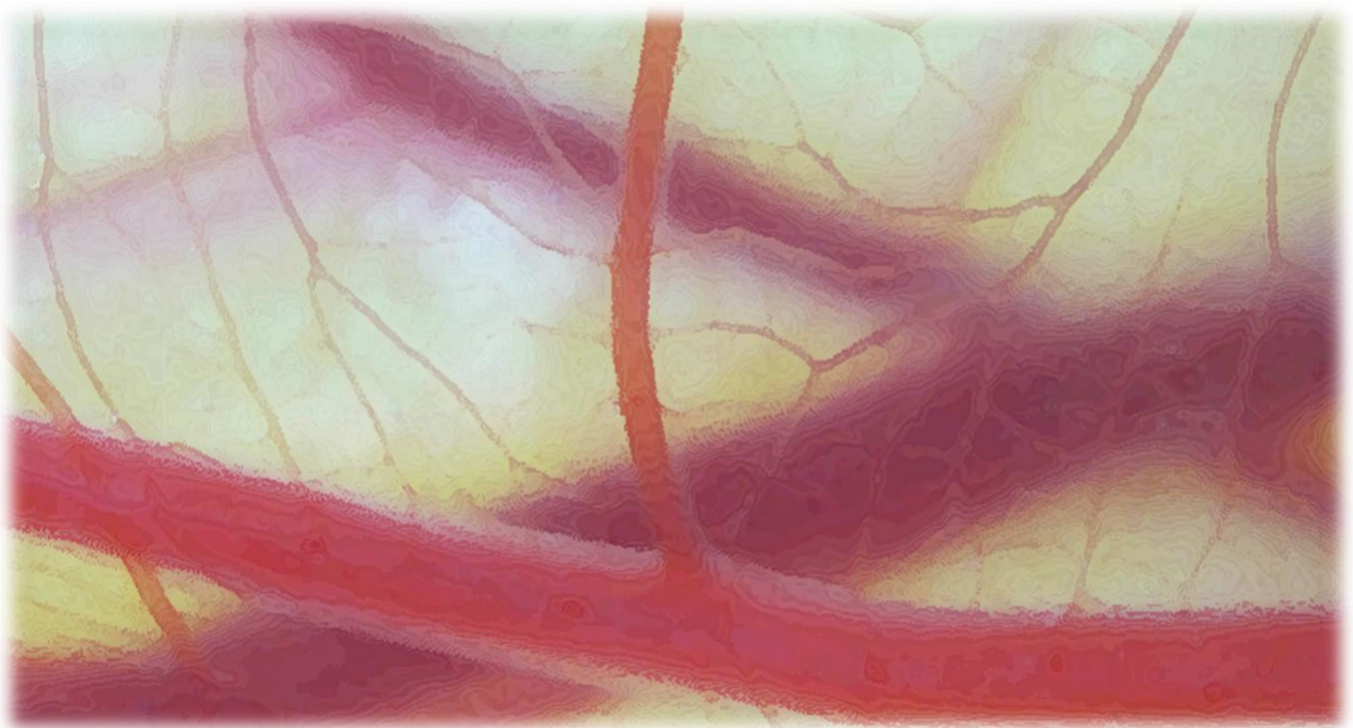


TESIS DOCTORAL

BÚSQUEDA Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS



Paloma Carrillo Fernández

Directoras:


Ana M. Rodríguez Quesada

Beatriz Martínez-Poveda



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Paloma Carrillo Fernández

 <http://orcid.org/0000-0003-2786-4469>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

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





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

Búsqueda y caracterización de nuevos candidatos a fármacos inhibidores de la angiogénesis

Paloma Carrillo Fernández

Málaga, 2019





Por el presente documento, Dña. Ana M. Rodríguez Quesada, catedrática del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, y Dña. Beatriz Martínez Poveda, profesora contratada doctora del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN

Que Dña. Paloma Carrillo Fernández, Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección conjunta el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral, que lleva por título “Búsqueda y caracterización de nuevos candidatos a fármacos inhibidores de la angiogénesis” en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga.

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

Para que conste, a efecto de lo establecido en el Real Decreto regulador de los estudios de Tercer Ciclo-Doctorado RD 99/2011, modificado por los Reales Decretos 534/2013, 43/2015 y 195/2016, AUTORIZAMOS la presentación de dicha Tesis Doctoral en la Universidad de Málaga.

Fdo: Ana M. Rodríguez Quesada

Fdo: Beatriz Martínez Poveda

Málaga, Junio de 2019

A mi familia y amigos, en especial a mis
padres, mi hermana y mi tío Emilio

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a Ana R. Quesada, a Beatriz Martínez Poveda y Miguel Ángel Medina, por la confianza depositada en mi para realizar esta Tesis Doctoral en este grupo de investigación y por ser mi guía en este camino. En especial, quiero agradecerle, Ana, que me dieras la oportunidad de realizar la Tesis contigo, que me animases a realizar la estancia predoctoral (de lo cual yo no estaba muy convencida y ha resultado ser una de las mejores experiencias que he tenido) y todo lo que me has enseñado dando prácticas, descubriéndome que no está nada mal lo del ser profe cuando lo haces con ganas e ilusión. A Bea, por iniciarte en dirigir tesis conmigo, por tu ayuda tanto en el laboratorio como fuera de él. Llegaste como un ángel caído del cielo para sacarme del pozo de los *western-blot*s y, a partir de ahí, te involucraste en cada uno de mis pasos siendo una codirectora maravillosa. A Miguel Ángel, por estar siempre al día en mis asuntos a pesar de no ser mi director. Por vuestra orientación, las ideas, el apoyo y por contar conmigo siempre, mil gracias a los tres.

Por supuesto, quiero agradecer a mis compañeros, a todos los que han pasado por el laboratorio a lo largo de estos tres años: Javi, José Joaquín, Mary, Clarita, Alba, Belén, Nicole y, especialmente a José Antonio, Laura y a Ana D., quienes llegaron en un momento difícil y me ayudaron a salir flote, y a Alejandro Cueto, por tu apoyo, tus consejos y escucharme siempre. Gracias por vuestra espontaneidad, por poder ser con vosotros yo misma en todas mis versiones sin juzgarme, por estar cuando os he necesitado, por la ayuda que me habéis prestado en el laboratorio, las risas y las confidencias. También quiero agradecer el apoyo tanto técnico como en el ámbito personal que he encontrado en la gente del SCAI; David, Lara, Auxi, Casi, Reme, Merche, Carol, y otros usuarios que se han convertido en amigos, como Patri, Virginia, Juan y Vicky.

A toda la gente del Departamento de Medicina Molecular y Traslacional, Oncología Experimental e Inmunología de la Universidad de Brescia, en especial a Marco Presta, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y a Chiara, Jessica y Andrea, por todo lo que me habéis enseñado y acogerme haciéndome sentir como en casa. A mis bárboras, Mariona, Carmen, Noe y Helena, ¡qué afortunada me siento por haberme cruzado con vosotras! A todos vosotros, gracias por hacer que mi estancia allí fuera una de las mejores experiencias que he vivido.

A mis lobos rurales, José, Dani, Pedro, Migue, Vicky, Borja, Chechu. Especialmente a Helen y Ro, con quien he compartido este camino de principio a fin, ¡qué suerte haberos tenido! no solo por sentirme comprendida en momentos en los que sentía que nadie lo hacía, si no por todo lo que me habéis ayudado. A mis amigos de Fuengirola, Laura, Vir, Sarita, Virhinia, Patri, Marina (Dps), Marina (SO), Sandra, Carmen, Paco, Manolo, Óscar... A todos y cada uno de vosotros, me siento muy afortunada de haber pasado esta etapa con vosotros, donde habéis compartido conmigo tanto mis baches como los buenos momentos.

AGRADECIMIENTOS

Finalmente, quiero agradecer a mi familia. A mis primos y mi tía, no puedo recordar esta etapa sin echarle mucho de menos.... A mis padres y mi hermana, porque gracias a vosotros esto ha sido posible, siendo mi apoyo incondicional a todos los niveles desde el primer hasta el último minuto. Lo más valioso de esta etapa es ver lo orgullosos que os sentís de mí. A Emilio, por estar a mi lado, saber comprenderme y hacer de los obstáculos pequeñas piedrecitas. Son tantas cosas las que os agradecería, que necesitaría otros 3 años para plasmarlas en papel.

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el grupo dedicado a la búsqueda y caracterización de nuevos fármacos antiangiogénicos del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. El trabajo se ha financiado fundamentalmente mediante los fondos del proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía P12 CTS 1507 “Búsqueda y caracterización de nuevos fármacos inhibidores de la angiogénesis” (I.P. Dra. Ana Rodríguez Quesada, Universidad de Málaga) y del proyecto BIO2014-56092-R (MINECO, I.P. Dr. Miguel Ángel Medina Torres, Universidad de Málaga). Además, se han dispuesto de los fondos del proyecto MuTaLig COST Action CA15135 (I.P. Dr. Stefano Alcaro. Università Magna Graecia di Catanzaro, Catanzaro, Italia). La doctoranda Paloma Carrillo Fernández disfrutó de un contrato como personal investigador en formación con cargo al incentivo concedido para tal fin en el proyecto P12 CTS 1507.

Paloma Carrillo Fernández realizó una estancia de 3 meses en el grupo de investigación del Dr. Marco Presta en la Sección de Oncología e Inmunología Experimental del Departamento de Medicina Molecular y Translacional (Università degli Studi di Brescia, Italia), que le facilitó el aprendizaje de nuevos ensayos *in vivo*, así como su posterior incorporación a la metodología disponible en el grupo de investigación. Para ello dispuso de una beca para estancias de investigadores de la UMA en centros de investigación de calidad del I Plan Propio de la UMA.

Fruto del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se han identificado dos compuestos de síntesis, análogos a compuestos procedentes de fuentes naturales, en concreto, el compuesto Solo F-OH, precursor de la síntesis de la molécula de solomonamida A producida por la esponja de mar *T. swinhoei*, y el compuesto GR-24, análogo sintético de las hormonas vegetales denominadas estrigolactonas, que presentan propiedades antiangiogénicas y son capaces de inhibir el crecimiento de diferentes líneas tumorales. Se han caracterizado las actividades de dichos compuestos *in vivo* e *in vitro* y se ha realizado la aproximación a su mecanismo de acción a nivel molecular.

Los resultados obtenidos han dado lugar, por el momento, a los siguientes artículos científicos, publicados o en revisión:

Cheng-Sánchez, I., Carrillo, P., Sánchez-Ruiz, A., Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., Medina, M. A., ... & Sarabia, F. (2018). Exploring the Ring-Closing Metathesis for the Construction of the Solomonamide Macrocyclic Core: Identification of Bioactive Precursors. *The Journal of organic chemistry*, 83(10), 5365-5383. DOI: 10.1021/acs.joc.7b02988.

Carrillo, P., Martínez-Poveda, B., Cheng-Sánchez, I., Guerra, J., Tobia, C., López-Romero, J.M., ... & Quesada, A. R. (2019). Exploring the Antiangiogenic Potential of Solomonamide A Bioactive Precursors: In Vitro and in Vivo Evidences of the Inhibitory Activity of Solo F-OH During Angiogenesis. *Marine Drugs*, 17(4), 228. DOI: 10.3390/md17040228.

Carrillo, P., Martínez-Poveda, B., Medina, M. Á. & Quesada, A. R. (2019). The Strigolactone Analog GR-24 inhibits angiogenesis *in vivo* and *in vitro* by a mechanism involving cytoskeletal reorganization and VEGFR2 signaling. Bajo revisión en *Biochemical Pharmacology*.

Dichos resultados han sido presentados en varios congresos y *workshops* científicos nacionales e internacionales, participando mediante la presentación de un póster en el *XXXIX SEBBM Congress* (Salamanca, España, 2016), el *29th Pezcoller Symposium "Building new bridges between basic and cancer"* (Trento, Italia, 2017), el *XL SEBBM Congress* (Barcelona, España, 2017), el *Workshop Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases* (Málaga, España, 2018), *41 SEBBM Congress* (Santander, España, 2018), y siendo invitada a realizar una presentación oral en el *MuTaLig COST ACTION CA15135, 3rd WG meeting 2019* (París, Francia, 2019).

| | |
|--|----|
| LISTADO DE ABREVIATURAS | 1 |
| SUMMARY | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 25 |
| 1. Formación de nuevos vasos mediante angiogénesis | 25 |
| 2. La angiogénesis está controlada por un equilibrio entre activadores e inhibidores | 26 |
| 3. Etapas del proceso angiogénico | 29 |
| a. Activación de las células endoteliales | 30 |
| b. Degradación de la matriz extracelular | 31 |
| c. Especialización de las funciones de las células endoteliales activadas | 31 |
| d. Elongación del brote | 31 |
| e. Morfogénesis y estabilización de los nuevos vasos | 33 |
| 4. Principales rutas de señalización implicadas en la modulación de la angiogénesis | 34 |
| 4.1 Señalización mediada por VEGF y sus receptores | 34 |
| 4.2 Señalización mediada por FGF y sus receptores | 37 |
| 5. Angiogénesis en condiciones patológicas | 48 |
| 5.1 La angiogénesis como seña de identidad del cáncer | 40 |
| 5.2 Terapias antitumorales basadas en la inhibición de la angiogénesis | 40 |
| 6. Compuestos antiangiogénicos naturales y sus derivados | 43 |
| 6.1 Las esponjas de mar como fuente de compuestos antiangiogénicos | 43 |
| 6.2 Las plantas como fuente de compuestos antiangiogénicos | 45 |
| 7. Estrategia para la búsqueda de candidatos a fármacos antiangiogénicos | 48 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 49 |
| <i>HYPOTHESIS AND AIMS</i> | 53 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 59 |
| 1. Material | 59 |
| 1.1 Medios de cultivo, reactivos y material fungible | 59 |
| 1.2 Compuestos estudiados en la Tesis Doctoral | 59 |
| 1.3 Anticuerpos | 59 |
| 1.4 Cebadores | 61 |
| 2. Cultivos celulares | 61 |
| 2.1 Células endoteliales | 61 |
| 2.1.1 Cultivo de células endoteliales de aorta bovina (BAEC) | 61 |
| 2.1.1 Cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) | 62 |
| 2.2 Líneas celulares tumorales | 62 |
| 3. Animales de experimentación | 63 |

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| 4. Ensayos <i>in vitro</i> | 63 |
| 4.1 Ensayo de viabilidad celular con MTT | 63 |
| 4.2 Ensayo de morfogénesis de células endoteliales sobre Matrigel | 64 |
| 4.3 Ensayo de disrupción vascular | 65 |
| 4.4 Estudio de la capacidad de degradación de la matriz extracelular: zimografías de gelatina | 66 |
| 4.5 Ensayo de invasión en cámara de Boyden modificada | 68 |
| 4.6 Ensayo de migración por “cicatrización de la herida” | 70 |
| 4.7 Ensayo de adhesión celular a componentes de la MEC | 70 |
| 4.8 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo | 71 |
| 4.9 Estudio de la inducción de apoptosis mediante la detección de fosfatidilserina en la superficie celular | 72 |
| 5. Ensayos <i>in vivo</i> | 73 |
| 5.1 Ensayos realizados con el modelo de la membrana corioalantoidea de pollo | 73 |
| 5.1.1 Ensayo CAM | 73 |
| 5.1.2 Ensayo de xenotransplante de células tumorales en CAM de pollo | 75 |
| 5.2 Ensayos realizados con el modelo del pez cebra | 76 |
| 5.2.1 Análisis de la formación de vasos intersegmentales en embriones de pez cebra | 76 |
| 5.2.2 Ensayo de inhibición de angiogénesis en el saco vitelino de embriones de peces cebra (ZFYM) | 78 |
| 5.2.3 Ensayo de regeneración de la aleta caudal de pez cebra | 79 |
| 6. Estudio del mecanismo de acción <i>in vitro</i> de los compuestos inhibidores de la angiogénesis | 80 |
| 6.1 Estudio de la activación de rutas de señalización implicadas en la angiogénesis mediante <i>Western-blot</i> | 80 |
| 6.2 Medida <i>in vitro</i> de la actividad tirosina quinasa de VEGFR2 | 82 |
| 6.3 Estudio de la expresión de determinados genes por PCR cuantitativa (rt-qPCR) | 82 |
| 6.4 Análisis de moléculas de adhesión expuestas en la membrana de células endoteliales por citometría de flujo | 83 |
| 6.5 Detección de proteínas del citoesqueleto en células endoteliales mediante inmunotinciones y marcaje fluorescente | 84 |
| 7. Análisis estadístico | 85 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 87 |
| CAPÍTULO I: ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE UNA SERIE DE COMPUESTOS INTERMEDIARIOS EN LA SÍNTESIS DE LAS SOLOMONAMIDAS | 89 |
| 1. Antecedentes de las <i>solomonamidas A y B</i> | 90 |
| 2. Síntesis de los compuestos precursores de las <i>solomonamidas</i> empleados en esta Tesis Doctoral | 93 |
| 3. Exploración de la actividad biológica de los precursores de <i>solomonamidas</i> | 95 |
| 3.1 Efecto de los precursores sintéticos de las <i>solomonamidas</i> sobre el crecimiento de líneas tumorales y endoteliales <i>in vitro</i> | 95 |
| 3.2 Selección de posibles inhibidores de la angiogénesis entre los precursores sintéticos de las <i>solomonamidas</i> | 97 |

| | |
|--|-----|
| 4. Estudio de la actividad inhibidora de la angiogénesis <i>in vitro</i> del compuesto <i>solo F-OH</i> | 98 |
| 4.1 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre las estructuras tubulares preformadas | 96 |
| 4.2 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la migración de células endoteliales | 99 |
| 4.3 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la invasión de células endoteliales | 100 |
| 4.4 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la capacidad proteolítica de células endoteliales y tumorales | 101 |
| 4.5 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre el ciclo celular de células endoteliales y tumorales | 103 |
| 5. Estudio de la actividad inhibidora de la angiogénesis <i>in vivo</i> del compuesto <i>solo F-OH</i> | 105 |
| 5.1 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la membrana corioalantoidea de embriones de pollo | 105 |
| 5.2 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la angiogénesis inducida por el xenotransplante de células tumorales en membrana corioalantoidea de pollo | 106 |
| 5.3 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la angiogénesis inducida en el plexo subintestinal de embriones de pez cebra | 108 |
| 6. Estudios del mecanismo de acción de la actividad antiangiogénica de <i>solo F-OH</i> | 109 |
| 6.1 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la activación de las vías de ERK-MAPK y PI3K/AKT en células endoteliales | 109 |
| 6.2 Efecto de <i>solo F-OH</i> sobre la actividad quinasa de VEGFR2 <i>in vitro</i> | 110 |
| 7. Discusión | 111 |
| CAPÍTULO II: ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANÁLOGO SINTÉTICO DE LAS ESTRIGOLACTONAS GR-24 EN EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS | 117 |
| 1. Antecedentes sobre las estrigolactonas y el análogo sintético GR-24 | 118 |
| 1.1 Estructura y actividad biológica de las estrigolactonas y sus análogos en plantas | 118 |
| 1.2 Actividad biológica de análogos de las SL con aplicaciones terapéuticas | 119 |
| 2. Estudio del potencial antiangiogénico de GR-24 <i>in vivo</i> | 120 |
| 2.1 Efecto del compuesto GR-24 en el ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i> en la membrana corioalantoidea (CAM) de pollo | 120 |
| 2.2 Efecto del compuesto GR-24 en la formación de vasos intersegmentales (ISV) en embriones de pez cebra | 121 |
| 2.3 Efecto del compuesto GR-24 en la regeneración de la aleta caudal en individuos adultos de pez cebra | 123 |
| 3. Estudios <i>in vitro</i> del efecto del compuesto GR-24 en pasos clave de la angiogénesis | 124 |
| 3.1 Efectos del compuesto GR-24 sobre el crecimiento de células endoteliales y tumorales <i>in vitro</i> | 124 |
| 3.2 Efectos del compuesto GR-24 sobre el ciclo celular de células endoteliales y tumorales | 125 |
| 3.3 Efectos del compuesto GR-24 sobre la formación de estructuras tubulares sobre Matrigel | 126 |
| 3.4 Efectos del compuesto GR-24 sobre las estructuras tubulares preformadas en el ensayo de interrupción vascular | 127 |

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----|
| 3.5 Efectos del compuesto GR-24 sobre la capacidad de invasión de las células endoteliales | 128 |
| 3.6 Efectos del compuesto GR-24 sobre la capacidad de degradación de la matriz extracelular | 129 |
| 3.7 Efectos del compuesto GR-24 sobre la migración de las células endoteliales | 130 |
| 3.8 Efectos del compuesto GR-24 sobre la capacidad de adhesión a la MEC de las células endoteliales | 132 |
| | |
| 4. Estudios <i>in vitro</i> del mecanismo de acción de la actividad antiangiogénica del compuesto GR-24 | 133 |
| 4.1 Efectos del compuesto GR-24 sobre la organización del citoesqueleto en células endoteliales | 133 |
| 4.2 Efecto del compuesto GR-24 sobre la activación de la ruta de señalización de FAK | 135 |
| 4.3 Efecto del compuesto GR-24 sobre la exposición de moléculas de adhesión entre células endoteliales | 136 |
| 4.4 Efecto del compuesto GR-24 sobre la actividad quinasa de VEGFR2 <i>in vitro</i> | 137 |
| | |
| 5. Discusión | 138 |
| | |
| CONCLUSIONES | 147 |
| CONCLUSIONS | 151 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 155 |
| | |
| ANEXOS | 191 |

LISTADO DE ABREVIATURAS

2-ME: 2-metoxiestradiol (*2-methoxyestradiol*)

7-AAD: 7-amino actinomicina (*7-amino actinomycin*)

ADAM: Familia desintegrinas y metaloproteinasas (*A disintegrin and MMP*)

AE-1: Aeroplisinina-1 (*Aeroplysinin-1*)

AHMOA: 4-amino-6-(2'-amino-4'-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-2-methyl-6-oxohexanoic acid

AKT o PKB: Proteína quinasa B (*Protein Kinase B*)

AMDOA: 4-amino (2'-amino-4'-hydroxy phenyl)-3,5-dihydroxy-2-methyl-6-oxo hexanoic acid

Ang: Angiopoyetinas (*Angiopoietins*)

ATCC: American Type Culture Collection

BAEC: Células endoteliales de aorta bovina (*Bovine Aortic Endothelial Cells*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CA4-P: combretastatina-4-fosfato (*combretastatin-4-phosphate*)

CAM: Membrana corioalantoidea (*ChorioAllantoic Membrane*)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)

Dpa: días post amputación

ECGS: Suplemento de crecimiento de células endoteliales (*Endothelial Cells Growth Supplement*)

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EGF: Factor de crecimiento epitelial (*Epithelial Growth Factor*)

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial (*endotelial Nitric Oxyde Synthase*)

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)

FAK: Quinasa asociada a adhesiones focales (*Focal Adhesion Kinase*)

LISTADO DE ABREVIATURAS

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)

FGFR: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor Receptor*)

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase*)

HGF: Factor de crecimiento hepatocitario (*Hepatocyte Growth Factor*)

HIF: Factor inducibles por hypoxia (*Hypoxia Inducible Factor*)

Hpf: horas post-fecundación

HUVEC: Células endoteliales humanas de cordón umbilical (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

IAP: Proteínas inhibidoras de la apoptosis (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*)

IC50: Concentración necesaria para producir una inhibición del 50% (*half maximal inhibitory concentration*)

