switch*.

In the present Doctoral Thesis, several investigations have been carried out. These have yielded two published original articles, two submitted manuscripts and a preliminary manuscript. These articles and manuscript are shown in the Results section.

A brief summary of the context and main results contained in each of the articles and manuscripts is provided below.

Article 1 | 4-Methylumbelliferone Inhibits Angiogenesis *in Vitro* and *in Vivo*. [Published in *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 4063-4071, 2013].

Manuscript 1 |

Manuscript 2 |

Article 2 | The brominated compound aeroplysinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. [Published in *PLoS ONE* 8: e55203, 2013].

Sponges are sessile organisms lacking any structural defense, so that these organisms synthesize secondary metabolites as chemistry defense against predators and parasites. *Aplysina aerophoba* is a sponge that synthesizes aeroplysinin-1 (Apl-1), a brominated compound that was characterized as a potent anti-angiogenic agent by our research group. Apl-1 was shown to be able to inhibit key stages of the angiogenic process, such as proliferation and migration of endothelial cells, their ability to form tube-like structures on Matrigel and their production of extracellular matrix remodelling enzymes.

In the present work, we initially confirmed the antiangiogenic activity of Apl-1 using immortalized microvascular (HMEC) and macrovascular (RF-24) endothelial cells. Furthermore, we show that Apl-1 has anti-inflammatory activity decreasing the production by both monocyte and HUVEC cells of several cytokines and proteins involved in the inflammatory response. Apl-1 treatment of HUVEC decreased their levels of interleukine 1 α (IL-1 α), extracellular matrix metalloproteinase 1 (MMP-1), and cyclooxygenase 2 (COX-2). On the other hand, Apl-1 treatment of human monocytes (THP-1) inhibited their proliferation cell and decreased MCP-1 and COX-2 transcript levels and COX-2 protein levels.

These results open new ways to the potential pharmacological action of aeroplysinin-1 not only on angiogenesis and cancer, but also on atherosclerosis and inflammation-dependent diseases.

Manuscript 3 |

INTRODUCCIÓN



1. El cáncer y sus “señales distintivas”

El término cáncer, enfermedad neoplásica o enfermedad tumoral, integra a una gran diversidad de condiciones patológicas con muy distintas etiologías, desarrollo y pronóstico. En la evolución de un tumor o progresión tumoral pueden distinguirse tres fases:

4. Transformación neoplásica.
5. Progresión tumoral *in situ* dependiente de angiogénesis.
6. Invasión y metástasis.

Cada una de estas etapas supone la acumulación de “fallos” en los diversos y sofisticados sistemas de regulación del organismo. Estos “fallos” consisten básicamente en la acumulación de mutaciones en genes cuyos productos juegan un importante papel en dichos sistemas de regulación. No todas las enfermedades neoplásicas pasan por estas tres fases. Así, en las leucemias no puede hablarse de un crecimiento *in situ* al tratarse de células sanguíneas circulantes. Por otra parte, hay numerosos tumores que permanecen encapsulados y nunca manifiestan capacidad invasiva y por tanto no dan lugar a metástasis. En la mayoría de los casos la carcinogénesis (etapa de transformación neoplásica) no es el principal problema del cáncer desde un punto de vista clínico, puesto que en la mayoría de los casos del cáncer humano las muertes son realmente causadas por las metástasis.

En los últimos 40 años se ha avanzado enormemente en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer. Una revisión exhaustiva de toda la información científica disponible acerca de las bases moleculares del cáncer, permitió a Hanahan & Weinberg identificar la existencia de varias características comunes (a las que denominaron *hallmarks of cancer*, o sea, “señales distintivas del cáncer”) a todas las enfermedades neoplásicas clínicamente relevantes^[51]. La lista de 6 “señales distintivas” del cáncer ha sido recientemente ampliada hasta diez en una actualización de su trabajo de revisión por los propios Hanahan & Weinberg^[52], como resume la figura 1.

Figura 1 | Representación de las “señales distintivas del cáncer” que propician las capacidades funcionales para el desarrollo de tumores sólidos propuestas por Hanahan y Weinberg. Imagen adaptada de Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144: 646- 674.

1. Mutaciones e inestabilidad genómica

El proceso de transformación neoplásica se debe a la acumulación de mutaciones en genes esenciales incrementando la tasa de crecimiento de la población celular afectada. Las mutaciones sufridas tanto en *genes supresores de tumores* como en *protooncogenes* son responsables de establecer condiciones que permiten la acumulación de otras mutaciones. Estos dos tipos de genes presentan zonas particularmente sensibles a sufrir mutaciones, por lo que la inestabilidad genómica del cáncer está estrechamente asociada a estos genes^[34]. Además, las mutaciones espontáneas junto con la alteración en el número de repeticiones de oligonucleótidos presentes en las secuencias de los microsatélites, así como en los telómeros, ayudan a crear inestabilidad cromosómica alterando la estructura y el número de los cromosomas^[89].

2. Potencial replicativo ilimitado

Está ampliamente aceptado que las células cancerígenas presentan un potencial replicativo ilimitado. Esta capacidad de las células tumorales contrasta con el comportamiento del resto de células, que solo se dividen un número limitado de veces. Esta condición viene determinada por la longitud de sus *telómeros*. Los telómeros son segmentos repetitivos en tándem de 6 nucleótidos (TTAGGG, en el caso del ser humano) ubicados al final de los cromosomas para evitar la pérdida de información genética relevante como consecuencia del propio mecanismo de replicación del DNA. Durante la replicación del DNA no se puede duplicar las secuencias finales del cromosoma debido a que la DNA polimerasa solamente puede sintetizar en dirección 5´- 3´. Los telómeros sirven como indicadores de senectud celular, ya que los cromosomas que han perdido los telómeros son inestables y susceptibles de sufrir reorganizaciones. Antes que tengan lugar dichas anomalías, se promueve la entrada en quiescencia o la apoptosis en caso de que la célula haya sufrido pérdidas de información importante para su correcto funcionamiento.

Las *telomerasas* son complejos enzimáticos formado por una subunidad catalítica (hTER) con actividad transcriptasa inversa y un componente de carácter ribonucleoproteico (hTERC). La actividad telomerasa mantiene la integridad y la longitud de los fragmentos teloméricos terminales de los cromosomas lineales eucariotas en células de la línea germinal, células embrionarias y en células madres.

Las células normales diferenciadas suelen presentar niveles basales de actividad telomerasa o telomerasa silente. Por contra, la telomerasa aparece sobreexpresada en un alto porcentaje de tumores, con lo que los telómeros se mantienen en los sucesivos ciclos de división celular evitando la entrada en apoptosis celular y manteniendo la capacidad de proliferación ilimitada^[16]. Se ha comprobado que la capacidad de las telomerasas para fomentar la progresión tumoral no se debe exclusivamente a su actividad para amplificar los telómeros, sino que también la subunidad hTERT actúa como cofactor del complejo de transcripción β -catenina/LFE, amplificando la señalización de la

ruta Wnt, ruta involucrada tanto en la supervivencia celular como en el crecimiento celular^[95]. Las telomerasas presentan además la capacidad de favorecer la proliferación celular y evitar la entrada en apoptosis^[62], atribuyéndosele un importante papel en la reparación del daño en el DNA^[83].

3. Estado de proliferación mantenida

La capacidad replicativa ilimitada de las células tumorales posibilita su permanente estado proliferativo. El organismo controla muy estrictamente la capacidad proliferativa de sus distintos tipos celulares mediante complejos mecanismos de regulación del ciclo celular que implican la participación de estímulos proliferativos transitorios mediados por factores de crecimiento. La regulación efectiva de la velocidad neta del ciclo celular es el resultado de un equilibrio dinámico entre productos de protooncogenes (aceleradores del ciclo) y de genes supresores del ciclo (que ejercen un freno del ciclo). Las células tumorales consiguen mantener un estado de constante proliferación activando sus protooncogenes o inactivando sus genes supresores tumorales. Como consecuencia de ello pueden producir autocrinamente los factores de crecimiento necesarios o pueden enviar señales químicas a las células estromáticas asociadas al tumor para que sean éstas las que provean de factores de crecimientos promotores de la proliferación celular a las células tumorales^[26, 71]. Otra forma en la que las células tumorales pueden mantener su estado proliferativo consiste en sobreexpresar receptores de la superficie de membrana para generar una respuesta desmesurada a pequeñas cantidades de factores de crecimiento. Alternativamente, puede producirse una alteración en los receptores para que los ligandos se unan más fácilmente o con mayor afinidad. Otro mecanismo de mantenimiento del estado proliferativo en las células tumorales consiste en la adquisición de mutaciones somáticas que provocan la activación constitutiva de rutas de señalización. Así, mutaciones en la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) hiperactiva todo el circuito de PI3K incluyendo importantes moléculas de bioseñalización como son Akt y PKB^[61]. Además, al permanecer activados los receptores se puede

producir activación cruzada entre múltiples rutas distintas por un mismo factor de crecimiento.

4. Evasión de las señales supresoras de crecimiento

La división celular está regulada por señales que llegan a las células e integran su información para determinar el momento en el que se dan condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso. Por el contrario, al recibir información que les indique parar la división celular, las células activan rutas de señalización que provoca la parada replicativa. Como ya queda dicho, las células tumorales acumulan mutaciones tanto en protooncogenes^[131] (transformándolos en oncogenes mediante mutaciones de ganancia de función) como en genes supresores de tumores (mediante mutaciones de pérdida de función)^[119]. Estas mutaciones provoca que las células mantengan los mecanismos de división celular permanentemente activados y no reaccionen ante estímulos de parada del ciclo celular.

Los productos de los genes supresores tumorales están encargados de regular la progresión del ciclo celular, controlar la transmisión de señales, la inducción de la apoptosis o la adhesión celular. Este tipo de genes pierden el control sobre las células cuando sufren mutaciones con pérdida de función en sus dos alelos, momento en el cual las células dejan de tener un estricto control sobre la replicación del DNA y sobre la división celular, como es el ejercido por p53. Atendiendo a la función principal que desempeñe su producto, los genes supresores de tumores se pueden clasificar en^[89]:

- Antioncogenes: Son inhibidores de las quinasas dependiente de ciclinas, como es el inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (CDKN2A).
- Genes de comprobación de daño en el DNA: Encargados de inducir la muerte celular o senescencia en respuesta a las mutaciones provocadas en por el estrés replicativo o daño en el DNA. En esta clasificación se encuentran genes supresores como p53 y ataxia telangiectasia mutada (ATM).

- Genes “cuidadores”: Codifican para proteínas que ayudan a mantener la estabilidad genómica mediante la reparación del DNA, como ocurre con el gen codificante de la proteína 1 reparadora de errores en el DNA (MLH1) y cáncer de mama 1 (BRCA-1), entre otros.

5. Evasión de la apoptosis

Dentro de los mecanismos de control de la división celular se encuentra el proceso apoptótico, mediante el cual las células mueren como consecuencia de su mal funcionamiento debido a la acumulación de mutaciones irreparables que ponen en peligro la viabilidad funcional y proliferativa de las células. Este mecanismo puede entenderse como un proceso preventivo de la transformación en células tumorales. La apoptosis puede llevarse a cabo por la activación de los denominados receptores de muerte celular (*ruta extrínseca*), provocando una cascada de bioseñalización en el interior celular que conduce a la activación de las caspasas efectoras de la apoptosis. Alternativamente, la integración de numerosos estímulos de estrés y genotoxicidad promueve la liberación de proteínas por parte de la mitocondria (*ruta intrínseca*), en especial del citocromo C, señal que estimula la activación del apoptosoma, en el que se integran las caspasas iniciadoras de la apoptosis.

La inhibición de la apoptosis en las células tumorales se debe esencialmente a la pérdida de función de genes proapoptóticos, tales como Bax, p53 y proteínas quinasas asociadas a receptores de muerte celular, como es el caso de DAPK. La inhibición de la apoptosis por pérdida de función de genes proapoptótico se refuerza por la expresión de genes antiaapoptóticos, entre los que cabe destacar Bcl-2, survivina y NF- κ B^[87].

Recientes investigaciones han revelado interacciones entre los circuitos de regulación que gobiernan la autofagia, la apoptosis y la homeostasis celular. Dichas evidencias han puesto de manifiesto que la ruta de señalización de PI3K, Akt, mTOR quinasa, son responsables de las señales de supervivencia celular por bloquear la apoptosis, a la vez que también inhibe la autofagia^[121].

Como se mencionó en el apartado anterior, otro de los mecanismos por los que las células tumorales también pueden evadir la apoptosis es mediante

modificación de la expresión de sus telomerasas. Alternativamente, pueden conseguir evadir la apoptosis como consecuencia de alteraciones en los telómeros provocado por mutaciones sobre la proteína POT1. POT1 ejerce un papel importante en la en la estabilización de los telómeros y en la unión de la telomerasa al DNA de hebra simple para que se sinteticen los telómeros. Mutaciones en POT1 impide la formación de los telómeros favoreciendo la fusión entre cromátidas hermanas, dando lugar a alteraciones cromosómicas y aberraciones genómicas, eventos esenciales en el desarrollo de la tumorigénesis^[98].

6. Reprogramación del metabolismo

Durante el proceso de transformación tumoral, las células sufren adaptaciones metabólicas debido tanto al efecto del microambiente como a los cambios genéticos y epigenéticos, implicando modificaciones en el metabolismo energético celular.

Una de las adaptaciones metabólicas de las células tumorales es el efecto Warburg, por el que presentan intensificada la ruta glucolítica, derivando el piruvato hacia la ruta fermentativa aún en presencia de oxígeno. En consecuencia, se generan altos niveles de ácido láctico producido por la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH). El lactato producido en el interior celular es secretado por transportadores de monocarboxilato 2 (MCT-2) hacia el espacio extracelular, a la vez que aumenta la expresión de los transportadores de protones, incluyendo varios miembros de la familia de intercambiadores Na^+/H^+ y aumento en los niveles de la anhidrasa carbónica (CA)^[132]. Esto favorece la acidificación del microambiente tumoral permitiendo la activación de las metaloproteasas y otras enzimas que remodelan la matriz extracelular promoviendo la invasión celular y la metástasis^[11].

En paralelo, el alto consumo de glucosa favorece el flujo del carbono hacia diversas rutas biosintéticas fomentando la síntesis de nucleótidos, lípidos, glutatión para la síntesis del DNA, síntesis de membranas y la regulación de los niveles redox. Como consecuencia de la elevada actividad glucolítica, se generan altos niveles de acetil-CoA, producto metabólico que puede ser

utilizado para la acetilación de las histonas, induciendo remodelaciones en las cromatinas que dará lugar a cambios epigenéticos influyendo sobre la expresión génica. La acumulación del intermediario glucolítico glucosa 6-fosfato favorece el flujo metabólico de la ruta de las pentosas fosfato, ruta que abastece a las células de poder reductor (NADPH) y de precursores para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos y lípidos^[11]. Altos niveles de glucosa en las células tumorales estimulan la activación de la ruta de PI3K, promoviendo la supervivencia celular por medio de la proteína Akt1. Akt1 es la responsable de fosforilar directamente a las enzimas glucolíticas hexoquinasa 2 y fosfofrutoquinasa, favoreciendo el efecto Warburg en células tumorales^[103].

La proliferación celular, en especial la de células tumorales, requiere no sólo de la presencia de glucosa sino también de glutamina, el segundo nutriente extracelular más abundante y la principal molécula transportadora de nitrógeno entre tejidos. No es de extrañar que al “redescubrimiento” del efecto Warburg le haya seguido el de la glutaminólisis como otra importante ruta metabólica favorecida en el contexto tumoral^[86, 107, 136]. El protooncogen c-Myc es responsable de la regulación de la expresión de enzimas glucolíticas y de la captación de glutamina y de su metabolismo, ya que c-Myc, controla la expresión del transportador de glutamina SLC1A5^[54]. La glutamina, además de ser un precursor para la biosíntesis de macromoléculas, puede servir como sustrato energético al ser oxidado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, restableciendo los niveles de oxalacetato contribuyendo a mantener los niveles de NADPH necesarios para la proliferación celular^[31].

En definitiva se ha llegado a un amplio consenso de que la progresión tumoral está asociada a una reprogramación global del metabolismo, que afecta también al metabolismo lipídico^[86, 107]. Esta reprogramación global del metabolismo puede interpretarse como el conjunto de adaptaciones metabólicas que posibilita que las células tumorales subsistan con fuentes de energía distintas a la habitual. Durante sus estadios iniciales de desarrollo, los tumores son aún avasculares pero las células posicionadas en el exterior de la masa tumoral presentan características diferenciadas respecto a las exhibidas por las células posicionadas en el interior de la masa. De hecho, el oxígeno

puede difundir hasta las células tumorales de la periferia, por lo que éstas pueden realizar glucólisis aeróbica. En cambio, las células tumorales del interior de la masa no reciben ni oxígeno ni glucosa, por lo que deben utilizar sustratos energéticos alternativos, a partir de la β -oxidación de ácidos grasos, aminoácidos, así como el lactato producido por las células tumorales que les rodean^[137]. Esta flexibilidad metabólica facilita la adaptación de las células tumorales al estrés metabólico.

7. Evasión de la destrucción por el sistema inmune

El sistema inmunitario se encarga de eliminar cualquier tipo de amenaza que ponga en riesgo el buen estado fisiológico del individuo, desde la invasión por organismos patógenos hasta la eliminación de las células propias que manifiesten algún tipo de anomalía o que hayan envejecido.

Durante los primeros estadios de formación de un tumor, las células tumorales no pueden ser diferenciadas morfológicamente de las células del tejido sano en el que se ubica, aunque presentan anomalías genéticas y liberan factores quimiotácticos para atraer a células mononucleares, esencialmente linfocitos y macrófagos^[8]. Paradójicamente, al llegar estas células a la zona tumoral actúan liberando factores de crecimiento y citocinas que refuerzan la señal proliferativa del tumor, dejando de lado la función reparadora y subsanadora para la que están destinadas. Este condicionamiento sobre las células del sistema inmunológico es consecuencia de dos alteraciones importantes en las células tumorales. Por una parte, modifican o disminuyen la expresión de antígenos necesarios para que sean reconocidas por las células inmunitarias, como es el caso de proteínas estimuladoras de linfocitos T y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I. Por otra parte, las células tumorales liberan factores inmunosupresivos (TGF- β , interleucina 10, ROS, enzimas, TRAIL, FasL, prostaglandinas E2, arginasa I) que modulan las funciones de las células inmunes e incluso pueden inducir su apoptosis. Además de los factores liberados por las propias células tumorales, las moléculas liberadas por las células del microambiente que previamente han

sido condicionadas por las células tumorales contribuyen a esta subversión de la respuesta inmune^[43].

8. Inflamación como promotor tumoral

Esta señal distintiva del cáncer se desarrolla en el próximo capítulo de esta introducción dado que parte del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha consistido en la identificación de efectos moduladores de compuestos bioactivos sobre marcadores inflamatorios.

9. Angiogénesis mantenida

Las células cancerígenas, al igual que los tejidos que están conformados por células sanas, requieren para su mantenimiento captar nutrientes y oxígeno así como su capacidad para evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La neovascularización asociada al tumor se genera fundamentalmente por angiogénesis. Esta señal distintiva del cáncer merece un capítulo aparte en esta introducción pues parte del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha versado en la caracterización de la actividad de nuevos moduladores de la angiogénesis.

10. Invasión de tejidos y metástasis

Como queda mencionado más arriba, a la fase de iniciación tumoral o carcinogénesis sigue, en el caso de los cánceres clínicamente relevantes, una fase de progresión tumoral que incluye la adquisición de un potencial invasivo por parte de las células tumorales y de la capacidad de “colonizar” órganos distantes mediante metástasis. El microambiente tumoral favorece la activación de proteínas que van a modificar la expresión génica generando cambios en proteínas y rutas de señalización involucradas en el metabolismo anaeróbico y en el desarrollo de la angiogénesis, invasión y supervivencia celular por inhibición de la apoptosis. En la región en la que se encuentra el tumor se produce un acúmulo de macrófagos en respuesta a la liberación de moléculas quimioatrayentes, que también son responsables del reclutamiento de

miofibroblastos y células progenitoras endoteliales, favoreciendo así la vascularización del tumor^[92].

En la progresión tumoral juega un papel importante la denominada *transición epitelio-mesénquima*, que también tiene lugar durante la embriogénesis. Esta transición epitelio mesénquima supone un cambio del fenotipo tumoral que posibilita la invasión y metástasis. Como en el caso de la transición epitelio mesénquima embrionaria, en el cáncer este cambio de fenotipo sucede bajo el control de factores de transcripción que provocan la pérdida de adherencia celular, la conversión de la morfología celular poligonal a alargado, la expresión de proteasas para degradar la matriz extracelular, el incremento de movilidad y resistencia a la apoptosis. Se han descrito otros posibles mecanismos de invasión por las células cancerígenas. Uno de ellos se denomina *invasión colectiva*^[42], en la que se desarrollan nódulos de células cancerígenas que avanzan en masa hacia el tejido adyacente, y es característico de carcinomas de células escamosas, aunque este tipo de tumores rara vez llegan a la metástasis, sugiriendo que esta forma de invasión carece de ciertos atributos funcionales que facilitan la metástasis. Menos evidente es la invasión denominada *ameboide*^[78], en el cual células cancerígenas individuales muestran plasticidad morfológica, permitiéndoles deslizarse a través de los intersticios existentes en la matriz extracelular en lugar de abrir camino por sí mismos como ocurre tanto en las formas mesenquimales y colectivas de invasión.

La metástasis tumoral es un proceso complejo que puede dividirse en varias etapas secuenciales: pérdida de adhesión celular, incremento en la capacidad motora e invasiva, entrada de la célula tumoral en la circulación, salida hacia el parénquima de órganos distantes y, finalmente, colonización de dicho órgano^[87]. Las células tumorales primarias circulantes presentan mayor o menor afinidad por colonizar un órgano u otro dependiendo del tipo de tumor primario del que proceda. Así, el cáncer de mama suele metastatizar en huesos, pulmones, hígado y cerebro, siendo los dos primeros los órganos afectados más frecuentemente; en cambio, las metástasis de células tumorales de pulmón ocurren preferentemente en cerebro, huesos y el pulmón contiguo^[25]. Las

células que han llegado a un órgano distante presentan un fenotipo particularmente agresivo, puesto que han sobrevivido a circunstancias de estrés ambiental, incluyendo la carencia de oxígeno y de alimentos, han subsistido en condiciones de bajo pH, especies reactivas de oxígeno y han esquivado la respuesta del sistema inmune. Todo ello contribuye a que dichas células puedan adaptarse al microambiente del nuevo órgano hospedador^[25].

1.2. Heterogeneidad y complejidad del cáncer

Como queda dicho, al hablar de cáncer nos estamos refiriendo a más de dos centenares de patologías diferenciadas. Pero además, dentro de un tipo concreto de cáncer se puede encontrar una notable heterogeneidad intratumoral, como han puesto de manifiesto estudios de alta resolución del genoma en células individuales de un mismo cáncer^[44].