IL: Interleucina (*Interleukin*)

INF- α y β : Interferón α y β (*Interferon α and β*)

ISV: Vasos intersegmentales (*Intersegmental Vessels*)

L-Gln: L-glutamina (*L-glutamine*)

LPS: Lipopolisacáridos (*Lipopolysaccharides*)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MEC (EMC): Matriz Extracelular (*Extracellular Matrix*)

MEK: Quinasa de MAPK (*MAPK kinase*)

MIC: Concentración inhibidora mínima (*Minimum Inhibitory Concentration*)

MMP: Metaloproteinasa de matriz extracelular (*Matrix Metalloproteinase*)

MT-MMP: Metaloproteinasa asociadas a membrana (*Membrane Type-MMP*)

- MTT:** *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*
- NCAM:** Molécula de adhesión de células neurales (*Neural Cell Adhesion Molecule*)
- NO:** Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)
- PAI:** Inhibidor del activador del plasminógeno (*Plasminogen Activator Inhibitor*)
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*)
- PE-Annexin V:** anexina V-ficoeritrina (*Phycoerythrin-annexin-V*)
- PECAM-1 (CD31):** Molécula de adhesión de células endoteliales a plaquetas 1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*)
- PEDF:** Factor pigmentario derivado del epitelio (*Pigment Epithelium-Derived Factor*)
- PF-4:** Factor plaquetario 4 (*Platelet Factor 4*)
- PFA:** Paraformaldehído (*Paraformaldehyde*)
- PHD:** Prolil hidroxilasas (*Prolyl Hydroxylases*)
- PI3K:** Fosfatidilinositol-3-quinasa (*Phosphatidylinositol-3-kinase*)
- PKC:** Proteína quinasa C (*Protein kinase C*)
- PLC- γ :** Fosfolipasa C- γ (*Phospholipase C- γ*)
- PIGF:** Factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor*)
- PTU:** Feniltiourea (*1-phenyl-2-thiourea*)
- RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute*
- rt-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*real-time quantitative Polymerase Chain Reaction*)
- SIV:** Vasos subintestinales (*Subintestinal Vessels*)
- SL:** Estrigolactonas (*Strigolactones*)
- sVEGFR:** Receptor soluble del factor de crecimiento del endotelio vascular (soluble *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)
- TGF- β :** Factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta*)

LISTADO DE ABREVIATURAS

Tie: Tirosina quinasa con dominios de tipo inmunoglobulina y EGF (*Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains*)

TIMP: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

tPA: activador tisular del plasminógeno (*Tissue Plasminogen Activator*)

TQ (TK): Tirosina quinasa (*Tyrosine kinase*)

TSP-1: Trombospondina- 1 (*Thrombospondin-1*)

uPA: Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (*urokinase-type Plasminogen Activator*)

uPAR: Receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (*urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*)

Ve-cadherin (CD44): Cadherina del endotelio vascular (*Vascular Endothelial cadherin*)

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

ZFYM: Saco vitelino del pez cebra (*Zebrafish Yolk Membrane*)

SUMMARY

INTRODUCTION

1. Angiogenesis is a tightly regulated multistep process

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from preexisting ones. This process is very active during embryogenesis, supporting the growth of tissues and organs, but during adulthood angiogenesis is restricted to certain physiological processes, such as endometrium formation and tissue repair, among others. Quiescence in endothelium is controlled by the balance of proangiogenic and antiangiogenic signals, produced by both endothelial cells and the surrounding tissue. Proangiogenic modulators are paracrine factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) or fibroblast growth factor (FGF), but also extracellular matrix (ECM) components or molecules located in the surface of adjacent cells are able to activate the process. In addition, endogenous angiogenesis inhibitors are usually fragments of proteins contained in ECM, such as endostatin or thrombospondin, of coagulation factors, such as angiostatin, or hormone metabolites such as 2-methoxyestradiol. The activation of angiogenesis only takes place when the balance between proangiogenic and antiangiogenic signals biases in favor of proangiogenic modulators, and this activation must be a transient event that should stop when the stimulus decreases. This model of activation is known as the “angiogenic switch”.

Angiogenesis consists of several sequential and coordinated steps. This sequence of events starts when the presence of proangiogenic signals is higher than that of antiangiogenic ones, and the switch is on. At that moment, certain endothelial cells in the vessel change from a quiescent status to an activated phenotype, characterized by the acquisition of migratory, proliferative and proteolytic capabilities. Endothelial cell activation is mediated by the binding of proangiogenic molecules to their surface receptors, which transduces the signal by means of several pathways that finally modulate the activation. Endothelial cells modify the expression pattern of adhesion molecules, losing their strong cell-to-cell contacts, increasing the permeability of the vessels, and expressing adhesion molecules implicated in cell-to-ECM contacts. Mural cells surrounding the vessel are then released and endothelial cells start the secretion of proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs), which degrade components of basement membrane and ECM. In this scenario, endothelial cells are able to invade EMC, migrate and proliferate, in a process named sprouting.

Following the sprout formation, cells proliferate and migrate toward the source of proangiogenic molecules in order to elongate the sprout. Activated endothelial cells acquire two different transitory phenotypes: the migratory *tip cells* and the proliferative and lumen builders *stalk cells*. The ligand-receptor binding activates the mitogen-activated protein kinases (MAPK) extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK 1/2) proliferation and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) survival

SUMMARY

intracellular pathways, and other related to migration such as focal adhesion kinase (FAK) signaling. In order to conclude the formation of the new vessel, endothelium must be stabilized: endothelial cells return to a quiescent phenotype and restore vessel integrity establishing strong cell-to-cell contacts. Adhesion molecules such as vascular endothelial cadherin (VE-cadherin, CD44) or platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1, CD31) are expressed by quiescent endothelium. Mural cells are also recruited by endothelial cells, in a process modulated by angiopoietins, transforming growth factor beta (TGF- β) and platelet-derived growth factor subunit B (PDGFB). In addition, shear haemodynamics have an important role in the remodelling of the new vessel.

2. Angiogenesis in pathological conditions

Tight regulation of angiogenesis is essential to ensure the proper control of the process. An imbalance in the presence of proangiogenic and antiangiogenic molecules is associated with the onset of several pathologies. Some of them are related to the deficiency of blood supply, for example diabetes, stroke, cardiac insufficiency, neurodegenerative disorders, wound healing defects, preeclampsia or alopecia. Some of the pathologies associated to an excess of angiogenesis are cancer, arthritis, psoriasis, retinopathies, endometriosis and several metabolic, infectious or inflammatory disorders.

Angiogenesis is one of the hallmarks of cancer, playing a determining role in tumor progression, invasion, and metastasis. For a tumor to grow, supply of oxygen and nutrients is needed, as well as a pathway for the removal of metabolic waste and CO₂. Therefore, in order to grow above the critical size of 1-2 mm, a solid tumor needs to activate the "angiogenic switch", inducing the continuous formation of new vessels that help to sustain the tumor growth. In this way, angiogenesis can enable the transition from a silent and avascular state, in which there is a balance between proliferation and cell death, to a state of exponential, invasive and metastatic growth. In tumor angiogenesis, the high amount of proangiogenic signals results in a chaotic and disorganized vascular network, with very permeable vessels characterized by a weakly joined endothelial cells and scarcity of pericytes. This permeability allows tumor cells to disseminate and produce metastasis. In addition, these conditions diminish the effectiveness of many of the traditional anti-tumor therapies, which cannot reach their target, modulate the production of pro- and anti-angiogenic factors and select the most malignant and metastatic cancer cells.

Antiangiogenic therapy, which targets activated endothelial cells, has a number of advantages over traditional therapy, which targets tumor cells. Firstly, endothelial cells are a genetically stable, diploid and homogeneous target in which spontaneous mutations occur very occasionally. This contrasts with the high genetic instability, heterogeneity and mutation rate of tumor cells, which favours the selection of

subpopulations resistant to the antitumor drug administered, and therefore the appearance of the phenomenon of resistance to chemotherapy. In addition, the fact that antiangiogenic therapy targets activated endothelial cells makes their target easily accessible through systemic administration, avoiding the frequent problem of low penetration of the antitumor drug in solid tumors. Finally, since a single capillary network can support the growth of many different populations of tumor cells, inhibition of the growth of the vessels that irrigate the tumor can impede the growth of many types of tumors.

Due to the relevant role played by the VEGF/VEGFR2 axis in the activation of angiogenesis, this signalling pathway has been the main target in antiangiogenic therapy. This inhibition can be exerted at different levels, including molecules that bind the angiogenic factor (e.g. bevacizumab, a humanized monoclonal anti-VEGF-A antibody), molecules that bind the receptor and block it (e.g. ramucirumab, a monoclonal anti-VEGFR2 antibody), and low molecular weight tyrosine kinase inhibitors that stop the VEGFR2 signaling pathway (e.g. sunitinib and sorafenib among many others FDA-approved antiangiogenic drugs).

Despite high expectations regarding the use of antiangiogenic therapies for the treatment of cancer, clinical results have not always been as good as expected. The benefits derived from the use of these drugs in the short term very often do not translate to the long term, and the response to inhibitors differs greatly in different types of tumors and patients. Finally, the appearance of resistance of tumors to the blockage of the VEGF pathway, advises the use of either therapeutic approaches combining antiangiogenic drugs with different targets, or antiangiogenic therapies combined with traditional chemotherapy or radiotherapy.

3. Antiangiogenic potential of natural compounds and their synthetic derivatives

Nature is a very prolific source of compounds of therapeutic interest and therefore the discovery and characterization of natural compounds with bioactive properties is one of the most promising challenges in pharmacological and biomedical research. Many natural compounds have shown to own antiangiogenic abilities. Some of them have long been used in traditional medicine, based on the use of natural resources (mostly plants) for the treatment of various diseases and ailments. Others have been identified and isolated from their natural sources, where they play a role in processes such as development, maintenance and protection/interaction with the environment. Some of the advantages of natural products versus synthetic drugs include a better delivery and the production of fewer secondary effects and resistance mechanisms.

Marine organisms represent an enormous source of bioactive compounds, many of them exhibiting interesting activities related to an antifungal, antitumoral

SUMMARY

antiinflammatory or antiangiogenic potential. Among the vast marine biodiversity, sponges are a very interesting source of bioactive secondary metabolites which play a defensive role in the sponges, allowing those sessile organisms to protect themselves from predators, infections or colonization by other marine organisms. A remarkable characteristic of marine sponge compounds is that they may present in their structures particular features that provide them potential activities and advantageous properties, such as not being recognized by proteases. Regarding their use as antiangiogenic drugs, a number of compounds derived from marine sponges exhibit the potential to inhibit angiogenesis at several steps by different mechanisms. Aeroplysinin-1 or bastadin-6 are good examples of antiangiogenic compounds isolated from marine sponges.

Plants are probably the most prolific source of bioactive compounds. The high variety of molecules produced during the secondary metabolism of plants are involved in different processes of plant physiology and ecology. According to pharmacological and biomedical research, a high number of plant-derived compounds have been described as potential therapeutic drugs, exhibiting antitumoral, antiinflammatory or antiangiogenic properties among others. Phenolic compounds such as resveratrol, alkaloids such as taxol or vegetal hormones such as brassinosteroids or abscisic acid are examples of antiangiogenic compounds isolated from plants.

4. Strategies for the search and characterization of new antiangiogenic compounds

The work presented in this Doctoral Thesis is included in one of the main research line of our group, involved over the last 20 years in the search and characterization of natural and synthetic compounds that could be used as new antiangiogenic drugs. Regarding to this, a complete battery of *in vitro* and *in vivo* methods was implemented in our laboratory in order to study the potential of these compounds to modulate angiogenesis.

The strategy followed in our group for the search and identification of new inhibitors of angiogenesis is based on a primary screening consisting on the evaluation *in vitro* of the capability of these compounds to inhibit endothelial cell survival and the formation of tubular-like structures on Matrigel. These studies are focused on the selection of the compounds that are able to inhibit the formation of endothelial tubular-like structures at non-toxic concentrations. Selected compounds are then evaluated in different *in vivo* models of angiogenesis, such as the chorioallantoic membrane (CAM) assay in fertilized chick eggs or the intersegmental vessels (ISV) formation assay in zebrafish. Those compounds that exhibit antiangiogenic effect *in vivo* are further characterized *in vitro* in order to identify the steps or process related to angiogenesis that could be affected by the presence of the compound. Finally, the molecular mechanism of action of the compounds is explored *in vitro*, by the study of the effect of the compounds on the main signaling pathways controlling angiogenesis.

METHODOLOGY

1. Cell cultures

Primary endothelial cell lines used in this Doctoral Thesis were bovine aortic endothelial cells (BAEC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), isolated in our laboratory. BAEC were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glucose (1 g/L) and supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), antibiotics, antimicrobials and glutamine; HUVEC were maintained in Medium 199 supplemented with 20% FBS, antibiotics, antimicrobials, glutamine, endothelial cell growth supplements and heparin. Tumor cell lines used in this work were obtained from the ATCC and maintained following the supplier's recommendations. All cell lines were maintained at 37°C and humidified 5% CO₂ atmosphere.

2. *In vitro* angiogenesis assays

- Cell survival assay: The MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) method was used to check cellular viability in presence of the tested compounds. This assay is based on the reduction of yellow MTT reagent by mitochondrial dehydrogenases of viable cells to a blue formazan product which can be measured spectrophotometrically. Tumor and endothelial cells in a low density were grown in MW96 plates in presence of serial dilutions of the compound for 3 days. MTT reagent was then added to the wells and, after 4 h incubation, absorbance was measured at 550 nm (A₅₅₀). IC₅₀ values were calculated from semilogarithmic dose-response plots as those concentrations of compound yielding 50% cell survival, taking the values obtained for the control to be 100%.

- Tubular-like structures formation on Matrigel: Endothelial cells were seeded on Matrigel-coated wells of MW96 plates in presence of the tested compounds or in control conditions. After 5 h of incubation, wells were photographed and tubular-like networks formation were evaluated. Staurosporine was used as positive control of inhibition in this assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) to inhibit the formation of tubular-like structures was determined for each tested compound. A modification of this assay, in where compounds were added once the tubular-like network was formed, and further incubated for 90 min, allowed us to analyze whether the compounds are vascular disruptors. In this case, the positive inhibition control was combretastatin-4-phosphate (CA4-P).

- Cell migration assay (wound healing): Confluent endothelial cells monolayers in MW6 plates were wounded to generate acellular areas. Cells were incubated in presence or absence of the tested compounds and wounded areas were observed and photographed after different incubation periods. The amount of migration at 7 h

SUMMARY

was determined by image analysis in control and treated wells and normalized with respect to their corresponding values at zero time. The migration of cells into the cell-free area was calculated as the percentage of the initial wounded area (time 0) that had been recovered by endothelial cells for each experimental condition. For long timing, mitomycin was added to ensure that proliferation was not contributing to the repopulation of the cell-free area.

- Cell invasion assay (modified Boyden chamber invasion assay): The invasion of endothelial cells towards a chemotactic gradient was assayed using porous membrane transwells coated with Matrigel solution. After 16 h of incubation either in the presence or the absence of the tested compounds, invading cells in the membrane were fixed and stained, and the number of invading cells was quantified.

- Zymographic assays for MMP-2 and MMP-9 detection: Zymographies to detect matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 presence were performed for both conditioned media and cellular extracts of endothelial and tumor cell lines incubated in presence or absence of the tested compounds. SDS-PAGE gels containing gelatin were run under non-denaturing conditions. After Coomassie-blue staining, the bands generated by gelatinase activity in the gels were detected as non-stained bands in a dark, stained background. The size and intensity of the bands were quantified by imaging software tools.

- Cell-to-ECM adhesion assay: Endothelial cells, preincubated in presence or absence of the tested compounds and with Calcein-AM fluorescent dye, were seeded on fibronectin- or collagen I-coated wells in a MW24. After 1 h of incubation, wells were gently washed and attached cells were photographed and counted.

- Cell cycle analysis: Endothelial or tumor cells were incubated in presence or absence of the tested compounds. After fixation and permeabilization, cells were incubated in a solution of propidium iodide containing RNase-A. Samples were analyzed in a flow cytometer and cellular subpopulations (in subG₁, G₀/G₁, S and G₂/M phases) were quantified. 2-methoxyestradiol was used as positive control of induction of G₂/M phase arrest and apoptosis (subG₁).

- Apoptosis detection assay (membrane phosphatidylserine detection by fluorescent annexin-V): PE-Annexin V Apoptosis Detection Kit I, was used to detect apoptotic cells. This kit is based on the detection of phosphatidylserine on apoptotic cell surface by fluorescence-labelled annexin-V. 7-amino actinomycin (AAD) is included as a marker of compromised/dead cells. Cells, incubated in presence or absence of the tested compounds, were processed according to manufacturer's protocol and samples were analyzed by flow cytometry. Four populations could be observed: non-stained (viable), PE-annexin V single stained (early apoptotic), PE-annexin V/7-AAD

double stained (late apoptotic) and 7-AAD single stained (dead) cells.

3. *In vivo* angiogenesis assays

- Ethical statement: The animal procedures considered in this Doctoral Thesis were performed in strict compliance with the European Communities Council Directive 2010/63/EU and the RD 53/2013 of Spanish Government, regulating the use and care of laboratory animals.

- Chorioallantoic membrane (CAM) assay: Fertilized chick eggs were incubated horizontally at 38°C in a humidified incubator and windowed after 3 days. Methylcellulose discs containing tested compounds were placed at day 8 on the CAM and the eggs were incubated for an additional 48 h. Aeroplysinin-1 was used as a routine positive assay control. After the incubation, the CAM was examined under a stereomicroscope and photographed. The assay was scored as positive when a significant reduction of vessels in the treated area was observed. The results were analysed by three independent observers.

- Tumor cells xenograft assay in CAM: Tumor cells (U87MG) were included into alginate pills in presence or absence of the tested compound. Pills were placed onto the CAM of 11 dpf (days post-fertilization) chick eggs, allowing the proangiogenic factors released by tumor cells to induce the angiogenic response in the CAM. After 3 days, CAM were photographed under a stereomicroscope and the inhibitory effect of the tested compound was evaluated.

- Intersegmental vessels (ISVs) formation assay: Transgenic zebrafish line $Tg(fli-1a:EGFP)^{y1}$, expressing GFP in vasculature under the promotor of *fli1* gene was used in this assay. 24 hours post-fertilization (hpf) embryos were dechorionated and arrayed in MW96 plates in presence or absence of tested compounds for 24 h. A positive control with sunitinib 20 μ M was included in this assay. After incubation, fish embryos were photographed under fluorescence. Phenotypic changes in intersegmental vasculature formation were evaluated by four different observers.

- FGF-2 induced angiogenesis zebrafish yolk membrane (ZFYM) assay: 48 hpf wildtype zebrafish embryos were manually dechorionated and microinjected with FGF-2 into the perivitelline space. The microinjection was performed in the proximity of developing subintestinal vessels (SIVs). After incubation of 24 h in the absence or presence of tested compound, embryos were fixed, stained for endogenous alkaline phosphatase activity, and photographed under a stereomicroscope. Evaluation of the angiogenic response was performed by assigning negative (–, no response to FGF-2 injection), positive (+, mild response), or very positive (++, strong response) scores to the embryos.

SUMMARY

- Caudal fin regeneration assay: Caudal fin from adult wild-type zebrafishes were amputated by a transversal cut with a scalpel and time zero photographs were taken (0 days post-amputation, 0 dpa). After 3 days incubation in presence or absence of the tested compound, animals were photographed. The results were interpreted as absence of regeneration compared with the negative control.

4. *In vitro* assays to explore the mechanism of action of the antiangiogenic compounds

- Western-blot: In order to detect total FAK presence and phosphorylation level, endothelial cells were incubated in the absence or presence of tested compound and protein lysates were obtained. To study the effect on proliferation and survival pathways, cells were starved in presence or absence of the compound and, after short induction with serum, cells were lysated. Denatured samples were subjected to SDS-PAGE electrophoresis and gels were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and incubated overnight at 4°C in the presence of primary antibodies. After incubation with HRP- conjugated secondary antibodies, immunoreactive bands were detected using chemiluminescence systems.

- *In vitro* measurement of VEGFR2 TK activity: VEGFR2 TK activity was measured *in vitro* using the VEGFR2 (KDR) Kinase Assay Kit. The compounds were tested according to the manufacturer's instructions, determining the percentage of remaining TK activity after 45 min of incubation at 30 °C. Sunitinib 1 µM was used as positive control of inhibition in the same experimental conditions.

- Quantitative real-time PCR (qPCR). RNA was extracted from endothelial cells treated with tested compounds. cDNA synthesis was carried out and qPCR reactions were done using SYBRgreen reagent with specific primers to detect transcription of selected genes. All qPCR data were normalized to GAPDH expression.

- Detection of surface VE-cadherin and PECAM-1 by flow cytometry: Endothelial cells in control conditions or treated with tested compound were incubated with the correspondent fluorescent-labelled primary antibody against PECAM-1 or VE-cadherin. Samples were analyzed in a flow cytometer and results were quantified by using a specific software.

- Fluorescence immunocytochemistry: Endothelial cells, seeded on gelatin-coated coverslips, were incubated either in the presence or in the absence of the tested compound. After fixation, permeabilization and blocking, cells were incubated with primary antibodies to detect FAK or alpha-tubulin, and fluorescence-labelled secondary antibodies. Actin filaments were detected by the incubation of cells with fluorescence-labelled phalloidin. Finally, cell nuclei were stained with Hoechst dye and preparations were observed and photographed under confocal microscopy.

RESULTS AND DISCUSSION

CHAPTER I: STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A SERIES OF SYNTHETIC PRECURSORS OF SOLOMONAMIDES

The compounds tested in this Chapter derived from an active collaboration with the group of Dr. Francisco Sarabia, from the Department of Organic Chemistry of the University of Málaga. Part of the *in vivo* experiments (SIVs formation and FGF-2-induced ZFYM assays in zebrafish, and xenograft in CAM assay) were performed during a short stay in the laboratory of Dr. Marco Presta (University of Brescia; Brescia, Italy). Results derived of this Chapter have been included in two original papers published in international research journals indexed in JCR:

- Cheng-Sánchez, I., Carrillo, P., Sánchez-Ruiz, A., Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., Medina, M. A., ... & Sarabia, F. (2018). Exploring the Ring-Closing Metathesis for the Construction of the *Solomonamide* Macrocyclic Core: Identification of Bioactive Precursors. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(10), 5365-5383. DOI: 10.1021/acs.joc.7b02988.
- Carrillo, P., Martínez-Poveda, B., Cheng-Sánchez, I., Guerra, J., Tobia, C., López-Romero, J.M., ... & Quesada, A. R. (2019). Exploring the Antiangiogenic Potential of *Solomonamide A* Bioactive Precursors: *In Vitro* and *In Vivo* Evidences of the Inhibitory Activity of *solo F-OH* During Angiogenesis. *Marine Drugs*, 17(4), 228. DOI: 10.3390/md17040228.

1. Overview

The marine sponge *Theonella swinhoei* has been described as a rich source of bioactive compounds with therapeutic potential, such is the case of perthamides and swinholides. Together with them, *solomonamide A* and *B* are two bioactive compounds that have been recently isolated from this sponge and they have been reported to exert a dose-dependent anti-inflammatory activity *in vivo*. *Solomonamides* are cyclic peptides that present in their structures an unusual peptide with non-proteinogenic amino acids named ADMOA (4-amino(2-amino-4-hydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-2-ethyl-6-oxohexanoic acid), in the case of *solomonamide A*, and its corresponding 5-deoxy derivative (AHMOA) for *solomonamide B*. These peptide structures provide protection against peptidases and constitute a scaffold for new compounds with better biological activities.