Las mutaciones silentes tienen el potencial de incrementar la plasticidad fenotípica de las células cancerígenas, tanto por la desregulación de las redes de expresión génica como por alteraciones epigenéticas. Aunque es improbable que la heterogeneidad genética pueda ser el mayor condicionante de la heterogeneidad fenotípica, existen diferencias hereditarias que proporcionan una fuente esencial para proveer al tumor de alternativas evolutivas durante la progresión tumoral y la aparición de mecanismos de resistencia a la terapia. Buena parte del fenotipo celular viene determinado por el tejido en el que se hallan las células y por los procesos bioquímicos que tienen lugar de manera estocástica en el interior celular. Otro de los factores que condicionan la heterogeneidad fenotípica intratumoral es el denominado “paisaje epigenético” junto con la red de genes reguladores que están involucrados en el mismo. El concepto de “paisaje epigenético” describe la forma mediante la cual existen una serie de posibilidades reales entre las que pueden dirigirse las células tumorales dependiendo de los eventos y circunstancias que tengan lugar, de manera que la fluctuación en la expresión de genes y otros procesos celulares cambian la posición de la célula en el “paisaje epigenético”, permitiéndole modificar su fenotipo. El microambiente actúa como un importante modulador

de la topología del “paisaje epigenético”. Por lo tanto, el fenotipo celular vendrá determinado por la interacción de los factores intrínsecos que sucedan en el interior celular, así como por los factores microambientales que rodean a la célula. La progresión tumoral implica cambios importantes en el microambiente de los tejidos, incluyendo aquellos en los componentes y propiedades de las células estromales, a la vez que tiene lugar una remodelación de la matriz extracelular^[15]. Por tanto, microambientes tumorales específicos pueden tener influencias sobre el “paisaje epigenético” de las células trasladándolas hacia un fenotipo anormal con mayor inestabilidad génica que, a su vez, incrementa la diversificación de la población de células cancerígenas. De esta forma, es posible que dos células cancerígenas situadas físicamente cercanas muestren distintos fenotipos^[82]. La heterogeneidad fenotípica de un tumor se puede emplear como un indicador de prognosis, resistencia a la terapia y capacidad para metastizar^[28].

Todo lo dicho anteriormente justifica que se haya planteado una revisión crítica sobre las “señales distintivas del cáncer” cuestionando que todas ellas estén presentes en todas las células tumorales en todo momento. Las “señales distintivas del cáncer” descritas por Hanahan & Weinberg aluden al cáncer como si estuviese conformado por células sincronizadas que adquieren las distintas propiedades de manera simultánea^[40]. Además, en el interior de una masa cancerígena existen diversos tipos de células no tumorales, las cuales pueden contribuir a la adquisición del fenotipo cancerígeno, poniendo de manifiesto que no todas las “señales distintivas del cáncer” pueden aplicarse a todas las células de un cáncer; es más, no todas las células tumorales de un tipo de cáncer tienen por qué presentar las propiedades necesarias para generarlo, de manera que solamente aquellas y las que se derivan de ellas serán las que desarrollarán las “señales distintivas del cáncer”. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la expresión de las “señales distintivas del cáncer” depende de la localización de las células y de las condiciones ambientales temporales, puesto que en el interior de una población celular homogénea pueden aparecer diferentes fenotipos debido a restricciones determinadas por las condiciones iniciales del ambiente. Así, las células ubicadas en el interior de un tumor

llevan a cabo una reprogramación metabólica en respuesta a las condiciones de anoxia, mientras que las posicionadas en la periferia, al estar adecuadamente oxigenadas, consumen y oxidan el lactato liberado por las células del interior tumoral^[37].

Existe cierta tendencia a considerar simplificada que la adquisición de las “señales distintivas del cáncer” se debe a relaciones causa-efecto lineales. La realidad es más compleja pues se ha comprobado que una condición oncogénica o la activación de una ruta de señalización puede desencadenar varias “señales distintivas del cáncer”^[47].

A la heterogeneidad celular de un tumor contribuye decisivamente el hecho de que en la masa tumoral aparezcan diversos tipos celulares no tumorales colectivamente identificados a veces como “células estromáticas”. Entre ellas se encuentran células endoteliales, diversas células inflamatorias y otras células “acompañantes”. Esta heterogeneidad celular de los tumores supone una nueva fuente de complejidad para su estudio y comprensión.

Por si todo lo dicho fuera poco, los complejos patrones de expresión de polimorfismos hacen que exista una heterogeneidad entre individuos que justifica la reciente reivindicación de la individualidad genética y metabólica de los cánceres humanos^[124].

En definitiva, el término cáncer alude a unas situaciones patológicas intrínsecamente heterogéneas y complejas que muestran niveles de complejidad a distinta escala desde el nivel molecular a los niveles microambiental, fisiopatológico e individual. Todas estas circunstancias hacen que el estudio del cáncer sean particularmente abordable por los enfoques sistémicos que proporciona la moderna biología de sistemas^[85].

1.3. Terapias frente al cáncer

El primer testimonio sobre la existencia del cáncer quedó recogido en el conocido papiro de Edwin Smith, datado del año 3000 a. C. Dicho papiro recoge información sobre cirugía traumática, describe observaciones anatómicas, examen, diagnóstico, tratamiento y pronóstico de numerosas

heridas, además de describir 8 casos de úlceras de mama que fueron tratados mediante cauterización. En dicho escrito, se concluye que para esta enfermedad “no existe tratamiento”.

Hipócrates de Cos fue el primero en utilizar los términos *carcinos* y *carcinoma* para describir formaciones no ulcerosas tumorales y formaciones ulcerosas tumorales. Pero el término cáncer no fue utilizado hasta que el médico romano Celso tradujo el término griego a la palabra latina cáncer.

El *tratamiento quirúrgico* del cáncer ha pasado de la *cirugía radical* defendida por William Steward Halsted (profesor de cirugía de la Universidad Johns Hopkins) a propuestas de *intervenciones quirúrgicas menos invasivas* pero con igual efectividad.

En 1896 el físico alemán Wilhelm Conrad Röntgen descubrió los rayos X y comenzaron a ser aplicados para la diagnosis en pocos meses tras su descubrimiento, y tres años más tarde se utilizó para el tratamiento del cáncer, inaugurándose así la historia de la *radioterapia*. Observaron que tras varias sesiones de radiación de baja intensidad durante semanas los pacientes mejoraban notablemente. Las dosis se fueron mejorando y también el modo de aplicación de los rayos ionizantes para irradiar únicamente la zona donde se encuentra el cáncer.

Thomas Beatson de la Universidad de Edimburgo en 1874, fue el primero en relacionar la formación de leche en las mamas con la presencia de los ovarios. Las investigaciones llevadas a cabo le condujeron a concluir que las mamas de conejos no producían leche al extirpar los ovarios. Este hecho le hizo concluir que los ovarios controlaban la producción de leche en un órgano alejado^[10]. Beatson llegó más allá al comprobar que tras eliminar los ovarios de pacientes con cáncer de mama avanzado, mejoraba dicho cáncer. Estas evidencias llevaron a Charles Huggins en 1939 a proponer la noción de *terapia hormonal*: al tratar con hormonas a hombres con cáncer de próstata, comprobó la disminución de los niveles de la fosfatasa ácida^[55].

Un notable avance terapéutico contra el cáncer sucedió en 1965, cuando James Holland, Emil Freireich y Emil Freid propusieron la combinación de fármacos con distintos mecanismos de acción para combatir el cáncer. Junto

con el desarrollo de la *quimioterapia combinada* y la mayor comprensión sobre las células inmunológicas y las células cancerígenas, en la década de 1970 se produjeron los primeros anticuerpos monoclonales para combatir a las células cancerígenas (*terapias inmunológicas*).

A pesar del relativo éxito de la quimioterapia combinada en el tratamiento del cáncer, este tipo de terapia presenta múltiples efectos secundarios no deseados al actuar indiscriminadamente tanto sobre células tanto cancerígenas como normales altamente proliferantes (células epiteliales y células del tracto digestivo, entre otras). Como ya queda dicho, la evolución en el conocimiento de la biología tumoral y las diferencias en el control de la proliferación de las células neoplásicas y de las no neoplásicas, llevaron a postular las “señales distintivas del cáncer” y con ello surgieron nuevas perspectivas en el tratamiento del cáncer mediante *terapias dirigidas*. El objetivo de las terapias dirigidas se basa en utilizar el conocimiento molecular del cáncer para inhibir los mecanismos de acción que confieren malignidad a las células cancerígenas.

Figura 2 | Ejemplos de terapias dirigidas diseñadas frente a cada una de las “señales distintivas del cáncer” para inhibir los mecanismos que favorecen el desarrollo de los tumores sólidos. Imagen adaptada de Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144: 646- 674.

Cada una de las “señales distintivas del cáncer” son etapas relevantes para el desarrollo de los cánceres sólidos, de manera que son potenciales dianas terapéuticas para impedir la evolución de la patología. En ese sentido se han buscado moléculas capaces de inhibir los mecanismos por los que tienen lugar las “señales distintivas del cáncer”. Algunas de ellas se muestran en la figura 2 y se relacionan a continuación:

- Mutaciones e inestabilidad genómica: Inhibidores de PARP como son el BMN673^[118] y el olaparib^[88].
- Potencial replicativo ilimitado: Inhibidores del EGFR entre los que se puede destacar el lapatinib^[134].
- Capacidad replicativa indefinida: Inhibidores de las telomerasas como es imetelstat (GRN163L)^[109] e inhibidores de proteínas involucradas en la expresión génica, como la histona deacetilasa inhibida por romidepsina^[120].
- Evasión de las señales supresoras de crecimiento: Inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas, es el caso del flavopiridol^[115].
- Evasión de la apoptosis: Moléculas miméticas al BH3 con capacidad proapoptótica como son el ABT-737^[137], el cisplatino y la pirimetamina^[45].
- Reprogramación del metabolismo: Inhibidores de enzimas claves de la glucólisis aeróbica, como el 3-BrOP y la carmustina que inhiben la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa^[141].
- Evasión de la destrucción por el sistema inmune: Anticuerpos anti-CTLA4 que activan a las células del sistema inmunológico, como son los anticuerpos *ipilimumab* y *ticlimumab*^[49].
- Inflamación como promotor tumoral: Moléculas antiinflamatorias selectivas, como son el 5-deprenillupulonol C^[4] y el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)^[5].
- Angiogénesis mantenida: Inhibidores de la señalización mediada por VEGF-A tales como el anticuerpo monoclonal humanizado

bevacizumab^[19] y las moléculas pequeñas inhibidoras de tirosín quinasas *sunitinib*^[72] y *axitinib*^[33].

- Invasión de tejidos y metástasis: Inhibidores del eje HGF/c-Met, como el *foretinib*^[116].

Inicialmente se pensó que la inhibición de las rutas de señalización o de las proteínas efectoras relacionadas con las “señales distintivas del cáncer” sería un método efectivo de controlar la evolución del cáncer con pocos efectos secundarios sobre células sanas, pero las pruebas clínicas demostraron que dichas terapias “dirigidas” solamente provocaban mejorías transitorias, apareciendo en la mayoría de los casos una recaída tras un cierto periodo de tiempo. El aparente fracaso de estas terapias se explica por las múltiples rutas de señalización y efectores que son capaces de llevar a cabo la misma respuesta ante un estímulo determinado. A ello hay que añadir el hecho de que existen células tumorales que presentan defectos en la ruta de señalización o en los efectores sobre los que actúa el fármaco, de manera que le permiten sobrevivir a la terapia, siendo responsables de generar una nueva subpoblación de células cancerígenas resistentes a la terapia aplicada. Estas adaptaciones de las células cancerígenas tras la supresión de una o varias “señales distintivas del cáncer” facilita el crecimiento de nuevas células que son independientemente de las mismas, seleccionándose así células tumorales más agresivas y difíciles de erradicar.

Frente al escaso éxito de las monoterapias, las nuevas *terapias combinadas* se centran en la administración conjunta de fármacos con distintos modos de acción para atacar a las células cancerígenas e impedir los mecanismos de resistencia bajo el supuesto de que la interacción de los fármacos va a provocar un efecto mayor que su administración por separado, además de poder suministrarse a menores dosis.

Son múltiples los estudios basados en el uso de terapias combinadas. Si bien es cierto que este tipo de terapia mejora la supervivencia a corto plazo y la calidad de vida de los pacientes, también es mencionable que hasta el momento no han mostrado un elevado éxito en la curación del cáncer. Por

tanto, las expectativas para la curación del cáncer actualmente están puestas en el diagnóstico personalizado de la enfermedad, debido a la alta heterogeneidad celular individual. De esta manera se crearán *terapias personalizadas* para cada paciente y para cada tipo de tumor, dado que cada individuo presenta una gama única y compleja de mutaciones diversas. Ello se podrá abordar mediante el estudio de perfiles de expresión génica y de microRNA que permitan diferenciar entre los distintos subtipos de cáncer. Además mediante el empleo de biomarcadores se podrá monitorizar a los pacientes y comprobar si el tumor responde a la terapia administrada o si presenta algún tipo de resistencia a la misma, lo que aconsejaría un cambio en el agente quimioterapéutico. Otra de las ventajas que presenta el diagnóstico personalizado, es que determinará las características moleculares del tumor facilitando la optimización de la aplicación de terapias biológicas como alternativa a la administración al paciente de una quimioterapia estándar, minimizando así los efectos tóxicos asociados a los tratamiento anticancerígenos convencionales. Como ejemplos de patologías en las que se está aplicando con éxito una estrategia de personalización de la terapia en función de parámetros moleculares del tumor caben destacar la detección de los biomarcadores receptor de estrógenos (ER), factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) y del receptor de la progesterona (PgR) en cáncer de mama^[128].

2. Inflamación

La inflamación es una respuesta fisiológica del sistema inmunitario frente a un agente infeccioso o una patología subyacente. Este proceso tiene como objetivo restablecer el buen funcionamiento de los tejidos que han sido dañados o infectados por algún patógeno. Sin embargo, paradójicamente, la inflamación ejerce un papel esencial en favorecer el desarrollo del cáncer. La inflamación cursa por la extravasación de células del sistema inmunitario desde los capilares hacia los tejidos dañados o infectados. Trasvasadas las células del sistema inmunitario, estas células liberan una gran cantidad de moléculas que van a remodelar la matriz extracelular, pueden activar la mitosis celular, a la

vez que liberan factores de crecimiento, mediadores lipídicos, prostaglandinas, así como moléculas con capacidad quimioatrayente para otros tipos de células del sistema inmune^[93]. Cuando esta situación se mantiene en el tiempo de manera no controlada, fomenta que mutaciones silentes se hagan manifiestas y que aparezcan nuevas mutaciones en el genoma de las células que conforman el tejido. Otro de los efectos que genera la inflamación prolongada es la activación de la angiogénesis en la zona inflamada^[60].

2.1. Mediadores del proceso inflamatorio

La inflamación puede actuar directamente como agente genotóxico, favoreciendo la aparición de mutaciones, al mismo tiempo que rompe el control del ciclo celular, permitiendo la división celular con daños en el DNA replicado, y disminuyendo la entrada en apoptosis. Una de las características principales de la inflamación relacionada con el cáncer es la infiltración de células sanguíneas de la línea blanca, esencialmente los macrófagos asociados al tumor (TAM), que van a secretar mediadores para favorecer la inflamación, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 1 β (IL-1 β), la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)^[9] y la proteína quimiotáctica de granulocitos (GCP-1). Los TAMs también liberan moléculas proangiogénicas, tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGFa), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb) y la interleucina 8 (IL-8), entre otras moléculas.

Se ha descrito que el cáncer relacionado con la inflamación puede originarse por dos rutas^[100]:

- Ruta intrínseca: Mediante esta ruta tiene lugar la expresión de genes cuyos productos (VEGF, interleucinas, eicosanoides, quimiocinas y lipoxinas) promueven la respuesta inflamatoria y el proceso angiogénico, ya que tienen la capacidad de dirigir los circuitos proinflamatorios, activando proteínas tirosín quinasa, Ras-Raf, oncogenes nucleares, a la vez que reclutan células mieloides y activan el interruptor angiogénico.

- Ruta extrínseca: Se asocia a la propia inflamación desencadenada por algún proceso infeccioso (*Helicobacter pylori*, papilomavirus) que puede producir cáncer gástrico, linfoma de las mucosas o carcinoma del cérvix. Algunas enfermedades autoinmunes también están ligadas a inflamación crónica. Es el caso de la inflamación intestinal crónica, que lleva asociada un aumento en la probabilidad de padecer cáncer de colon^[81].

Ambas rutas se interrelacionan mediante factores transcripcionales (NF- κ B y STAT3) y citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β y TNF- α), que pueden ser liberadas tanto por células tumorales como por el proceso de inflamación propiamente dicho. NF- κ B es el principal factor de transcripción que interviene durante el desarrollo de la inflamación, favoreciendo la expresión de citocinas inflamatorias, óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y fomentando la presencia de mediadores inflamatorios y de factores angiogénicos. Además, se ha identificado que muchos tipos de cáncer presentan una mala regulación de este factor de transcripción, provocado por alteraciones génicas (amplificaciones, mutaciones o deleciones) que inducen la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) y de proteínas de respuesta a hipoxia (HIF-1 α)^[127].

Otro factor de transcripción relevante en las relaciones de la inflamación con el cáncer es el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). STAT3 se encuentra activado en la mayoría de los cánceres, pero su activación no viene determinada usualmente por una mutación directa, sino que se debe a las señales de las células vecinas, y ocasionalmente por mutación en alguna de las proteínas involucradas en su ruta de señalización^[47]. La activación de STAT3 en las células tumorales se debe a varios factores inflamatorios regulados por NF- κ B (Figura 3) y por la interleucina 6 (IL-6), favoreciendo la capacidad de evasión de las células del sistema inmune, ya que STAT3 impide la maduración de las células dendríticas a la vez que suprime la respuesta inmune hacia las células tumorales detectadas^[67]. Además, STAT3 controla la división celular de células T en el tumor y es necesario para el

desarrollo de las células T_H17 . Este último tipo celular puede favorecer el crecimiento tumoral y es responsable de la expresión de citocinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos. Estas moléculas posibilitan que las células del sistema inmune acudan a la región tumoral, para reforzar la señal proinflamatoria mediante la liberación de más citocinas, factores de crecimiento y agentes proinflamatorio por las células inmunes. Todo ello hace que exista una retroalimentación positiva entre las células tumorales y las células inmunes generando un microambiente tumoral. Por tanto, STAT3 media tanto la propagación del tumor desarrollado por la inflamación, como la supresión de la inmunidad frente a las células tumorales^[139]. La activación de STAT3 tiene un efecto pleiotrópico sobre diversos factores de crecimiento y citocinas, entre las que se puede destacar IL-6, IL-11, IL-22, HGF e EGF, y sobre oncogenes de tipo tirosín quinasa, tales como los receptores c-Met y Scr. Los efectos provocados por la activación de STAT3 favorece la proliferación y supervivencia celular de las células tumorales^[48].

Figura 3 | Las citocinas producidas por las células inmunitarias infiltradas en el tumor activan factores transcripcionales claves como NF- κ B o STAT-3, en células premalignas controlando diversos procesos protumorales.
Imagen tomada de Grivennikov, S., Greten, F. R., and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. Cell 140: 883- 899.

2.2. Células que intervienen en la inflamación asociada al tumor

En el transcurso normal de una infección o de la reparación de algún tejido dañado, la inflamación es transitoria de forma que las células inmunológicas desaparecen de la zona tras solventar la anomalía. En cambio, la inflamación crónica favorece el desarrollo de diversas patologías como la fibrosis, la angiogénesis aberrante y las neoplasias^[63].

Las infiltraciones de células inmunológicas en las zonas de crecimiento tumoral son indispensables para el desarrollo y la malignización del tumor. El microambiente tumoral contiene células inmunes innatas (como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células asesinas y células supresoras derivadas mieloides) y células del sistema inmune adaptativo (linfocitos T y linfocitos B), además de las células cancerígenas y el estroma que lo envuelve (fibroblastos, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales)^[29]. La comunicación entre los distintos tipos celulares tiene lugar mediante contacto directo o mediante la producción de citocinas y quimiocinas que actúan de manera autócrina y paracrina. Este conjunto heterogéneo de células son las responsables de sintetizar y secretar diversos mediadores y moduladores inflamatorios, determinando si el microambiente tendrá características protumorales o antitumorales^[73].

Las células inmunes más frecuentemente halladas en el microambiente tumoral son los macrófagos y las células T. Los macrófagos asociados al tumor (TAMs) contribuyen a la malignización del tumor al liberar citocinas, factores de crecimiento y proteasas que degradan la matriz extracelular así como factores proangiogénicos (VEGF, PDGF-BB y CXCL8)^[104]. Existen evidencias de que el ácido láctico secretado por las células tumorales en hipoxia induce estímulos proinflamatorios al activar a los macrófagos mediante la ruta de señalización mediada por IL-23 e IL-27. Las proteasas liberadas por los macrófagos son responsables de la degradación de la matriz extracelular, liberando moléculas como el versican que al unirse a los receptores TLR2 y TLR6 sobre la superficie de los TAM, amplifica la cascada inflamatoria a la vez que potencia la metástasis tumoral^[66]. Los TAMs se acumulan en las zonas

hipóxicas de los tumores sólidos, encontrándose muy próximos a los vasos tumorales en desarrollo.

Las células dendríticas asociadas al tumor se caracterizan por presentar un fenotipo inmaduro, y por no tener la capacidad de estimular a las células T^[3]. Los linfocitos, en concreto las células T asesinas, son poco frecuentes en el microambiente tumoral, aunque sí se asocian a los tumores las células T de memoria, responsables de la liberación de IL-4 e IL-5 involucradas en la promoción, progresión y metástasis tumoral^[102].

2.3. La inflamación como agente mutagénico

Las células inmunes pueden actuar como fuente para la generación de mutaciones desestabilizando el genoma de las células tumorales mediante diversos mecanismos: induciendo daños en el DNA directa o indirectamente, eliminando los puntos de control del ciclo celular (lo que incrementa las segregaciones anormales de los cromosomas y las aneuploidías) o afectando a los sistemas de reparación del DNA. Las mutaciones o silenciamientos epigenéticos sobre los mecanismos de reparación del DNA se asocian con el incremento de la inestabilidad génica debido a la presencia de microsatélites, lo que favorece la tasa de errores durante la replicación del DNA. Otra de las circunstancias que afecta al mal funcionamiento de los mecanismos de reparación del DNA es la presencia de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno generados por las células inflamatorias activadas. En concreto, el óxido nítrico (NO) incrementa la actividad de la DNA metiltransferasa, aumentando el número de citosinas metiladas en el genoma, lo cual conlleva el silenciamiento génico o pérdida de expresión de efectores que intervienen en los mecanismo de reparación del DNA^[39]. También, se ha descrito que el óxido nítrico induce la hiperfosforilación de la proteína RB (retinoblastoma). Esta hiperfosforilación libera el factor 1 unido al promotor E2 (E2F1) que permite la expresión de la proteína Mad2, componente principal de uno de los punto de control del ciclo celular. El aumento en los niveles de Mad2 favorece la segregación cromosómica e incrementa la tasa mitótica^[53].

Algunos tipos de células inflamatorias liberan metaloproteasas. Aunque la principal función de estas proteasas es la remodelación de la matriz extracelular y de la lámina basal, se ha demostrado que algunas de ellas pueden manifestar actividad de oncogén por impulsar la inestabilidad cromosómica. Este es el caso de la MT1-MMP, que está presente en la cara extracelular de la membrana plasmática. La sobreexpresión de esta metaloproteasa también ha sido detectada en el compartimento pericentrosomal, pudiendo desencadenar la formación de células aneuplóides debido a la malformación del huso mitótico, dando lugar a múltiples polos mal alineados en el momento de la citocinesis^[46]. Otra de las metaloproteasas que promueven la inestabilidad cromosómica es MMP3, que estimula la producción de Rac1b, una isoforma de Rac1 debida a un procesamiento alternativo del RNA mensajero, el cual favorece la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden causar daños oxidativos en el DNA e impulsar la inestabilidad cromosómica^[84].

A todo ello hay que sumar que los mediadores inflamatorios, de manera directa o indirecta, disminuyen la ruta de reparación del DNA y hacen que se pierdan los puntos de control del ciclo celular, desestabilizando el genoma de las células cancerígenas. Uno de los mediadores claves para el desarrollo tanto de la inflamación como de la angiogénesis es el metabolismo del ácido araquidónico, en especial el metabolismo mediado a través de las ciclooxigenasas (COX) y de las lipooxigenasas (LOX). Del metabolismo del ácido araquidónico se obtienen productos como el tromboxano 2 (TXA2), la prostanglandina E2 (PGE2) y la prostanglandina I2 (PGI2)^[58]. En concreto, las prostanglandinas formadas por COX-2 estimulan la angiogénesis a través de la inducción de la síntesis de VEGF. Además, estas prostanglandinas provocan una disminución de la apoptosis al activar la ruta de señalización de Akt y la activación de la transcripción de Bcl-2^[117].

3. ANGIOGÉNESIS

Todas las células del organismo requieren del aporte de nutrientes, oxígeno y de la retirada de sustancias de desecho generadas durante el

metabolismo celular, que se llevan a cabo por el sistema circulatorio, por lo que es de vital importancia para el correcto funcionamiento celular. De hecho, el sistema circulatorio es el primero que se desarrolla durante la embriogénesis^[76]. En concreto, en humanos los primeros vasos sanguíneos comienzan a formarse a las 3 o 4 semanas del desarrollo del feto a partir de la capa mesodérmica embrionaria. La formación del sistema circulatorio en el feto se produce a partir de los islotes sanguíneos formados por células denominadas hemangioblastos, ubicados en el centro del islote sanguíneo, se diferenciarán a células hematopoyéticas, que serán las responsables de producir todos los tipos celulares existentes en la sangre. Los hemangioblastos ubicados en la periferia de los islotes sanguíneos se denominan angioblastos y se caracterizan porque expresan el receptor VEGFR-2. Al interactuar con su ligando, el VEGF-A de las células mesodérmicas que las rodean, se inicia la formación de los vasos sanguíneos^[106]. La formación del sistema circulatorio en el embrión tiene lugar mediante dos procesos claramente diferenciados y secuenciales: i) *Vasculogénesis*. Consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de los angioblastos. Mediante este proceso se forma el plexo vascular primario en el embrión. ii) *Angiogénesis*. Es la formación de vasos sanguíneos a partir del lecho vascular preexistente. Para ello, tiene lugar la movilización, división y migración de células endoteliales que ya formaban parte de los vasos sanguíneos.

La mayoría de las células endoteliales en el adulto están en quiescencia y solamente el 0,01% de este tipo de células se encuentran en fase de división celular^[23]. Esto implica que en el adulto sólo se produce la formación de nuevos vasos sanguíneos bajo ciertos procesos fisiológicos de mantenimiento. La formación de nuevos vasos en el adulto puede tener lugar por medio de la angiogénesis^[106] o de la vasculogénesis^[6]. Existen distintos tipos celulares en el adulto con capacidad de diferenciarse a células endoteliales, como son los mesoangioblastos, células progenitoras endoteliales, células progenitoras adultas multipotentes o de células de la matriz ósea^[22].

3.1. Interruptor angiogénico

Tras el primer año de vida del individuo, la angiogénesis contribuye a establecer la red vascular a partir del lecho vascular primario y al crecimiento de los órganos proporcionándoles el alimento y oxígeno necesario. En el adulto, sólo se produce una angiogénesis transitoria y estrictamente regulada en procesos como el ciclo menstrual, reparación de heridas y durante desarrollo de la placenta en el embarazo. Sin embargo, las células endoteliales presentan la capacidad de entrar en división celular bajo estímulos fisiológicos tales como un estrés metabólico (hipoxia, hipoglucemia o disminución del pH), un estrés mecánico (generación de presión debido a la proliferación celular), la respuesta inflamatoria (células del sistema inflamatorio que han sido filtradas a tejidos) y por mutaciones genéticas (activación de un oncogén o inactivación de un gen supresor de tumores que controlan la producción de reguladores angiogénicos)^[23]. Estas situaciones son las responsables de la generación de diversas sustancias con capacidad para que las células endoteliales quiescentes proliferen, migren y finalmente se diferencien para formar los nuevos vasos. Bajo estos estímulos fisiológicos se establece un intercambio de información entre distintos tipos celulares mediante la liberación de sustancias tales como interleucinas, citocinas, mediadores lipídicos, hormonas, proteasas, factores de crecimientos y neuropéptidos^[22], que van a provocar que se produzcan las modificaciones necesarias, tanto en las células endoteliales como en el microambiente que lo rodea, para que las células endoteliales se activen y se inicie el proceso angiogénico.

Las células endoteliales no solamente reciben señales de proliferación (denominada señales proangiogénicas), sino también otras que les indican que permanezcan en quiescencia (denominadas señales antiangiogénicas). Ante tal situación, es el resultado del balance entre las señales proangiogénicas y antiangiogénicas el que determinará la acción que tienen que llevar a cabo. A este balance entre señales proangiogénicas y señales antiangiogénicas se conoce como "*interruptor angiogénico*" (Figura 4). Cuando el balance favorece a las señales proangiogénicas, se produce el crecimiento de los vasos sanguíneos a partir del lecho vascular existente. Cuando el balance favorece a

las señales antiangiogénicas, las células endoteliales permanecen en estado de quiescencia e incluso puede producirse la regresión de los vasos en ciertas circunstancias. Así pues, la angiogénesis fisiológica está sometida a un estricto control dinámico, activándose solo en aquellos casos que es necesario. En cambio, cuando el balance entre las señales proangiogénicas y antiangiogénicas está desplazado hacia la señal proangiogénica y es persistente en el tiempo tiene lugar el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos, lo que se denomina angiogénesis patológica.

Figura 4 | Representación del interruptor angiogénico. Las células endoteliales determinan su acción ponderando las señales proangiogénicas frente a las señales antiangiogénicas. Imagen tomada de Bergers, G, and Benjamin, L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* 3: 401- 410.

La angiogénesis patológica está asociada a una gran diversidad de enfermedades, tales como la artritis reumatoide, la obesidad, el sarcoma de Kaposi, la inflamación crónica, la psoriasis, el asma, la retinopatía diabética, la aterosclerosis, el cáncer, las enfermedades autoinmunes y ciertas enfermedades infecciosas, entre otras. En contraposición, una angiogénesis anormal y permanentemente reprimida se asocia a isquemias, preeclampsia, insuficiencia cardíaca, neurodegeneración, hipertensión, osteoporosis y distrés respiratorio, entre otras patologías^[22, 76].

Las moléculas activadoras de la señal angiogénica (figura 5) son principalmente ligandos de receptores con actividad tirosín quinasa. Este es el caso de VEGF-A, FGFs, PDGF, EGF y PlGF. Sin embargo, también existen otros tipos de señales proangiogénicas, tales como LPA, S1P, IL-8, HIF-1 y Ang-1, entre otras moléculas. Por su parte, las moléculas destacables que ejercen una señal antiangiogénica son principalmente aquellas que derivan de la proteólisis de la matriz extracelular, entre las que cabría destacar la endostatina, la canstatina y la tumstatina (derivados de la proteólisis del colágeno tipo IV), diversas moléculas formadas a partir de la escisión del colágeno XVIII, la trombospondina-1, el interferon- α , el interferon- β y la angiostatina, esta última producto de la escisión de la plasmina^[12].

Figura 5 | Principales rutas de la transducción de señal en angiogenesis. Los ligandos (PlGF, VEGF, FGFs, HGF, proteínas de la matriz extracelular, Ang1 y Ang2) al unirse a sus respectivos receptores inducen la dimerización y la autofosforilación de estos. Hecho que genera toda una cascada de señalización a través de proteínas adaptadoras y transductoras, generando la respuesta celular. Imagen tomada de Quesada, A. R., Medina, M. A., Muños-Chápuli, R., and Ponce, A. L. (2010) Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies. *Currents Pharmaceutical Design* 16: 3932- 3957.

Las diversas moléculas involucradas en el proceso angiogénico son liberadas por los distintos tipos celulares presentes en el microambiente donde tiene lugar, bien porque residan allí o bien por la extravasación de las células inmunitarias al foco requerido.

Figura 6 | Etapas del proceso angiogénico. A) La angiogénesis se inicia por la activación de las células endoteliales en respuesta al VEGF-A liberado. B) Tras su activación, las células endoteliales liberan proteasas para degradar la matriz extracelular. C) El VEGF-A induce la diferenciación de las células endoteliales en *tip cell* y *stalk cell*. D) Las *tip cells* dirigen el sentido del crecimiento de los vasos y las *stalk cells* se elongan y proliferan para formar el nuevo vaso. E) Las *tip cells* se unen y fusionan dando lugar al nuevo vaso sanguíneo. F) Formado el vaso, se produce su estabilización y maduración por el recubrimiento de células murales (pericitos y células de la musculature lisa). Imagen tomada de Blanco, R., and Gerhardt, H. (2012) VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 3: a006569.

El proceso angiogénico puede considerarse integrado por diversas etapas secuenciales resumidas en la figura 6:

- 1) Los tejidos dañados o neoplásicos liberan moléculas con capacidad proangiogénica que llegan a las células endoteliales cercanas.
- 2) Estas moléculas se unen a sus correspondientes receptores en las células endoteliales provocando que se propague la señal recibida al interior celular mediante cascadas de señalización intracelulares que activan la síntesis de nuevas moléculas, entre las que se encuentran distintas metaloproteasas que degradan la matriz extracelular.
- 3) Entre las moléculas liberadas por el daño del tejido o por células tumorales se encuentra el VEGF-A. Este factor de crecimiento es de vital

importancia para que se inicie el proceso angiogénico, ya que es el principal responsable de la activación de las células endoteliales, favoreciendo la síntesis y liberación de proteasas, y el aumento de la permeabilidad vascular que favorece la extravasación de células inmunitarias. El aumento de la permeabilidad vascular se debe a que el VEGF-A es capaz de desestabilizar las uniones intercelulares entre células endoteliales, y entre células endoteliales y células murales. El hecho que se desprendan las células murales de las células endoteliales provoca la desestabilización del vaso, favoreciendo la migración y proliferación del endotelio.

- 4) Las proteasas liberadas por los distintos tipos celulares comienzan a degradar la matriz extracelular formando poros, para favorecer la migración de las células endoteliales.
- 5) Las células endoteliales inician la migración y proliferación. El proceso de migración celular, se ha demostrado que es un proceso jerarquizado y llevado a cabo por las células endoteliales en el frente de crecimiento (*tip cells*) y las células endoteliales que siguen a éstas (*stalk cells*)^[59](Figura 7).
- 6) A medida que va creciendo el nuevo vaso sanguíneo, las células que lo conforman se van estabilizando mediante proteínas de adhesión entre célula endotelial y célula endotelial, célula endotelial y célula mural, y entre célula endotelial y matriz extracelular. Este proceso de estabilización del nuevo vaso en formación tiene lugar mediante la intervención de proteínas como Ang-1-Tie-2, Slit-ROBO-4, NOTCH-Dll4, efrinas y sus receptores, entre otras proteínas de adhesión^[75]. De manera simultánea, las células que conforman el nuevo vaso sanguíneo se van estabilizando y generan una nueva lámina basal, asegurando la integridad del nuevo vaso en formación. El lumen del vaso se forma por coalescencia de vacuolas intracelulares pinocíticas, las cuales se interconectan con las vacuolas de la célula vecina. La formación del lumen se produce por la región apical de la membrana de las células

endoteliales, ya que presentan glicoproteínas con carga negativas para que exista repulsión electrostática y se mantenga abierto el lumen^[96].

Figura 7 | Representación de la iniciación del proceso angiogénico, en el cual se define la identidad de las “*tip cells*” y “*stalk cell*” en respuesta al VEGF-A. La célula que capte en primer lugar VEGF-A y se encuentre sometida a hipoxia, expresará la proteína Dll4 que se unirá a al receptor NOTCH de las células adyacentes para establecer la identidad celular en el vaso en crecimiento. Imagen tomada de Quesada, A. R., Medina, M. A., Muños-Chápuli, R., and Ponce, A. L. (2010) Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies. *Currents Pharmaceutical Design* 16: 3932-3957.

- 7) Los vasos en formación que se sitúan cercanos entre sí, se anastomosan mediante los filopodios de las células *tip cells* de ambos vasos, estableciendo así la continuidad de la red capilar. Se ha descrito que la anastomosis entre las células guías no necesitan la intervención de ninguna otra célula, aunque el proceso puede estar favorecido por macrófagos^[36].
- 8) Por último, se produce la maduración de los vasos. Para ello se establecen los límites entre células endoteliales arteriales y células endoteliales venosas, estableciéndose los límites de la red vascular y adaptándose al patrón vascular requerido por las necesidades del tejido.

3.2. Angiogénesis fisiológica frente a angiogénesis patológica

Aunque en principio ambos procesos constan de las mismas etapas y están controlados por las mismas señales, en la angiogénesis patológica las señales proangiogénicas están completamente desreguladas, tanto en su intensidad como en la duración con que se mantienen. Estas diferencias son las responsables de las desigualdades morfológicas y estructurales entre los vasos formados mediante angiogénesis fisiológica, frente a los vasos formados mediante la angiogénesis patológica.

La angiogénesis fisiológica está desencadenada por respuestas a la hipoxia o por un daño tisular, entre otras causas. Las células endoteliales responden iniciando la degradación parcial de la matriz extracelular y de la lámina basal, lo cual permite la infiltración de distintos tipos celulares dirigida por macromoléculas como el VEGF-A, que actúa como un factor proangiogénico y como mitógeno de células endoteliales. Además del VEGF-A libre, también existe VEGF-A unido a heparina que interactúa con los receptores neuropilina 1 (NRP-1) existentes en las células endoteliales para favorecer la señal desencadenada por el VEGF-A una vez unido a VEGFR-2. De manera colateral, también se libera VEGF-C y VEGF-D, macromoléculas que interactúan con el receptor VEGFR-3 para estimular la linfangiogénesis.

El VEGF-A es el promotor de la formación de la célula endotelial guía (*tip cell*), fenotipo responsable del inicio de la degradación de la lámina basal y de la matriz extracelular, por acción de la metaloproteasa de membrana MT1-MMP. La degradación de la lámina basal y de la matriz extracelular favorece el cambio en la disposición del citoesqueleto de la célula endotelial promoviendo el inicio de la migración^[101]. El VEGF-A que llega a la *tip cell* induce la expresión de Dll4, proteína transmembrana que interactúa con su receptor Notch en la célula adyacente para condicionar el fenotipo de esta última a célula en el frente de crecimiento. Este mecanismo favorece el desarrollo ordenado y no excesivo de nuevos vasos. A continuación, las células endoteliales dejan de proliferar y comienzan a secretar PDGF-BB que permitirá la estabilización del vaso recién formado mediante el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas. Tras la unión de estos dos tipos celulares, las células

endoteliales comienzan a expresar el inhibidor tisular para la metaloproteasa 2 (TIMP-2) y los pericitos expresan el inhibidor de tisular para la metaloproteasa 3 (TIMP-3), consiguiendo que las células endoteliales pierdan el fenotipo proteolítico^[110]. La estabilización del nuevo vaso también está favorecida por la expresión de la Ang-1 en la superficie de las células murales, que interactúa con su receptor Tie-2 ubicado en la membrana de las células endoteliales (Figura 8).

Se ha establecido que la difusión del oxígeno y de los nutrientes no llega más allá de unos 200 μm de distancia desde los vasos sanguíneos. Por ello, los tumores en crecimiento que se encuentran alejados del torrente sanguíneo, y por lo tanto, se encuentran bajo condiciones de hipoxia, al adquirir entre 1 a 2 milímetros de diámetro necesitan vascularizarse para cubrir las necesidades metabólicas. Esta situación de hipoxia es la responsable de la activación de HIF-1 α por parte de las células tumorales.

Figura 8 | La angiogénesis es dependiente de la cooperación entre el efecto producido entre el VEGF y las angiopietinas. A) Las células murales (pericitos y células de la musculatura lisa) liberan Ang-1 que se une a su receptor Tie-2 ubicado en las células endoteliales. Esta interacción hace que las células endoteliales permanezcan en quiescencia. B) Las células endoteliales liberan Ang-2, la cual actúa como antagonista de Ang-1, impidiendo su unión a Tie-2. La unión de Ang-2 a Tie-2 hace que las células endoteliales pierdan las uniones entre células y con la matriz extracelular, además de permitirles responder ante el estímulo angiogénico, como es el VEGF-A. C) Si las células endoteliales reciben VEGF-A, entran en proliferación celular, migran y se diferencian para la formación del nuevo vaso. D) En cambio, si las células endoteliales activadas no reciben el estímulo angiogénico del VEGF-A, entran en apoptosis y provocan la regresión del vaso
Imagen tomada de Quesada, A. R., Medina, M. A., Muños-Chápoli, R., and Ponce, A. L. (2010) Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies. *Currents Pharmaceutical Design* 16: 3932- 3957.

Un proceso que se ha descrito en células tumorales es la denominada mimetización de hipoxia. Este proceso consiste en la producción y liberación de HIF-1 α por parte de las células tumorales bajo condiciones de normoxia. En concreto, se ha demostrado que mutaciones en el gen supresor de von Hippel Lindau (VHL) potencia la producción de HIF-1 α en el carcinoma renal^[112]. Otras mutaciones sobre oncogenes y el incremento en la señalización tienen como resultado la activación de MAPK, PI3K o la ruta de la proteína quinasa C, incrementando los niveles de HIF-1 α ^[114].

La vasculatura tumoral presenta un patrón aberrante, caracterizado por un diámetro irregular a lo largo de su extensión, la presencia de vasos muy sinuosos recubiertos deficientemente por una lámina basal incompleta con numerosas derivaciones y conexiones arteriovenosas, y pérdidas de sangre en diversos puntos debidas a la deficiente conexión entre células endoteliales. Estos vasos frecuentemente carecen de células de musculatura lisa. A ello hay que añadir un escaso y deficiente recubrimiento por los pericitos, que además difieren de los que recubren a los vasos sanos normales en que están poco unidos a las células endoteliales^[97]. Otra de las diferencias entre la angiogénesis fisiológica y la patológica reside en que en la vasculatura tumoral la señal de la proteína Dll4 está inhibida, de manera que no se establece una jerarquía definida entre las células endoteliales, y por ello, se generan numerosos puntos de inicio de los vasos vasculares^[27].

Se ha descrito que los tumores también tienen la capacidad de promover la *linfoangiogénesis*, es decir, el crecimiento de los vasos linfáticos a partir de otros preexistentes. La linfoangiogénesis está siendo intensamente investigada, ya que puede facilitar la migración de células cancerígenas a través de este sistema favoreciendo la metástasis tumoral.

La estrategia de los tumores para vascularizarse no se limita a promover la angiogénesis y la vasculogénesis, sino que se ha descrito que las células tumorales tienen la capacidad de generar estructuras similares a los vasos sanguíneos en el interior del propio tumor. A este proceso, se le conoce como "*vasculogénesis mimética*" (Figura 9). Este proceso consiste en la generación de

canales, sin la participación de células endoteliales, en el interior de la masa tumoral^[80], generando de esta manera un sistema circulatorio intratumoral alternativo. La “*vasculogénesis mimética*” tiene especial relevancia en los primeros estadios del desarrollo del tumor y parece ser llevada a cabo por las células madres cancerígenas (CSCs)^[138]. Estas células pueden reproducirse y adquirir el fenotipo de cualquier tipo celular, reflejando su plasticidad para diferenciarse o transdiferenciarse en otro tipo celulares, inclusive en células no tumorigénicas^[21]. La diferenciación o la transdiferenciación de las CSCs viene condicionado por el microambiente, tanto la matriz extracelular como las células que rodean a la CSC, y promueve la formación de la vasculatura mimética asociada a las CSC.

Figura 9 | ”Vasculatura mimética”. En el recuadro se representa cómo los vasos sanguíneos (rojo) se conectan con los vasos linfático (amarillo) mediante los canales de la “vasculature mimetica”. Imagen tomada de Ruoslahti, E. (2002) Specialization of tumour vasculature. *Nature Reviews Cancer* 2: 83- 90.

3.3. Modelos celulares y métodos de investigación preclínica en angiogénesis

Las características distintivas de las células endoteliales se pueden dividir en fenotípicas y funcionales^[18]. Entre las *características fenotípicas diferenciales* de las células endoteliales se incluyen: 1) La presencia de cuerpos de Weibel-Palade. Estos son orgánulos específicos de las células endoteliales que almacenan el factor de von Willebrand (vWF). Este factor es una glicoproteína de adhesión que además sirve para estabilizar el factor VIII en la sangre con el

que circula formando un complejo. 2) La expresión de ICAM, VCAM y selectina-E, siendo todas ellas sobreexpresadas al activarse las células endoteliales. 3) La presencia de VE-cadherinas como uniones celulares. Entre las *características funcionales diferenciales* de las células endoteliales se incluye: 1) La presencia de la enzima activa convertidora de angiotensina (ACE). 2) La capacidad de acetilar las lipoproteínas de baja densidad (acLDL). 3) La capacidad de unir la lecitina aglutinina I de *Ulex europaeus*.

Las células endoteliales presentan diferencias respecto al tamaño, forma, uniones complejas y ausencia o presencia de cuerpos plasmalemales. La heterogeneidad funcional de las células endoteliales también ha de tenerse en consideración, por lo que hay que incluir su papel en el control de la vasoconstricción y vasodilatación, coagulación sanguínea, fibrinólisis, presentación de antígenos, aterogénesis y catabolismo de lipoproteínas. El proceso angiogénico involucra esencialmente a la microvasculatura y de forma excepcional a la macrovasculatura. Estas diferencias proporcionan una idea de que los distintos linajes de células endoteliales no responderán de la misma manera ante los diversos estímulos. Además, la mayoría de las células endoteliales en el organismo suelen estar en estado de quiescencia, mientras que el mantenimiento de este tipo celular en condiciones *in vitro*, se hace en condiciones de proliferación constante, adquiriendo un fenotipo proliferativo^[123].

Las diferencias entre las células endoteliales microvasculares y las macrovasculares como modelos del estudio de la angiogénesis incluyen^[1]:

- Las células endoteliales microvasculares necesitan medios de cultivos con mayor número de suplementos para ser mantenidas en condiciones *in vitro* que las células endoteliales macrovasculares, hecho que manifiesta diferencias entre ambos niveles de diferenciación existentes.
- Las células endoteliales microvasculares, bajo el estímulo adecuado, forman estructuras tubulares mucho más rápido que las células endoteliales macrovasculares .