Due to the scarcity of these molecules in nature and the evidence of their biological *in vivo* activity, different research groups have been involved in the design and implementation of a complete synthesis of *solomonamides*. In this context, Dr. Francisco Sarabia's group carried out a strategy directed to the *solomonamide* complete molecule

SUMMARY

synthesis based on an olefin metathesis. During this strategy, several synthesis intermediates were isolated at different points of the process, obtaining a series of compounds that were tested for their biological activity along the course of this Doctoral Thesis. These compounds represent different scaffolds, by getting increasing closed to *solomonamide* molecules structure, and they were named *solo-1*, *solo-2*, *solo-3*, *solo-4*, *solo-5*, *solo-6*, *solo F-Bz* and *solo F-OH*.

2. Results and Discussion

As a first attempt to characterize the biological activities of the synthetic *solomonamide* precursors, the cytotoxicity profile of the compounds was examined using nine different cancer cell lines, as well as a primary culture of endothelial cells (BAEC). The results of these biological evaluations clearly revealed a relevant cytotoxic activity for only one compound, *solo F-OH*, which displayed the best values of inhibition of the series in the low μM range, against all the tumor cell lines. In addition, *solo F-OH* could also inhibit the growth of endothelial cells, which could indicate a putative antiangiogenic effect of this compound.

Synthetic *solomonamide* precursors were tested to evaluate their possible antiangiogenic potential *in vitro* by means of the assay of the tubular-like structures formation on Matrigel, using endothelial cells. *Solo F-OH* displayed a highlighted inhibitory activity in this assay, which confirmed the unique bioactivity of this compound as compared to the rest of the *solomonamide* precursors studied. In addition, the low MIC value exhibited in this assay by *solo F-OH* (1 μM), which was around 20-fold lower than the dose required to inhibit BAEC cell growth, pointed to a mechanism of action independent of its growth inhibitory activity in endothelial cells. The potent activity of *solo F-OH* to inhibit the formation of endothelial tubular-like structures on Matrigel prompted us to select this compound for a further analysis of its antiangiogenic potential.

Interestingly, *solo F-OH* significantly reduced the migratory and invasive capabilities of BAEC *in vitro* at not-toxic doses. As a remark, the inhibition of endothelial cell migration showed by *solo F-OH* in the wound-healing assay was achieved after a short time lapse, at which cell proliferation was not relevant, suggesting that the antiproliferative activity of this compound was not playing a role in the inhibition of migration. Diminished endothelial cell invasion in the presence of *solo F-OH* could be derived not only from the defective migratory capability observed after the treatment with the compound, but also from a prevention of the endothelial degradation of ECM. In this regard, incubation with this compound decreased the endothelial MMP-2 production, both in conditioned medium and cell extracts, in a dose-dependent manner.

In addition to the *in vitro* evidence of an inhibitory activity of *solo F-OH* in different angiogenesis-related processes, the antiangiogenic potential of this compound was

evaluated *in vivo* by means of three different models of angiogenesis. Results from the CAM assay demonstrated that *solo F-OH* was able to inhibit angiogenesis in a dose-dependent manner at low concentrations. Additionally, *solo F-OH* diminished the angiogenic response of subintestinal vessels to exogenous FGF-2 in zebrafish, which was evidenced by a decreased number of embryos presenting a strong or mild angiogenic response and an increased number of embryos that were unresponsive to the FGF-2 stimulus. Finally, tumor cells xenografts on the CAM assay were performed, and preliminary results showed that *solo F-OH* reduced the neovessels formed radially to the alginate pills containing tumor cells. Taken together, our *in vivo* results suggest that *solo F-OH* is capable of interfering not only with physiological angiogenesis, but also with the angiogenic response of the pre-existing vasculature toward an exogenous source of proangiogenic molecules, which could mimic a pathological activation of angiogenesis.

Regarding the mechanism of action underlying the antiangiogenic activity of *solo F-OH*, our data reveal that this compound prevents AKT phosphorylation, interfering in the activation of the pathway. Additionally, *solo F-OH* inhibits the phosphorylation of ERK1/2, an essential protein in the MAPK pathway, the main proliferative pathway activated in endothelial cells during angiogenesis. These data point to common upstream elements of these pathways as the major targets of *solo F-OH*. Since both PI3K/AKT and ERK-MAPK pathways are involved in the transduction of signals elicited by VEGF/VEGFR2 and FGF-2/FGFR, our results suggest that *solo F-OH* could inhibit angiogenesis by targeting these signaling systems, although additional studies are needed to clarify this point.

CHAPTER II: STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE STRIGOLACTONES SYNTHETIC ANALOGUE GR-24 IN THE ANGIOGENIC PROCESS

Results derived of this Chapter have been included in a manuscript submitted to the international research journal *Biochemical Pharmacology*. Currently, the response to the first revision of the manuscript has been submitted. New data derived from revisors suggestions are included in Annex III.

- Carrillo, P., Martínez-Poveda, B., Medina, M. Á. & Quesada, A. R. (2019). The Strigolactone Analog GR-24 inhibits angiogenesis *in vivo* and *in vitro* by a mechanism involving cytoskeletal reorganization and VEGFR2 signaling. *Biochemical Pharmacology*, *under review*.

1. Overview

Strigolactones (SL) are phytohormones involved in several aspects of plant development, modulating shoot branching and root architecture. These phytohormones are terpenoid lactones derived from carotenoids, with a chemical structure consisting of an ABC ring connected to a D butanolide ring, which seems to be necessary to their

SUMMARY

activity in plants. GR-24 is one of the most used SL synthetic analogue in plant development research. The GR-24 used in this work was purchased from the research group of Dr. Zwanenburg (Radboud University Nijmegen, The Netherlands). According to bibliography, GR-24 and other SL synthetic analogues have been described as bioactive compounds with antitumoral activity, but the possible role of GR-24 as antiangiogenic compound has not been studied before.

2. Results and Discussion

GR-24 was selected in the course of an *in vivo* primary screening based in the CAM assay in chicken embryos, due to the potent antiangiogenic effect observed in this assay. Additionally, the inhibitory effect of GR-24 on angiogenesis was tested in the intersegmental vessels formation assay in *Tg(fli:EGFP)y1* zebrafish embryos, confirming its activity. The dose-response effect observed in both angiogenesis assays points to the high potential of GR-24 as a candidate to antiangiogenic drug. The inhibitory effect of GR-24 in the caudal fin regeneration assay in adult wild-type zebrafish, preventing neovascularization of the tissue and therefore its regeneration, supported the proposed role of this compound as antiangiogenic compound.

The *in vitro* evaluation of the direct effect of GR-24 in endothelial cells revealed that this compound decreases the survival of these cells, with an IC_{50} value in the micromolar range. Additionally, and according to previously reported data, the described anti-cancer potential of this compound *in vitro* was confirmed in survival experiments performed in a panel of human cancer cell lines (including leukemia, fibrosarcoma, osteosarcoma, glioblastoma, breast cancer, cervix and colon). These results suggest that GR-24 exhibit a non-especific effect on endothelial cell growth. Changes in the cell cycle distribution of endothelial cell population were detected in presence of GR-24, which induced an accumulation of cells in G_0/G_1 phase without producing an increase in subG1 population. Interestingly, breast cancer cells showed a different response to GR-24, detecting an accumulation of cells in G_2/M phase when this tumor cell line was treated with the compound. Although the exact mechanisms unraveling the different responses induced by GR-24 in endothelial and tumor cell cycle remain to be determined, this observation suggests a differential activity on endothelial cells, making this compound a good candidate to be studied for antiangiogenic therapy.

In order to elucidate how GR-24 was affecting different steps of the angiogenic process, a series of *in vitro* assays were performed. The results presented in this Doctoral Thesis show that the SL analog produced a dose-dependent inhibitory effect in the formation of endothelial tubular-like structures on Matrigel, with a non-toxic MIC value, suggesting that antiangiogenic activity of GR-24 may be due not only to its antiproliferative activity, but also to additional effects directly exerted on these cells. Another interesting effect of GR-24 was the reduction of the invasive potential of

endothelial cells which correlated to an inhibition of the production and secretion of endothelial MMP-2. In addition, migration of endothelial cells and adhesion to the ECM components fibronectin and collagen type I were also reduced in presence of GR-24 at short time-lapses, at which effects in proliferation were discarded.

The work presented in this Doctoral Thesis also suggested that GR-24 could affect cytoskeleton in endothelial cells. In order to evaluate this possibility, the cytoskeleton components beta-actin and alpha-tubulin were studied in endothelial cells treated with GR-24. In presence of this compound, both actin and microtubule cytoskeletons in endothelial cells were disorganized, as compared to the control situation. Cells became round-shaped, and few actin stress fibers were observed. Besides, microtubules disposition changed from a longitudinal pattern to a bundle-like shape. Interestingly, the number of focal adhesions in endothelial cells was decreased in presence of GR-24 treatment. The GR-24 observed effects in the organization of cytoskeleton and in the presence of focal adhesion in endothelial cells suggest that this compound interferes in the correct cytoskeleton dynamics and functions, supporting the effects of GR-24 on cell cycle, tubular-like structures formation, invasion, migration, and adhesion in endothelial cells *in vitro* and the potent inhibition of angiogenesis *in vivo*.

Our results suggest that GR-24 induces the maintainance of the quiescent phenotype in endothelial cells, preventing the changes initiated in these cells when angiogenesis is induced. According to this, the levels of VE-cadherin and PECAM-1, two important adhesion proteins implicated in cell-to-cell contacts, exposed in the surface of endothelial cells when treated with the SL analog were increased, pointing to the maintenance of the vessel integrity in presence of GR-24 and hence the inhibition of key steps in angiogenesis.

Exploring the mechanisms of action of GR-24 in angiogenesis inhibition, we investigated the non-receptor cytoplasmic tyrosine kinase FAK (focal adhesion kinase), which localized in focal adhesions and acts as a key regulator in integrin-mediated and growth factor receptors signaling during angiogenesis. Data presented here show that GR-24 reduces the expression of FAK (mRNA and protein), and also FAK phosphorylation, indicating a downregulation of the cell signaling transduced through this kinase. Whether GR-24 directly targets FAK and how exactly this SL analog is able to inhibit the signaling through this pathway in endothelial cells remain to be elucidated.

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El término angiogénesis designa el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular preexistente. Los vasos sanguíneos constituyen una compleja red de tubos que permite la distribución de la sangre por todo el organismo. Su formación es un proceso indispensable para los organismos vertebrados, siendo el sistema cardiovascular el primero que se desarrolla (Risau y Flamme, 1995; Takada *et al.*, 2017) para permitir el transporte de nutrientes, oxígeno, hormonas y células inmunes necesarios para el correcto desarrollo, homeostasis y funcionalización de los órganos en crecimiento activo, así como la eliminación de los desechos metabólicos producidos (Jensen y Cao, 2017; Takada *et al.*, 2017). Hay varios tipos de vasos sanguíneos que, en conjunto, forman las redes jerarquizadas que constituyen el sistema vascular periférico y que son de mayor a menor calibre, arterias y venas, arteriolas y vénulas, y capilares. Estos últimos están formados por una monocapa de células endoteliales que se rodea de la lámina basal que comparten con las células murales que le aportan estabilidad al vaso (Alberts *et al.*, 2002; Jensen & Cao, 2017). Los capilares son los encargados del intercambio de sustancias con el resto de tejidos y pueden ser de distintos tipos – continuos, fenestrados o sinusoides – en función del órgano donde se localicen y de las necesidades de aporte y retirada de metabolitos del órgano o tejido en cuestión (Okada *et al.*, 2017).

Existen diferentes modos de crecimiento vascular. En las primeras etapas del desarrollo embrionario, en concreto durante la gastrulación, tiene lugar la formación de los primeros vasos del sistema circulatorio mediante el fenómeno de vasculogénesis (Czirok y Little, 2001; Wolf *et al.*, 2018). Estos vasos sanguíneos se forman *de novo* a partir de unas células de origen mesodérmico llamadas angioblastos. Estos precursores de las células endoteliales primero se agregan en islas y posteriormente se organizan formando estructuras capilares que constituyen el llamado plexo capilar primario (Risau, 1997; Papetii & Herman, 2002), que mediante la angiogénesis se expande y forma las redes jerarquizadas anteriormente mencionadas (Risau & Flamme, 1995; Ribatti & Crivellato, 2012). Durante el resto del desarrollo embrionario, así como cuando sea necesario en el organismo adulto, la formación de vasos sanguíneos tiene lugar de forma predominante mediante el proceso de la angiogénesis (Muñoz-Chápuli, 2011; Wolf *et al.*, 2018).

Mientras que la angiogénesis tiene un papel indispensable durante el desarrollo embrionario, en el organismo adulto es un fenómeno poco frecuente, de modo que en su gran mayoría las células endoteliales se encuentran en un estado quiescente y necesitan ser estimuladas para iniciar el proceso angiogénico. El término angiogénesis engloba tanto la formación de nuevos vasos que “brotan” de los preexistentes (“*sprouting angiogenesis*”), como la división de estos últimos, que aporta complejidad a la red vascular en formación (“*non-sprouting – intussusceptive – angiogenesis*”) (Risau, 1997; Ribatti & Crivellato, 2012; Mentzer & Kondering, 2014; Díaz-Flores *et al.*, 2017).

INTRODUCCIÓN

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de la inhibición de la angiogénesis por la formación de nuevos brotes.

2. LA ANGIOGÉNESIS ESTÁ CONTROLADA POR UN EQUILIBRIO ENTRE ACTIVADORES E INHIBIDORES DEL PROCESO

Para controlar que en el organismo adulto la angiogénesis esté limitada a determinadas circunstancias fisiológicas, como son la reparación de tejidos dañados, el desarrollo del folículo ovárico durante el ciclo reproductor femenino y la vascularización asociada a la placenta durante el embarazo, este proceso se encuentra estrechamente regulado mediante el equilibrio de una compleja red de señales activadoras e inhibitoras que son secretadas tanto por las propias células endoteliales como por su entorno (Papetii & Herman, 2002; Tonini *et al.*, 2003; Carmeliet, 2005; Varricchi *et al.*, 2018). Según el modelo de activación conocido como el “interruptor angiogénico” (*angiogenic switch*) (Hanahan y Folkman, 1996), la predominancia de factores activadores de angiogénesis en el entorno endotelial conectaría el interruptor activando la angiogénesis y, por el contrario, éste se desconectaría en los casos en que las señales inhibitoras fueran las más abundantes (**Figura 1**).

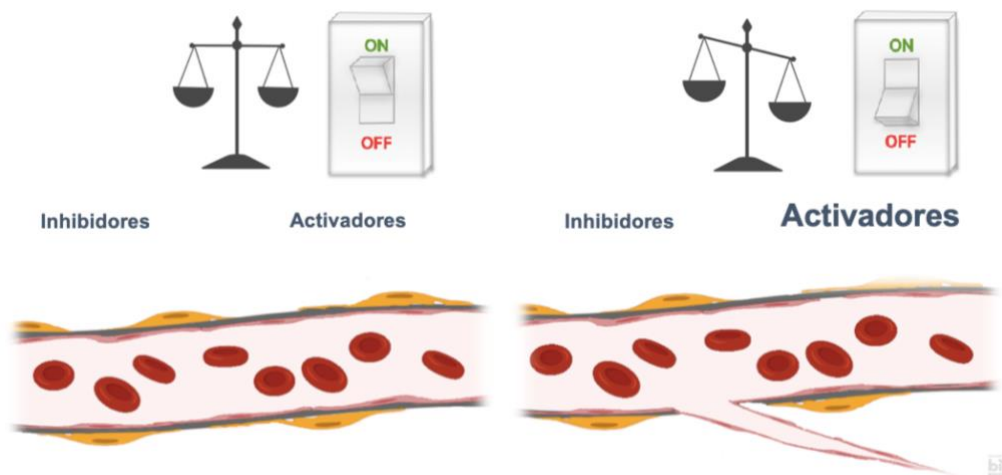


Figura 1. Encendido del “interruptor” angiogénico. En el endotelio adulto, existe un balance entre moléculas inhibitoras y activadoras de la angiogénesis que mantienen al endotelio en un estado de quiescencia. Sin embargo, este equilibrio se ve truncado en situaciones fisiológicas concretas o en determinadas patologías teniendo como consecuencia la activación del proceso angiogénico.

A continuación, se destacan las principales moléculas inhibitoras y activadoras de la angiogénesis:

- **Inhibidores endógenos de la angiogénesis:** El endotelio se mantiene quiescente en el organismo adulto gracias a la acción de una serie de inhibidores endógenos de la

angiogénesis, muchos de los cuales son proteínas o fragmentos de las mismas y que pueden clasificarse según su procedencia (**Tabla 1**).

Tabla 1. Principales inhibidores endógenos de la angiogénesis. (Modificada de Ribatti, 2009).

| Derivados de la matriz extracelular | | | |
|---|--|---------------------------------------|---|
| Arrestina | Canstatina | Integrinas de unión a la fibronectina | Trombospodina (TSP) 1 y 2 |
| Endostatina | Tumstatina | Endorrepelina | Anastelina (fragmento de la fibronectina) |
| No derivados de la matriz extracelular | | | |
| Factor pigmentario derivado del epitelio (PEDF) | Interferón α y β (INF- α y - β) | | Interleucinas IL-1 β , -4, -12, -18 |
| Fragmentos de factores coagulantes | | | |
| Angiostatina | Antitrombina III | Factor plaquetario 4 (PF-4) | Protrombina |
| Otros | | | |
| Vasostatina | 2-metoxiestradiol (2-ME) | | Troponina I |
| Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) | Fragmento de 16 kDa de la prolactina (16K-PRL) | | Fragmento no catalítico de la MMP-2 (PEX) |
| Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) | Condromodulina | | Receptor soluble de VEGF -1 (sVEGFR1) |

Muchos de los inhibidores endógenos de la angiogénesis derivan de la matrix extracelular (MEC), y se generan cuando ésta es degradada por la acción de enzimas proteolíticas (Grant y Kallur, 2005). Entre los inhibidores endógenos de la angiogénesis derivados de la MEC destacan la endostatina, la arrestina, la trombospondina, la canstatina o la tumstatina, entre otros (Carmeliet, 2005; Monboisse *et al.*, 2014; Neve *et al.*, 2014).

La *endostatina* es un péptido de 20 kDa generado del dominio C-terminal de la cadena α_1 del colágeno tipo XVIII, y constituye uno de los más potentes inhibidores endógenos de la angiogénesis (O'Reilly *et al.*, 1997). Uno de los mecanismos por los que inhibe la angiogénesis es su interferencia con rutas de señalización mediadas por señales proangiogénicas como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *Fibroblast Growth Factor*). La *trombospondina-1* (TSP-1) fue la primera proteína inhibidora endógena de angiogénesis descubierta (Good *et al.*, 1990). Se localiza asociada a la MEC por su unión a residuos de heparina y ejerce su acción inhibidora inhibiendo la proliferación de las células endoteliales, desestabilizando las uniones célula-célula en este tipo celular e induciendo su apoptosis, entre otros efectos (Taraboletti *et al.*, 1990; Iruela-Arispe *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1997; Lawler y Lawler, 2012; Huang *et al.*, 2017). Entre los inhibidores no derivados de la MEC se encuentran la *angiostatina*, un fragmento

INTRODUCCIÓN

interno de la molécula de plasminógeno, a la cual se le han atribuido mecanismos como la inhibición de la proliferación de células endoteliales o la unión a integrinas con sus consecuentes defectos en la migración de estas células, entre otros (Sato, 2006; Farnoodian *et al.*, 2017).

- **Activadores de la angiogénesis:** Las señales activadoras de la angiogénesis son mayoritariamente factores paracrinos que se unen a receptores en la superficie de las células endoteliales, iniciando cascadas de señalización que modulan la proliferación de las células endoteliales, su supervivencia, su migración o su capacidad proteolítica. Entre ellas cabe destacar los miembros de la familia de VEGF como son VEGF-A (a partir de ahora nombrado como VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PIGF, *Placental Growth Factor*), el FGF básico (FGF-b o FGF-2, *basic Fibroblast Growth Factor*) y las angiopoyetinas (Ang 1/2). Otros activadores de la angiogénesis son el factor de crecimiento epitelial (EGF, *Epithelial Growth Factor*), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*), los factores de crecimiento transformante-beta (TGF- β , *Transforming Growth Factor beta*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet-derived Growth Factor*) y citoquinas y quimiocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor alpha*) (Yadav *et al.*, 2015) y las interleucinas IL-1/-5/-6/-8/-17 (Ribatti, 2018). Además de estos factores solubles, existen elementos de la MEC que actúan como activadores de la angiogénesis. Son ejemplos las moléculas completas de colágeno tipo I, III, IV, XV o XVIII, la fibronectina, la fibrina, la vitronectina o las lamininas 1 y 8 (Neve *et al.*, 2014). En el apartado 4 se describen algunas de estas señales en el contexto de la vía de señalización por la que median su actividad en las células endoteliales.

Uno de los principales fenómenos desencadenantes de la conexión del interruptor angiogénico es la hipoxia, o descenso en la concentración tisular de oxígeno. El regulador central de la detección de oxígeno es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, *Hypoxia inducible factor 1*), un factor de transcripción heterodimérico formado por las subunidades HIF-1 α e HIF-1 β . En presencia de oxígeno (normoxia), la familia de las proil hidroxilasas (PHD, *Prolyl Hydroxylases*), hidroxilan a HIF-1 α para su ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Las PHD necesitan oxígeno para realizar su función, por tanto, en condiciones de hipoxia, estas enzimas pierden su capacidad para hidroxilar a HIF-1 α , con su consecuente acumulación en el citoplasma y su translocación al núcleo donde se une a HIF-1 β . El dímero activa la transcripción de genes diana, entre ellos, algunos factores activadores del interruptor angiogénico (Fallah y Rini, 2019; Lee *et al.*, 2019).

3. ETAPAS DEL PROCESO ANGIOGÉNICO

La angiogénesis es un proceso complejo que comprende una serie de etapas coordinadas, secuenciales e interdependientes que finalmente llevan a la aparición de nuevos vasos en tejidos donde se requiere un mayor aporte sanguíneo. Tras la unión del factor angiogénico a su receptor, las células endoteliales, normalmente en estado quiescente, adquieren un fenotipo activado que les facilita degradar la MEC circundante, proliferar y migrar hacia la fuente del estímulo. En las últimas etapas, las células endoteliales retornan al estado quiescente y forman el lumen de los nuevos vasos que, finalmente, serán estabilizados mediante el reclutamiento y superposición de las células murales y la formación de una nueva lámina basal (Quesada *et al.*, 2004; Ribatti & Crivellato, 2012) (**Figura 2**). Estas etapas se describen con algo más de detalle a continuación.