- El perfil de secreción de las prostanglandinas de las células endoteliales microvasculares es diferentes al de las células endoteliales macrovasculares.
- Existen diferencias entre la cantidad de moléculas de adhesión entre los dos tipos celulares endoteliales (ICAM-1^[35] y CD36^[125] se expresan más en células endoteliales microvasculares mientras que VCAM-1^[125] se expresa más en células endoteliales macrovasculares).
- Los procesos de trasvasación de leucocitos hacia los distintos tejidos tienen lugar exclusivamente entre las células endoteliales microvasculares, de manera, que este tipo celular expresa moléculas de adhesión específicas para leucocitos.

El interés creciente por el papel de las células endoteliales en condiciones fisiológicas y patológicas ha llevado al incremento en el número de modelos *in vitro* para estudiar diferentes mecanismos o patologías, con el consiguiente interés por aislar y mantener en cultivo células endoteliales procedentes de distintas fuentes^[18]. Una de las limitaciones más importantes del uso de células endoteliales en cultivos primarios es su rápida senescencia. En concreto, las células endoteliales macrovasculares HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical humano) solo pueden usarse durante los 10 primeros pases tras su aislamiento, momento en el cual adquieren mayor tamaño, detienen la proliferación, se convierten en células multinucleadas y finalmente mueren. Otro inconveniente del uso de células endoteliales en cultivos primarios estriba en que al proceder de donadores distintos pueden presentar comportamientos diferentes y causar diferencias en los resultados obtenidos^[135].

La necesidad de obtener resultados reproducibles ha llevado a la creación de líneas celulares endoteliales inmortalizadas, para ser bien caracterizadas y mantener de forma estable las propiedades endoteliales^[18]. Muy frecuentemente, la inmortalización de las células endoteliales se consigue transformándolas mediante el empleo del antígeno T del virus SV40, el cual induce la expresión de las telomerasas (hTER-HUVEC) e inactiva el gen p53 y el gen del retinoblastoma. Otro mecanismo por el que se puede realizar la inmortalización celular consiste en la introducción de los genes E6/E7 del

papilomavirus humano. Los linajes celulares resultantes son las alternativas disponibles al uso de células endoteliales primarias^[22].

Un ejemplo de línea endotelial macrovascular inmortalizada es EC-RF24, resultado de la integración de los genes E6/E7 del papiloma virus humano en HUVEC. Estas son células diploides, dependientes de anclaje, crecen de modo polar e inhiben su crecimiento por contacto. Presenta niveles de expresión de marcadores específicos endoteliales como vWF, endoglina, PECAM-1, E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1; además, expresan marcadores no endoteliales como con CD9, CD13, CD14, CD29, CD36, CD40, CD51 y CD55, de igual manera que HUVEC. EC-RF24 tiene una tasa de trans migración de neutrófilos semejante a la de HUVEC, presenta cuerpos de Weibel-Palade y muestra síntesis constitutiva de PAI-1 e inducible del factor del tejido (TF), y la deposición de ambos en la matriz subendotelial^[18].

Un caso de línea celular endotelial microvascular inmortalizada lo representa la línea HMEC-1, resultado de la inmortalización de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas mediante la transfección con el antígeno T del virus SV40. Las células HMEC-1 presentan la típica morfología en adoquines de las células endoteliales, expresan y secretan el factor de von Willebrand, realizan la acetilación de la lipoproteína de baja densidad, tienen la capacidad de formar estructuras tubulares al ser depositadas sobre matrigel y pueden unir linfocitos de manera específica. Además, estas células inmortalizadas expresan en su membrana ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, CD31, CD36 (marcador característico de células endoteliales microvasculares), CD44, complejo de histocompatibilidad clase II (MHC-II), activador de plasminógeno de tejido (tPA), inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1), factor del tejido (TF) y trombomodulina (TM)^[1].

Modelos *in vitro* para el estudio preclínico de la angiogénesis

Existen diversos modelos para el estudio del proceso angiogénico, que recrean las etapas que tienen lugar *in vivo* durante la angiogénesis, desde las uniones de las células endoteliales para formar una pared vascular hasta el final de la morfogénesis del tubo, maduración y conexión a otros tubos. Además,

estos modelos deben cumplir los requisitos de ser reproducibles, fáciles de realizar y que sean fácilmente cuantificables. Estos modelos emplean células endoteliales (en cultivos primarios o como líneas inmortalizadas) y pueden ser bidimensionales o tridimensionales.

Los modelos bidimensionales consisten en ensayos en los que las células se depositan paralelas a la superficie de la placa de cultivo, ya sea directamente o sobre un lecho de alguna proteína o matriz. Los ensayos bidimensionales no reflejan todas las etapas del proceso angiogénico y carecen del patrón espacial de organización celular que se produce durante el inicio del crecimiento del vaso en formación^[130]. Entre ellos destacan los siguientes:

- Ensayo de proliferación celular: La proliferación celular es considerada como el incremento del número de células que ha tenido lugar tras un periodo. Esto puede analizarse simplemente considerando el número de células del que se inició y contabilizando el número de células existentes tras el periodo de incubación. Ello se puede llevar a cabo mediante una cámara cuenta glóbulos o un contador de partículas electrónico. Otro método muy usado, es el basado en el uso de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro], una sal de tetrazolio amarilla que es captada por las células vivas y reducida por enzimas deshidrogenasas mitocondriales generando cristales azul/violeta (llamados cristales de formazano), que se acumulan exclusivamente en células vivas. Estos cristales se pueden disolver con disolvente orgánicos. Se puede establecer una relación lineal entre la absorbancia medida y el número de células existentes viables^[32].
- Ensayo de migración: Durante el proceso angiogénico, las células endoteliales son activadas y tienen que degradar la lámina basal y migrar hacia el estroma perivascular en respuesta al gradiente angiogénico establecido por los factores proangiogénicos. Este ensayo se puede realizar mediante dos metodologías posibles:
 1. Ensayo en “*transwell*”: Consiste en depositar las células en una pequeño pocillo que en su parte inferior consta de un filtro con poros de 8 μm de diámetro, por los cuales solo pueden pasar células activas, hacia el fondo de la placa, donde se ubica un quimioatrayente.

2. Ensayo de la herida y cicatrización: Sobre una placa en confluencia celular, se realiza el raspado de las células, generando una zona sin células, y a los lados zonas bordeadas por regiones con células. El margen formado se utiliza como referencia para denotar la capacidad de migración de las células. De esta manera se puede monitorizar en el tiempo la migración celular. Una de las limitaciones de este ensayo es que a periodos de 24 horas o más es difícil discriminar entre la migración y la proliferación celular, lo que se puede evitar añadiendo un inhibidor de proliferación para aquellos ensayos que requiera de incubaciones prolongadas.
- Ensayo de morfogénesis de tubos: La formación de estructuras tubulares es una de las etapas finales del proceso angiogénico. Este ensayo es usado para analizar el potencial proangiogénico o antiangiogénico de nuevos compuestos. Para ello, se depositan las células sobre una matriz de proteína o de una mezcla de proteínas, sobre el que se depositan las células endoteliales. Esta matriz estimula el anclaje, migración y diferenciación de las células endoteliales a la formación de estructuras tubulares^[69].

Los modelos tridimensionales se basan en la capacidad que tienen las células endoteliales para invadir los sustratos en las tres dimensiones del espacio. Estos modelos están más cercanos a los procesos que tienen lugar *in vivo*, puesto que puede emular los procesos de iniciación de vasos, proliferación, migración o diferenciación de las células, proveyendo una comprensión más cercana a la situación fisiológica. Para ello, se utilizan matrices de colágeno, fibrina purificada, Matrigel o mezclas de varias proteínas purificadas.

Otra de las aplicaciones que tienen los modelos tridimensionales, es que permiten evaluar el efecto que ejerce cada factor de crecimiento sobre cada una de las etapas de la angiogénesis. Además, permiten evaluar la distancia entre las células, la difusión de nutrientes y de oxígeno y la estimulación de los factores de crecimientos^[130].

Modelos *ex vivo*

Estos modelos se llevan a cabo a partir de una sección de un órgano animal que posteriormente se mantiene en condiciones *in vitro*, con el objetivo de evaluar los mecanismos moleculares que tiene lugar durante algunas de las etapas de la angiogénesis. Este tipo de ensayo suele realizarse embebiendo la sección del órgano en alguna matriz proteica, de manera que se pueda recrear las condiciones estructurales en las que se daría el proceso en el interior del animal. La matriz junto con el tejido suele recubrirse con medio de cultivo para propiciar los requerimientos de sustento de tejido, evitando su necrosis. Otra de las ventajas que presenta este tipo de ensayos es que las células endoteliales no han sido alteradas por sucesivos pases, por lo que mantienen su estado de quiescencia celular en el momento en el que se obtiene el explante, asemejándose más a la situación de angiogénesis *in vivo*. Otra utilidad importante de estos modelos es que permiten evaluar la capacidad antiangiogénica de compuestos.

El ensayo del anillo aórtico de rata/ratón es el ensayo más común de los ensayos *ex vivo*, debido a la facilidad que presenta y a la cantidad de información que proporciona. En cambio, este ensayo presenta una alta variabilidad entre los explantes obtenidos de individuos distintos^[70].

Modelos *in vivo*

Estos modelos hacen uso del animal vivo para inducir algún proceso patológico y evaluar la capacidad de compuestos con potencial antiangiogénico, o para determinar la relevancia de una proteína o factor de crecimiento en el desarrollo de la angiogénesis.

Entre los modelos *in vivo* para la investigación preclínica de la angiogénesis suelen utilizarse:

- Ensayo de la membrana corioalantoidea: Este ensayo utiliza como modelo de vasculatura la membrana corioalantoidea del embrión del pollo. Sobre dicha membrana se pueden testar compuestos para determinar su capacidad antiangiogénica. Para ello, se deposita el compuesto sobre un disco de metilcelulosa y tras 48 horas de incubación se procede a evaluar el efecto

del compuesto sobre la vasculatura, considerando como positivo la desaparición, disminución o efecto de rebote de los vasos en el área tratada^[70].

- Pez cebra (*Danio rerio*): Ensayo que se realiza utilizando un pez tropical de agua dulce, que en condiciones óptimas produce cientos de huevos en cada puesta. Este pez, como modelo angiogénico, comparte con los mamíferos genes y mecanismos de regulación angiogénica; además, los embriones presentan la piel transparente, lo que permite la visualización de los vasos intersegmentales. Esto facilita el análisis para la valoración de compuestos inhibidores de la angiogénesis. Existe un pez cebra transgénico en el que la proteína fluorescente verde (GFP) se expresa bajo promotores específicos del desarrollo de la vasculatura. Este transgénico se conoce como *Fli-eGFP* y facilita la visualización de la vasculatura tanto en adulto como en embriones, por lo que es frecuentemente usado como modelo en estudios de angiogénesis.

3.4. Antiangiogénesis como terapia antitumoral

Judah Folkman propuso a principios de la década de 1970 una teoría en la que argumentaba que el crecimiento tumoral es dependiente de angiogénesis tras alcanzar cierto tamaño, ya que necesita el aporte de nutrientes procedentes de la sangre para continuar su crecimiento^[41]. Desde el momento en el que se estableció una estrecha relación entre el tumor y la angiogénesis, las terapias antiangiogénicas han sido objeto de gran interés para evitar el crecimiento y la diseminación de células tumorales a otros órganos o tejidos^[38]. Por ello, la inhibición de la angiogénesis presenta gran interés desde el punto de vista farmacológico, utilizando las distintas etapas de la angiogénesis (degradación de la matriz extracelular, migración, proliferación, evasión de la apoptosis y diferenciación de los nuevos vasos) como puntos esenciales para interferir e inhibir el proceso. A pesar de las múltiples dianas potenciales que presenta el proceso angiogénico, la terapia antiangiogénica actualmente usada en clínica se basa esencialmente en la inhibición del efecto del VEGF-A, bien sea mediante el bloqueo de su unión a sus receptores por el uso de anticuerpos, o por la administración de moléculas pequeñas que interfieren en la ruta de

señalización del receptor VEGFR-2. Estas terapias para el tratamiento del cáncer se han puesto recientemente en cuestión porque existen evidencias en modelos experimentales que sugieren que algunos fármacos antiangiogénicos pueden favorecer la invasividad tumoral y la metástasis^[94]. Sin embargo, no existe ninguna evidencia clínica hasta el momento que avale esta hipótesis acerca de los potenciales efectos prometastásicos de los tratamientos antiangiogénicos en pacientes oncológicos. En cambio, sí es una realidad que buena parte de las terapias antiangiogénicas actualmente aprobadas han de utilizarse en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales y que hasta el momento los resultados obtenidos son modestos^[97].

Ante la compleja regulación y la cantidad de factores involucrados durante el proceso angiogénico, se han buscado diversas estrategias para identificar nuevos marcadores moleculares específicos de la vasculatura tumoral, utilizando distintas metodologías y aproximaciones. La búsqueda de marcadores endoteliales de la vasculatura tumoral se inició con la metodología del análisis de cDNA substractivo; también se ha utilizado las plataformas de micromatrices y recientemente el análisis serial de la expresión génica (SAGE) ha revelado diferencias en los patrones de expresión génica en células endoteliales derivadas en eventos de angiogénesis fisiológica y patológica^[111]. Dada la ingente información existente acerca de los transcriptomas de tumores sólidos y la asociación de éstos con las células endoteliales, otra de las estrategias utilizadas para la búsqueda de nuevos marcadores de angiogénesis tumoral consiste en comparar dichos transcriptomas y analizarlos con procedimientos bioinformáticos^[56].

Fruto de todas las metodologías utilizadas para dilucidar marcadores endoteliales tumorales, se ha conseguido validar diversos marcadores específicos de la vasculatura tumoral (Tabla 1).

Marcador vascular tumoral	Función
Dominios EDA y EDB de la fibronectina	La proteólisis alternativa de los dominios de la fibronectina tales como el dominio extra A (EDA) y el dominio extra B (EDB) están expresada en abundancia en los procesos de crecimiento activo de la vasculatura. EDA es un excelente marcador vascular de metástasis ^[90] .
Dominio extra de la tenascina C	Mediante el procesamiento alternativo del transcrito primario de la tenascina C se obtiene la isoforma "larga" que está ausente en el adulto, en cambio, se expresa de manera abundante en ciertos tumores ^[17] .
Endogлина	Proteína transmembrana homodimérica que actúa como correceptor para el TGF- β y es sobre expresada en células endoteliales neovasculares de varios tumores sólidos ^[20] .
Antígeno de membrana específico de la próstata (PMSA)	Glicoproteína de membrana con actividad proteolítica, que originalmente se detectó su sobreexpresión en el cáncer de próstata, pero estudios posteriores han demostrado que su sobreexpresión tiene lugar en la vasculatura en formación de varios tumores sólidos, mientras que en condiciones fisiológicas sanas su expresa se limita a la próstata, duodeno, epitelio mamario y a los túbulos renales ^[74] .
Annexina A1	Proteína citoplasmática que puede asociarse a la membrana plasmática por su unión a fosfolípidos dependientes de calcio. Ha sido propuesta como diana vascular, por que no se expresa en las células endoteliales sanas y si en células endoteliales sujetas a procesos tumorales ^[91] .
Fosfatidilserina (PS)	Fosfolípido esencial de la membrana celular, preferentemente en la capa interna lipídica en condiciones normales. Cuando la célula está sometida a estrés, apoptosis o se encuentra en proliferación, la fosfatidilserina se transloca a la capa exterior de la membrana celular ^[99] .
VEGF-A y receptores VEGF (VEGFR)	El VEGF-A es una citocina multifuncional que tienen un papel importante tanto en la angiogénesis fisiológica como en la angiogénesis patológica. Esta citocina es la responsable de la activación de las células endoteliales cuando se une a los receptores VEGFR localizados en la superficie de las células endoteliales.
Integrinas	Heterodímeros constituidos por una subunidad α y otra β . Se ha demostrado que la integrina $\alpha_5\beta_1$ solamente se expresa en células endoteliales tumorales y esta ausente en la vasculatura de los tejidos no neoplásicos ^[65] .
Robo 4	Expresado exclusivamente en bajo condiciones de angiogénesis activa, principalmente asociada a tumores ^[57] .
Proteína (Endo PDI)	Este gen es inducido bajo condiciones de hipoxia esencialmente y se expresa en el endotelio. Se ha demostrado que EndoPDI se necesita para el plegamiento de moléculas endoteliales de protección, entre las que cabe destacar la endotelina-1 (EDN1), la adernomedulina (ADM) y CD105, las cuales son expresadas por células endoteliales expuestas a estrés hipoxico. EndoPDI se expresa en las células endoteliales tumorales favoreciendo la supervivencia celular ^[90] .
Locus 1 del desarrollo endotelial (DEL1)	Proteína expresada ampliamente en el embrión pero completamente ausente en el adulto, a excepción de condiciones de angiogénesis activa. Esta proteína es una molécula de adhesión específica de células endoteliales y se une al receptor de la integrina $\alpha_v\beta_3$.
Estaniocalcina 1 (STC-1)	El análogo humano ha sido descrito como un modulador selectivo del factor de crecimiento hepático (HGF) sobre el endotelio, inhibiendo la migración y la morfogénesis de las células endoteliales en respuesta al HGF, pero no su proliferación. Mediante hibridación <i>in situ</i> se ha que STC-1 está sobreexpresado en vasos sanguíneos tumorales, con lo cual se destaca como un buen marcador de la vasculatura ^[104] .

Nuevos marcadores endoteliales tumorales (TEMs)	Son proteínas que se expresan en la superficie celular con dominios transmembranas. TEM-1, -7 y -8 solo tienen un dominio transmembrana mientras que TEM-5, es una proteína con 7 dominios transmembranas con un largo dominio extracelular N-terminal acoplado a proteína G. TEM-5 y TEM-8 se expresan intensamente en la vasculatura tumoral y están ausentes en la vasculatura normal ^[24] . TEM-1 se expresa predominantemente en fibroblastos y pericitos asociados a vasos tumorales pero no al endotelio tumoral ^[77] .
Delta 4	Se encuentra únicamente en el endotelio con angiogénesis activa ^[90] .

Tabla 1 | Marcadores distintivos presentes en la vasculatura tumoral.

Se están explorando diversas vías de actuación para inhibir la creación de nuevos vasos. Reflejo de ello, son las diferentes categorías en las que se pueden clasificar las drogas con potencial antiangiogénico^[64].

- Anticuerpos monoclonales: Terapia en la que se usa anticuerpos altamente específicos dirigidos frente a factores angiogénicos libres en circulación. Este tipo de terapia consiste en neutralizar los factores angiogénicos para que no se unan a sus receptores en las células, evitando la consecuente activación celular.
- Anticuerpos frente a receptores angiogénicos: El uso de anticuerpos dirigidos frente a receptores con capacidad angiogénica ubicados en las células. Este mecanismo de acción impide que los factores angiogénicos se unan a las células, llevar a cabo la respuesta celular frente al estímulo angiogénico.
- Inhibidores tirosín quinasas: Moléculas que se destacan por su capacidad para impedir la fosforilación de distintas proteínas, evitando así el flujo de información hacia el interior celular y con ello evita la activación celular. Estas moléculas afectan a todo el quínoma celular, de manera que deben de ser muy bien evaluada la acción de este tipo de moléculas en todas las dianas susceptibles de inhibición, ya que puede inhibir proteínas de procesos esenciales para la integridad de células sanas.

Dada la diversidad de tipos celulares (las células endoteliales interactúan con células murales, progenitoras vasculares, macrófagos, células dendríticas, plaquetas y leucocitos)^[23], la ampliación del conocimiento sobre la biología de la angiogénesis abrirá nuevas expectativas para desarrollar terapias antiangiogénicas dirigidas a todos los tipos celulares involucradas en el proceso para obtener resultados más prometedores para el tratamiento del cáncer.

3.5. Mecanismos de resistencia a las distintas terapias antiangiogénicas

Existen evidencias que apuntan a que la inhibición de una sola diana angiogénica conlleva el incremento de factores angiogénicos alternativos, como ocurre en la terapia anti-VEGF que incrementa los niveles de PlGF, VEGFR-2 y EGFR^[23].

Se ha descrito que los tumores presentan dos tipos mecanismos de resistencia frente a los fármacos antiangiogénicos^[13].

- 1- Resistencia adaptativa: Causadas por mutaciones de los genes para los efectores angiogénicos a los que se dirige el fármaco, o por la alteración de la absorción del fármaco y por la difusión hasta el foco tumoral. Además, rutas alternativas de señalización sustentan el crecimiento tumoral a pesar que el efector diana de la droga permanezca inhibida. Se han descrito varios mecanismos por los que se genera la resistencia adaptativa:
 1. Activación de rutas de señalización proangiogénicas del tumor.
 2. Reclutamiento de células progenitoras derivadas de la médula ósea, debido a las condiciones de hipoxia de la región tumoral.
 3. Aumento del número de pericitos que recubren el vaso tumoral, actuando como soporte y disminuyendo la necesidad de VEGF.
 4. Potenciación de la capacidad de invasión y de metástasis proveyendo el acceso de células tumorales a las vasculatura de los tejidos sanos sin neovascularización.
- 2- Resistencia inherente a la terapia antiangiogénica: Resistencia producida cuando las células tumorales no responden al tratamiento administrado y no se aprecia efecto antiangiogénico ni siquiera a corto plazo. Entre los

Dada la diversidad de tipos celulares (las células endoteliales interactúan con células murales, progenitoras vasculares, macrófagos, células dendríticas, plaquetas y leucocitos)^[23], la ampliación del conocimiento sobre la biología de la angiogénesis abrirá nuevas expectativas para desarrollar terapias antiangiogénicas dirigidas a todos los tipos celulares involucradas en el proceso para obtener resultados más prometedores para el tratamiento del cáncer.

3.4. Mecanismos de resistencia a las distintas terapias antiangiogénicas

Existen evidencias que apuntan a que la inhibición de una sola diana angiogénica conlleva el incremento de factores angiogénicos alternativos, como ocurre en la terapia anti-VEGF que incrementa los niveles de PlGF, VEGFR-2 y EGFR^[23].

Se ha descrito que los tumores presentan dos tipos mecanismos de resistencia frente a los fármacos antiangiogénicos^[13].

1- Resistencia adaptativa: Causadas por mutaciones de los genes para los efectores angiogénicos a los que se dirige el fármaco, o por la alteración de la absorción del fármaco y por la difusión hasta el foco tumoral. Además, rutas alternativas de señalización sustentan el crecimiento tumoral a pesar que el efector diana de la droga permanezca inhibida. Se han descrito varios mecanismos por los que se genera la resistencia adaptativa:

1. Activación de rutas de señalización proangiogénicas del tumor.
2. Reclutamiento de células progenitoras derivadas de la médula ósea, debido a las condiciones de hipoxia de la región tumoral.
3. Aumento del número de pericitos que recubren el vaso tumoral, actuando como soporte y disminuyendo la necesidad de VEGF.
4. Potenciación de la capacidad de invasión y de metástasis proveyendo el acceso de células tumorales a las vasculatura de los tejidos sanos sin neovascularización.

2- Resistencia inherente a la terapia antiangiogénica: Resistencia producida cuando las células tumorales no responden al tratamiento administrado y no se aprecia efecto antiangiogénico ni siquiera a corto plazo. Entre los

mecanismos por los que las células tumorales presentan resistencia inherentes están:

1. Señales proangiogénicas redundantes.
2. Protección vascular mediada por células inflamatorias preexistentes liberan un amplio número de factores proangiogénicos.
3. Hipovascularización y la falta de respuesta a los inhibidores angiogénicos.
4. Metástasis mediante cooptación de vasos normales sin desarrollo del proceso angiogénico.
5. Cambios en la isoforma dominante del VEGF.

Una de las principales razones para que la terapia antiangiogénica basada en la inhibición del VEGF-A y de sus receptores no presente el éxito esperado es que las células cancerígenas cambian la isoforma dominante del VEGF que liberan, junto con la pérdida en la regulación de la división celular por el VEGF-A en las células endoteliales debido a alteraciones en la ruta de señalización del VEGFR-2^[122]. Se ha comprobado que la terapia antiangiogénica dirigida contra el VEGF, provoca condiciones de hipoxia aguda en el tumor, lo que hace que se establezca HIF-1 α , promoviendo la supervivencia tumoral bajo estas condiciones. A su vez, se favorece la expresión de genes controlados por HIF-1 α , entre los que se encuentran genes involucrados en el metabolismo glucolítico tales como la fosfoglicerato quinasa (PGK) y la aldolasa (ALDOA), transportadores de glucosa (GLUT1) y proteínas reguladoras de la movilidad, como la lisil oxidasa y proteínas involucradas en la metástasis como CXCR4 y las E-cadherinas^[113]. A ello hay que añadir que el proceso angiogénico está controlado por múltiples moléculas procedentes de distintos tipos celulares entre los que se destacan factores proangiogénicos que no son inhibidos por la terapia anti-VEGF/VEGFR, y que son capaces de mediar y favorecer la angiogénesis tumoral, tales como FGF, PLGF, Ang-1 y Ang-2, entre otros^[68]. Además, mecanismos de resistencia a la inhibición del VEGF-A están ligados a la alteración del flujo sanguíneo interno de los vasos tumorales, la cooptación de vasos sanguíneos normales cercanos, el incremento de la hipoxia

intratumoral, la activación de las rutas de señalización que favorece la transición epitelio-mesénquima (EMT), la promoción de la invasividad del tumor, la supresión del control de células inmunes, la inducción de la tolerancia y la activación de las células madres cancerígenas^[50].

Bibliografía utilizada en esta sección:

1. Ades E. W., Candal, F. J., Swelick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., and Lawley, T. J. (1992) HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal Of Investigative Dermatology*. 99: 683- 690.
2. Albin, A., Tosetti, F., Benelli, R., and Noonan, D. M. (2005) Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Research* 65: 10637- 10641.
3. Allavena, P., Sica, A., Vecchi, A., Locati, M., Sozzani, S., and Mantovani, A. (2000) The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunological Reviews* 177: 141- 149.
4. Akazawa, H., Kohno, H., Tokuda, H., Suzuki, N., Yasukawa, K., Kimura, Y., Manosroi, A., Manosroi, J., and Akihisa, T. (2012) Anti-inflammatory and anti-tumor promoting effects of 5-deprenyllupulol C and other compounds from Hop (*Humulus lupulus L.*). *Chemistry and Biodiversity* 9: 1045- 1054.
5. Akihisa, T., Nakamura, Y., Tagata, M., Yasukawa, K., Uchiyama, E., Suzuki, T., and Kimura, Y. (2007) Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry and Biodiversity* 4: 224- 231.
6. Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J.M. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research* 85: 221- 228.
7. Baeriswyl, V., and Christofori, G. (2009) The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminar in Cancer Biology* 19: 329- 337.
8. Balkwill, F. (2004) Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* 4: 540- 550.
9. Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357: 539- 545.
10. Beatson, G. T. (1986) On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* 2: 104- 107; 162- 165.
11. Berardi, M. J., and Fantin, V.R. (2011) Survival of the fittest: metabolic adaptations in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 21: 59- 66.
12. Bergers, G., and Benjamin L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Review Cancer* 3: 401- 410.
13. Bergers, G., and Hanahan, D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Review Cancer* 8: 592- 603.
14. Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003) Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation* 111: 1287- 1295.
15. Bissell, M. J., Kenny, P. A., and Radisky, D. C. (2005) Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symposia on Quantitative Biology* 70: 343- 356.

16. Blasco, M. A. (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics* 6: 611- 622.
17. Borsi, L., Balza, E., Gaggero, B., Allemanni, G., and Zardi, L. (1995) The alternative splicing pattern of the tenascin-C pre-mRNA is controlled by the extracellular pH. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 6243- 6245.
18. Bouis, D., Hospers, G.A.P., Meijer, C., Molema, G., and Mulder N.M. (2001) Endothelium *in vitro*: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4: 91- 102.
19. Bruhn, M., Townsend, A. R., Lee, C. K., Shivasami, A., Price, T. J., Wrin, J., Arentz, G., Tebbut, N. C., Hocking, C., Cunningham, D., and Hardingham, J. E. (2013) Pro-angiogenic tumor proteins as potential predictive or prognostic biomarkers for bevacizumab therapy in metastatic colorectal cancer. *International Journal of Cancer* doi:10-1002/ijc.28698.
20. Burrows, F. J., Derbyshire, E. J., Tazzari, P. L., Amlot, P., Gazdar, A. F., King S. W., Letarte, M., Vietta, E. S., and Thorpe, P. E. (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clinical Cancer Research* 1: 1623- 1634.
21. Bussolati, B., Grange, C., Sapino, A., and Camussi, G. (2009) Endothelial cell differentiation of human breast tumor stem/progenitor cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13: 309- 319.
22. Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9: 653- 660.
23. Carmeliet, P., and K. Jain, R. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.
24. Carson-Walter, E. B., Neil Watkins, D., Nanda, A., Vogelstein, B., Kinzler, K., and St. Croix, B. (2005) Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Research* 61: 6649- 6655.
25. Chiang, A. C., and Massagué, J. (2008) Molecular basis of metastasis. *New England Journal of Medicine* 359: 2814- 2823.
26. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H. L. (2008) Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblast enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research* 6: 1521- 1533.
27. Chung, A. S., Lee, J., and Ferrara, N. (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Review Cancer* 10: 505- 514.
28. Clevers, H. (2011) The cancer stem cell: promises, promises and challenges. *Nature Medicine* 17: 313- 319.
29. Coffelt, S. B., Lewis, C. E., Naldini, L., Brown, J. M., Ferrara, N., and De Palma, M. (2010) Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *American Journal of Pathology* 176: 1564- 1576.
30. Colotta, F., Allavena, P., Seca, A., Garlanda, C., and Mantovani, G. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30: 1073- 1081.
31. DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C. B. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 19345- 19350.

32. Denizot, F., and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89: 271- 277.
33. Domblides, C., Gross-Goupil, M., Quivy, A., and Ravaud, A. (2013) Emerging antiangiogenics for renal cancer. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 18: 495-511.
34. Durin, S. G., and Glover, T. W. (2007) Chromosome fragile sites. *Annual Review of Genetics* 41: 169- 192.
35. Dutt, K., Del Monte, M., Agarwal, N., Sternberg, P., Srivastava, S. K., and Srinivasan, A. (1990) Establishment of human retinal pigment epithelial cell lines by oncogenes. *Oncogene* 5: 195- 200.
36. Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhiy, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010) Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116: 829- 840.
37. Feron, S. (2009) Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cell. *Radiotherapy & Oncology* 92: 329- 333.
38. Ferrara, N., and Alitalo, K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Medicine* 5: 1359- 1364
39. Fleisher, A. S., Esteller, M., Harpaz, N., Leytin, A., Rashid, A., Xu, Y., Liang, J., Stine, O. C., Yin, J., Zou, T. T., Abraham, J. M., Kong, D., Wilson, K. T., James, S. P., Herman, J. G., and Meltzer, S. J. (2009) Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Research* 60: 4864- 4868.
40. Floor, S. L., Dumont, J. E., Maenhaut, C., and Raspe, E. (2012) Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends in Molecular Medicine* 18: 509- 515.
41. Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285: 11882- 1186.
42. Friedl, P., and Wolf, K. (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of Cell Biology* 188: 11- 19.
43. Gabilovich, D. (2004) Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic cell differentiation in cancer. *Nature Reviews Immunology* 4: 941- 952.
44. Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., Nohadani, M., Eklund, A. C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, A., and Swanton, C. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England Journal of Medicine* 366: 883- 892.
45. Giammarioli, A. M., Gambardella, L., Barbati, C., Pietraforte, D., Tinari, A., Alberton, M., Gnessi, L., Griffin, R. J., Minetti, M., and Malorni, W. (2012) Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response. *International Journal of Cancer* 15: E337-347.

46. Golubkov, V. S., Boyd, S., Savinov, A. Y., Chekanov, A. V., Osterman, A. L., Remacle, A., Rozanov, D. V., Doxsey, S. J., and Strongin, A. Y. (2005) Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT-1MMP) exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 25079- 25086.
47. Grivennikov, S., and Karin, M. (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Reviews* 1: 11- 19.
48. Grivennikov, S., Greten, F. R., and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140: 883- 899.
49. Grosso, J. F., and Jure-Kunkel, M. N. (2013) CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immunity* 13: 5- 19.
50. Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2010) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21: 309- 322.
51. Hanahan, D., and Weinberg, R. (2000) The Hallmarks of cancer. (2000) *Cell* 100: 57- 70.
52. Hanahan, D., and Weinberg, R. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646- 674.
53. Hernando, E., Nahlé, Z., Juan, G., Díaz-Rodríguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., Lowe, S. W., and Cordon-Cardo, C. (2004) Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 430: 797- 802.
54. Hua, W., Zhanga, C., Wua, R. Suna, Y., Levinea, A., and Fenga, Z. (2009) Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 107: 7455- 7460.
55. Huggins, C., and Hodges, C. V. (1941) Studies on prostatic cancer. The effects of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research* 1: 293- 297.
56. Huminiecki, L., and Bicknell, R. (2000) *In silico* cloning of novel endothelial-specific genes. *Genome Research* 10: 1796- 1806.
57. Huminiecki, L., Gorn, M., Suchting, S., Poulosom, R., and Bicknell, R. (2002) Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 79: 547- 552.
58. Inou, H., Takamori, M., Shimoyama, Y., Ishinibashi, H., Yamamoto, S., and Koshihara, Y. (2002) Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human sinovial fibroblast. *Journal of Pharmacology* 136: 287- 295.
59. Jakobsson, L., Franco, C. A., Bentley, K., Collins, R. T., Ponsioen, B., Aspalter, I. M., Rosewell, I., Busse, M., Thurson, G., Medvinsky, A., Schuler-Merker, S., and Gerhardt, H. (2010) Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology* 12: 943- 953.
60. Jeong, S. J., Koh, W., Lee, E. O., Lee, H. J., Lee, H. J., Bae, H., Lü, J., and Kim, S. H. (2010) Antiangiogenic phytochemicals and medicinal herbs. *Phytotherapy research*. DOI: 10.1002/ptr.3224.
61. Jiang, B. H., and Liu, L. Z. (2009) PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advance Cancer Research* 102: 19- 65.

62. Kang, H. J. Choi, Y. S., Hong, S. B., Kim, K. W., Woo, R. S., Won, S. J., Kim, E. J., Jeon, H. K., Jo, S. Y., Kim, T. K., Bachoo, R., Reynolds, I. J., Gwang, B. J., and Lee, H. W. (2004) Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience* 24: 1280 – 1287.
63. Karin, M., Lawrence, T., and Nizet, V. (2006) Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124: 823- 835.
64. Kerenidi, T., and Syrigos, K. (2010) Angiogenesis: Antiangiogenesis strategy and angiogenesis inhibitors. *Angiogenesis and Therapeutic targets in cancer*. Bentham Science Publishers p. 1 – 34.
65. Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., and Varner, J. A. (2000) Regulation of angiogenesis *in vivo* by ligation of integrin alpha5 beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *The American Journal of Pathology* 156: 1345- 1362.
66. Kim, S., Takahashi, H., Lin, W. W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J. L., and Karin, M. (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457: 102- 106.
67. Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H. Mulé, J., Jove, R., Pardoll, D., and Yu, H. (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nature Medicine* 11: 1314- 1321.
68. Larcher, F., Franco, M., Bolontrade, M., Rodríguez-Puebla, M., Casanova, L., Navarro, M., Yancopoulos, G., Jorcano, J. L., and Conti, C. J. (2003) Modulation of the angiogenesis response through Ha-ras control, placenta growth factor, and angiopoietin expression in mouse skin carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis* 37: 83- 90.
69. Lawley, T. J., and Kubota, Y. (1989) Induction to morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *Journal of Investigative Dermatology* 93: 595–615.
70. Lawson, N. D., and Weinstein, B. M. (2002) *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Developmental Biology* 248: 308- 318.
71. Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141: 1117- 1134.
72. Limaverde-Sousa, G., Sternberg, C., and Ferreira, C. G. (2013) Antiangiogenesis beyond VEGF inhibition: A journey from antiangiogenic single-target to broad spectrum agents. *Cancer Treatment Reviews*. Pii:S0305-7372(13)00262-4. Doi: 10.1016/j.ctrv.2013.11.009.
73. Lin, W. W., and Karin, M. (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation* 117: 1175- 1183.
74. Liu, H. Moy, P., Kim, S., Xia, Y., Rajasekaran, A., Navarro, V., Knudsen, B., and Bander, N. H. (1997) Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. *Cancer Research* 57: 3629- 3634.
75. London, N. R., Whitehead, K. J, and Li, D. Y. (2009) Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis* 12:149-158.
76. Lopez, O., Magariño, Y., and Delgado, R. (2009) El proceso angiogénico y el cáncer. *Biotecnología aplicada* 26: 104-110.
77. MacFadyen, J. R. Haworth, O., Roberston, D., Hardie, D., Webster, M. T., Morris, H. R., Panico, M., Sutton-Smith, M., Dell, A., van der Geer, P., Wienke, D., Buckley, C.

- D., and Isacke, C. M. (2005) Endosialin (TEM1, CD284) is a marker of stromal fibroblasts and is not selectively expressed on tumour endothelium. *FEBS Letters* 570: 2569- 2575.
78. Madsen, C. D., and Sahai, E. (2010) Cancer dissemination-Lessons from leukocytes. *Developmental Cell* 19: 13- 26.
 79. Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W. C., and Masutomi, K. (2009) An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* 461: 230- 235.
 80. Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Peer, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., and Hendrix, M. J. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American Journal of Pathology* 155: 739-752.
 81. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436- 444.
 82. Marusyk, A., Almedro, V., and Polyak, K. (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer* 12: 323- 333.
 83. Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J. M., Collins, K., and Hahn, W. C. (2005) The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102: 8222- 8227;
 84. Matos, P., Collard, J. G., and Jordan, P. (2003) Tumor-related alternatively spliced Rac 1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 50442- 50448.
 85. Medina, M. A. (2013) Systems biology for molecular life sciences and its impact in biomedicine. *Cell Molecular Life Science* 70: 1035- 1053.
 86. Medina, M. A. (2014) Targeting the metabolism of cancer -cells a foreword. *Currents Pharmaceutical Design* In Press.
 87. Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006) Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer* 6: 449-458.
 88. Murai, J., Huang, S. Y., Renaud, A., Zhang, Y., Ji, J., Takeda, S., Morris, J., Teicher, B. A., Doroshow, J. H., and Pommier, Y. (2013) Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Molecular Cancer Therapeutics* doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0803.
 89. Negrini, S., Gorgoulis, V. G., and Halazonetis, D. (2010) Genomic instability – a evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 220- 228.
 90. Neri, D., and Bicknell, R. (2005) Vascular tumour targeting. *Nature Reviews Cancer* 5: 436- 446.
 91. Oh, P., Li, Y., Yu, J., Durr, E., Krasinska, K. M., Carver, L. A., Testa, J. E., and Schnitzer, J. E. (2004) Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 429: 629- 635.
 92. Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1 α /CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335- 348.
 93. Ono, M. (2008) Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as target for therapeutic strategy. *Cancer Science* 99: 1501- 1506.

94. Páez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanova, O. (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cell* 15: 220- 231.
95. Park, J. I., Venteicher, A. S., Hong, J. Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., McLaughlin, M., Veenstra, T. D., Nusse, R., McCrea, P. D., and Artandi, S. E. (2009) Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460: 66- 72.
96. Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011) Basic and Therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146: 873- 887.
97. Quesada, A. R., Medina, M. A., Muñoz-Chápuli, R., and Ponce, A. L. (2010) Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies. *Currents Pharmaceutical Design* 16: 3932- 3957.
98. Ramsay, A. J., Quesada, V., Foronda, M., Conde, L., Martínez-Trillos, A., Villamor, N., Rodríguez, D., Kwarcia, A., Garabaya, G., Gallardo, M., López-Guerra, M., López-Guillermo, A., Puente, X., Blasco, M., Campo, E., and López-Otín, C. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. (2013) *Nature Genetics* 45: 526- 532.
99. Ran, S., He, J., Huang, X., Soares, M., Scothoron, D., and Thorpe, P. E. (2005) Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice. *Clinical Cancer Research* 11: 1551- 1562.
100. Rius, J., Guma, M., Schahtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S. Haddad, G. G., and Karin, M. (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453: 807- 811.
101. Rhodes, J. M. and Simons, M. (2007) The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11: 176- 205.
102. Roberts, S. J., Ng, B. Y., Filler, R. B., Lewis, J., Glusac, E. J., Hayday, A. C., Tigelaar, R. E., and Girardi, M. (2007) Characterizing tumor-promoting t cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 6770- 6775
103. Robey, R. B., and Hay, N. (2009) Is Akt the "Warburg kinase"? Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminar in Cancer Biology* 19: 25- 31.
104. Robinson-Smith, M., Isaacsohn, I., Mercer, C. A., Zhou, M., Van Rooijen, N., Hussein, N., McFarland-Mancini, M. M., and Drew, A. F. (2007) Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Research* 67: 5708- 5716.
105. Romiti, A., Cox, M. C., Sarcina, I., Di Rocco, R., D'Antonio, C., Barucca, V., and Marchetti, P (2013) Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 72: 13- 33.
106. Rössler, J., and Lagodny, J. (2005) Blood and lymph vessels in embryonic tumors. *Hematological Oncology* 23: 94-101.
107. Rössler, J., and Lagodny, J. (2005) Blood and lymph vessels in embryonic tumors. *Hematological Oncology* 23: 94-101.

108. Röth, A., Harley, C. B., and Baerlocher, G. M. (2010) Imetelsat (GNR163L)--telomerase-based cancer therapy. *Recent Results Cancer Research* 184: 221-234.
109. Ruiz-Perez, M. V., Sánchez-Jiménez, F., Alonso, F. J., Segura, J. A., Márquez, J., and Medina, M. A. (2014) Glutamine, glucose and other fuels for cancer. *Currents Pharmaceutical Design*. In Press.
110. Saunder, W. B., Bohnsack, B. L., Faske, J. B., Anthis, N. J., Bayless, K. J., Hirschi, K. K., and Davis, G. E. (2006) Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *The Journal of Cell Biology* 175: 179- 191.
111. Seaman S., Stevens, J., Young, M., Logsdon, D., Graff-Cherry, C., and St Croix, B. (2007). Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell*. 11: 539–554.
112. Semenza, G. L. (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Reviews of Cell Developmental Biology* 15: 551– 578.
113. Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3:721- 732.
114. Semenza, G.L. (2009) Oxygen homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine* 2: 336- 361.
115. Senderowicz, A. M. (1999) Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Investigational New Drugs* 17: 313- 320.
116. Shan, M. A., Waingerg, Z. A. Catenacci, D. V., Hochster, H. S., Ford, J., Lee, F. C., Kallender, H., Cecchi, F., Rabe, D. C., Keer, H., Martin, A. M., Liu, Y., Gagnon, R., Bonate, P., Liu, L., Gilmer, T., and Bottaro, D. P. (2013) Phase II study evaluating 2 dosing schedules of oral foretinib (GSK1363089), cMET/VEGFR2 inhibitor, in patients with metastatic gastric cancer. *Plos One* 8: 1- 9.
117. Sheng, H., Saho, J., Morrow, J. D., Beauchamp, R. D., and DuBois, R. N. (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research* 58: 362.
118. Shen, Y., Rehman, F. L. Feng, Y., Boshuizen, J., Bajrami, I., Elliott, R., Wang, B., Lord, C. J., Post, L. E., and Ashwort, A. (2013) BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clinical Cancer Research* 19: 5003- 5015.
119. Sherr, C. J., and McCormick, F. (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2: 103 -112.
120. Singerland, M., Guchelaar, H. J., and Gelderblom, H. (2014) Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anticancer Drugs* 25: 140- 149.
121. Sinha, S., and Levine, B. (2008) The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 S137- S148.
122. Sitohy, B., Nagy, J. A., Jaminet, S. C., and Dvork, H. F. (2011) Tumor-surrogate blood vessels subtypes exhibit differential susceptibility to anti-VEGF therapy. *Cancer Research* 71: 7021- 7028.
123. Staton, C. A., Reed, M. W. R., and Brown, N. J. (2009) A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology* 90: 195- 221.
124. Suhre, K., Shin, S. Y., Petersen, A. K., Mohny, R., MEtedith, D., Wägele, B., Altmaier, E., CARDIoGRAM, Delokas, P., Erdmann, J., Grundberg, F., Mangina, M.,

- Meisinger, C., Meitinger, T., Mewes, H. W., Milburn, M. V., Prehn, C., Raffler, J., Ried, J. S. Römisch-Margl, W., Samani, N. J., Small, K. S., Wichmann, H. E., Zhai, G., Illig, T., Spector, T. D., Adamski, J., Soranzo, N., and Gieger, C. (2011) Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature* 477: 54- 60.
125. Swerlick, R., Lee, K., Li, L. J., Sepp, N., Caughman, S., and Lawley, T. (1992) Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *The Journal of Immunology* 149: 698- 705.
 126. Swerlick, R., Lee, K., Wick, T., and Lawley, T. (1992) Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Immunology* 148: 78- 83.
 127. Taylor, C. T. (2008) Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *The Journal of Physiology* 586; 4055-4059.
 128. Tessari, A., Palmeri, D., and Di Cosimo, S. (2014) Overview of diagnostic/targeted treatment combinations in personalized medicine for breast cancer patients. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 7: 1- 19.
 129. Tysome, J. R., Lemoine, N. R., and Wang, Y. (2013) Update on oncolytic viral therapy – targeting angiogenesis. *OncoTargets and Therapy* 6: 1031–1040.
 130. Vailhé, B., Vittet, D., and Feige, J. J. (2001) *In vitro* models of vasculogenesis and angiogenesis. *Laboratory Investigation* 81: 439- 452.
 131. van Oijen, M. G. C., and Slootweg, P. J. (2000) Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clinical Cancer Research*. 6: 2138- 2145.
 132. Vaupel, P. (2010) Metabolic microenvironment of tumor cells: A key factor in malignant progression. *Experimental Oncology* 32: 125- 127.
 133. Wainberg, Z. A., and Hecht, J. R. (2007) Panitumumab in colorectal cancer. *Expert Reviews of Anticancer Therapy* 7: 967- 973.
 134. Wainberg, Z. A., Anghel, A., Desai, A. J., Ayala, R., Ruo, T., Safran, B., Fejzo, M. S., Hecht, J. R., Slamon, D. J., and Finn, R. S. (2010) Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab *in vitro* and *in vivo*. *Clinical Cancer Research* 16: 1509- 1519.
 135. Watson, C. A., Camera-Benson, L., Palmer-Crocker, R., and Pober, J. S. (1995) Variability among human umbilical vein endothelial cultures. *Science* 268: 447-448.
 136. Wise, R. D., and Thompson, C. B. (2010) Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Science* 35: 427- 433.
 137. Wroblewski, D., Jiang, C. C., Farrelly, M. L., Zhang, X. D., and Hersey, P. (2013) OBATOCLAX and ABT-737 induce ER stress responses in human melanoma cells that limit induction of apoptosis. *Plos One* 19: 3 84073.
 138. Yang, C., Sudderth, J., Bachoo, R. M., McDonald, J. G., DeBerardinis, R. J. (2009) Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Research* 69: 7896- 7993.
 139. Yao, X., Ping, Y., and Bian, X. (2011) Contribution of cancer stem cells to tumor vasculogenic mimicry. *Protein Cell* 2: 266- 272.
 140. Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer* 9: 798- 809.