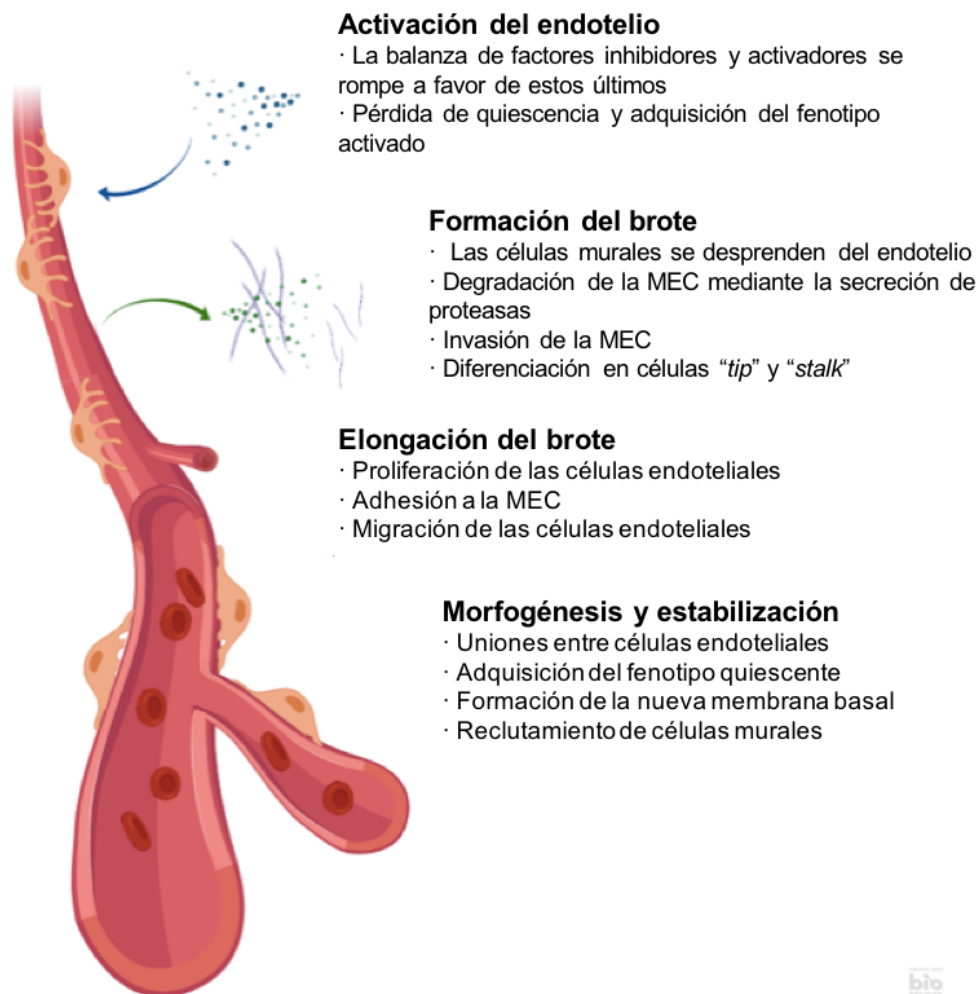


Figura 2. Esquema de las etapas de la angiogénesis y los principales procesos que ocurren en cada una de ellas.

INTRODUCCIÓN

a. Activación de las células endoteliales

Como se ha mencionado anteriormente, los factores angiogénicos se unen a sus receptores transmembrana en las células endoteliales, iniciando una serie de cascadas de transducción de señales que se traducen en cambios tanto en las propias células endoteliales, con la consecuente activación de los diferentes procesos involucrados en la angiogénesis, así como en su entorno. Muchos de estos receptores son del tipo tirosina quinasa (TQ). En estos casos la unión del ligando al receptor da lugar a la dimerización del mismo y a su activación por fosforilación cruzada en residuos de tirosina de su dominio intracelular (Zachary, 2003; Álvarez-Aznar *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2019). Cuando se hace mención a la adquisición del “fenotipo activado” o a la “activación” de la célula endotelial se alude precisamente a este cambio de comportamiento que se produce al recibir las señales angiogénicas. Fenotípicamente, las células endoteliales activadas adquieren unas características que incluyen la pérdida de uniones entre ellas, conducente a un aumento de la permeabilidad vascular, el aumento de la exposición de moléculas de adhesión a la MEC y a los leucocitos, la producción de citoquinas (Zhang *et al.*, 2010) y la adquisición las capacidades de proliferar, migrar e invadir el tejido. En cuanto a la disociación de las células murales del endotelio, que facilita la exposición de las células endoteliales al factor angiogénico, las angiopoyetinas juegan un papel esencial, sobre todo la Ang2, liberada por las células endoteliales y que estimula la disociación de estas células (Augustin *et al.*, 2009; Eklund *et al.*, 2017; Akwii *et al.*, 2019) (Figura 3).

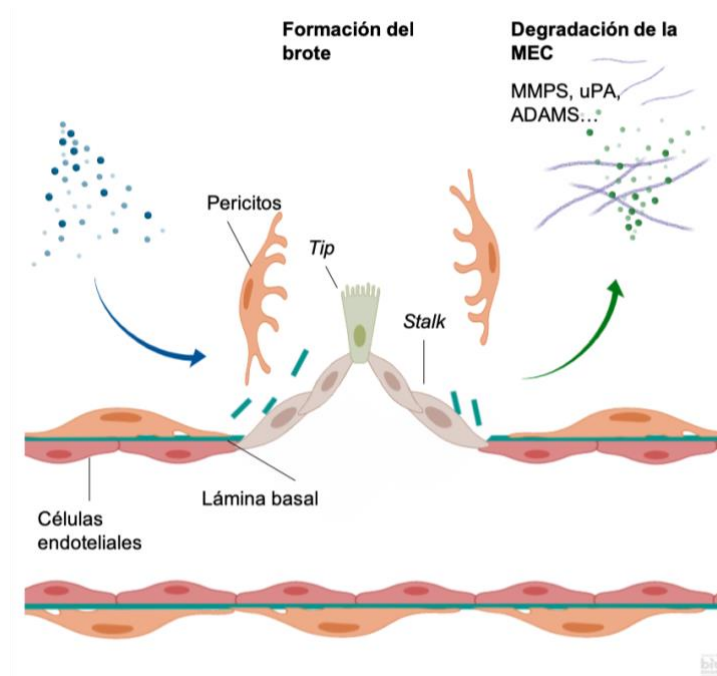


Figura 3. Inicio de la formación del brote. La activación endotelial mediante la señalización por estímulos angiogénicos conduce a cambios tanto dentro de las células, que pierden las características de células quiescentes y se diferencian en células “tip” y “stalk”, así como en el entorno, de modo que se desprenden de los pericitos y secretan proteasas para degradar la membrana basal y la matriz extracelular.

b. Degradación de la matriz extracelular

Tras su activación, las células endoteliales adquieren la capacidad de degradar la lámina basal y la MEC gracias a la producción y secreción de proteasas, como las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP, *Matrix Metalloproteinases*) entre las cuales destaca la MMP-2 o gelatinasa A, expresada de forma constitutiva por células endoteliales (Nguyen *et al.*, 2001). Otras proteasas de relevancia en el proceso son las metaloproteinasas asociadas a membrana (MT-MMP, *Membrane type-MMP*), la familia de desintegrinas y metaloproteinasas (ADAM, *A disintegrin and MMP*), y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA, *urokinase-type Plasminogen Activator*) y su receptor (uPAR, *urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*), entre otros. La actividad de estas enzimas está regulada negativamente por inhibidores, como los inhibidores tisulares de MMP (TIMP, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) o el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI, *Plasminogen Activator Inhibitor*) (Davis y Senger, 2005; Van Hinsbergh *et al.*, 2006). En la expresión de estas moléculas interviene la activación del factor de transcripción Ets-1, inducido por la unión de los factores angiogénicos a sus receptores (Oda *et al.*, 1999; Heo *et al.*, 2010) (**Figura 3**). Además, y como ya se ha mencionado, la degradación de la MEC da lugar a la liberación de factores asociados a ésta en el entorno del brote, tanto angiogénicos (Arroyo y Iruela-Arispe, 2010) como antiangiogénicos (Nyberg *et al.*, 2005), que formarán parte de los complejos mecanismos reguladores implicados en la formación del nuevo vaso.

c. Especialización de las funciones de las células endoteliales activadas

El modelo de formación del brote más aceptado distingue entre dos fenotipos morfológica y funcionalmente distintos en las células endoteliales activadas: las células de la punta (*tip cells*) y las células del tronco (*stalk cells*) (Phng y Gerhardt, 2009; Eilken y Adams, 2010) (**Figura 3**). Las células de la punta son células polarizadas, forman filopodios, y tienen capacidad de migrar, haciendo las veces de guía hacia la fuente del estímulo proangiogénico durante la formación del brote. Las células del tronco se caracterizan por ser células proliferantes, que van a intervenir en la elongación del brote y van a dar lugar al lumen del nuevo vaso (Ribatti & Crivellato, 2012; Chen *et al.*, 2019). La vía de señalización de Notch es determinante para el establecimiento de estos dos fenotipos endoteliales (Blanco y Gerhardt, 2013; Chen *et al.*, 2019), que son transitorios, ya que al finalizar el proceso angiogénico estas células volverán a adquirir el fenotipo quiescente propio del endotelio del vaso sanguíneo.

d. Elongación del brote

El crecimiento de los nuevos vasos implica la adquisición de la capacidad proliferativa por parte de las células endoteliales. En su estado quiescente, las células endoteliales presentan una tasa de proliferación muy baja. Sin embargo, durante la angiogénesis, la

INTRODUCCIÓN

división celular se activa en las células del tronco como respuesta a factores como el VEGF, el FGF-2 o el TGF- β . Una de las vías principales implicadas en el control de esta proliferación es la ruta de las quinasas activadas por mitógenos reguladas por señalización extracelular (ERK/MAPK, *Extracellular-signal-Regulated Kinases/Mitogen Activated Protein Kinases*). Además de proliferar, las células del tronco deben migrar hacia la fuente del estímulo angiogénico, guiadas por las células de la punta (**Figura 4**) (Ribatti & Crivellato, 2012; Chen *et al.*, 2019).

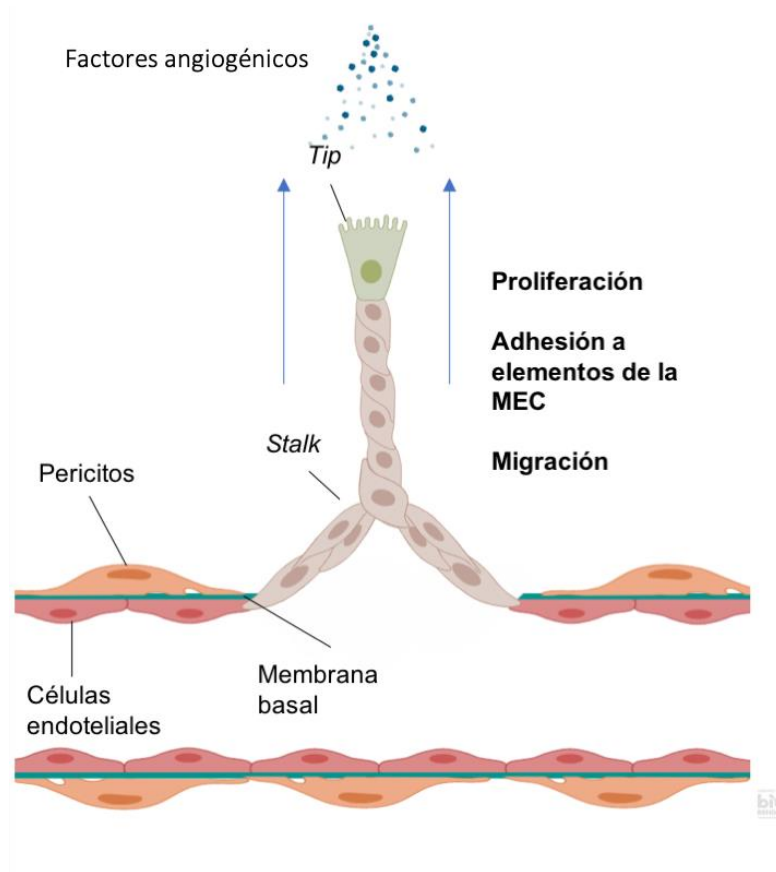


Figura 4. Elongación del brote. Una vez se ha iniciado el proceso angiogénico, las células endoteliales comienzan a proliferar y migrar siguiendo el gradiente de señales angiogénicas.

Para ello deben desorganizar sus uniones con otras células endoteliales y con la MEC, estableciendo otras nuevas en un proceso dinámico. Durante la migración se activa la expresión de determinadas moléculas que median en las uniones célula-MEC, principalmente integrinas (Davis & Sanger, 2005), mientras que se internalizan moléculas de adhesión implicadas en los contactos célula-célula, como la VE-cadherina (Schimmel y Gordon, 2018). En cuanto a la interacción con la MEC, destacan las adhesiones focales, que son áreas de la membrana celular donde se concentran quinasas asociadas a adhesiones focales (*Focal adhesion kinase*, FAK), integrinas, proteínas adaptadoras y filamentos de actina formando fibras de estrés. La activación de FAK produce cambios en la organización del citoesqueleto y a su vez activa diferentes señales involucradas en la

adhesión y movilidad celular, así como también puede afectar a rutas de supervivencia y proliferación (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001; Braren *et al.*, 2006; Zang *et al.*, 2017).

Debido a que la migración implica la pérdida del contacto entre las células endoteliales y el establecimiento de uniones dinámicas con la MEC, para evitar la apoptosis inducida por la pérdida de adhesión al sustrato (anoikis) durante la angiogénesis, se deben activar mecanismos que promuevan la supervivencia celular, siendo una de las principales vías de transducción de señales involucradas en el mantenimiento de la supervivencia la ruta de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (PKB o AKT) PI3K/AKT (Chavakis y Dimmeler, 2002; de Sousa Mesquita *et al.*, 2017).

e. Morfogénesis y estabilización de los nuevos vasos

En esta etapa final del proceso, es necesario que el estímulo angiogénico cese, y que las células endoteliales se diferencien y formen el lumen de los nuevos vasos, que serán estabilizados con el reclutamiento de células murales y la formación de la nueva lámina basal (Figura 5).

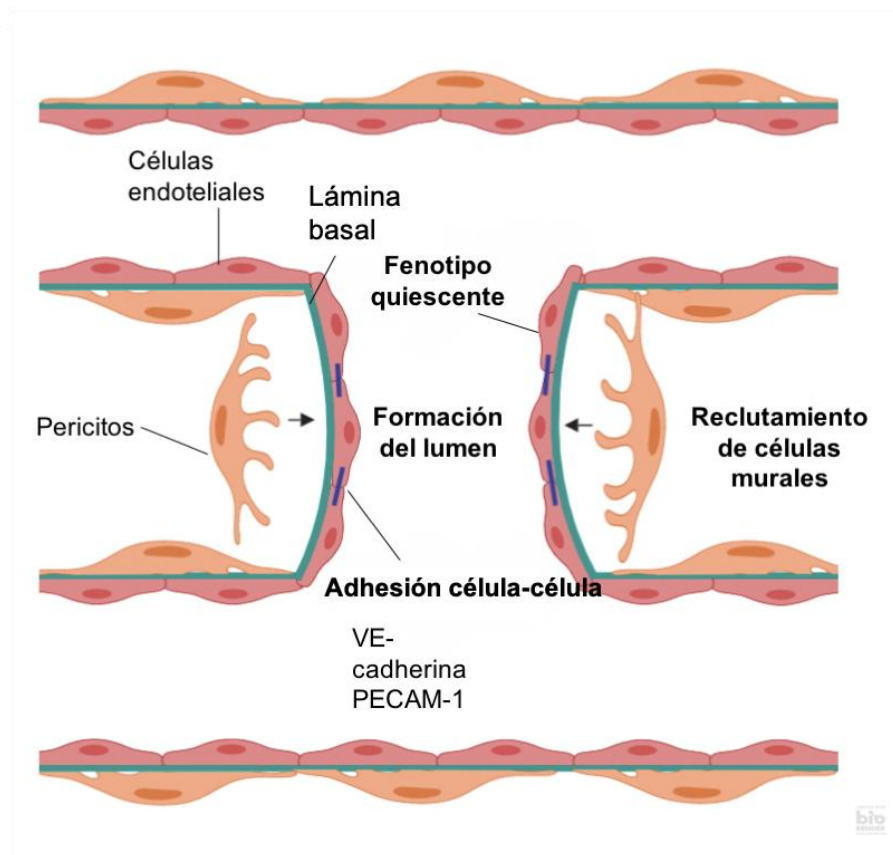


Figura 5. Morfogénesis y estabilización de los nuevos vasos. La angiogénesis finaliza con la formación de la nueva lámina basal y de uniones fuertes entre células endoteliales, la formación del lumen del nuevo vaso, el reclutamiento de células murales y la adquisición de un fenotipo quiescente.

INTRODUCCIÓN

La diferenciación supone un retorno al fenotipo quiescente. En este proceso se producen cambios en la adhesión celular, de modo que dejan de expresarse moléculas de adhesión relacionadas con la migración y vuelven a expresarse moléculas que intervienen en las uniones célula-célula en el endotelio quiescente, como la VE-cadherina (Ribatti & Crivellato, 2012). También es necesario que se forme el lumen a partir del cordón sólido de células y que se genere una nueva lámina basal (Dejana, 1996; Iruela-Arispe & Davis, 2009). Durante estos últimos pasos, se reclutan células murales que se disponen alrededor del endotelio estabilizando y contribuyendo al fenotipo quiescente, para lo cual median diversas moléculas como TGF- β , PDGF-B y angiopoyetinas (Tonini & Claudio, 2003; Potente *et al.*, 2011; Mentzer & Konerding, 2014).

Las fuerzas hemodinámicas derivadas del restablecimiento del flujo sanguíneo también intervienen en la estabilización del vaso (Potente *et al.*, 2011). Una vez formado el lumen, la sangre comienza a fluir a través del nuevo vaso y a medida que va pasando, el diámetro del lumen irá creciendo por la presión ejercida por el flujo sanguíneo (Ribatti & Crivellato, 2012). Para la formación de una nueva red capilar es necesaria la remodelación vascular, de modo que los nuevos vasos por donde transcurre el flujo sanguíneo maduran y permanecen, mientras que aquellos por donde no transcurre el flujo o es muy escaso desaparecen. En este proceso de remodelación cobran gran importancia las MMP (Davis y Senger, 2005) y la señalización por Ang/Tie (Augustin *et al.*, 2009).

4. PRINCIPALES RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA MODULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

4.1 Señalización mediada por VEGF y sus receptores

La familia de factores de crecimiento VEGF está formada por VEGF-A, -B, -C, -D y -E y el factor de crecimiento placentario (PlGF, *Placental Growth Factor*). Dentro de esta familia, el principal activador de la angiogénesis es el VEGF-A. En cuanto al resto, el VEGF-B se relaciona con angiogénesis en situaciones patológicas, mientras que VEGF-C y -D están involucrados en el control de la linfangiogénesis (proceso de formación de nuevos vasos linfáticos a partir de vasos preexistentes). PlGF se relaciona con la angiogénesis placentaria y asociada a la inflamación (Lohela *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2016) y VEGF-E (*orf*-VEGF) está codificado por el parapoxvirus zoonótico *Orf* (Ferrara *et al.*, 2003; Shibuya, 2006; Wise *et al.*, 2012).

Los distintos VEGF se unen a receptores de tipo tirosina quinasa en la membrana de las células endoteliales. Existen tres receptores diferentes de VEGF (VEGFR1, 2 y 3), con diferentes afinidades por los distintos VEGF (**Figura 6**) (Tammela *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2018).

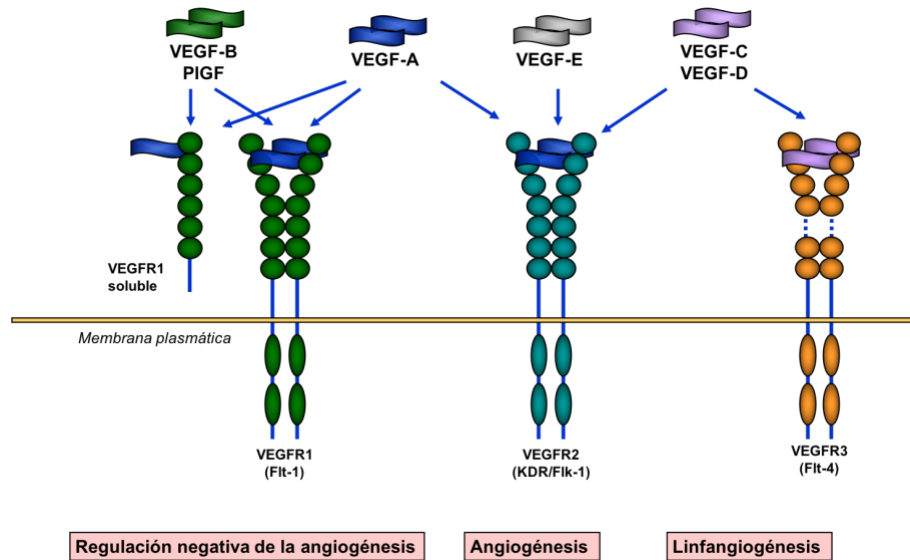


Figura 6. Tipos de receptores de VEGF, ligandos que unen y función asociada. (Figura modificada de Medina *et al.*, 2009).

El VEGFR1 (Flt-1) se expresa en células endoteliales y en otras como monocitos, macrófagos, pericitos, o células dendríticas. Es capaz de unir a VEGF-A, -B y PIGF y está involucrado en la angiogénesis durante el desarrollo embrionario y en procesos patológicos (Fong *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2018), asociándose con una regulación negativa de VEGFR2 (Koch y Claesson-Welsh, 2012). Existe una forma soluble de este receptor (sVEGFR1 o sFlt-1) que también puede actuar como inhibidor de la angiogénesis (Kendall y Thomas, 1993; Goldman *et al.*, 1998). VEGFR2 (KDR o Flk-1) es capaz de unir a VEGF-A, VEGF-E y algunas formas resultantes del procesado proteolítico de VEGF-C y -D (Shibuya, 2006; Zhang *et al.*, 2018). El receptor VEGFR3 está presente en el endotelio de los vasos linfáticos, por lo que están involucrados principalmente en linfangiogénesis y une VEGF-C y -D (McColl *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2018).

El eje VEGF/VEGFR2 es la vía mayoritaria de activación de la angiogénesis (Domingues *et al.*, 2011). Tras su activación mediante un mecanismo de dimerización y fosforilación cruzada, VEGFR2 es capaz de fosforilar a diferentes proteínas que contienen dominios SH2 (*Src Homology 2*) involucradas en la transducción de señales mitogénicas y quimiotácticas (Muñoz-Chápuli *et al.*, 2004; Ribatti y Crivellato, 2012).

La activación de VEGFR2 promueve la supervivencia y la proliferación celular a través de la señalización mediada por ERK/MAPK. Esta transducción de señales culmina con la activación de factores de transcripción involucrados en la proliferación celular (Mavria *et al.*, 2006), y la vía de señalización de PI3K AKT (Karar & Maity, 2011) (**Figura 7**).

INTRODUCCIÓN

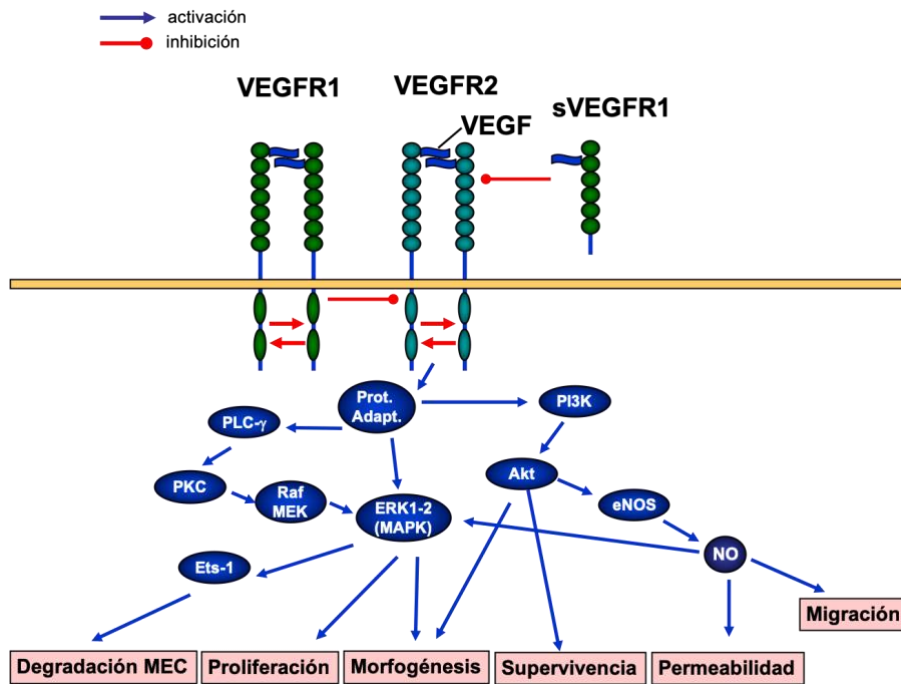


Figura 7. Vías de señalización y procesos activados por VEGFR2. La unión del ligando conduce a la dimerización de estos receptores tirosina quinasa, teniendo como consecuencia su activación mediante fosforilación cruzada que, a su vez, permite la activación de proteínas adaptadoras iniciando diferentes cascadas de señalización implicadas en procesos clave en angiogénesis (Figura modificada de Medina *et al.*, 2009).

VEGFR2 puede activar la ruta de ERK/MAPK de dos formas. La primera es mediante la activación de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ , *Phospholipase C- γ*), que utiliza fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato para producir diacilglicerol e inositol-fosfato, con la consecuente liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. Ello conlleva la activación secuencial de la proteína quinasa C (PKC, *Protein kinase C*), que a su vez activa la serina/treonina quinasa Raf, que activa a la quinasa de MAPK (MEK, *MAPK kinase*) que, finalmente, activa a ERK-MAPK (Peach *et al.*, 2018). La segunda es a través de proteínas adaptadoras como Shc o Skc, que llevan al acoplamiento de Grb2 al factor intercambiador de nucleótidos Sos, que a su vez activa a la GTPasa Ras. Ras es el principal activador de la serina-treonina quinasa Raf, que comienza una cascada de señalización que lleva a la activación consecutiva de MEK1/2 y ERK-MAPK (Takahashi *et al.*, 1999; Muñoz-Chápuli *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2019).

Otra de las quinasas activadas por VEGFR2 es PI3K, que a su vez puede activar a AKT (Kim y Chung, 2002). La activación de AKT promueve la supervivencia a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, *endothelial Nitric Oxide Synthase*), lo que conlleva un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) que conduce tanto a la supervivencia como a la proliferación, la migración y a la permeabilidad de los vasos. Además, AKT suprime la apoptosis mediante la inhibición de proteínas proapoptóticas, como Bad, Bax o caspasas, así como mediante la inducción de

la expresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP, *Inhibitor of Apoptosis Proteins*), a través de la activación del factor de transcripción NF κ B (Datta *et al.*, 1997; Buckley *et al.*, 1999; Yamaguchi y Wang, 2001; Li *et al.*, 2012).

Además de a través de la producción de NO, la activación de VEGFR2 promueve la permeabilidad vascular mediante la fosforilación e internalización de moléculas de superficie que participan en la unión célula-célula, como la VE-cadherina (Koch y Claesson-Welsh, 2012). También promueve la migración a través de la unión con integrinas, lo que conlleva la activación de FAK y de la cascada mediada por p38-MAPK, involucradas, respectivamente, con la formación de adhesiones focales y la polimerización de la actina (Cross y Claesson-Welsh, 2001; Koch y Claesson-Welsh, 2012). VEGFR2 activa otros procesos de relevancia en angiogénesis, como la degradación de la MEC a través de la inducción de la expresión de enzimas proteolíticas, como las MMP o el uPA, mediada por la proteína Ets-1 (Sato, 2001). Finalmente, junto con VEGFR1 y los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR, *Fibroblast Growth Factor Receptors*), promueven la diferenciación y morfogénesis vascular (Stratman *et al.*, 2011).

4.2 Señalización mediada por FGF y sus receptores

La familia de proteínas del FGF está formada por 23 miembros (Imamura, 2014) que se unen a los receptores de tipo tirosina quinasa de FGF (FGFR1, 2, 3 y 4) (Cross y Claesson-Welsh, 2001) a moléculas de heparán-sulfato proteoglicanos y a integrinas (Crivellato, 2011). La unión de FGF a sus receptores está implicada en la activación de vías de señalización celular claves en la angiogénesis.

El principal ligando de esta familia implicado en angiogénesis es el FGF-2, que fue el primer factor proangiogénico descrito (Shing *et al.*, 1984). La vía de señalización mediada por FGF-2/FGFR1 juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de los vasos y la homeostasis de las células endoteliales controlando la activación de los procesos de degradación de la MEC, proliferación, supervivencia, migración y morfogénesis (Yang *et al.*, 2015). De forma similar a lo explicado para VEGFR2, la unión de FGF-2 a su receptor provoca su dimerización y autofosforilación, activando diferentes vías de señalización involucradas en procesos clave implicados en la angiogénesis. Así, activa la proliferación, migración y diferenciación celular, a través de PI3K/AKT y Ras-MAPK (Larsson *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2007). También activa a la PLC- γ , lo cual conlleva cambios en la organización del citoesqueleto y la activación de la PKC (Cross *et al.*, 2000; Maffucci *et al.*, 2009), de gran importancia en el control de la migración celular (Figura 8).

INTRODUCCIÓN

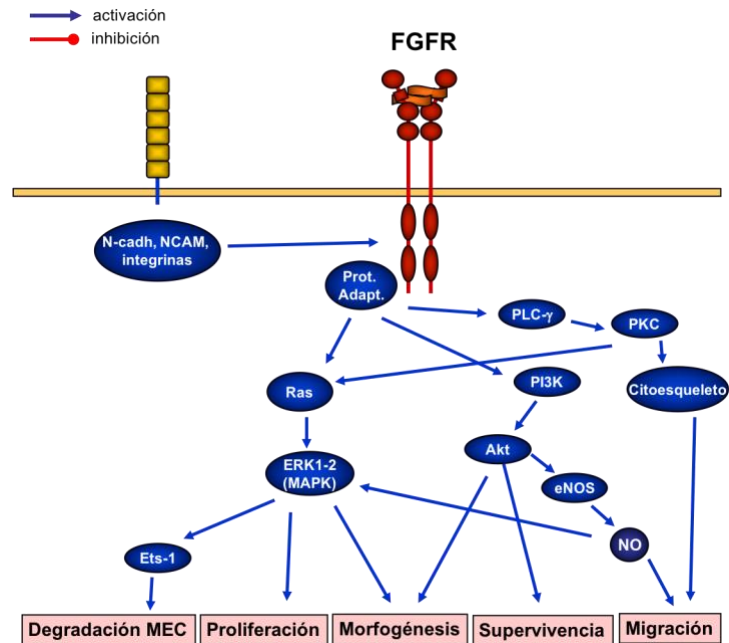


Figura 8. Vías de señalización y procesos activados por FGFR. (Figura modificada de Medina *et al.*, 2009).

El receptor FGFR1 también se puede activar por vías no canónicas o independientes de la unión al ligando, mediante la interacción con otras moléculas de la membrana celular como la N-cadherina, NCAM (*Neural cell adhesion molecule*), las integrinas o los síndecanos (Murakami *et al.*, 2007).

Por último, la importancia de la señalización por mediada por los FGFR en la angiogénesis no radica exclusivamente en su actuación sobre las células endoteliales, sino que también estimula el crecimiento, la migración y la plasticidad fenotípica de las células murales (Yang *et al.*, 2015).

5. ANGIOGÉNESIS EN CONDICIONES PATOLÓGICAS

El estricto mecanismo de control en el tiempo y en el espacio al que está sometida la angiogénesis asegura su activación sólo cuando es necesaria, la correcta modulación en cada uno de sus pasos, y su desactivación cuando el estímulo cesa. A pesar de ello, este proceso se encuentra desregulado en diversas patologías, tanto por exceso como por defecto en la activación, contribuyendo al inicio o al progreso de las mismas. Hay una larga lista de enfermedades dependientes de angiogénesis en las que se observan defectos en su regulación, y con el paso del tiempo esta lista sigue aumentando (Carmeliet, 2003).

Existen patologías relacionadas con una angiogénesis insuficiente, en las que se producen malformaciones en los vasos o regresión vascular, con un defecto en la irrigación de los tejidos. Son ejemplos la diabetes, la reestenosis aórtica, el ictus, trastornos neurodegenerativos (como el Alzheimer), la osteoporosis, la preeclampsia o la

alopecia (Bhise *et al.*, 2001; Carmeliet, 2005). En estos casos, las estrategias terapéuticas van encaminadas a una promoción de la angiogénesis y persiguen un aumento del riego sanguíneo, por ejemplo, en la regeneración ósea o tisular o en diferentes enfermedades neurodegenerativas.

En contraposición, existen patologías en las que se produce un exceso de angiogénesis, ya sea por una activación incorrecta, o por la persistencia en el tiempo de una angiogénesis no resuelta. Entre las enfermedades relacionadas con un exceso de angiogénesis se encuentran el cáncer, la artritis, la psoriasis, las retinopatías diabéticas, la endometriosis, la aterosclerosis, la degeneración macular asociada a la edad y diferentes trastornos metabólicos, inflamatorios o infecciosos (Carmeliet, 2005; Quesada *et al.*, 2006). Precisamente por la dependencia de la angiogénesis que presentan estas enfermedades, las terapias dirigidas a activar el proceso cuando éste es defectivo o a inactivarlo cuando es excesivo, representan una interesante estrategia para el tratamiento de las mismas. Este tipo de terapias se fundamentan en el modelo del *interruptor angiogénico*, mencionado en apartados anteriores, de modo que su conexión (angiogénesis terapéutica) o desconexión (terapia antiangiogénica) mediante la intervención farmacológica podrían ser de utilidad en el tratamiento de los pacientes que sufren estas patologías (Figura 9).

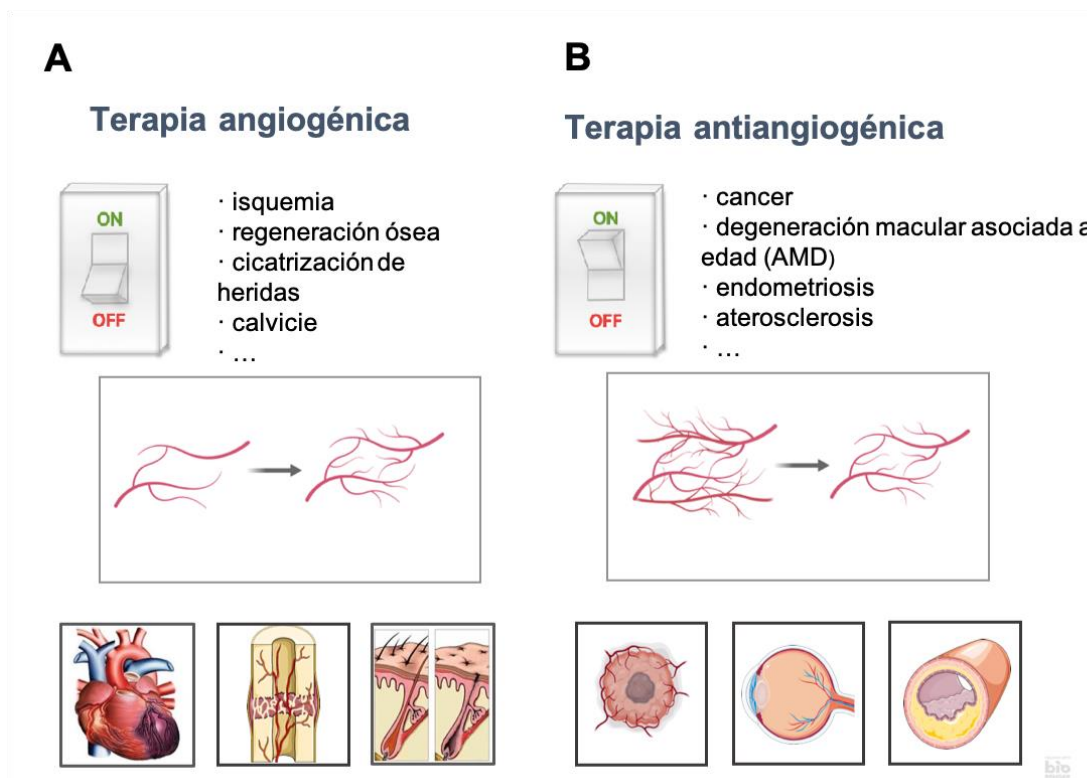


Figura 9. Terapias basadas en la modulación de la angiogénesis. **A.** La terapia angiogénica se basa en la inducción de la angiogénesis en patologías donde un mayor aporte de sangre resulta beneficioso. **B.** La terapia antiangiogénica se basa en la inhibición de la angiogénesis en patologías caracterizadas por un exceso de formación de nuevos vasos.

INTRODUCCIÓN

5.1 La angiogénesis como señal de identidad del cáncer

La activación de la angiogénesis es fundamental durante el inicio y la progresión de los tumores sólidos, constituyendo una señal de identidad del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011). Los tumores necesitan disponer de una red de vasos para mantener el intercambio de nutrientes y oxígeno, y para eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono, al igual que ocurre en tejidos sanos, estimándose que la masa tumoral no podría crecer más de 2mm de diámetro si no se vascularizase (Folkman, 1971). Por ello, los tumores aseguran su crecimiento mediante la activación crónica del “interruptor angiogénico”, liberando factores angiogénicos como el VEGF. En la mayoría de los casos, es la hipoxia el factor desencadenante de la expresión de VEGF por las células tumorales, aunque también algunos oncogenes pueden ser determinantes para esta activación (Ferrara, 2009). Además de ser determinante para el desarrollo tumoral, la activación de la angiogénesis y la consecuente vascularización del tumor suponen una vía de diseminación de las células transformadas durante la metástasis, las cuales se desprenden de la masa tumoral y pasan a la circulación sanguínea por un proceso conocido como extravasación (Fidler, 2003; Valastyan y Weinberg, 2011).

Las células tumorales no son las únicas responsables en liberar factores proangiogénicos, sino que otros tipos celulares dentro del microambiente tumoral (macrófagos, neutrófilos, mastocitos, leucocitos, fibroblastos, entre otros) también contribuyen a la activación de la angiogénesis (De Palma *et al.*, 2017). Debido precisamente al exceso de señales proangiogénicas, la regulación de la angiogénesis en los tumores es deficiente y los vasos que se producen en este contexto son anormales tanto funcional como estructuralmente (Potente *et al.*, 2011). También se aprecian menos pericitos cubriendo estos nuevos vasos, siendo muy permeables, lo que favorece la extravasación de las células tumorales durante la metástasis (Papetti y Herman, 2002; Potente *et al.*, 2011; Al-Abd *et al.*, 2017).

En base a la dependencia que presentan los tumores a la angiogénesis, la aplicación de la terapia antiangiogénica supone una estrategia muy explorada en el campo de la biomedicina. En el siguiente apartado se tratará en mayor profundidad la terapia basada en la inhibición de la angiogénesis y los fármacos antiangiogénicos aprobados actualmente para su uso clínico.

5.2 Terapias antitumorales basadas en la inhibición de la angiogénesis

A pesar de que el desarrollo de las terapias antiangiogénicas ha estado mayormente dirigido al tratamiento del cáncer, actualmente su abanico de estudio y aplicación no se limita a los tumores, sino que es mucho más amplio, incluyendo otras enfermedades dependientes de la activación de la angiogénesis. Cabe destacar entre ellas, la aplicación

de fármacos anti-VEGF para algunos de los tipos de ceguera más prevalentes en países civilizados (Fogli *et al.*, 2018).

Entre las ventajas que presenta la terapia antiangiogénica del cáncer se incluyen: (1) la estabilidad genética de las células endoteliales, lo que, en principio, supone una menor aparición de resistencia a fármacos por parte de estas células; (2) la expresión de marcadores específicos por parte del endotelio activado frente al endotelio quiescente, lo que supone una mayor especificidad en la diana; (3) el contacto directo de las células endoteliales con la sangre, por lo que tienen un acceso directo a los fármacos suministrados de forma sistémica; (4) su aplicación a diferentes tipos de cáncer, pues comparten similares mecanismos de vascularización (Quesada *et al.*, 2006).

Debido a la importancia del eje VEGF/VEGFR2 en la activación de la angiogénesis, esta vía de señalización ha supuesto la principal diana en la terapia antiangiogénica. Esta inhibición se puede dar a diferentes niveles, entre los que destacan: (1) moléculas que se unen al ligando impidiendo su unión al receptor, como es el caso del bevacizumab (*Avastin*, Roche), un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF-A; (2) moléculas que se unen al receptor impidiendo la unión del ligando, como el ramucirumab (*Cyramza*, Lilly Medical), un anticuerpo monoclonal anti-VEGFR2; (3) inhibidores de la actividad tirosina quinasa que bloquean la señalización a partir del receptor, como el sunitinib (*Sutent*, Pfizer) o el sorafenib (*Nexavar*, Bayer).

A día de hoy existe un buen número de fármacos antiangiogénicos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*), muchos de los cuales se recogen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Fármacos antiangiogénicos aprobados por la FDA/EMA para el tratamiento de tumores sólidos. (Fuentes: <https://www.cancer.gov>, Al-Abd *et al.*, 2017, García-Caballero *et al.*, 2018)

| Fármaco | Mecanismo de acción | Diana molecular | Tipo de tumor |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------|---|
| Bevacizumab (Avastin) | Anticuerpo monoclonal que une VEGF | VEGF | CCM, CPCNP, OC, CMM, glioblastoma, CCR, cáncer endometrial, mesotelioma y cáncer cervical |
| Ziv-aflibercept (Zaltrap) | Trampa de VEGF (proteína de fusión) | VEGFA/B, PlGF | CCM |
| Ramucirumab (Cyramza) | Anticuerpo monoclonal contra VEGFR2 | VEGFR2 | CCM, CPCNP, adenocarcinoma gástrico |
| Cabozantinib (Cometriq) | Inhibidor TQ | VEGFR2, Tie2 | CCR refractario avanzado, CT medular metastásico, TNP |
| Cediranib | Inhibidor TQ | VEGFR1/3 | CO |

INTRODUCCIÓN

| Fármaco | Mecanismo de acción | Diana molecular | Tipo de tumor |
|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|--|
| Axitinib (Inlyta) | Inhibidor TQ | VEGFR1/3, PDGFR β | CCR avanzado |
| Lenalidomide (Revlimid) | Aminoácido | VEGF, FGF-2 | Mieloma, LCM |
| Lenvatinib mesylate (Lenvima) | Inhibidor TQ | VEGFR1/3, PDGFR β , FGF1/4 | CT, CH, CCR |
| Pazopanib (Votrient) | Inhibidor TQ | VEGFR1/3, PDGFR β , FGF1/2 | CTB metastásico y CCR avanzado |
| Regorafenib (Stivarga) | Inhibidor TQ | VEGFR1/3, PDGFR β , FGF1/2 | CCM, CH, TEG |
| Sorafenib (Nexavar) | Inhibidor TQ | VEGFR2, PDGFR β | CCR avanzado, CT metastásico diferenciado, CH |
| Sunitinib (Sutent) | Inhibidor TQ | VEGFR1/2, PDGFR β | CCR metastásico, TEG, TNP |
| Vandetanib (Caprelsa) | Inhibidor TQ | VEGFR2 | TC metastásico |
| Nintedanib (Ofev) | Inhibidor TQ | VEGFR1/3, FGFR1/3, PDGFR | Cáncer de pulmón |
| Temsirolimus (Torisel) | Inhibidor TQ | mTOR | CCR |
| Everolimus (Afinitor) | Inhibidor TQ | mTOR | CCR, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer de mama avanzado, TNP, ASCG |

Tirosina quinasa (TQ), Carcinoma colorectal metastásico (CCM), Carcinoma de células renales (CCR), Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), Cáncer de ovario (CO), Cáncer de mama metastásico (CMM), Carcinoma hepatocelular (CH), Carcinoma de tiroides (CT), Carcinoma de tejido blando (CTB), Tumores neuroendocrinos pancreáticos (TNP), astrocitoma supratentorial de células gigantes (ASCG), Linfoma de células del manto (LCM), Tumores del estroma gastrointestinal (TEG).

A pesar de las grandes expectativas en torno al uso de terapias antiangiogénicas para el tratamiento del cáncer, los resultados clínicos a veces no han sido tan positivos como se esperaba. En ocasiones los beneficios derivados del uso de estos fármacos a corto plazo no han demostrado ser extrapolables a largo plazo, observándose que existe mucha variabilidad en cuanto a la respuesta a los inhibidores en distintos tipos de tumores y pacientes (Potente 2011; Bellou *et al.*, 2013; Annese *et al.*, 2019).

Se han descrito diversos mecanismos que explicarían la resistencia de los tumores al bloqueo de la vía del VEGF, en ocasiones debida a la activación de vías alternativas que de vascularización tumoral (Bellou *et al.*, 2013; Vasudev y Reynolds, 2014; Zhao y Adjei, 2015). Así, frente al bloqueo del eje VEGF/VEGFR2, la angiogénesis puede seguir activa por mediación de otros factores angiogénicos o por la aparición de mecanismos de vascularización alternativos a la angiogénesis, como pueden ser la vasculogénesis o el mimetismo vascular, entre otros (Bergers y Hanahan, 2008; Maj *et al.*, 2016). Una forma

de evitar el efecto de la aparición de estos mecanismos compensatorios sería el uso de aproximaciones terapéuticas que combinen fármacos antiangiogénicos con diferentes dianas, o bien la terapia antiangiogénica combinada con quimioterapia o radioterapia (Van Beijnum *et al.*, 2015).

6. COMPUESTOS ANTIANGIOGÉNICOS NATURALES Y SUS DERIVADOS SINTÉTICOS

La medicina se ha basado desde tiempos inmemoriales en la utilización de recursos naturales (en su mayoría plantas) para el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias. La naturaleza constituye una fuente muy prolífica de compuestos con interés terapéutico y por ello el descubrimiento y la caracterización de compuestos naturales con propiedades bioactivas es uno de los retos más prometedores en la investigación farmacológica y biomédica.

Dependiendo del origen de las moléculas, los agentes terapéuticos pueden ser naturales, sintéticos o semi-sintéticos. Los compuestos semi-sintéticos son moléculas híbridas generadas a partir de la estructura de una molécula natural mediante modificaciones químicas (Feher y Schmidt, 2003). Estos derivados pueden suponer una mejora de las propiedades bioactivas del compuesto original o en su farmacocinética. En la actualidad, una gran cantidad de fármacos aprobados por la US FDA se basan en moléculas de origen natural o en otras derivadas de éstas. Como ejemplo, de las 175 moléculas de pequeño tamaño aprobadas para el tratamiento del cáncer desde 1940 a 2014, el 49% fueron productos naturales o compuestos directamente derivados de productos naturales (Newman y Cragg, 2016).