141. Yuan, S., Wang, F., Chen, G., Zhang, H., Feng, L., Wang, L., Colman, H., Keating, M. J., Li, X., Xu, R. H., Wang, J., and Huang, P. (2013) Effective elimination of cancer stem cells by a novel drug combination strategy. *Stem Cells* 31: 23- 34.
142. Zlot, C., Ingle, G., Hongo, J., Suya, Y., Sheng, Z., Schawall, R., Paoni, N., Wang, F., Peale Jr., A. V., and Gerritsen, E. (2003) Stanniocalcin 1 is an autocrine modulator of endothelial angiogenic responses to hepatocyte growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 47654- 47659.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



En base a la información aportada en el capítulo introductorio y al historial previo del grupo de investigación en el que se desarrolla este trabajo, resulta razonable delimitar los objetivos de la presente tesis doctoral en función de las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis 1: La naturaleza es una fuente de nuevos compuestos bioactivos con efecto antiangiogénico, antiinflamatorio o antitumoral con potencial interés farmacológico.

Hipótesis 2: Las combinaciones de compuestos antiangiogénicos, antiinflamatorios o antitumorales pueden producir efectos sinérgicos que mejoren los obtenidos por su aplicación individual.

Estas hipótesis son contrastadas en la presente tesis a través de la consecución de cuatro objetivos específicos:

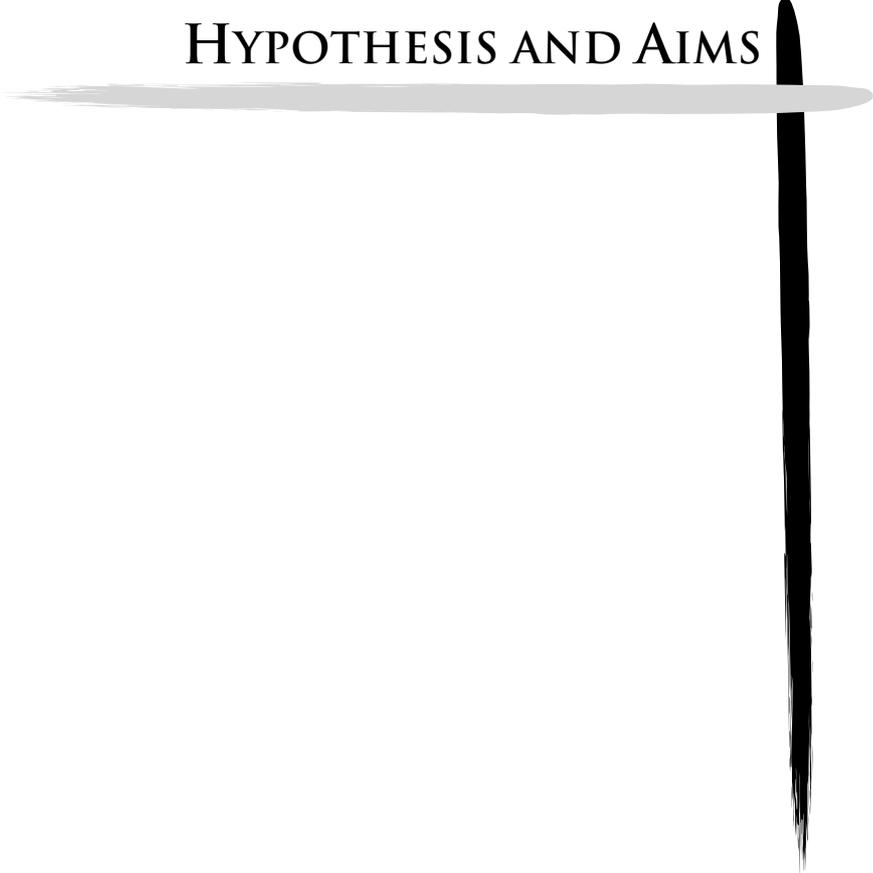
Objetivo 1: Identificación y caracterización de nuevas moléculas con potencial antiangiogénico mediante ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Objetivo 2: Análisis de la capacidad antiinflamatoria de una molécula (aerolisina-1) con actividad antiangiogénica.

Objetivo 3: Estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales candidatos a fármacos previamente analizados por el grupo ejercen su actividad antitumoral, antiinflamatoria o antiangiogénica.

Objetivo 4: Búsqueda de efectos sinérgicos en combinaciones pareadas de compuestos antitumorales o antiangiogénicos.

HYPOTHESIS AND AIMS



Hypothesis and Aims

On the basis of the information provided in the Introduction chapter and the previous work of our research group, it seems plausible to propose the following two working hypothesis as the framework of the present Doctoral Thesis:

Hypothesis 1: Nature is a source of new bioactive compounds with anti-tumoral, anti-inflammatory and/or anti-angiogenic effect with potential pharmacological interest.

Hypothesis 2: Combinations of drugs with anti-tumor, anti-inflammatory and/or anti-angiogenic effect could have synergistic effects yielding better results than those obtained from monotreatments.

Both hypothesis are checked in the present Doctoral Thesis with four specific aims:

Aim 1: Identification and characterization of potential new antiangiogenic molecules through *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* assays.

Aim 2: Analysis of the anti-inflammatory effect of a natural compound (aerophysinin-1) previously shown to have and anti-angiogenic activity.

Aim 3: Study of the molecular mechanisms through which drug candidates previously analyzed by our research group exhibit anti-tumor, anti-inflammatory or anti-angiogenic activity.

Aim 4: Screening to search synergistic effects of paired combinations of anti-tumor and anti-angiogenic compounds.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Medios de cultivos y reactivos

Los medios de cultivo celulares fueron suplementados con 1% antibiótico (penicilina/estreptomicina), 0,5% antifúngico (anfotericina B), 1% L-glutamina y 10% suero fetal bovino (FBS). Las líneas celulares endoteliales humanas inmortalizadas hay que suplementarlas además con 10% de suero humano (HS). Todos los medios de cultivo y los suplementos se adquirieron a la casa comercial Biowhittaker (Walkersville, MD, EEUU), a excepción del FBS que se adquirió a Harlan-Seralab (Belton, Reino Unido). Los medios MCDB131 y MEM 10x utilizados para el ensayo *ex vivo* del anillo aórtico de rata, fueron obtenidos a Gibco (Grand Island, New York, EEUU).

El Matrigel (10,28 – 10,5 mg/mL) y el colágeno tipo I de cola de rata (3,91 mg/mL) fueron adquiridos a Becton Dickinson Biosciences. La calceína-AM y el damnacantal se obtuvieron de Calbiochem (Damstadt, Germany). Los factores de crecimiento FGFb y VEGF₁₆₅ y los anticuerpos p-Akt, Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, p-c-Met, c-Met, p-mTOR, mTOR, p-Ikk α/β , Ikk β , fueron adquiridos a Cell Signaling Technology (Denver, MA, EEUU) y COX-2 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU). Los anticuerpos primarios frente a ETL, FADD, MMP-1, LRP-6, IL-9 e IL-1 α , junto con los anticuerpos secundarios anti-IgG conejo y anti-IgG ratón con jugados a peroxidasa se adquirió a AbCam (Cambridge, England).

Los reactivos utilizados para los distintos ensayos, como bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), suplemento para el crecimiento de células endoteliales (ECGS), heparina, agar, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico (HEPES), diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), formalina, yoduro de propidio, metilcelulosa, RNasa-A, Hoechst, gelatina bovina, tricaína, albúmina bovina, agarosa tipo VII, así como el compuesto 4-metilumbeliferona y diversas sales utilizadas para preparar distintas soluciones y tampones fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). La aeroplisinina-1 fue suministrado por Instituto Biomar S. A. (León, España).

El material fungible utilizado para realizar los ensayos y para mantener las células *in vitro* fueron de NUNC (Roskilde, Dinamarca). Las pipetas

serológicas y tubos de 15 y 50 mL fueron de VWR (West Chester, Pensilvania, EEUU).

2. Animales de experimentación

El ensayo de implantación subcutánea de Matrigel se llevó a cabo con ratones C57BL/6. El ensayo del anillo aórtico de rata, se realizó con una rata hembra de la cepa Wistar. Todos los animales de estos ensayos fueron adquiridos al laboratorio Charles River (Wilmington, MA, EEUU).

Los peces cebra (*Danio rerio*) transgénicos TG(l1:EGFP)y1 utilizados en la generación de embriones para el ensayo de neovascularización embrionaria, se obtuvieron de Zebrafish International Resource Center (ZIRC, Eugene, OR, EEUU).

El ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo se utilizaron huevos fertilizados de gallinas de la Granja Santa Isabel (Córdoba, España).

Todos los ensayos con animales se realizaron bajo el reglamento del Comité de ética de la investigación y del bienestar animal de la Universidad de Málaga (<http://www.uma.es/ceuma/cms/menu/funciones-y-ambito-de-aplicacion/comite-etico-de-experimentacion-animal/>).

3. Cultivos celulares

3.1. Células endoteliales

3.1.1. Células endoteliales de aorta bovina (BAEC)

Las células fueron aisladas a partir de una aorta de vaca suministrada por el matadero de industrias cárnicas FAMADESA (Campanillas, Málaga). El método de aislamiento de las células a partir del arco aórtico, se realizó como queda recogido en Gospodarowicz^[1]. El arco aórtico se limpió con tampón fosfato salino (PBS) suplementado con antibióticos y antifúngico. El arco aórtico se despojó por completo de tejido conectivo y de tejido graso. Se cerraron las arterias intercostales con bridas de plástico estériles, la abertura inferior se cerró con unas pinzas de Korcher, para rellenar el interior del arco aórtico con solución de colagenasa P disuelta a 1 mg/mL en PBS con MgCl₂· 6H₂O (0,1

mg/mL) y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,172 mg/mL) esterilizada mediante filtración. El arco aórtico con la solución de colagenasa P, se dejó incubando durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a presionar y friccionar las paredes del arco aórtico para liberar las células endoteliales del arco aórtico. El contenido se recuperó en un tubo de 50 mL, y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. El precipitado de células se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo y se depositó en un frasco de 25 cm² pretratado con gelatina al 1,5%. El medio de cultivo utilizado fue DMEM con 1g/L de glucosa suplementado con penicilina (50 IU/mL) estreptomycin (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM) y FBS 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de ¼ cada 3 días.

3.1.2. Células endoteliales aisladas de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

Las células endoteliales de cordón umbilical se aislaron utilizando el protocolo descrito por Kubota^[2]. Se limpió el interior del cordón umbilical con PBS para eliminar los restos de sangre y se inyectó una solución de colagenasa P (descrita en el aislamiento de células endoteliales de aorta bovina), se cerraron los extremos del cordón con pinza-tijeras Kocher y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido el periodo de incubación, se recuperó el contenido del interior del cordón umbilical y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. El precipitado celular se lavó y las células se disolvieron en medio 199 suplementado con heparina (100 µg/mL), ECGS (30 µg/mL), penicilina (50 IU/mL), estreptomycin (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM), HEPES (10 mM) y FBS 20% (v/v). Las células se depositaron en placas de cultivos celulares pretratadas con gelatina al 1,5%. Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de ¼ cada 4 días.

3.2. Células endoteliales humanas inmortalizadas

Las dos líneas endoteliales inmortalizadas humanas fueron proporcionadas por el Dr. Arjan W. Griffioen de la Universidad de Maastricht (Holanda).

3.2.1 Células endoteliales humanas microvasculares (HMEC)

La inmortalización de la línea celular se consiguió mediante la incorporación del gen E6/E7 del papiloma virus humano 16, el cual induce la expresión de la telomerasa (hTERT-HUVEC). Esta línea celular fue mantenida en medio RPMI 1640 suplementado con penicilina (50 IU/mL), estreptomicina (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM), FBS 10% (v/v) y suero humano 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de 1/4 cada 3 días.

3.2.2. Células endoteliales humanas macrovasculares (RF-24)

El método de inmortalización de las células derivadas del linaje celular HUVEC, se realizó mediante la incorporación del gen E6/E7 del papiloma virus humano 16, el cual induce la expresión de la telomerasa (hTERT-HUVEC). Esta línea celular fue mantenida en medio RPMI 1640 suplementado con penicilina (50 IU/mL), estreptomicina (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM), FBS 10% (v/v) y suero humano 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de 1/4 cada 4 días.

3.3. Células tumorales

Las líneas celulares inmortalizadas fueron adquiridas a *Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EEUU).

HT-1080: Células de fibrosarcoma humano. Esta línea celular fue mantenida en medio DMEM con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con penicilina (50 IU/mL), estreptomicina (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM) y

FBS 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de ¼ cada 4 días.

U2-OS: Células de osteosarcoma humano. Esta línea celular fue en medio McCoy's 5A, suplementado con penicilina (50 IU/mL) estreptomicina (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM) y FBS 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de ¼ cada 4 días.

HeLa: Células de adenocarcinoma de cérvix humano. Esta línea celular fue mantenida en medio DMEM con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con penicilina (50 IU/mL) estreptomicina (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM) y FBS 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de ¼ cada 4 días.

MDA-MB-231: Células de adenocarcinoma de mama humano. Esta línea celular fue mantenida en medio RPMI 1640, suplementado con penicilina (50 IU/mL) estreptomicina (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM) y FBS 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de ¼ cada 2 días.

Hep G2: Células de carcinoma hepatocelular humano. Esta línea celular fue mantenida en medio EMEM, suplementado con penicilina (50 IU/mL) estreptomicina (50 µg/mL), anfotericina B (1,25 µg/mL), L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales 1% y FBS 10% (v/v). Las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C y se mantuvieron en placas P100 a razón de ¼ cada 4 días.

4. Ensayos *in vitro*

4.1. Ensayo de citotoxicidad celular

Para evaluar la capacidad citotóxica que tiene un compuesto sobre el crecimiento celular se empleó el ensayo colorimétrico MTT. La viabilidad celular fue cuantificada por la reducción del 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio de bromo por la deshidrogenasa mitocondrial de células viables al producto azul de formazán, que puede ser medido espectrofotométricamente. Las células se depositaron en placa de 96 pocillos a una densidad celular de $3 \cdot 10^3$ células/pocillo, para células endoteliales, y a $2 \cdot 10^3$ células/pocillo, para células tumorales. En cualquier caso, las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 3 días.

Concluido el periodo de incubación, se preparó una solución de MTT a 5mg/mL, se esterilizó por filtración y se añadió 10 µL de solución a cada pocillo. Las células junto con la dilución de MTT se incubaron durante 4 horas más a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Tras ello, se añadió 150 µL de isopropanol con 0,04 N de HCl, para solubilizar el precipitado cristalino de azul de formazán.

Las distintas concentraciones del compuesto fueron ensayadas en 4 pocillos distintos en tres experimentos independientes.

Este ensayo también permite evaluar la capacidad citotóxica de los tratamientos administrados a los cultivos celulares a la densidad celular y a los tiempos de incubación que se utilizan en otros ensayos.

Debido a la reproducibilidad y sensibilidad de este ensayo, fue elegido para realizar la búsqueda de efectos sinérgicos en la supervivencia celular para las combinaciones pareadas entre compuestos antitumorales o antiangiogénicos. Las combinaciones llevadas a cabo y el diseño para la distribución de las diluciones pareadas ensayadas, queda descrito en el apartado de Material y Métodos del Manuscrito 3 titulado "*Screening of synergic interactions of anti-angiogenic or anti-tumor compounds*".

4.2. Morfogénesis de tubos con células endoteliales

Ensayo diseñado para analizar la capacidad de formación de estructuras capilares de células endoteliales. Para inducir la formación de tubos en las células endoteliales se depositan sobre un lecho de Matrigel. El Matrigel es la matriz extracelular del sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón, que es un tumor rico en colágeno, laminina, proteoglicanos, de factores de crecimiento y de enzimas degradadoras de la matriz extracelular.

Se depositó 50 μL de Matrigel en el fondo de cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillo y se dejó polimerizar a 37°C durante 30 minutos. A continuación se adicionaron a cada pocillo $5 \cdot 10^4$ células endoteliales en 200 μL de medio sin FBS, junto con el compuesto a ensayar a la concentración deseada y se incubó a 37°C hasta la formación de estructuras tubulares. Las estructuras tubulares se observaron mediante un microscopio invertido de contrastes de fase, al que se le incorporó una cámara fotográfica Nikon F-601M (Tokyo, Japón) para tomar fotografías.

El criterio utilizado para evaluar los resultados de este ensayo consistió en asignar la concentración mínima inhibidora del compuesto a la que produce la completa inhibición en la formación de las estructuras tubulares. El efecto del compuesto a concentraciones inferiores se determinó contabilizando el número de estructuras completamente cerradas.

4.3. Ensayo de migración celular

Los ensayos de migración celular nos proporcionan información sobre la capacidad de desplazamiento que presentan las células bajo el efecto de un compuesto a analizar. Según el caso, se ha usado uno u otro de los siguientes dos tipos de ensayos en lo que respecta a la movilidad celular:

- Ensayo de la herida: Las células depositadas en una placa de 6 pocillos se dejaron crecer hasta que el pocillo quede completamente tapizado por las células. En dicho momento se raspó el fondo del pocillo con una punta amarilla estéril, trazando dos líneas perpendiculares entre sí. El pocillo se lavó dos veces con PBS y se adicionó medio de cultivo suplementado junto con el compuesto de interés a la concentración

deseada. Se realizó la monitorización de la movilidad celular tomando fotografías del área de raspada a las 0, 4, 7 y 24 horas. El área sin células se cuantificó con el programa informático *NIH Image 1.6*. El área para cada tratamiento fue normalizado al área existente para dicho tratamiento a tiempo 0 h. Las fotografías se realizaron en un microscopio invertido de contraste de fases Nikon DIAPHOT-TMF (Tokyo, Japón) con una cámara Nikon F-601M (Tokyo, Japón).

- Ensayo de migración en cámara de Boyden modificada: Para llevar a cabo este ensayo se requiere que las células estén marcadas con calceína-AM y de unos insertos que presentan una membrana con 8 μm de tamaño de poro y con la peculiaridad que dicha membrana es opaca a la fluorescencia. El marcaje con calceína-AM se realizó añadiendo directamente al medio de cultivo la calceína-AM (5 μM) e incubando a 37°C durante 2 horas. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se ajustó la densidad celular a 4 $\cdot 10^5$ células/mL en medio de cultivo suplementado con BSA al 0,1%. En una placa de 24 pocillos, se depositaron 500 μL de medio de cultivo suplementado, para que el FBS que contiene actuase como quimioatrayente celular. A continuación, se colocó el inserto y en su interior se depositaron 500 μL de suspensión celular ajustada a 4 $\cdot 10^5$ células/mL, junto con el compuesto a ensayar a la concentración deseada. En paralelo, se pusieron controles positivos, en el que la suspensión celular contenía el mismo volumen de DMSO que los pocillos ensayados a la mayor concentración del compuesto; y controles negativos, en el que la suspensión celular no contenía compuesto y en el fondo del pocillo se utilizó medio de cultivo sin quimioatrayente (FBS). Todos los controles (tanto positivos como negativos) y los tratamientos se llevaron a cabo en tres pocillos por cada uno de los tres experimentos independientes. La capacidad de migración de las células se cuantificó mediante la captación de emisión de fluorescencia en el fondo del pocillo medida por el lector de fluorescencia *FL600FA* de *BIOTEK Instruments* (Winooski, VT, EEUU),

configurado para la excitación/emisión a 485 nm / 530 nm. El cálculo de las células que han conseguido migrar a través de la membrana porosa se realizó interpolando los datos de fluorescencia en la recta patrón realizada con las mismas células del ensayo a concentraciones conocidas y utilizando la misma configuración para detectar los niveles de fluorescencia que en el ensayo de migración.

4.4. Ensayo de invasión

Ensayo diseñado para evaluar la capacidad que manifiestan las células para degradar componentes de la matriz extracelular y desplazarse a través de la matriz degradada. El procedimiento para llevar a cabo este ensayo es el mismo que el descrito en el ensayo de migración en cámara de Boyden modificada, con la diferencia que en el ensayo de invasión el fondo del inserto que contiene la membrana se recubre con 25 μ L de Matrigel.

4.5. Ensayos zimográficos para la detección de actividad proteasa

Este tipo de ensayo permite detectar la actividad proteasa, tanto de medios acondicionados como de extractos celulares, utilizando técnica electroforética con geles que contienen algún sustrato, como proteínas que se encuentran en la matriz extracelular, para evaluar la actividad proteasa de las células tras ser sometidas a tratamiento con el compuesto de interés.

- Zimografía de gelatina (Gelatinograma): Técnica electroforética utilizada para detectar metaloproteasas de tipo gelatinolítica, como es el caso de la metaloproteinasa de matriz extracelular 2 (MMP 2) con un tamaño molecular de 72 kDa y de la metaloproteinasa de matriz extracelular 9 (MMP 9) con un tamaño molecular de 92 kDa.

Las células se mantuvieron en placas de 6 pocillos hasta adquirir la confluencia celular del 80%, momento en el que se procedió a retirar el medio de cultivo, se lavó dos veces con PBS y se añadió medio de cultivo sin suero suplementado con BSA al 0,1% más aprotinina a 200 KIU/mL. Para los pocillos controles, se añadió al medio de cultivo el mismo volumen de DMSO correspondiente a la mayor dosis del

tratamiento, ya que el compuesto utilizado se encontraba disuelto en DMSO. Para los pocillos del tratamiento se adicionó al medio de cultivo el volumen correspondiente para ensayar el efecto del compuesto a la concentración deseada. Las células con el tratamiento se incubaron a 37°C durante 24 horas, periodo tras el cual se recuperó el medio acondicionado, se lavaron las células dos veces con PBS frío y se lisaron las células con 500 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 0,1 M; pH 7,4; 0,2% (p/v) de Triton X-100 y aprotinina 200 KIU/mL).