6.1 Las esponjas de mar como fuente de compuestos antiangiogénicos

Los organismos marinos, como hongos, algas, cianobacterias o esponjas de mar, representan una enorme fuente de compuestos bioactivos. Dentro de estos organismos, destacan las esponjas (*phylum Porifera*) (Mehbub *et al.*, 2014). Las esponjas presentan unas características anatómicas y fisiológicas (cuerpo blando y modo de vida sésil) que determinan la presencia de un gran número de metabolitos secundarios con funciones defensivas. Aseguran de esta forma su supervivencia en un entorno hostil en el que están expuestas a los ataques de depredadores (tortugas y peces), la colonización por parte de otros organismos y a las infecciones bacterianas (Thoms *et al.*, 2006). La estructura química de estos metabolitos secundarios es muy diversa, incluyendo una larga lista de compuestos alcaloides, péptidos, terpenos, esteroides, isoprenoides, o quinonas entre otros (Sipkema *et al.*, 2005; Kotoku *et al.*, 2016). En muchas ocasiones, los metabolitos derivados de esponjas presentan características inusuales en su estructura que los hacen especialmente interesantes para la investigación farmacológica (Yu y Van Gunsteren, 2004; Mehbub *et al.*, 2013). De esta forma, estos compuestos derivados de esponjas presentan un amplio abanico de actividades biológicas con aplicaciones terapéuticas

INTRODUCCIÓN

como antivirales, antifúngicos, antitumorales, antiinflamatorios o antiangiogénicos (Spikema et al., 2005; Perdicaris *et al.*, 2013; Mehbub et al., 2014).

En cuanto a su actividad como antiangiogénicos, los compuestos aislados de las esponjas pueden inhibir la angiogénesis a distintos niveles, desde la activación mediada por la hipoxia y por los factores de crecimiento VEGF y FGF-2 hasta la morfogénesis de los nuevos vasos y suelen hacerlo afectando a las topoisomerasas, la polimerización de tubulina o modulando el balance entre moléculas pro y antiapoptóticas (Senthilkumar *et al.*, 2013). Algunos de los compuestos derivados de esponjas que han demostrado poseer actividad antiangiogénica se presentan en la (Tabla 3).

TABLA 3. Compuestos obtenidos de esponjas de mar con propiedades antiangiogénicas.

| Compuesto | Fuente | Mecanismo de acción | Referencia |
|------------------------|---|--|--|
| Aeroplisinina-1 (AE-1) | <i>Aerophysia aerophoba</i> | Inhibe: proliferación, migración, morfogénesis, expresión de diferentes citokinas, de MMPs y de marcadores pro-angiogénicos Regula el balance Redox | Rodríguez-Nieto et al., 2002 Martínez-Poveda <i>et al.</i> , 2013 García-Vilas <i>et al.</i> , 2016 García-Vilas <i>et al.</i> , 2018 |
| Ácidos globosteláicos | <i>Rhabdastrella globostellata</i> | Inhibe; proliferación, migración inducida por VEGF y morfogénesis inducida por FGF-2 | Aoki et al., 2007 ^a |
| Ageladina A | <i>Agelas nakamurai</i> | Induce: apoptosis Inhibe: proliferación y producción de MMPs | Fujita <i>et al.</i> , 2003 |
| Azumamidas | <i>Mycale izuensis</i> | Inhiben: histona deacetilasas | Nakao <i>et al.</i> , 2006 Nakao <i>et al.</i> , 2008 |
| Bastadina-6 | <i>Ianthella basta</i> | Inhibe: migración y morfogénesis inducidas por VEGF y FGF-2 | Aoki <i>et al.</i> , 2006a Kotoku <i>et al.</i> , 2008 |
| Cortistatinas | <i>Corticium simplex</i> | Induce: apoptosis Inhiben: proliferación, migración inducida por VEGF y morfogénesis inducida por FGF-2 | Aoki <i>et al.</i> , 2006b Aoki <i>et al.</i> , 2007b |
| Lembehsteroles A y B | <i>Petrosia strongylata</i> | Inhiben: timidina fosforilasa | Aoki <i>et al.</i> , 2002 |
| Psammaplina A | <i>Poecillastra</i> sp y <i>Jaspis</i> sp | Inhibe: aminopeptidasa N, proliferación, invasión y morfogénesis en células endoteliales estimuladas con FGF-2 | Shim <i>et al.</i> , 2004 |
| Compuesto | Fuente | Mecanismo de acción | Referencia |

| | | | |
|--------------------------|--|---|---|
| Puupehenonas | Órdenes <i>Verongida</i> y <i>Dictyoceratida</i> | Inhiben: migración, invasión, morfogénesis Inducen: apoptosis | Castro <i>et al.</i> , 2004 Martínez-Poveda <i>et al.</i> , 2017 |
| Motuporaminas | <i>Xestospongia exigua</i> | Inhiben: invasión y activación de integrina- β 1 | Roskelley <i>et al.</i> , 2001 Williams <i>et al.</i> , 2002 |
| Smenospongina | <i>Dactylospongia elegans</i> | Inhibe: proliferación, migración, morfogénesis | Kong <i>et al.</i> , 2011 |
| Spongistatina 1 | <i>Hyrtios erecta</i> | Inhibe: polimerización de microtúbulos, proliferación, migración, morfogénesis y PKC α | Rothmeier <i>et al.</i> , 2009 |
| 1,3-dimetilisoguanidinio | <i>Amphimedon paraviridis</i> | Inhibe: proliferación de células endoteliales inducida por FGF-2 y morfogénesis | Jeong <i>et al.</i> , 2003 |

En esta Tesis Doctoral se ha evaluado la actividad biológica de una serie de compuestos de síntesis precursores de la *solomonamida A*, cuyo potencial antiinflamatorio se había descrito previamente (Festa *et al.*, 2011; Jachak *et al.*, 2018). Los detalles acerca de este compuesto y sus efectos como inhibidor del crecimiento tumoral y la angiogénesis se exponen en el Capítulo I de la sección de Resultados y Discusión.

6.2 Las plantas como fuente de compuestos antiangiogénicos

Las plantas representan el paradigma de fuente natural de compuestos con potencial terapéutico. Existen registros históricos del uso de plantas medicinales desde el año 2600 a.C. en la cultura mesopotámica y su utilización se ha extendido desde entonces dentro de lo que ahora denominamos “medicina tradicional”, en base a un conocimiento observacional y empírico. El aislamiento, cristalización y estudio de las propiedades farmacológicas de la morfina en 1817 supuso el inicio del descubrimiento racional de fármacos. A partir de entonces se han caracterizado un amplio conjunto de productos bioactivos terapéuticos derivados de las plantas (Atanasov *et al.*, 2015). Estos compuestos suelen ser metabolitos secundarios de muy variada naturaleza química (alcaloides, terpenos, flavonoides...) que pueden estar presentes tanto en la planta como en los frutos, y cumplen funciones muy variadas (de defensa, de atracción para polinización, fitohormonas...). Presentan un abanico muy amplio de propiedades bioactivas: antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, antiangiogénica, etc., y muchos de ellos están aprobados actualmente por la US FDA para el tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Sun *et al.*, 2015).

INTRODUCCIÓN

La **Tabla 4** resume algunos compuestos derivados de plantas que presentan actividad antiangiogénica. Entre ellos, destacan los compuestos fenólicos. Uno de los aspectos remarcables de este tipo de compuestos es que causan menor resistencia a fármacos (Ribeiro *et al.*, 2018). Son ejemplos la curcumina, el resveratrol, los flavonoides o la genisteína (Fan *et al.*, 2006; Varinska *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2016). También destacan los alcaloides, como la vinblastina; los terpenoides y taninos, como los ginsenoides o el taxol, y diferentes extractos de plantas (Lu *et al.*, 2016). Otros, son fitohormonas que se encargan de regular diferentes procesos en el desarrollo, metabolismo o relación de las plantas con el entorno.

Tabla 4. Compuestos obtenidos de plantas con propiedades antiangiogénicas.

| Compuesto | Fuente | Mecanismo de acción | Referencia |
|--|--|--|---|
| Ácido abscísico (ABA) | Todas las plantas | Inhibe: proliferación, migración morfogénesis, diferenciación células <i>tip</i> y <i>stalk</i> | Chaour <i>et al.</i> , 2018 |
| Ácido cafeico | <i>Coffea</i> sp. | Inhibe: ROS y expresión de VEGF, STAT3 e HIF1 α | Jung <i>et al.</i> , 2007 Kim <i>et al.</i> , 2009a |
| Ácido rosmarínico | Familia <i>Lamiaceae</i> (romero, albahaca, tomillo, menta...) | Inhibe: proliferación, adhesión, migración y morfogénesis, expresión de VEGF dependiente de ROS, NF- κ B y liberación IL-8 Induce: p21 | Huang y Zheng, 2006 Kim <i>et al.</i> , 2009b Cao <i>et al.</i> , 2016 |
| Ácido ursólico | Familia <i>Lamiaceae</i> y piel de algunas frutas (manzanas, ciruelas, peras...) | Inhibe: VEGF e iNOS, proliferación, migración, invasión y producción de MMP Induce: TIMP-1 | Cárdenas <i>et al.</i> , 2004 Kanjoomana y Kuttan, 2010 |
| Aloe emodina | Género <i>Aloe</i> | Inhibe: HIF1 α y VEGF, proliferación, migración, invasión, morfogénesis y producción de MMP | Cárdenas <i>et al.</i> , 2006 Wu <i>et al.</i> , 2016 |
| Brasinoesteroides y derivados sintéticos | Todas las plantas | Inhiben: migración, morfogénesis, FAK, VEGFR2, ERK 1/2, CDK5 Agonistas/antagonistas de receptores de estrógenos | Rárová <i>et al.</i> , 2012 Rárová <i>et al.</i> , 2018 |
| Carnosol | <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) | Inhibe: proliferación, migración, morfogénesis, producción de MMP Induce: apoptosis | Kayashima y Matsubara, 2012 López-Jiménez <i>et al.</i> , 2013 |
| Catequinas | <i>Camellia sinensis</i> (Té verde) | Inhibe: producción de MMP, fosforilación de AKT y VE-cadherina, señalización por VEGF y FGF-2 y migración | Kojima-Yuasa <i>et al.</i> , 2003 Tang <i>et al.</i> , 2003 Lai <i>et al.</i> , 2004 Yamakawa <i>et al.</i> , 2004 |
| Combretastatinas | <i>Combretum caffrum</i> (Sauce africano) | Inhibe: proliferación, migración, morfogénesis, fosforilación de FAK y de VE-cadherina dependiente de VEGF Desestabilizador de microtúbulos | Ahmed <i>et al.</i> , 2003 Porcù <i>et al.</i> , 2016a |
| Curcumina | <i>Curcuma longa</i> | Inhibe: señalización por VEGF, FGF-2 y Ang 1/2, producción de MMP, migración, proliferación y diferenciación | Singh <i>et al.</i> , 1996 Arbiser <i>et al.</i> , 1998 Thaloor <i>et al.</i> , 1998 Gururaj <i>et al.</i> , 2002 |

| Compuesto | Fuente | Mecanismo de acción | Referencia |
|---------------------|---|--|---|
| Damnacanthal | <i>Morinda citrifolia</i> (Noni) | Inhibe: actividad tirosina quinasa, proliferación, supervivencia, migración y morfogénesis | García-Vilas <i>et al.</i> , 2017a |
| Genisteína* | Leguminosas | Inhibe: actividad tirosina quinasa, HIF1 α , MMP-9, NF- κ B y señalización por VEGF | Fotsis <i>et al.</i> , 1993 Wang <i>et al.</i> , 2005 Yu <i>et al.</i> , 2012 Yuliawati <i>et al.</i> , 2018 |
| Ginsengósidos** | <i>Panax ginseng</i> (Gingseng) | Inhiben: invasión, la producción de MMP Inducen: expresión de PEDF | Sato <i>et al.</i> , 1994 Lee <i>et al.</i> , 2013 Lu <i>et al.</i> , 2017 |
| Hidroxitirosol | Aceite de oliva | Inhibe: la producción de MMPS y uPA, aumenta la producción de TIMP | García-Vilas <i>et al.</i> , 2017b |
| Hiperforina | <i>Hypericum perforatum</i> (Hierba de San Juan) | Inhibe: proliferación y morfogénesis en células endoteliales, producción de MMP y uPA, señalización por VEGF | Martínez-Poveda <i>et al.</i> , 2005a Schempp <i>et al.</i> , 2005 Quiney <i>et al.</i> , 2006 |
| Hipericina | <i>Hypericum perforatum</i> (Hierba de San Juan) | Inhibe: proliferación, migración, morfogénesis, producción de MMP y la activación de ERK 1/2 por FGF-2 | Martínez-Poveda <i>et al.</i> , 2005b Lavie <i>et al.</i> , 2005 |
| Kahweol | <i>Coffea arabica</i> | Inhibe: proliferación, migración, producción de MMP y morfogénesis | Cárdenas <i>et al.</i> , 2011 |
| Resveratrol | Uvas y frutos rojos | Inhibe: proliferación, migración, señalización por VEGF y FGF-2 y síntesis de ROS | Igura <i>et al.</i> , 2001 Brakenhielm <i>et al.</i> , 2011 Lin <i>et al.</i> , 2003 |
| Taxol | <i>Taxus brevifolia</i> (Tejo del pacífico) | Inhibe: producción de VEGF y de HIF1 α Estabiliza microtúbulos. | Belotti <i>et al.</i> , 1996 Bocci <i>et al.</i> , 2013 |
| 4-metilumbeliferona | Familia <i>Apiaceae</i> | Inhibe: proliferación, adhesión, migración, morfogénesis y producción de MMP | García-Vilas <i>et al.</i> , 2013 |

*Dependiendo de la dosis, la genisteína puede resultar anti o proangiogénico (Berndt *et al.*, 2018). ** El ginseng puede presentar propiedades proangiogénicas en función al contenido concreto de ginsenosidos en el extracto (Sengupta *et al.*, 2004).

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el potencial del análogo sintético de las estrigolactonas GR-24 tanto para inhibir el crecimiento de diferentes líneas tumorales *in vitro* como para inhibir la angiogénesis. Los detalles acerca de este compuesto y sus efectos como inhibidor del crecimiento tumoral y la angiogénesis se exponen en el Capítulo II de la sección de Resultados y Discusión.

INTRODUCCIÓN

7. ESTRATEGIA PARA LA BÚSQUEDA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIANGIOGÉNICOS

El trabajo de esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de trabajo de nuestro grupo de investigación, dedicado desde hace más de 20 años a la búsqueda de nuevos compuestos moduladores de la angiogénesis. Para ello se ha desarrollado una completa batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* que han permitido estudiar el potencial antiangiogénico de numerosos compuestos de diversos orígenes: suministrados por parte de empresas dedicadas a aislamiento y descubrimiento de fármacos, sintetizados por grupos de investigación de química orgánica, o seleccionados mediante la consulta de la bibliografía.

En el estudio de potenciales inhibidores de la angiogénesis, los compuestos candidatos se someten a un proceso de rastreo primario que consiste en valorar *in vitro* sus efectos inhibidores sobre la supervivencia de células endoteliales y sobre la capacidad de éstas para formar estructuras tubulares sobre Matrigel (estos ensayos están descritos en la sección de Metodología). En este primer paso del rastreo se seleccionan aquellos compuestos que muestran indicios de baja toxicidad e inhiben la formación de estructuras similares a tubos. Los compuestos seleccionados en base a este criterio pasan a estudiarse en ensayos de angiogénesis *in vivo*, como el ensayo CAM (en membrana corioalantoidea de huevo de pollo fecundado) o el ensayo de los vasos intersegmentales del pez cebra (ambos ensayos descritos en el apartado de Metodología).

Continuando con la estrategia de caracterización, aquellos compuestos capaces de inhibir la angiogénesis en los modelos *in vivo* se seleccionan para una evaluación exhaustiva de su actividad inhibidora de la angiogénesis *in vitro*, mediante la utilización de ensayos que nos puedan indicar qué pasos o procesos implicados en la angiogénesis están siendo afectados por los compuestos estudiados. Esto permite además realizar una comparación con la actividad de los compuestos descritos en la bibliografía, proporcionando una primera idea del potencial farmacológico de los compuestos. Finalmente se estudia el mecanismo de acción a nivel molecular de los compuestos con mayor potencial antiangiogénico, mediante la exploración de su efecto *in vitro* sobre las vías de señalización claves implicadas en el proceso angiogénico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo, la búsqueda y caracterización de nuevos compuestos inhibidores de la angiogénesis. En base a los datos expuestos previamente, se plantean las siguientes **HIPÓTESIS**:

1. La inhibición farmacológica de la angiogénesis basada en el bloqueo de una o varias de las funciones de las células endoteliales activadas puede ser una alternativa para el tratamiento de diferentes patologías caracterizadas por una angiogénesis desregulada.
2. Los productos naturales y sus derivados estructurales pueden constituir una fuente importante de nuevos candidatos a fármacos con actividad antiangiogénica.

Con objeto de contrastar estas hipótesis, se proponen los siguientes **OBJETIVOS**:

Objetivo 1: Identificación de nuevos compuestos inhibidores de la angiogénesis; evaluación *in vivo* y caracterización *in vitro* de su actividad antiangiogénica.

Objetivo 2: Aproximación *in vitro* al estudio del mecanismo de acción molecular de los compuestos inhibidores de la angiogénesis identificados en el Objetivo 1.

HYPOTHESIS AND AIMS

This doctoral thesis is part of one of the main lines of research of our group, the search and characterization of new angiogenesis inhibitors. Based on the data previously exposed in the Introduction section, the following **HYPOTHESIS** are presented:

1. Pharmacological inhibition of angiogenesis, based on the blockade one or more of the functions of activated endothelial cells, may be an alternative for the treatment of different diseases characterized by a deregulated angiogenesis, including cancer.
2. Natural products and their structural derivatives may constitute an important source of new antiangiogenic drug candidates.

In order to contrast these hypotheses, the following **AIMS** are proposed:

Aim 1: Identification of new compounds inhibiting angiogenesis; in vivo evaluation and in vitro characterisation of their antiangiogenic activity.

Aim 2: In vitro approach to the study of the molecular mechanism of action of the angiogenesis inhibitors identified in Objective 1.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 Medios de cultivo, reactivos y material fungible

Los medios de cultivo, el antibiótico penicilina/estreptomicina, el antifúngico anfotericina B y el ácido etilendiaminetetraacético (EDTA, *Ethylenediaminetetraacetic acid*) fueron adquiridos a BioWhittaker (Lonza) (Walkersville, MD, EEUU), mientras que el suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) fue adquirido a BioWest (Kansas, EEUU) y la L-glutamina (L-Gln) a Sigma Aldrich (Merck) (Darmstadt, Alemania). El suero fetal bovino se inactivó durante una hora a 55 °C. El factor VEGF-A fue adquirido a Tebu-Bio Spain S.L. (Barcelona, España).

En cuanto al fungible utilizado, las placas y los frascos para cultivos celulares fueron de la marca NUNC (Roskilde, Dinamarca), mientras que las pipetas y los tubos de centrifuga fueron de VWR (West Chester, Pensilvania, EEUU) y las puntas de micropipetas y tubos de microcentrifuga fueron de Daslab (Barcelona, España). Las placas de 96 pocillos para luminometría fueron de Falcon (Corning, NY, EEUU).

Los compuestos de uso frecuente como el *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT), la albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*), la aprotinina, la fibronectina, el yoduro de propidio, la ARNasa, la gelatina, el dimetilsulfóxido (DMSO), la tricaína, la metilcelulosa, o las sales para preparar los tampones, entre otros, fueron adquiridos a Sigma Aldrich (MERK) (Darmstadt, Alemania). El Matrigel y el coágenu tipo I se adquirieron a la casa comercial Corning (NY, EEUU). La calceína-AM fue de Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

1.2 Compuestos estudiados en la Tesis Doctoral

El GR-24, un análogo sintético de las estrigolactonas, se adquirió al laboratorio del Dr. Zwanenburg (Radboud University Nijmegen, Países Bajos) en forma de mezcla racémica. La serie de compuestos productos intermediarios de la síntesis de la Solomonamida A, fue proporcionada por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Francisco Sarabia del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga (Málaga, España). Los compuestos se disolvieron en DMSO y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

1.3 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios anti-fosfo-VEGFR2 (Y1175), anti-VEGFR2, anti-fosfo-AKT (Ser473), anti-AKT, anti-fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5), anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y anti- α -Tubulina (DM1A) se adquirieron a *Cell Signalling Technology* (San Diego, CA, EEUU). Los anticuerpos primarios con marcaje fluorescente utilizados para la

MATERIAL Y MÉTODOS

detección de moléculas de superficie por citometría de flujo fueron el anti-mouse CD31 (PECAM-1) Monoclonal Antibody (390)-APC y anti-mouse CD144 (VE-cadherin) Monoclonal Antibody (EBioBV13(BV13), ambos de *eBioscience* (San Diego, CA, EEUU). Por su parte, el anticuerpo primario anti-P-FAK (Tyr397) fue adquirido a *Invitrogen* (Rockford, IL, EEUU) y el anti-FAK a *BD Biosciences* (San Jose, CA, EEUU). La **Tabla 5** resume los anticuerpos primarios empleados y sus especificaciones.

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis doctoral. (WB: *western-blot*; ICQ: inmunocitoquímica; MS-CF: detección de moléculas de superficie por citometría de flujo).

| Anticuerpo | Origen | Casa comercial | Tipo de ensayo (Dilución) |
|---|--------|---|-----------------------------|
| Anti-fosfo-VEGFR2 (Y1175) | Conejo | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB(1:500) |
| Anti -VEGFR2 | Conejo | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB(1:500) |
| Anti-fosfo-AKT (Ser473) | Conejo | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB(1:500) |
| Anti-AKT | Conejo | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB (1:500) |
| Anti-fosfo-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) | Conejo | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB (1:1000) |
| Anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) | Conejo | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB (1:1000) |
| Anti-GAPDH | Conejo | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB (1:1000) |
| Anti- α -tubulina (Polyclonal Antibody) | Ratón | <i>Cell Signalling Technology</i> | WB(1:1000) ICQ(1:16.000) |
| Anti-fosfo- FAK (Tyr397) | Conejo | <i>Invitrogen (Thermo-Fisher Scientific)</i> | WB (1:500) |
| Anti-FAK (Monoclonal Antibody) | Ratón | <i>BD Biosciences Transduction Laboratories</i> | WB(1:500) ICQ(1:100) |
| Anti-mouse CD31 (PECAM-1) Monoclonal Antibody (390)-APC | Ratón | <i>eBioscience</i> | MS-CF (1:100) |
| Anti- mouse CD144 (VE-cadherin) Monoclonal Antibody (EBioBV13(BV13) | Ratón | <i>eBioscience</i> (San Diego, CA, USA) | MS-CF (1:100) |

En cuanto a los anticuerpos secundarios, en esta tesis se ha utilizado un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano desarrollado en cabra (goat anti-rabbit IgG HRP Linked Whole Antibody) de Sigma-Aldrich (Merck), un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (goat anti-mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody) de Sigma-Aldrich (Merck), un anticuerpo anti-mouse IgG-Alexa fluor 568 desarrollado en cabra de Invitrogen (*Thermo Fisher Scientific*) (Waltham, MA, USA). La **Tabla 6** resume los anticuerpos Secundarios empleados y sus especificaciones.

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis doctoral. (WB: *western-blot*; ICQ: inmunocitoquímica).

| Anticuerpo | Tipo de conjugación | Origen | Casa comercial | Tipo de ensayo (Dilución) |
|---|----------------------|--------|----------------|---------------------------|
| Anti-rabbit IgG HRP Linked Whole Antibody | Peroxidasa de rábano | Cabra | Merck | WB (1:5000) |
| Anti-mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody | Peroxidasa de rábano | Cabra | Merck | WB (1:5000) |
| Anti-mouse IgG-Alexa fluor 568 | Alexa fluor 568 | Cabra | Invitrogen | ICQ (1:1000) |

1.4 Cebadores

Los cebadores utilizados para el análisis del ARN mensajero por qPCR (*KiCqStartTM SYBR Green Primers Predesigned*) se detallan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cebadores utilizados para la determinación de la expresión de determinados genes por PCR cuantitativa a tiempo real (rt-qPCR) adquiridos de *KiCqStartTM SYBR Green Primers Predesigned* (MERK).

| Gen | Identificación | Cebador | Especie |
|------------|----------------|-----------------------------------|---------|
| FAK (PTK2) | FH1_PTK2 | Forward: 5'-GTATGTCCTATGGTGAAGG | Humano |
| FAK (PTK2) | RH1_PTK2 | Reverse: 5'-GGTCAGAGTTCAATAGCTTC | Humano |
| GAPDH | GAPDH-D2 | Forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC | Humano |
| GAPDH | GAPDH-R2 | Reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG | Humano |

2. CULTIVOS CELULARES

2.1 Células endoteliales

2.1.1 Cultivo de células endoteliales de aorta bovina (BAEC)

Las células endoteliales utilizadas en esta tesis doctoral han sido principalmente células endoteliales de aorta bovina (BAEC, *Bovine Aortic Endothelial Cells*) aisladas en nuestro laboratorio a partir de una aorta de vaca proporcionada por el matadero de FAMADESA (Campanillas, Málaga) siguiendo el procedimiento que se describe en Gospodarowicz *et al.* (1976). Estas células se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con una concentración de glucosa de 1 g/L

MATERIAL Y MÉTODOS

y suplementado con L-Gln (2 mM), antibióticos (penicilina/estreptomicina 50 U/mL), antifúngico (anfotericina B 1.25 µg/mL) y FBS al 10%. Se incubaron a 37 °C, en atmósfera húmeda y 5% CO₂ y se subcultivaron a razón 1:5 al llegar a la confluencia.

2.1.2 Cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

Las células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) aisladas por nuestro grupo de investigación como se describe en Kubota *et al.* (1988) se mantuvieron en medio 199 suplementado con HEPES 10 mM, heparina 100 µg/mL, suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS, *Endothelial Cells Growth Supplement*) 30 µg/mL, L-Gln (2 mM), antibióticos (penicilina/estreptomicina 50 U/mL), antifúngico (anfotericina B 1,25 µg/mL) y FBS al 20%.

2.2 Líneas celulares tumorales

Las líneas celulares tumorales usadas en esta tesis doctoral se adquirieron a la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, Virginia, EEUU). La **Tabla 8** recoge los nombres de las líneas celulares, su procedencia y los medios de cultivo utilizados para su mantenimiento. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con L-glutamina (2 mM), antibióticos (penicilina/estreptomicina 50 U/mL), antifúngico (anfotericina B 1.25 µg/mL) y FBS y se mantuvieron a 37 °C, en atmósfera húmeda y 5% CO₂ hasta su confluencia y posterior subcultivo.

Tabla 8. En esta tabla se recogen las líneas tumorales utilizadas en esta tesis doctoral, así como su procedencia y los medios de cultivo utilizados para su mantenimiento. (EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium; DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute).

| Línea celular | Origen | Medio de cultivo |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------|
| HT1080 | Fibrosarcoma humano | EMEM 10% FBS |
| MDA-MB-231 | Cáncer de mama humano triple negativo | RPMI1640 10% FBS |
| U87MG | Glioblastoma humano | EMEM 10% FBS |
| U2OS | Osteosarcoma humano | DMEM 4,5 g Glc/L 10% FBS |
| HT29 | Cáncer colorectal humano | DMEM 4,5 g Glc/L 10% FBS |
| HepG2 | Hepatocarcinoma humano | EMEM 10% FBS |
| HL60 | Leucemia promielocítica humana | RPMI1640 20% FBS |
| U937 | Linfoma histiocítico humano | RPMI1640 10% FBS |
| KU812F | Leucemia mielógena crónica humana | RPMI1640 10% FBS |

3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los huevos fecundados fueron adquiridos de la Granja santa Isabel (Córdoba, España). Los peces de la especie *D. rerio*, se han utilizado ejemplares mantenidos en el Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (BIONAND) y ejemplares pertenecientes al estabulario de peces del Departamento de Medicina Molecular y Translacional (Università degli Studi di Brescia, Italia). Las líneas de *Danio rerio* utilizadas en esta tesis doctoral fueron la línea salvaje (AB *strain*) y la línea transgénica Tg (*fli-1a:EGFP*)^{y1} cuyas células endoteliales expresan la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) bajo control del promotor del factor de transcripción “*friend leukemia virus integration 1*” (*fli-1*) (Lawson and Weinstein, 2002). La línea transgénica fue cedida por la Dra. Nadia Mercader (CNIC, Madrid), con el consentimiento del Dr. Brant Weinstein (NIH/NICHD). Los procedimientos que implican el uso de animales de experimentación realizados durante esta tesis doctoral se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 (BOE, 34/-11421, 2013), con el cumplimiento de la directiva de la Comunidad europea 2010/63/EU que regula el uso y cuidado de los animales de laboratorio. Los experimentos con *D. rerio* realizados en la Università degli Studi di Brescia (Italia) estaban de acuerdo con la legislación italiana para la experimentación animal.

4. ENSAYOS *IN VITRO*

4.1 Ensayo de viabilidad celular con MTT

Se trata de un ensayo colorimétrico que proporciona una medida cuantitativa de la viabilidad de las células presentes en un cultivo. Se utiliza para ello el reactivo MTT, que en su estado oxidado es soluble en medio acuoso y presenta un intenso color amarillo. El MTT es internalizado por las células y es reducido por la actividad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, pasando a su estado de formazán, que es insoluble y de color azulado. De este modo, la cantidad de formazán detectado en un cultivo celular será proporcional a la cantidad de células vivas. Mediante la aplicación de este método podemos determinar la concentración inhibidora 50 (IC50) de un determinado compuesto (concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de la población celular *in vitro* en un 50%).

En cuanto al procedimiento (**Figura 10**), se partió de cultivos de células proliferantes, que se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad $2.5 \cdot 10^3$ células/pocillo en el caso de células endoteliales o $2 \cdot 10^3$ células/pocillo en el caso de células tumorales. En todos los ensayos se incluyeron un blanco (medio de cultivo), un control de crecimiento (células en presencia DMSO), y las diluciones seriadas del compuesto objeto de estudio. Las células se incubaron durante 72 h en condiciones estándar para cultivos celulares (37 °C, atmósfera húmeda y 5% CO₂).

MATERIAL Y MÉTODOS

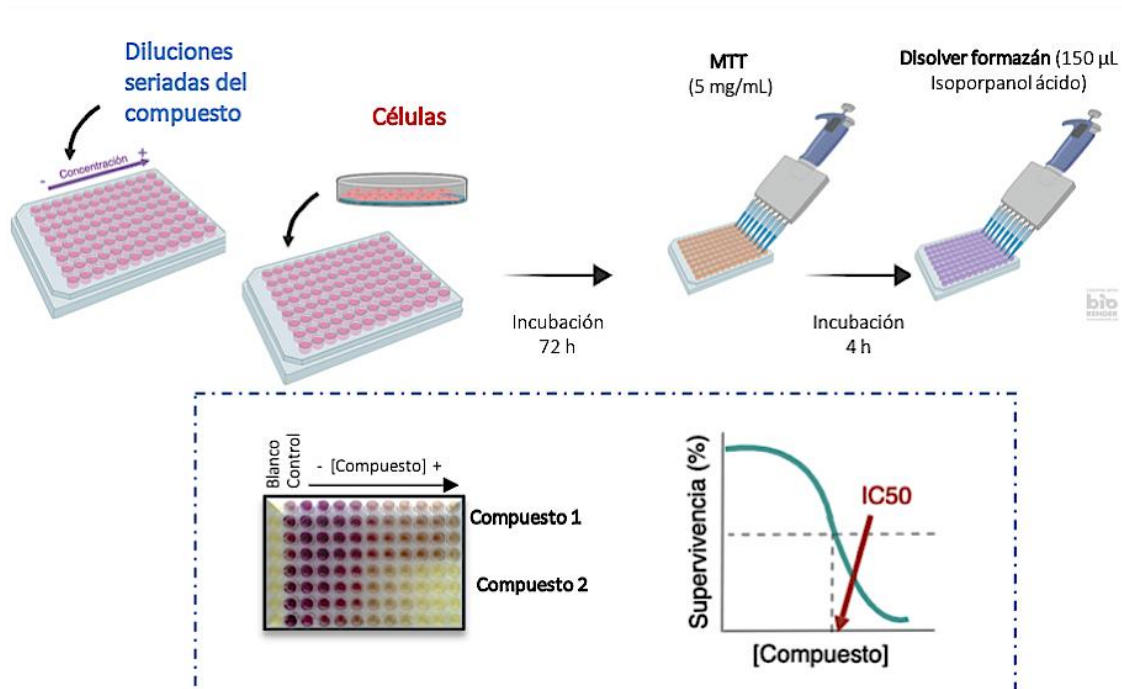


Figura 10. Ensayo de proliferación y supervivencia celular con MTT.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 µL por pocillo de una solución de MTT (5 mg/mL) y se incubaron 4 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, se añadieron 150 µL de isopropanol ácido (HCl 0.04N) a cada pocillo para solubilizar el formazán producido y se midió la absorbancia a 550 nm (A_{550}) en el espectrofotómetro para microplacas *Eon* de Biotek (Winooski, VT, USA) con el programa *Gen5 2.05*. Con los datos obtenidos se realizaron curvas dosis-respuesta de supervivencia celular frente a la concentración de compuesto, considerando el 100% de crecimiento la absorbancia en el control de células en ausencia del compuesto. A partir de estas curvas se calcularon las IC50 para cada uno de los compuestos en las distintas líneas celulares. En cada experimento se ensayó cada condición experimental por cuadruplicado y realizaron al menos tres experimentos independientes para poder calcular el valor medio de la IC50.

Ocasionalmente, este método fue empleado en distintas condiciones de tiempo y/o densidad celular para comprobar que los compuestos estudiados no presentaban toxicidad en las condiciones utilizadas durante otros ensayos *in vitro* de angiogénesis.

4.2 Ensayo de morfogénesis de células endoteliales sobre Matrigel

El objetivo de este ensayo, ampliamente utilizado para evaluar *in vitro* la posible actividad antiangiogénica de un compuesto (Goodwin, 2007), es determinar el efecto de un compuesto sobre la formación de estructuras similares a tubos por parte de células endoteliales sobre Matrigel (Figura 11).

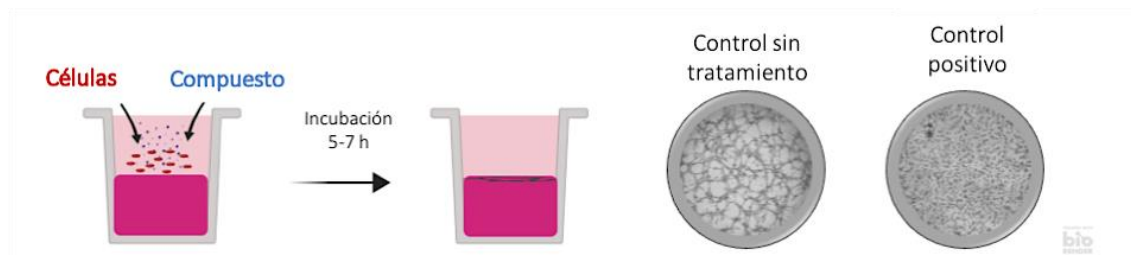


Figura 11. Ensayo de morfogénesis de células endoteliales sobre Matrigel.

El Matrigel es una matriz sólida tridimensional que contiene una mezcla de proteínas de la lámina basal y matriz extracelular secretada por las células de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón, asemejándose al complejo medio extracelular. Entre sus componentes están la laminina, el colágeno tipo IV, proteoglicanos heparán sulfato, TGF- β , FGF-2, activador tisular del plasminógeno (tPA) y otros factores de crecimiento producidos por el sarcoma EHS (Kibbey, 1994). Así, las células endoteliales tienden a formar redes bidimensionales sobre el Matrigel polimerizado dando lugar a las estructuras cerradas similares a tubos. Para la realización del ensayo de morfogénesis sobre Matrigel se depositaron 50 μ L de Matrigel frío en pocillos de placas de 96 pocillos, manteniendo el Matrigel y la placa en hielo (en estas condiciones, el Matrigel se encuentra en estado líquido). Para su polimerización, la placa se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez polimerizado, se añadió a los pocillos 200 μ L de una suspensión de células endoteliales ($2.5 \cdot 10^5$ células/mL) en medio sin suero.

Finalmente, se añadieron las concentraciones de compuesto deseadas en un volumen final de 5 μ L, o en el caso del control negativo de inhibición, el mismo volumen del vehículo en el que estaban disueltos los compuestos (DMSO). Se incluyeron pocillos con estaurosporina (2 μ M) como control positivo de inhibición (Oikawa *et al.*, 1992). Se incubó la placa a 37 °C, en atmósfera húmeda y 5% CO₂ durante unas 5-6 h y se tomaron fotografías con una cámara *Nikon DS-Ri2* acoplada a un microscopio *Nikon Eclipse Ti* (Nikon, Tokyo, Japan). Cada concentración se ensayó por duplicado y se realizaron al menos tres experimentos independientes para obtener un resultado fiable. Para cada compuesto se determinó su MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), como la concentración mínima del compuesto necesaria para la completa inhibición de la formación estructuras tubulares cerradas.

4.3 Ensayo de disrupción vascular

Una modificación del ensayo de morfogénesis de células endoteliales sobre Matrigel nos permitió estudiar si los compuestos poseían o no actividad disruptiva vascular, es decir, si eran capaz de desorganizar estructuras tubulares una vez ya formadas (**Figura 12**). El procedimiento fue similar al del ensayo de formación de tubos sobre Matrigel,

MATERIAL Y MÉTODOS

con la diferencia de que las células fueron sembradas en ausencia de compuesto y, una vez que las estructuras se formaron, se añadió el compuesto. Los resultados se obtuvieron tras 90 min de incubación a 37 °C y se utilizó como control positivo de disrupción vascular la combretastatina 4-fosfato (CA4-P) (Vincent *et al.*, 2005; Porcù *et al.*, 2016a), que produce una disrupción completa de las estructuras formadas, a una concentración de 0.2 μ M. Se realizaron al menos tres experimentos independientes para confirmar el resultado.

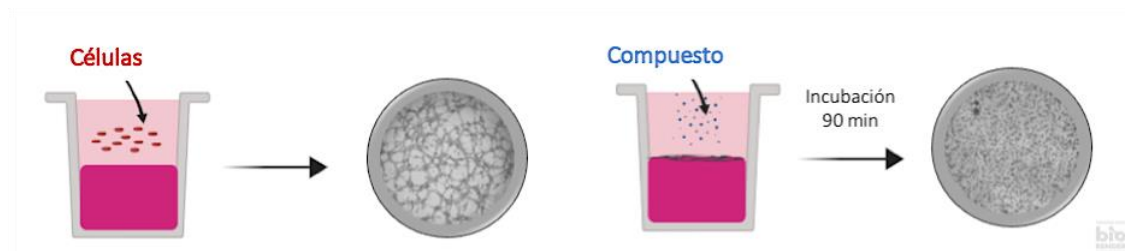


Figura 12. Ensayo de disrupción vascular sobre Matrigel.

4.4 Estudio de la capacidad de degradación de la matriz extracelular: zimografías de gelatina

En las primeras etapas de la angiogénesis, las células endoteliales activadas secretan proteasas que degradan la lámina basal y la MEC circundante permitiendo así la migración de las células hacia la fuente del estímulo proangiogénico, así como la liberación de factores asociados a elementos de la MEC que contribuyen a la progresión de la angiogénesis (Egeblad y Werb, 2002; Van Hinsbergh *et al.*, 2006). Entre estas proteasas, son claves las MMP. Las células endoteliales producen de forma predominante la MMP-2 o gelatinasa A, de 72 kDa de peso molecular. Además de la MMP-2, otra metaloproteínasa con actividad gelatinasa es la MMP-9 (gelatinasa B), de 92 kDa de peso molecular, que se expresa, junto con la MMP-2 en determinadas líneas celulares tumorales. Se realizaron zimografías de gelatina para detectar la presencia de MMP en las células o las secretadas en el medio de cultivo y evaluar así cómo los compuestos estudiados afectan a la síntesis, la secreción o la actividad de las MMP en una línea celular determinada (**Figura 13 A**).

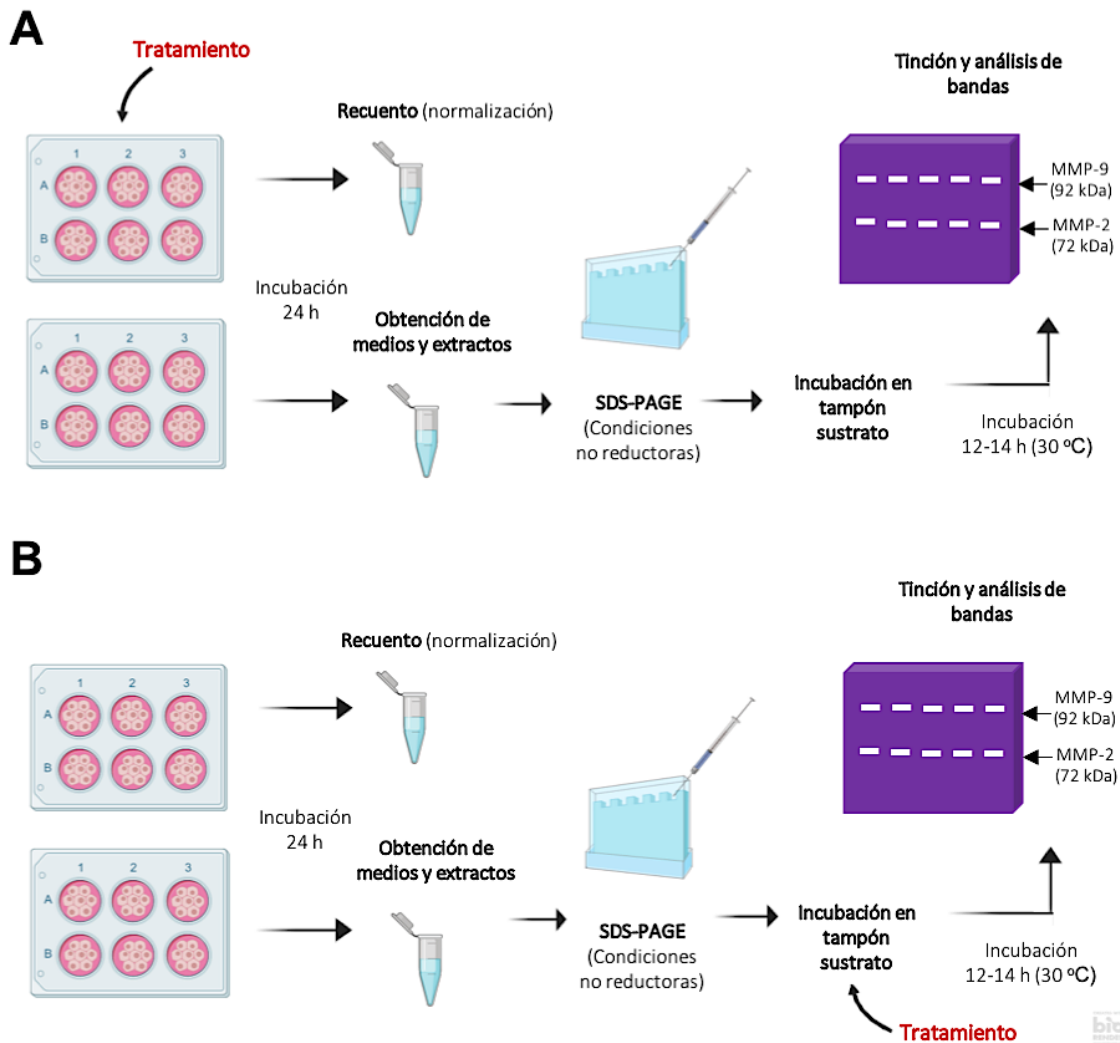


FIGURA 13. Zimografías de gelatina para detectar la actividad de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs). **A.** Zimografías de gelatina con extractos celulares o medios acondicionados de células tratadas con diferentes concentraciones del compuesto. **B.** Zimografías de gelatina *in situ*. Los compuestos se añadieron al tampón sustrato usado para incubar los geles, en los cargaron medios acondicionados por células sin tratar.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos hasta alcanzar el 50% de confluencia. Se reemplazó el medio de cultivo completo por medio de cultivo sin suero suplementado con 0,1% con BSA y con aprotinina (inhibidor de serín-proteasas) a 200 KIU/mL, en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones del compuesto objeto de estudio, ensayando cada condición experimental por duplicado. Tras una incubación de 24 horas, se usó un duplicado para el recuento de células mediante un contador de partículas Z2 de Beckman Coulter (Hialeah, Florida), con el objeto de normalizar las distintas muestras en función de la densidad celular. El otro duplicado se usó para recoger los medios acondicionados por las células (medio de cultivo en el que se habrán secretado las MMP durante las 24 horas de incubación) y obtener los extractos celulares mediante raspado de los pocillos en presencia de 0,5 mL de tampón de lisis (Tris-HCl 0,1 M con 0,2% Triton X-100 y 200 KIU/mL de aprotinina). Tanto los medios acondicionados como los extractos celulares se centrifugaron a 1000 g durante

MATERIAL Y MÉTODOS

10 min a 4 °C. Las muestras normalizadas a la misma densidad celular se mezclaron con tampón de carga (12,5% Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 40 % glicerol, 8% SDS, 0,05 % azul de bromofenol) y se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras (2h 30 mA/gel a 4 °C), donde el gel separador contenía gelatina a una concentración de 1 mg/mL, con un equipo *Miniprotean* de Bio-Rad (Hércules, CA, USA). Los geles se lavaron dos veces con tampón de lavado I (Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 con Triton X-100 al 2 % (p/v)) durante 10 minutos en agitación para eliminar el SDS usado en la electroforesis, realizándose otros dos lavados de 10 minutos en agitación con tampón de lavado II (Tris-HCl 0,5 M pH 7,4). A continuación, se incubaron durante 12-14 horas a 37 °C en presencia de un tampón sustrato (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 con Tritón X-100 al 1 %, CaCl₂ 5 mM y Na₃N 0,02 %) para permitir que las MMP presentes en el gel degradaran la gelatina contenida en el mismo. Finalmente, se tiñeron con una solución de azul de Commassie R-250 al 1% en agua:metanol:ácido acético (5:5:2), adquiriendo un color azul intenso uniforme debido a la presencia de gelatina. Tras lavar con una solución de agua:metanol:ácido acético (6:3:1), los geles se fotografiaron en el *Chemidoc XRS System* con el programa *Image Lab* y las bandas de degradación se cuantificaron mediante el programa *Image J*. Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes para obtener un valor medio.