Los medios acondicionados y los extractos celulares fueron centrifugados a 10000 g a 4°C durante 10 minutos. Tras ello, se recuperaron los sobrenadantes y se hicieron fracciones alícuotas que fueron almacenadas a -80°C. Para cargar la misma cantidad de proteínas en todos los casos, las muestras fueron normalizadas atendiendo al número de células. Las muestras se mezclaron con tampón de carga no reductor (12,5 % (v/v) de Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; 40% de glicerol; 8% (p/v) SDS y 0,005% (p/v) azul de bromofenol). Las muestras junto con el tampón de carga se depositaron en los pocillos de un gel al 10% de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) suplementado con gelatina 1 mg/mL. El tampón de electroforesis utilizado estaba constituido por Tris 25 mM, glicina 192 mM y 1% (p/v) de SDS. La migración de las muestras se realizó a 4°C. Concluida la electroforesis, los geles se lavaron dos veces durante 10 minutos cada lavado con tampón de lavado I (Tris-HCl 0,05 M; pH 7,4; Triton X-100 al 2% (p/v)), a temperatura ambiente en agitación. A continuación, los geles se lavaron dos veces más durante 10 minutos cada lavado con tampón de lavado II (Tris-HCl 0,05 M; pH 7,4) a temperatura ambiente y en agitación. Los geles se incubaron a 37°C durante 12 horas con tampón sustrato (Tris-HCl 0,05 M; pH 7,4; Triton X-100 al 1%, CaCl₂ 5 mM y NaN₃). Por último, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) diluido en agua-metanol-acético (5:5:2), y después se destiñeron con una solución de agua-metanol-acético (6:3:1), para poder visualizar la actividad proteasa como bandas claras en un fondo de color azul.

- Zimografía de plasminógeno: Técnica electroforética utilizada para detectar actividad proteasa de tipo plasminógeno.

El procedimiento para la toma de muestras y la realización de la técnica electroforética es la misma que la descrita para los gelatinogramas, a diferencia que el gel de electroforesis para la detección de la actividad proteasa de plasminógeno es al 10% de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) pero no está suplementado con gelatina. Concluida la electroforesis, se procedió al lavado del gel siguiendo las mismas condiciones que para los gelatinogramas. Una vez concluidos los lavados, sobre el gel de poliacrilamida se depositó el gel sustrato (solución de leche desnatada al 1,5% (p/v), agar 0,8% (p/v), plasminógeno 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y NaN_3 al 2%) y se dejó a 4°C durante 12 horas. Transcurrido el periodo de incubación a 4°C, se incubó el gel en cámara húmeda a 37°C hasta 8 horas el tiempo necesario para que aparezcan las bandas proteolíticas debidas a la actividad uPA.

Para los dos tipos de zimografía se cuantificó la actividad de las proteasas mediante densitometría utilizando para ello el *software NIH Image J 1.6*.

4.6. Análisis del ciclo celular

Las células se mantuvieron en placas de 6 pocillos hasta alcanzar la confluencia celular del 80%. Las células se lavaron con PBS y se les añadió medio de cultivo suplementado junto con el volumen de compuesto a ensayar. Las células se incubaron a 37°C durante 14 horas. Tras el periodo de incubación con el compuesto, se procedió a lavar las células dos veces con PBS frío y se fijaron las células con etanol al 70% durante una hora a -20°C. Las células se centrifugaron 2 veces a 1000 g durante 5 minutos para eliminar el etanol y se volvió a lavar con PBS frío. A continuación, las células se incubaron durante una hora en oscuridad con una solución de yoduro de propidio (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con RNAsa-A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disuelto en PBS. Marcadas las células con el

ioduro de propidio, se procedió a analizar el contenido de DNA mediante citometría de flujo. Atendiendo a la intensidad de la marca de ioduro de propidio se puede diferenciar las distintas etapas del ciclo celular en las que se encuentra la población celular. De manera que, se puede diferenciar entre:

- Fase sub G1: etapa en la que las células se encuentran con el contenido genético de DNA $< 2n$ y representa la población de células que están en apoptosis celular, ya que la entrada en apoptosis se caracteriza por la fragmentación del DNA.
- Fase G1: Etapa en que las células presentan DNA = $2n$.
- Fase S: Etapa en el que las células están iniciando la replicación de su material genético, de manera, que presentan mayor contenido de DNA pero no han completado la replicación al completo, por ello, su carga genética se puede describir como $2n < \text{DNA} < 4n$.
- Fase G2/M: Etapa en que las células están replicando su material genético y presentan DNA = $4n$.

El citómetro de flujo utilizado fue *MoFlo de Dakocytomation* y los resultados obtenidos fueron analizados con el *software Summit 4.3*, para calcular el porcentaje de células que se encontraban en cada etapa del ciclo celular tras someterlas a los distintos tratamientos. Los resultados para cada tratamiento fueron comparados con los resultados obtenidos para el control, de esta manera, se determinó si el compuesto induce la entrada en apoptosis o provoca la cambios en la distribución del ciclo celular.

4.7. Ensayo de adhesión a proteínas de la matriz extracelular

Este ensayo permite evaluar el efecto que ejerce un compuesto sobre las proteínas de unión a componentes de la matriz extracelular, ubicadas en la superficie celular.

Alcanzada la confluencia del 80 %, las células se lavaron con PBS y se les adicionó medio de cultivo fresco suplementado junto con el volumen necesario del compuesto a ensayar y se incubó a 37°C durante 12 horas. Dos horas antes que se completen las 12 h, se añadió calceína-AM para marcar las células.

En una placa de 24 pocillos se añadió fibronectina a 10 ng/mL y se dejó a 4°C durante 12 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se aspiró la fibronectina y se añadió 300 µL de BSA al 3%.

Concluido el tiempo de incubación de las células con el compuesto y con la calceína-AM, se lavaron las células dos veces con PBS, se ajustó la densidad celular a $3 \cdot 10^4$ células/mL y se depositaron 300 µL de suspensión celular y se incubó a 37°C durante 2 horas. Concluida las dos horas, se aspiró la suspensión celular y se lavó tres veces con 500 µL de PBS cada pocillo. Se aspiró el PBS y se procedió a tomar 7 fotografías del fondo del pocillo. Se contabilizaron las 7 fotografías de cada pocillo y para cada tratamiento se pusieron dos pocillos. El ensayo se repitió tres veces de manera independiente.

4.8. Ensayo clonogénico

La habilidad de generar clones es una características de las células con fenotipo maligno. El ensayo se lleva a cabo con células tumorales que son tratadas con el compuesto de interés para evaluar si dicho compuesto interfiere en la capacidad de generar clones.

Para evitar que las células puedan adherirse al fondo del pocillo, se depositó 1,5 mL de agarosa de bajo punto de fusión a 0,5% y se esperó a que polimerizase. Las células se lavaron con PBS y se preparó una suspensión celular a 5000 células/mL. A la suspensión celular se le adicionó agar de bajo punto de fusión a 0,3% junto con el volumen del compuesto a ensayar para obtener la concentración deseada. Antes que polimerizase el agar que contiene las células y el compuesto, se depositó sobre el agar ya depositado y polimerizado en el fondo del pocillo. Las células se incubaron a 37°C durante 14 días, periodo de tiempo en el que se procedió a contabilizar todas aquellas colonias que presenten un tamaño mínimo de 100 µm.

4.9. PCR semicuantitativa

Las células ya tratadas con el compuesto de interés bajo la concentración deseadas y el tiempo de incubación, se lavaron con PBS frío dos veces y se congelaron introduciendo el vial en nitrógeno líquido. A

continuación, se procedió a la extracción y aislamiento del RNA total de las células, utilizando para ello *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit* (Sigma-Aldrich). La manera de proceder fue la descrita por el manual del kit. Una vez purificado y aislado el RNA se cuantificó la concentración de RNA y los contaminantes mediante espectrofotómetro *NanoDrop 2000* de Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). La síntesis de cDNA se realizó con *iScript cDNA Synthesis kit* de BioRad (Hercules, CA, USA) utilizando para ello 1 µg de RNA total. Los volúmenes y el perfil térmico utilizado fue el indicado en el manual proporcionado por el kit. El termociclador utilizado fue *Boeco TC-Pro* (Hamburg, Alemania). El cDNA fue almacenado a -20°C hasta su utilización para llevar a cabo la qPCR. La reacción de amplificación se llevo a cabo con *iProof™ High-Fidelity DNA polymerase* de BioRad (Hercules, CA, USA). Los volúmenes para llevar a cabo la reacción fueron los descritos en el manual del proveedor y el perfil térmico para los primers utilizados en la amplificación de MCP-1 está descrito en la Tabla 2 del Artículo 2.

4.10. qPCR

Las células ya tratadas con el compuesto de interés bajo la concentración deseada y el tiempo de incubación, se lavaron con PBS frío dos veces y se congelaron introduciendo el vial en nitrógeno líquido. A continuación, se procedió a la extracción y aislamiento del RNA total de las células, utilizando para ello *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit* (Sigma-Aldrich). La manera de proceder fue la descrita por el manual del kit. Una vez purificado y aislado el RNA se cuantificó la concentración de RNA y los contaminantes mediante espectrofotómetro *NanoDrop 2000* de Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). La síntesis de cDNA se realizó con *iScript cDNA Synthesis kit* de BioRad (Hercules, CA, USA) utilizando para ello 1 µg de RNA total. Los volúmenes y el perfil térmico utilizado fue el indicado en el manual proporcionado por el kit. El termociclador utilizado fue *Boeco TC-Pro* (Hamburg, Alemania). El cDNA fue almacenado a -20°C hasta su utilización para llevar a cabo la qPCR. La amplificación mediante PCR en tiempo real se llevó a cabo con *KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal* de

KAPA Biosystems (Boston, Massachusetts, USA) utilizando el termociclador *Eco™ Real-Time PCR System* de CultiK. Los volúmenes para llevar a cabo la reacción fueron los descritos en el manual del proveedor y el perfil térmico fue adaptado para cada uno de las parejas de primers utilizados.

La expresión de los distintos marcadores fue relativizada atendiendo a los niveles de GADPH, mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Los cebadores utilizados, los tamaños de los amplicones y las condiciones específicas de las distintas qPCR quedan recogidos en la Tabla 2 del Artículo 2, reproducido en la sección de Resultados.

4.11. Western Blot

Las células se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia del 80% con el medio de cultivo suplementado. Se lavaron las células y se les añadió medio de cultivo sin FBS pero suplementado con 0,1% BSA durante 14 horas. Se lavaron las células dos veces con PBS y se añadió medio de cultivo fresco sin suero suplementado con HGF 50 ng/mL durante 15 minutos. Finalizado los 15 minutos de incubación a 37°C, las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con 500 μ L de tampón de lisis (50 mM Tris; pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,25% desoxicolato sódico; 1mM EDTA; 1mM ortovanadato sódico y 5mg/mL de una mezcla de inhibidores de proteasas). El extracto celular obtenido se centrifugó a 13000 g a 4°C durante 15 minutos. Tras el proceso de centrifugado, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas en cada muestra mediante el método de Bradford. Las muestras fueron almacenadas a - 80°C hasta el momento de su uso. Las muestras se mezclaron con tampón de carga Laemmli, se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Finalizada la electroforesis, las muestras se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa, que se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche desnatada al 5% diluida en TBS-T (50 mM Tris; pH 8,4; 0,9% NaCl; 0,05% Tween 20). La membrana se incubó con la dilución del anticuerpo indicada en la hoja de datos y se incubó a 4°C durante 12 horas. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS-T con 5% de BSA.

Finalizado el periodo de incubación con el anticuerpo primario, se procedió a lavar la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente y en agitación. El anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa se diluyó en TBS-T con 5% leche desnatada a 1:5000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Se procedió a lavar la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente y en agitación; y la presencia de las proteínas en la membrana se detectaron mediante el sistema de detección de quimioluminiscencia *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* de Pierce (Rockford, USA). Las bandas fueron cuantificadas mediante densitometría utilizando el *software ImageLab 3.0*.

4.11. SuperArray GE-Array Q Series Human Endothelial Cell Biology Gene Array

Las células HUVEC se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia del 80% con el medio de cultivo suplementado. Se lavaron las células y se les añadió medio de cultivo junto con el volumen de aeroplisinina-1 para ensayarla a una concentración final de 10 μM , dejando incubar el tratamiento durante 4,5 horas a 37 °C. Concluido el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1x frío y se procedió a la extracción y aislamiento del RNA total de las células, utilizando para ello *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit* (Sigma-Aldrich). La manera de proceder fue la descrita por el manual del kit. Una vez purificado y aislado el RNA se cuantificó la concentración de RNA y los contaminantes mediante espectrofotómetro *NanoDrop 2000* de Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). La síntesis del cDNA se realizó con *GE-Array AmpoLabeling-LPR Kit* de SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA) siguiendo las indicaciones descritas en el manual del kit. El cDNA se utilizó en las membranas de la matriz *GE-Array Q Series Human Angiogenesis Gen Array* de SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA). La detección de la matriz se realizó con el dispositivo Phosphorimager FujiBass 1500 de Fujifilm (Tokyo, Japan).

4.12. Human Antibody L-series 507 Cytokine Array

Las células HUVEC se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia del 80% con el medio de cultivo suplementado. Se lavaron las células y se les añadió medio de cultivo sin suero suplementado con 100 μM del péptido SLIGKV-NH₂ (Sigma-Aldrich) junto con aeroplisinina-1 a una concentración final de 10 μM , dejando incubar el tratamiento durante 16 horas a 37 °C. Concluido el tratamiento, se tomó el medio acondicionado para evaluar las citocinas mediante el *Human Antibody L-series 507 Cytokine Array* de RayBiotech (Norcross, GA, USA) siguiendo las instrucciones del manual del array.

4.13. MCP-1 Human Biotrak Easy ELISA Kit

Las células HUVEC se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia del 80% con el medio de cultivo suplementado. Se lavaron las células y se les añadió medio de cultivo fresco junto con el volumen de aeroplisinina-1 para ensayarla a una concentración final de 10 μM , dejando incubar el tratamiento durante 4,5 horas a 37 °C. Concluido el tratamiento, se tomó el medio acondicionado y se realizó el *MCP-1 Human Biotrak Easy ELISA Kit* de GE Healthcare siguiendo las instrucciones proporcionadas por el manual del kit. La absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas Microplate reader 680 de BioRad (Hercules, CA, USA).

4.14. HTScan Met Kinase Assay Kit

Para evaluar la capacidad en la inhibición de la fosforilación del receptor c-Met se utilizó el HTScan Met Kinase Assay Kit de Cell Signaling (Denver, MA, EEUU). El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas en el manual del kit. La absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de placas Microplate reader 680 de BioRad (Hercules, CA, USA).

5. Ensayo *ex vivo* de anillos aórticos en rata

Este ensayo pretende mimetizar las distintas etapas que tiene lugar durante el proceso angiogénico en condiciones *in vivo*. Para ello, se utilizó una rata Wistar de 12 semanas de edad con un peso aproximado de 250 gramos. La rata se anestesió en atmósfera de isofluorano y posteriormente se decapitó. Se extrajo la aorta de la rata, y se despojó del tejido adiposo y del tejido conectivo. La aorta se seccionó en anillos de 1 mm de longitud.

Se prepararon anillos de agarosa con un diámetro interior de 10 mm en los que se depositaron 150 μL de solución de colágeno (colágeno 2 mg/mL, MEM 10x, NaHCO_3 (186 mg/mL) y NaOH (1M) (7,5:1:1,5:0,1)). Se ajustó el pH a 7,4 añadiendo NaOH . El colágeno se dejó polimerizar a 37°C durante 20 minutos. Polimerizado el colágeno, se depositó en cada anillo de agarosa en anillo aórtico y se cubrió con 150 μL más de colágeno y se dejó polimerizar a 37°C durante otros 20 minutos más. Por último, se adicionaron 6 mL de medio de cultivo MCD131 suplementado con 25 mM de NaHCO_3 , 1% L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina. Para evaluar la actividad del compuesto a analizar, en el medio de cultivo MCD131 suplementado (descrito anteriormente) se adicionó el compuesto de interés. Los anillos aórticos se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

El crecimiento de los microvasos sanguíneos a partir del explanto del anillo aórtico se fotografió a los 6, 9 y 14 días, y se contabilizó el número de microvasos existente en cada uno de los días.

6. Ensayos *in vivo*

6.1. Ensayo de implatación subcutánea de Matrigel en ratón

Ensayo realizado con ratones C57BL/6 con 6 semanas de edad. Los ratones fueron anestesiados en atmósfera con xilacina/ketamina. Anestesiados los ratones se procedió a inyectarle por vía subcutánea en la línea media abdominal con una aguja de grosor 21 Gauge 300 μL de Matrigel suplementado con FGFb (1 $\mu\text{g/mL}$) para los ratones controles, y Matrigel suplementado con FGFb (1 $\mu\text{g/mL}$) más el compuesto a la concentración

deseada para los ratones con el tratamiento. Tras 4 días desde la implantación del Matrigel, se extrajeron los implantes, se fotografiaron y se usaron para cuantificar la cantidad de hemoglobina presente en ellos mediante el reactivo de Drabkin que permite la cuantificación de hemoglobina existente en el Matrigel, siendo esta una medida indirecta del grado de vascularización.

6.2. Ensayo sobre la membrana corioalantoidea de pollo

El ensayo se llevó a cabo con huevos de gallina fertilizados. Los huevos se incubaron a 37,5°C durante 3 días en agitación suave en un incubador con bandeja basculante *Masalles 25 L-HS* (Barcelona, España). Con una jeringa se extrajeron 2 mL de albúmina, para generar una cámara de aire y así poder realizar una abertura en la cáscara por donde acceder a la membrana corioalantoidea. La abertura se selló con cinta adhesiva y se mantuvo en incubación durante 5 días más pero sin basculación.

El compuesto se depositó en una solución de metilcelulosa a 1,2% (p/v) en agua destilada. Los controles negativos se suplementaron con el mismo volumen de DMSO correspondiente a la máxima concentración ensayada del compuesto a analizar. Esta solución se depositó sobre una superficie de teflón en gotas de 10 μ L y se dejaron secar durante 24 horas en una cámara de flujo laminar. Al secarse, las gotas adquieren forma de disco plano, los cuales fueron depositados sobre la membrana corioalantoidea (CAM), colocando un solo disco por CAM. Los huevos con el tratamiento fueron nuevamente sellados y se incubaron durante 2 días más a 37,5°C. Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a fotografiar el efecto del compuesto sobre la vasculatura de la CAM. Para ello, se utilizó un microscopio Nikon AZ-100 y las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon Sight DS-5Mc, controlada por el *software NIS-Elements*. Los resultados fueron evaluados por doble ciego para evitar interpretaciones influenciadas por la persona que realiza el ensayo.

El criterio para considerar positivo el efecto de un compuesto sobre la vasculatura de la CAM fue la desaparición de los vasos en el área tratada, la desorganización y el crecimiento centrífugo de los vasos periféricos, siempre y

cuando alguna de estas manifestaciones no estuviesen acompañadas de signos de inflamación.

6.3. Ensayo de formación de vasos intersegmentales en el pez cebra (*Danio rerio*)

El desarrollo de los vasos intersegmentales en el pez cebra tiene lugar desde la aorta hacia la anastomosis dorsal mediante angiogénesis durante las primeras 24 horas del desarrollo embrionario. Esto permite analizar la capacidad antiangiogénica de compuestos que se quieran evaluar.

Este ensayo se llevó a cabo con embriones del pez cebra. Los huevos fecundados, se lavaron varias veces con lejía diluida en agua del propio sistema (5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM MgSO₄). Los huevos fertilizados se incubaron a 28,5 °C durante 24 horas, periodo tras el cual se procedió a eliminar el corion con ayuda de unas pinzas. Se depositó un embrión por pocillo de una placa de 96 pocillos con 100 µL de agua del sistema en presencia del compuesto a ensayar a la concentración deseada. Los embriones con el tratamiento se incubaron a 28,5 °C durante 24 horas. Concluido el periodo de incubación, los embriones se anestesiaron con 0,02% de triclaína, se colocaron en un porta excavado y se procedió a observar los embriones en un microscopio de fluorescencia Nikon Microphot-FXA con filtro FITC y se realizaron fotografías con una cámara digital Nikon DS-L1.

Bibliografía utilizada en esta sección

1. Gospodarowicz, D., Moran, J., Braun, D., and Birdwell, C. (1976) Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: Fibroblast growth factor as a survival agent. *Proceeding National Academy Science USA* 73: 4120- 4124.
2. Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R, and Lawley, T. J. (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells in to capillary-like structures. *The Journal of Cell Biology* 107: 1588- 1598.

RESULTADOS



Para cumplir los objetivos propuestos en la presente Tesis Doctoral, se han realizado diversas investigaciones que han generado el cuerpo de resultados que se presenta en este apartado como dos artículos de investigación ya publicados, dos manuscritos en vías de publicación y un manuscrito preliminar.

El artículo primero describe la caracterización del compuesto natural 4-metilumbeliferona como antiangiogénico. Los dos manuscritos en vías de publicación describen la caracterización del compuesto natural damnacantal como anti-tumoral multidiana con potente efectos inhibidores sobre células de hepatocarcinoma humano y como nuevo antiangiogénico. El segundo artículo caracteriza los efectos inhibidores de aeroplisinina-1 (un compuesto brominado de esponjas previamente caracterizado por nuestro grupo como potente antiangiogénico) sobre proteínas pro-inflamatorias claves. Finalmente, el tercer manuscrito muestra los resultados preliminares de nuestro *screening* de 105 combinaciones pareadas de compuestos antiangiogénicos o antitumorales con el objetivo de seguir estudiando en profundidad las combinaciones sinérgicas más prometedoras.

La información correspondiente a los resultados no se muestra porque está sujeta a copyright (JAFC) o porque son resultados que están en vías de evaluación y deben permanecer de momento inéditos.

Manuscrito 1

Esta información no se hace pública aquí porque está en vías de publicación sujeta a derechos de copyright.

Manuscrito 2

Esta información no se hace pública aquí porque está en vías de publicación sujeta a derechos de copyright.

The Brominated Compound Aeroplysinin-1 Inhibits Proliferation and the Expression of Key Pro-Inflammatory Molecules in Human Endothelial and Monocyte Cells

Beatriz Martínez-Poveda^{1*}, Javier A. García-Vilas^{1*}, Casimiro Cárdenas¹, Esther Melgarejo¹, Ana R. Quesada^{1,2}, Miguel A. Medina^{1,2*}

1 Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga, Málaga, Spain, 2 CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Málaga, Spain

[Publicado en *PLoS ONE* 8: e55203, 2013].



Factor de impacto: 3,73

Posición relativa según Science JCR 2012: 5 / 81

doi:10.1371/journal.pone.0055203.t001

Manuscrito 3

Esta información no se hace pública aquí porque está en vías de publicación sujeta a derechos de copyright.

DISCUSIÓN

El cáncer se ha convertido en la primera causa de mortandad en los países industrializados. Por ello, en las cuatro últimas décadas se ha investigado mucho acerca de la biología del cáncer. Fruto de ello, se ha generado conocimiento sobre los factores que favorecen el desarrollo del cáncer y los mecanismos moleculares que dan lugar a la transformación en células cancerígenas. Ello se ha utilizado para desarrollar estrategias terapéuticas, en primer lugar por la diferencia en la tasa de replicación de las células cancerígenas en comparación a las células sanas, y posteriormente, atendiendo a los mecanismos moleculares que caracterizan a las células cancerígenas. La identificación de las así denominados “señales distintivas del cáncer” ha abierto una nueva vía de exploración de terapias dirigidas.

Entre las “señales distintivas del cáncer” se encuentran la angiogénesis y la inflamación. El grupo de investigación en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral tiene un extenso historial previo en oncología básica en general y en la identificación de compuestos antiangiogénicos y antiinflamatorios en particular. De acuerdo con los intereses de la línea de investigación del grupo, la presente Tesis Doctoral nace con el propósito de buscar y caracterizar nuevos compuestos naturales con potencial antitumoral, antiinflamatorio o antiangiogénico. Se han realizado ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para la caracterización de los compuestos seleccionados, contribuyendo al conocimiento de su modo de acción. Además, se ha realizado una primera búsqueda sistemática de efectos sinérgicos en combinaciones pareadas de compuestos antitumorales o antiangiogénicos con distintos mecanismos de acción.

La información correspondiente a los resultados no se muestra porque está sujeta a copyright (JAF) o porque son resultados que están en vías de evaluación y deben permanecer de momento inéditos

A modo de resumen/conclusión

Esta Tesis Doctoral identifica dos nuevo compuestos naturales antiangiogénicos y describe sus efectos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Además, esta Tesis Doctoral identifica uno de estos dos compuestos como un potente inhibidor de tirosina cinasas que, a través de su efecto inhibidor sobre c-Met, se perfila como un nuevo compuesto prometedor para el tratamiento de cáncer de hígado. En esta Tesis Doctoral también hemos ampliado el espectro de acciones biológicas atribuibles al compuesto natural aeroplisinina-1 (previamente descrito como anti-angiogénico por nuestro grupo), identificándolo como inhibidor de moléculas pro-inflamatorias. Finalmente, esta Tesis Doctoral abre un nuevo camino de investigación en el grupo para la búsqueda de nuevas estrategias antitumorales, antiinflamatorias o antiangiogénicas basado en el efecto que ejercen combinaciones de fármacos sobre las etapas claves en los proceso tumoral y angiogénico.

Bibliografía utilizada en esta sección:

1. Abounader, R., Reznik, T., Colantuoni, C., Martinez-Murillo, F., Rosen, E. M. and Lathera, J. (2004) Regulation of c-Met-dependent gene expression by PTEN. *Oncogene* 23: 9173- 9182.
2. Arihiro, S., Ohtani, H., Hiwatashi, N., Toril, A., Sorsa, T., and Nagura, H. (2001) Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 39: 50- 59.
3. Basilio, C., Arnesano, A., Galluzzo, M., Comoglio, P. M., and Michieli, P. (2008) A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 21267- 21277.
4. Benvenuti, S., Lazzari, L., Arnesano, A., Li Chiavi, G., Gentile, A. and Comoglio, P. M. (2011) Ron kinase transphosphorylation sustains MET oncogene addiction. *Cancer Research* 71: 1945- 1955.
5. Blanco, Y. C., Vaillant, F., Perez, A. M., Reynes, M., Brillouet, J. M., and Brat, P. (2006) The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 645- 654.
6. Cárdenas, C., Quesada, A. R., and Medina, M. A. (2011) Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PLoS One* 6: e23407.
7. Chen, C. X., Soto, I., Guo, Y. L., and Liu, Y (2011) Control of secondary granule release in neutrophils by ral GTPase. *Journal of Biological Chemistry* 286: 11724- 11733.
8. Danovi, D., Cremona, C. A., Machado-da-Silva, G., Basu, S., Noon, L. A., Parrinello, S., and Lloyd, A. C. (2010) A genetic screen for anchorage-independent proliferation in mammalian cells identifies a membrane-bound neuregulin. *Plos One* 5: e11774.
9. Eder, J. P., Woude, G. F., Boerner, S. A., and LoRusso, P. M. (2009) Novel therapeutic inhibitor of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clinical Cancer Research* 15: 2207- 2214.
10. Faltyněk, C. R., Schroeder, J., Mauvais, P., Miller, D., Wang, S., Murphy, D., Lehr, R., Kelley, M., Maycock, A., Michne, A., Miski, M., and Thunberg, A. L. (1995) Damnacanthal is a highly potent, selective inhibitor of p56^{Lck} tyrosine kinase activity. *Biochemistry* 34: 12404- 12410.
11. Flaherty, K. T., Schiller, J., Schuchter, L., Glenn, L., Tuveson, D. A., Redlinger, M., Lathia, C., Xia, C., Petrenciuc, O., Hingorani, S. R., Jacobetz, M. A., Van Belle, P. A., Elder, D., Brose, M. S., Weber B. M., Albertini, M. R., and O'Dwyer, P. J. (2008) A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel. *Clinical Cancer Research* 14: 4836- 4842.
12. Fontaine, L., Grand, M, Molho, D., Chabert, M. J., Boschetti, E. (1968) Choleric, spasmolytic and general pharmacologic activities of 4-methylumbelliferone. *Therapie* 23: 51- 62.

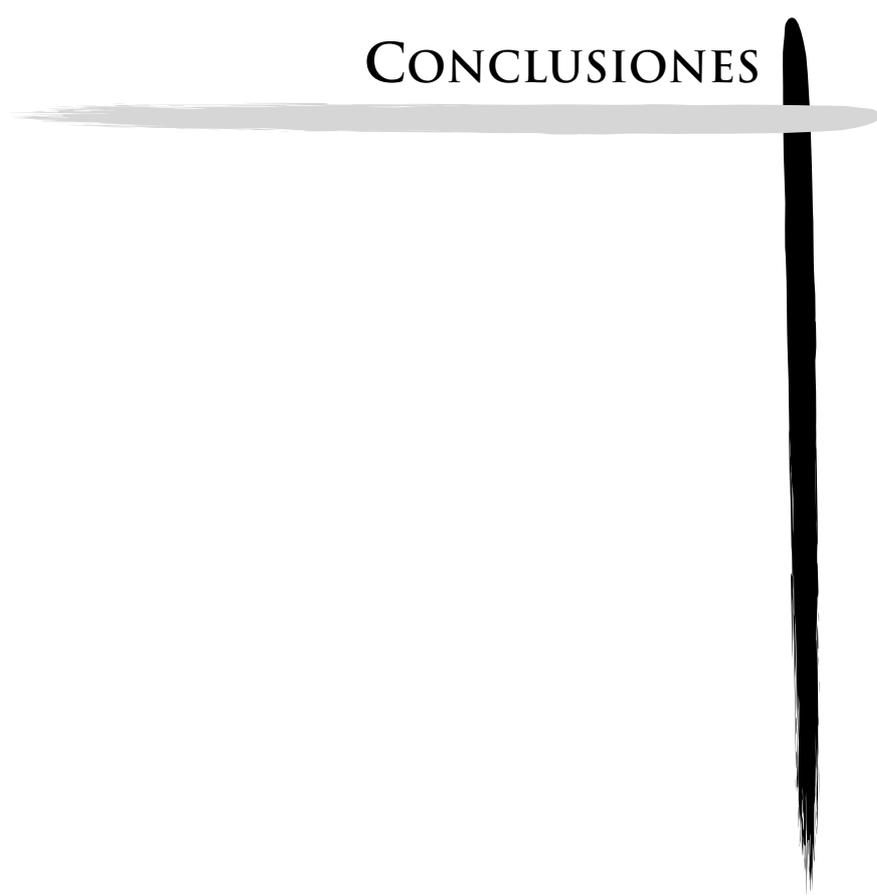
13. Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 331- 341.
14. Ikeda, U., Matsui, K., Murakami, Y., Shimada, K. (200) Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clinical Cariology* 25: 143- 147.
15. Issekutz, T. B. (1995) In vivo blood monocyte migratin to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of integrin. *American Association of Immunologists* 154: 6533- 6540.
16. Jo, M., Stolz, D. B., Esplen, J. E., Dorko, K., Michalopoulos, G. K., and Strom, S. C. (2000) Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 8806- 8811.
17. Kamata, M., Wu, R. P., An, D. S., Saxe, J., Damoiseaux, R., Phelps, M. E., Huang, J., and Chen, I. (2006) Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Commun* 348: 1101- 1106.
18. Kang, J. L., Lee, H. W., Kin, H. J., Lee, H. S., Castranova, V., Lim, C. M., and Koh, Y. (2010) Inhibition of SRC tyrosine kinases suppresses activation of nuclear factor- $\kappa\beta$, and serine and tyrosine phosphorylation of I $\kappa\beta$ - α in lipopolysaccharide-stimulated in Raw 264.7 macrophages. *Journal of Toxicology and Enviromental Healt, Part A* 68: 1643- 1662.
19. Kanokmedhakul, K., Kanokmedhakul, S., and Phatchana, R. (2005) Biological activity of anthraquinones and titerpenoids from *Prismatomeris fragrans*. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 284-288.
20. Kuwabara, H., Yoneda, M., Hayasaki, H., Nakamura, T., and Shibayama, Y. (2011) A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits the tumor invasión associated with N-cadherin decrease. *Pathology International* 61: 262- 263.
21. Lai, A. Z., Abella, J. V. and Park, M. (2009) crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends in Cell Biology* 19: 542- 551.
22. Li, Z., Carrier, L., and Rowan, B. G. (2008) Methylseleninic acid synergizes with tamoxifen to induce caspase-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 3056- 3053.
23. Lin, F. L., Hsu, J. L., Chou, C. H., Wu, W. J., Chang, C. I., and Liu, H. J. (2010) Activation of p38 MAPK by damnacanthal mediates apoptosis in SKHep 1 cells through the DR5/TRAIL and TNFR1/TNF- α and p53 pathways. *European Journal of Pharmacology* 650: 120- 129.
24. Lokeshwar, V. B., Lopez, L., Muñoz, D., Chi, A., Shirodkar, S. P., Lokeshwar, S. D., Escudero, D., Dhir, N., and Altman, N. (2010) Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methyumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer Research* 70: 2613- 2623.
25. Mahabeleshwar, G. H., Das, R., and Kundu, G. C. (2004) Tyrosine Kinase, p56^{Lck}-induced cell motility, and urokinase-type plasminogen ativator secretion involve activation of epidermal growth factor receptor/extracelular signal regulated kinase pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 9733- 9742.

26. Martínez-Poveda, B., Muñoz-Chápuli, R., Riguera, R., Fernández, A., Medina, M. A., and Quesada, A. R. (2008) DTD, an anti-inflammatory ditriazine, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 1211- 1219
27. Martínez-Poveda, B., Muñoz-Chápuli, R., Rodríguez-Nieto, S., Quintela, J. M., Fernández, A., Medina, M. A., and Quesada, A. R. (2007) IB05204, a dicholopyridodithienotriazine, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* 6: 2675- 2685.
28. Martínez-Poveda, B., Rodríguez-Nieto, S., García-Caballero, M., Medina, M. A., and Quesada, A. R. (2012) The antiangiogenic compound aeroplysinin-1 induces apoptosis in endothelial cells by activating the mitochondrial pathway. *Marine Drugs* 9: 2033- 2046.
29. Masiero, M., Simoes, F. C., Han, H. D., Snell, C., Peterkin, T., Bridges, E., Mangala, L. S., Wu, S., Pradeep, S., Li, D., Han, C., Dalton, H., Lopez-Berestein, G., Tuynman, J. B., Mortensen, N., Li, J. L., Patient, R., Sood, A. K., Banham, A. H., Harris, A. L., and Buffa, F. M. (2013) A core human primary tumor angiogenesis signature identifies the endothelial orphan receptor ETL1 as a key regulator of angiogenesis. *Cancer Cell* 24: 229- 241.
30. Melgarejo, E., Medina, M. A., Sánchez-Jiménez, F., and Urdiales, J. L. (2009) Epigallocatechin gallate reduces human monocyte mobility and adhesion in vitro. *British Journal of Pharmacology* 158: 1705- 1712.
31. Munshi, N., Jeay, S., Li, Y., Chen, C. R., Frnace, D. S., Ashwell, M. A., Hill, J., Moussa, M. M., Legget, D. S. And Li, C. J. (2011) ARQ197, a novel and selective inhibitor of the human c-Met receptor tyrosine kinase with antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics* 9: 1544- 1553.
32. Nakai, M., Yoshihara, S., Moroshashi, H., Ishido, K., and Sasaki, M. (2008) Effects of hyaluronan synthase inhibitors, 4-methylumbelliferone and 4-methylscutellin on human pleural malignant mesothelioma cells (NCI-H2052). *The Hiroaki medical journal* 59: 118- 127.
33. Nakamura, R., Kuwabara, H., Yoneda, M., Yoshihara, S., Ishikawa, T., Miura, T., Nozaka, H., Nanashima, N., Sato, T., and Nakamura, T. (2007) Suppression of matrix metalloproteinase-9 by 4-methylumbelliferone. *Cell biology international*. 31: 1022- 1026.
34. Nakamura, T., Ishikawa, T., Nanashima, N., Miura, T., Nozaka, H., Nakaoka, R., Sato, T. (2002) 4-methylumbelliferone induces the expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in cultured human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298: 646- 650.
35. Narizhneva, N. V., Razorenava, O. V., Podrez, E. A., Chen, J., Chandrasekharan, U. M., DiCorleto, P. E., Plow, E. F., Topol, E. J., and Byzova, T. V. (2005) Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB Journal* 19: 1158- 1160.
36. Nualsanit, T., Rojanapanthu, P., Gritsanapan, W., Lee, S. H., Lawson, D., and Baek, S. J. (2012) Damacantal, a Noni component, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 23: 915- 923.
37. Okusada, K., Nakamoto, K., Nishida, M., Fujita-Hamabe, W., Kamiya, K., Mizushima, Y., Satake, T., and Tokuyama, S. (2011) The antinociceptive and anti-inflammatory action of the CHCL3-soluble phase and its main active

- component, damnacanthal, isolate from the root of *Morinda citrifolia*. *Biol. Pharm. Bull.* 34: 103- 107.
38. Organ, S. L., and Tsao, M. S. (2011) An overview of the c-Met signaling pathway. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 3: S7- S19.
 39. Park, M. J., Kim, M. S., Park, I. C., Kang, H. S., Yoo, K., Park, S. H., Rhee, C. H., Hong, S. I., and Lee, S. H. (2002) PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. *Cancer Research* 62: 6318- 6322.
 40. Paulissen, S. M., van Hamburg, J. P., Davelaar, N., Asmawidjaja, P. S., Hazes, J. M., and Lubberts, E. (2013) Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23. *The Journal of Immunology* 191: 1364- 1372.
 41. Phillippe, M., Sweet, L. M., Bradley, D. F., and Engle, D. (2009) Role of Non-receptor protein tyrosine kinases during phospholipase C- γ 1 related uterine contractions in the rat. *Reproductive Sciences*. 16: 265- 273.
 42. Puri, N. and Salgia, R. (2008) Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non small cell lung cancer. *Journal of Carcinogenesis* 7: 9- 25.
 43. Rioja, I., Ubeda, A., Terencio, M. C., Guillén, I., Riguera, R., Quintela, M., González, L. M., and Alcaraz, M. J. (2000) An anti-inflammatory ditriazine inhibiting leukocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2. *European Journal of Pharmacology* 397: 207- 217.
 44. Rodríguez-Nieto, S., González-Iriarte, M., Carmona, R., Muñoz-Chápuli, R., Medina, M. A., and Quesada, A. R. (2002) Antiangiogenic activity of aeropylsinin-1, a bromotinated compound isolated from a marine sponge. *FASEB Journal* 16: 261- 263.
 45. Saito, T., Dai, T., and Asano Ryuji (2013) The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methyumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells. *Oncology Letters* 5: 1068- 1074.
 46. Shaker, K. H., Zinecker, H., Ghani, M.A., Imhoff, J. F., Schneider, B. (2010) Bioactive metabolites from the sponge *Suberea* sp. *Chemistry of Biodiversity* 7: 2880– 2887.
 47. Sheng, H., Saho, J., Morrow, J. D., Beauchamp, R. D. and DuBoix, R. N. (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research* 58: 362.
 48. Singh, D.N., Verma, N., Raghuwanshi, S., Shukla, P.K., and Kulshreshtha, D.K. (2006) Antifungal anthraquinones from *Saprosma fragrans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16: 4512- 4514.
 49. Tannous, M., Amin, R., Popoff, M. R., Fiorentini, C., and Kowluru, A. (2001) Positive modulation by Ras of interleukin-1 β -mediated nitric oxide generation in insulin-secreting clonal β (HIT-T15) cells. *Biochemical Pharmacology* 62: 1459- 1468.
 50. Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2010) MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature Reviews Cell Biology* 11: 834- 848.

51. Urakawa, H., Nishida, Y., Wasa, J., Arai, E., Zhuo, L., Kimata, K., Kozawa, E., Futamura, N., Ishiguro, N. (2012) Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo. *International Journal of Cancer* 130: 454- 466.
52. Van Den Neste, E., de Valeriola, D., Kerger, J., Bleiberg, H., Kusenda, Z., Brassinne, C., Bartholomeus, S., Selleslags, J., Hennebert, P., Wythouck, H., Cazenave, I., Lefresne-Soulas, F., and Piccart, M. (2000) A phase I and pharmacokinetic study of docetaxel administered in combination with continuous intravenous infusion of 5-fluorouracil in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research* 6: 64- 71.
53. Vigetti, D., Rizzi, M., Viola, M., Karousou, E., Genasetti, A., Clerici, M, Bartolini, B., Hascall, V. C., De Luca, G., and Passi, A. (2009) The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP-2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells. *Glycobiology* 19: 537-546.
54. Vogt, A., McDonald, P. R., Tamewitz, A., Sikorski, R. P., Wipf, P., Skoko, J. J., and Lazo, J. S. (2008) A cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases restores paclitaxel-induced apoptosis in dexamethasone-protected cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 330- 340.
55. Xu, M., Andrews, K. T., Birrell, G. W., Tran, T. L., Camp, D., Davis, R. A., Quinn, R. J. (2011) Psammaphysin H, a new antimalarial bromotyrosine alkaloid from a marine sponge of the genus *Pseudoceratina*. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 21: 846– 848.
56. You, H., Ding, W., Dang, H., Jiang, Y., & Rountree, C. B. (2011) c-Met represents a potential therapeutic target for personalized treatment in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 54: 879- 889.
57. Yu, C., Friday, B. B., Lai, J. P., Yang, L., Sarkaria, J., Kay, N. E., Carter, C. A., Roberts, L. R., Kauffmann, S. H., and Adjei, A. A. (2006) Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH₂-terminal kinase pathways. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 2378- 2387.
58. Yuan, F. Y., Meg, Q., Hawker, J., and Wu, H. M. (1998) Tyrosine phosphorylation of paxillin/pp125^{FAK} and microvascular endothelial barrier function. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology* 44: H84- H93.

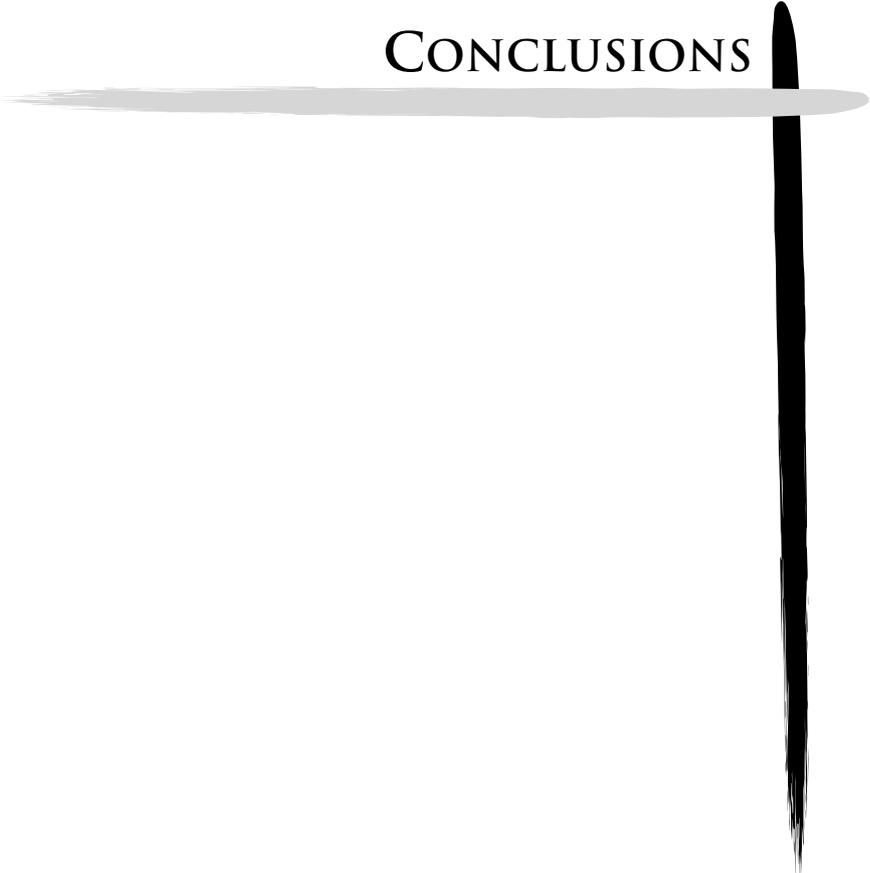
CONCLUSIONES



El trabajo realizado durante la ejecución de esta tesis doctoral y los resultados derivados del mismo han permitido cumplir los objetivos propuestos tal como aquí se especifica:

- **Conclusión 1:** Empleando ensayos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, la 4-metilumbeliferona y el damnacantal, compuestos aislados a partir de fuentes naturales, han sido caracterizados como nuevos potentes moduladores de la angiogénesis capaces de inhibir etapas claves del proceso angiogénico: proliferación y supervivencia celular, formación de estructuras tubulares sobre Matrigel, capacidad de remodelación de la matriz extracelular y adhesión celular.
- **Conclusión 2:** Se ha confirmado que la aeroplisinina-1 tiene actividad antiangiogénica sobre células endoteliales humanas y además inhibe parcialmente MCP-1, TSP-1, MMP-1, IL-1 α y COX-2, proteínas con actividad proinflamatoria, por lo que este compuesto puede ser considerado un nuevo compuesto antiinflamatorio.
- **Conclusión 3:** Se ha descrito el efecto del damnacantal sobre dianas moleculares esenciales en el proceso tumoral en células de carcinoma hepatocelular y en otras líneas tumorales.
- **Conclusión 4:** Se han identificado combinaciones pareadas de los compuestos ensayados que presentan potentes efectos sinérgicos en el ensayo MTT de proliferación celular para células endoteliales o tumorales.

CONCLUSIONS



The results obtained in the present Doctoral Thesis have enabled to meet the proposed objectives leading to the following conclusions:

Conclusion 1: Using *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* assays, 4-methylumbelliferone and damnacanthal (two compounds isolated from natural sources) have been characterized as new potent modulators of angiogenesis able to inhibit key stages of the angiogenic process: cell proliferation and survival, tube-like structure formation on Matrigel, cell adhesion and the production of extracellular proteases able to remodel extracellular matrix.

Conclusion 2: The anti-angiogenic effects aeroplysinin-1 have been confirmed on immortalized human endothelial cells. Furthermore, this compound is able to inhibit pro-inflammatory proteins such as MCP-1, TSP-1, MMP-1, IL-1 and COX-2, so that aeroplysinin-1 can be considered as a new anti-inflammatory compound.

Conclusion 3: Damnacanthal targets key processes and molecules involved in the progression of hepatocellular carcinoma and other types of cancer cells.

Conclusion 4: Some of the tested paired combinations of drugs have shown potent synergistic effects on the proliferation of endothelial or tumor cells as determined by the MTT assay.