Mediante una modificación de este ensayo se puede determinar si el compuesto estudiado es capaz de inhibir directamente la actividad gelatinasa de las MMP (**Figura 13 B**). Para ello se aplicó el mismo procedimiento anteriormente descrito para las zimografías de gelatina utilizando como muestras los medios acondicionados de células sin tratar. Tras la electroforesis, se recortaron las calles y se incubaron con el tampón sustrato en ausencia o presencia del compuesto, de forma que, si es capaz de inhibir la actividad de la gelatinasa *in situ*, las bandas de degradación serán menores o inexistentes con respecto a las obtenidas tras la incubación con el tampón sustrato sin compuesto.

4.5 Ensayo de invasión en cámara de Boyden modificada

Este ensayo se fundamenta en la utilización de unos insertos (*transwells*) con una membrana con poros de 8 µm de diámetro que se colocan en los pocillos de placas de 24. Con este sistema, los pocillos quedan divididos en una cámara inferior y una cámara superior, estando éstas comunicadas entre si por una membrana porosa que permite el paso de las células (**Figura 14 A**). Para estudiar la capacidad de invasión de las células frente a componentes de la MEC la base de los insertos fue cubierta con 100 µL de Matrigel (0,12 mg/mL) y se dejaron secar en cabina de flujo laminar.

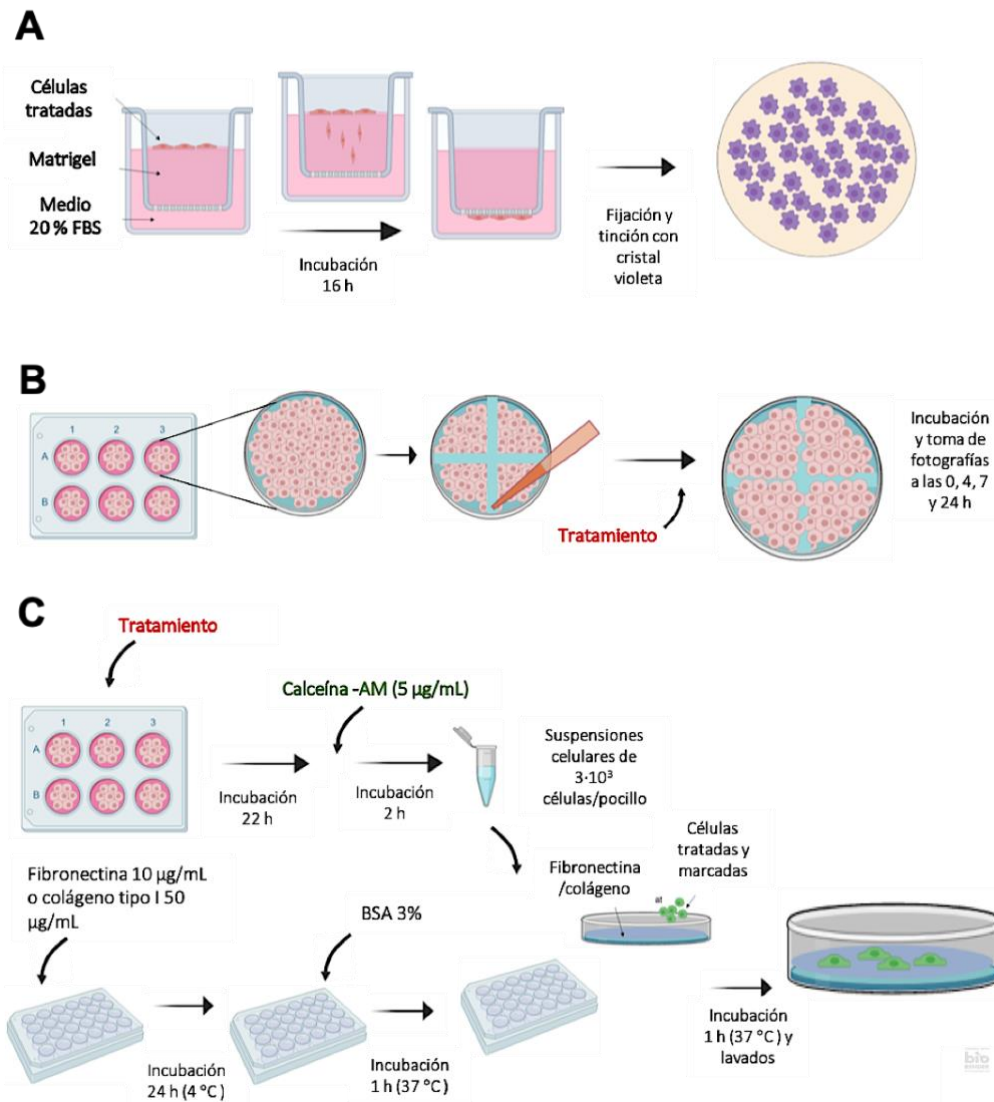


Figura 14. Esquematación de los ensayos de movilidad y adhesión. **A.** Ensayo de invasión en cámara de Boyden modificada. **B.** Ensayo del cierre de la herida (*Wound healing*). **C.** Ensayo de adhesión a componentes de la ECM.

En la cámara inferior se dispuso el medio con FBS al 20%, que actuó como quimioatrayente de las células induciendo su invasión a través del Matrigel, excepto en una de las condiciones experimentales donde se añadió medio sin suero para comprobar que la estimulación estaba teniendo lugar correctamente. En la cámara superior se añadieron las células endoteliales ($5 \cdot 10^5$ células/mL) en medio sin suero suplementado con BSA al 0,1 % y ausencia o presencia de las concentraciones del compuesto a ensayar, que habían sido pretratadas 15 min a temperatura ambiente. Para el control negativo (ausencia de compuesto), se añadió la cantidad correspondiente de DMSO.

Tras 16 h de incubación, se retiró el medio de cultivo de ambas cámaras y las células adheridas a ambas caras de la membrana porosa se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se tiñeron

MATERIAL Y MÉTODOS

con cristal violeta al 1 % en etanol al 2 % durante 20 min a temperatura ambiente. Los insertos se lavaron con agua destilada y las células que no habían invadido (parte superior de la membrana porosa) se retiraron con un bastoncillo de algodón humedecido. Finalmente, la cara inferior de la membrana, donde se encontraban las células que habían invadido el Matrigel, se fotografió con una cámara *Nikon DS-Ri2* acoplada a un microscopio *Nikon Eclipse Ti* (Nikon, Tokyo, Japan). Las células que habían invadido en cada condición experimental se contabilizaron y se calculó el porcentaje de invasión con respecto al control estimulado con FBS y en ausencia de compuesto.

4.6 Ensayo de migración por “cicatrización de la herida” (*wound healing*)

Para analizar los efectos de un compuesto sobre la capacidad migratoria de las células endoteliales se utilizó el ensayo de cicatrización de la herida (*wound healing*) (**Figura 14 B**). Este ensayo consiste en eliminar mecánicamente las células de una zona de un cultivo confluyente permitiendo así la migración de las células del cultivo hacia el área libre de células. Mediante la obtención de fotos a distintos tiempos y el análisis posterior de imagen se puede determinar la capacidad migratoria de las células tratadas con respecto a un control sin tratamiento.

Las células endoteliales se sembraron en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer hasta alcanzar un 100% de confluencia. Con una punta de micropipeta, se realizaron dos líneas perpendiculares en forma de cruz sobre las monocapas, dando lugar áreas libres de células de 1 mm de anchura, aproximadamente. Se lavaron los pocillos con PBS para eliminar las células despegadas y se añadió el medio de cultivo con la concentración de compuesto correspondiente, dejando siempre un pocillo como control sin tratamiento y con el vehículo utilizado para disolver el compuesto (DMSO). Se realizaron fotografías para cuantificar el área libre de células a los tiempos 0, 4, 7 y 24 h con una cámara *Nikon DS-Ri2* acoplada a un microscopio *Nikon Eclipse Ti* (Nikon, Tokyo, Japan). Para asegurar que el efecto producido por el compuesto era sobre la capacidad migratoria de las células y no sobre su proliferación, se añadió al medio mitomicina (10 ng/mL). El área libre de células se cuantificó con el programa *Image J* y se normalizó respecto a su tiempo 0 h para calcular el porcentaje del área recubierta por las células para cada tiempo y concentración del compuesto. Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes para obtener un valor medio.

4.7 Ensayo de adhesión celular a componentes de la MEC

Durante el proceso de angiogénesis, y ligado al proceso de migración celular, las células endoteliales modifican el patrón de expresión y/o exposición de proteínas de adhesión en la membrana plasmática. De esta forma, su capacidad de adherirse a componentes de la MEC cambia, posibilitando la formación del nuevo vaso. Para analizar los posibles efectos de un compuesto sobre la adhesión de células endoteliales

a componentes de la ECM, se recubrieron los pocillos de placas de 24 pocillos con fibronectina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (300 μL) o colágeno tipo I a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (400 μL), y se incubaron a 4 °C durante 24 h. Tras la incubación, las soluciones se aspiraron, se añadió 0.3 mL de BSA al 3% para saturar los pocillos y se incubaron 1 h más (**Figura 14 C**).

Las células endoteliales se incubaron durante 24 h en ausencia (control) o presencia del compuesto y se marcaron con el marcador fluorescente calceína-AM (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante las dos últimas horas antes de terminar el tratamiento. Tras aspirar el exceso de BSA en los pocillos, se realizaron dos lavados con PBS y las células en las distintas condiciones experimentales se tripsinizaron para preparar suspensiones celulares de $3 \cdot 10^4$ células/mL en medio completo. Se añadieron 0.3 mL de estas suspensiones celulares a los pocillos (9.000 células/pocillo) y, tras 1 h de incubación, se realizaron tres lavados con PBS para eliminar las células que no se hubieran adherido en ese tiempo. Finalmente, se tomaron fotografías con una cámara *Nikon DS-Ri2* acoplada a un microscopio *Nikon Eclipse Ti* (Nikon, Tokyo, Japan) para cuantificar el número de células por pocillo y se calculó el porcentaje de las mismas en cada condición experimental respecto al control sin tratamiento (considerado como 100 %). Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes para obtener un valor medio.

4.8 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, se dejaron crecer hasta llegar a la subconfluencia y se sustituyó el medio de cultivo por medio con la concentración de compuesto correspondiente. En los controles negativos se añadió DMSO y en los positivos 2-ME a 10 μM . Las placas se incubaron entre 14-16 horas (*overnight*), o, puntualmente, 24 horas. Al finalizar la incubación, se recogieron tanto los medios como las células adheridas al pocillo. Se centrifugaron 5 min a 1500 rpm y el *pellet* obtenido fue lavado dos veces con tampón de citometría (PBS con FBS al 1% y HEPES 10 mM). Las células se fijaron con etanol frío al 70% durante 1 h a -20 °C y, a partir de aquí, se mantuvieron siempre en frío. Tras la fijación, se realizaron otros dos lavados con tampón de citometría y finalmente las células se resuspendieron en una solución de PBS con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de yoduro de propidio (IP) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARNasa (para eliminar el ARN y que el marcaje de IP corresponda solamente con el contenido en ADN) y se incubaron 30 min a 37 °C para su posterior análisis en el citómetro de flujo *FACS VERSETM* (BD Biosciences) con el programa *DB FACSuite* (**Figura 15**), lo que nos permitió distinguir las fases del ciclo celular en función al contenido de ADN; fase Sub G1, que corresponde con aquellas células haplodiploides (con un contenido en ADN menor a 2n) y se relaciona con células en apoptosis que tienen el ADN fragmentado; fase G0/G1, células diploides (2n) que bien pueden encontrarse en la fase G1 del ciclo celular o en un estado de quiescencia (G0); fase S, que corresponde con aquellas células que están en la fase de síntesis del ciclo celular y tienen un contenido de ADN de 2n a 4n; fase G2/M o células tetraploides (4n) que ya han duplicado su ADN y se encuentran en mitosis o en

MATERIAL Y MÉTODOS

fase G2. Se compararon los porcentajes de cada subpoblación en células tratadas compuesto determinado en relación al control sin tratamiento y se analizó si el compuesto producía una parada en alguna de las fases del ciclo celular o un aumento de la población en apoptosis (Sub G1). Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes para obtener un valor medio.

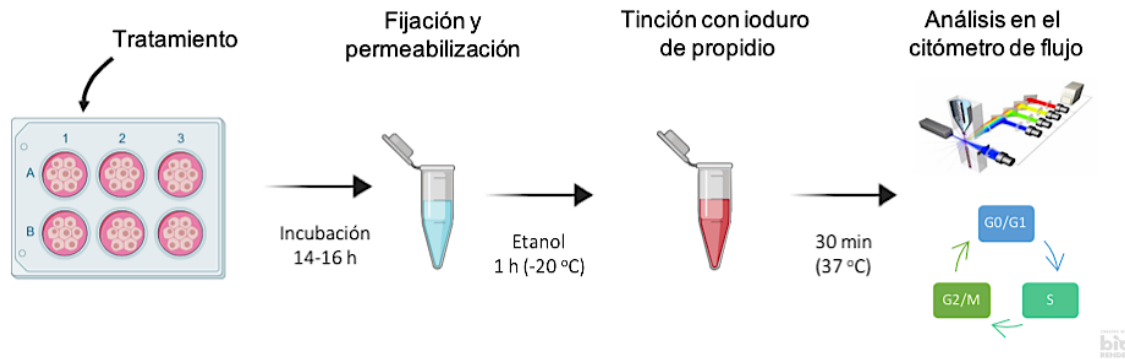


FIGURA 15. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo. La tinción con yoduro de propidio permite la comparación entre las fases del ciclo celular SubG1 (apoptosis), G0/G1, G2/M y S de los tratamientos respecto a un control sin tratar.

4.9 Estudio de la inducción de apoptosis mediante la detección de fosfatidilserina en la superficie celular

Durante el proceso de apoptosis se producen determinados cambios morfológicos en las células, entre ellos, la translocación del fosfolípido fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática hacia la cara externa. De esta forma, en fases tempranas de la apoptosis, esta puede ser identificada por la exposición de fosfatidilserina en su membrana antes de que se produzcan otros eventos como la pérdida de la integridad de la membrana o la fragmentación del ADN. Para detectar fosfatidilserina en la membrana de las células usamos el *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I*, de BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA).

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, se dejaron crecer hasta llegar a la subconfluencia y se trataron durante 14-16 horas con los compuestos estudiados. Tras dos lavados con PBS frío, se tripsinizaron y se prepararon suspensiones celulares de 100.000 células/100 μ L para cada condición experimental. Además de un control sin tratamiento (DMSO) y las diferentes concentraciones del compuesto ensayado, se incluyó un control positivo de inducción de apoptosis con 2-ME a 10 μ M. Los controles permitieron asegurar el correcto marcaje de las células en el ensayo y delimitar las diferentes subpoblaciones de células viables (sin marcaje), en apoptosis temprana (marcadas con PE-AV), en apoptosis tardía (marcadas con PE-AV y con 7-AAD) o en necrosis (marcadas con 7-AAD (**Figura 16**)). Las muestras se incubaron con los marcadores durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad y se pasaron por el

citómetro de flujo *FACS VERSETM* (BD Biosciences) con el programa *DB FACSuite*. Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes para obtener un valor medio.

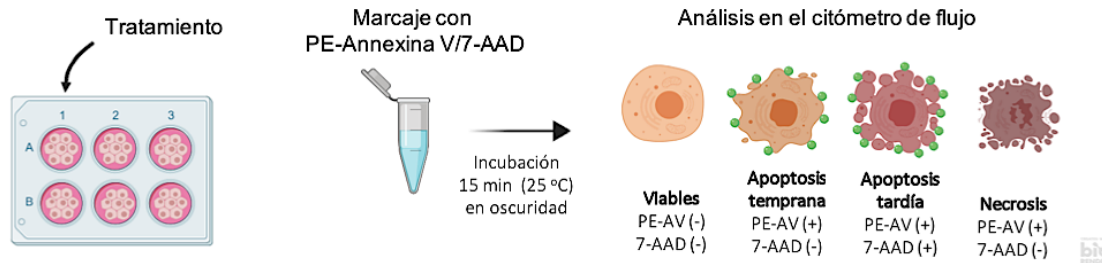


FIGURA 16. Ensayo de citometría de flujo para la detección de fosfatidilserina por marcaje con ficoeritrina-Annexina V (PE-AV) y análisis de la integridad de la membrana por marcaje con 7-AAD. Según el marcaje, se distinguen 4 subpoblaciones celulares; doble marcaje negativo o viables; PE-AV positivas o en apoptosis temprana; doble positivas o en apoptosis tardía; 7-AAD positivas o en necrosis.

5. ENSAYOS *IN VIVO*

5.1 Ensayos realizados con el modelo de la membrana corioalantoidea de pollo

5.1.1 Ensayo CAM

Entre los días 5 y 6 del desarrollo embrionario del pollo se forma en el huevo una estructura llamada membrana corioalantoidea (CAM), por la fusión parcial del corion y el alantoides. La CAM sufre un proceso de angiogénesis muy activa entre los días 8 y 10 del desarrollo embrionario, que da lugar a una compleja red vascular. El ensayo de angiogénesis en CAM consiste en depositar un disco que contenga un compuesto determinado sobre la superficie de la CAM, comprobando posteriormente si la presencia del mismo afecta a la formación dicha red vascular (Ribatti *et al.*, 2001).

El procedimiento del ensayo CAM queda representado en la **Figura 17** y se detalla a continuación. Los huevos fecundados se incubaron horizontalmente en agitación suave durante 3 días a 38 °C en una incubadora humidificada con bandeja basculante *Mesalles 25 L-HS* (Barcelona, España), tras los cuales se procedió a la extracción de entre 3-4 mL de albúmina para permitir la formación de una cámara de aire en la parte superior y proceder a la apertura de una ventana en la cáscara para comprobar si los huevos están fecundados y vivos. Las ventanas se sellaron con cinta adhesiva y los huevos se incubaron 5 días más sin agitación en las condiciones anteriormente mencionadas. Se prepararon discos planos que contenían los compuestos mezclando éstos con una solución de metilcelulosa al 1.2 % en agua destilada estéril y colocando

MATERIAL Y MÉTODOS

gotas de 10 μ L en una superficie de teflón, que se dejaron secar en una cámara de flujo laminar.

En los controles negativos se añadieron volúmenes de DMSO equivalentes a los contenidos en las muestras y como control positivo se usó 3 nmol/disco de aeroplisinina-1 (Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002). Los discos se colocaron sobre la CAM, las ventanas se sellaron de nuevo con cinta adhesiva y se incubaron 2 días más. Finalmente, las CAM se examinaron y fotografiaron con un estereomicroscopio acoplado a una cámara (*Nikon DS-Ri2 camera*) utilizando el programa *NIS-elements* (Nikon, Tokyo, Japón). Las fotografías se evaluaron a ciegas por, al menos, dos observadores diferentes. La evaluación de los efectos fue cualitativa, de modo que un resultado se consideró positivo cuando se observaron anomalías en el desarrollo de la vasculatura como una menor cantidad de vasos en el área bajo el disco, la desorganización de la vasculatura y/o el crecimiento centrífugo de los vasos periféricos al disco. Además de estos efectos, se tuvieron en cuenta otras posibles observaciones como la presencia de respuestas inflamatorias o hemorragias, de modo que bajo estas circunstancias se clasificaron como no valorables.

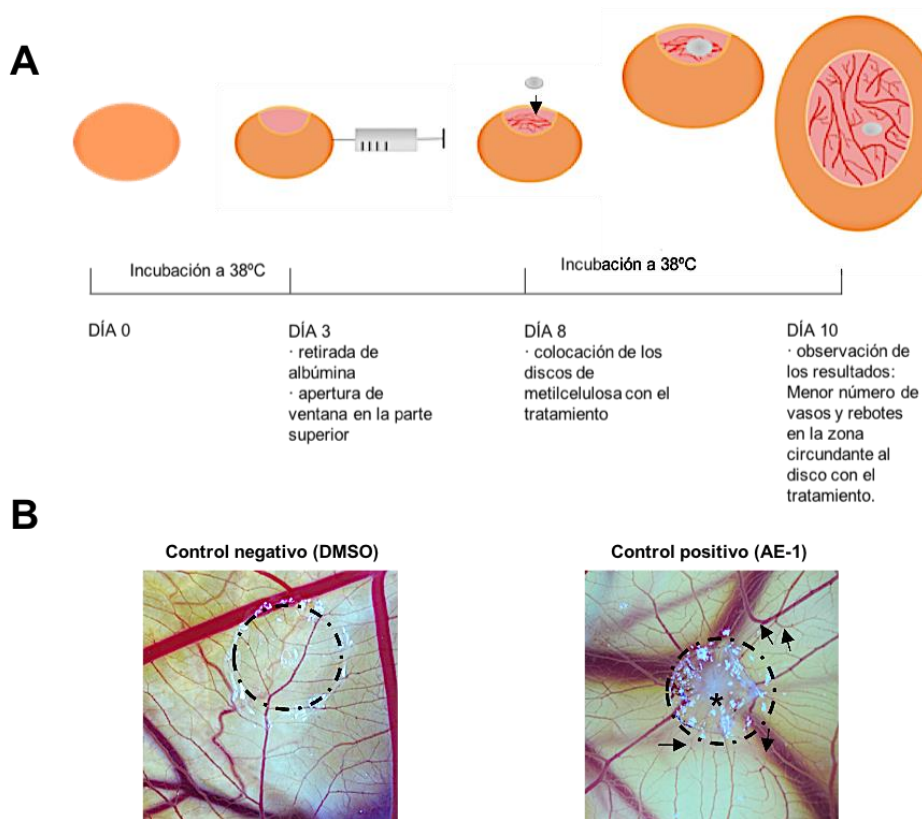


Figura 17. A. Esquema temporal del procedimiento para realizar el ensayo de angiogénesis CAM de embriones de pollo. **B.** Fotografías representativas de un control de inhibición negativo cuyo disco contiene DMSO y un control de inhibición positivo cuyo disco contiene 3 nmol de aeroplisinina-1. Los círculos discontinuos señalan la posición de los discos de metilcelulosa, las flechas señalan vasos periféricos con crecimiento centrífugo y el asterisco la falta de vasos bajo el disco.

5.1.2 Ensayo de xenotransplante de células tumorales en CAM de pollo

La diferencia de este ensayo con el anterior es que se induce la formación de nuevos vasos mediante la presencia de células tumorales (Swadi et al 2018; DeBord et al. 2018). El procedimiento que se llevó a cabo se presenta esquematizado en la **Figura 18**. Los huevos fecundados se incubaron horizontalmente en agitación suave a 38 °C y a los 3 días se extrajeron 3-4 mL de albúmina y se abrió una ventana en la cáscara, de forma similar a lo descrito en el ensayo CAM. Las ventanas se sellaron con cinta adhesiva y los huevos se incubaron hasta el día 11, cuando la CAM ya está completamente desarrollada (Moreno-Jiménez *et al.*, 2016; Porcù *et al.*, 2016b; Swadi *et al.*, 2018). Se colocaron sobre la CAM unas píldoras de alginato al 6% que contenían en su interior el compuesto en evaluación, en este caso disuelto en PBS libre de lipopolisacáridos (LPS), y $3 \cdot 10^4$ células de la línea de glioblastoma U87MG. Se incluyeron como grupos control píldoras de alginato que contenían el medio de cultivo de las células y píldoras de alginato que contenían el estímulo proangiogénico sin tratamiento (PBS libre de LPS). Los huevos se volvieron a sellar e incubar hasta el día 14, en el que se realizó el recuento de nuevos vasos formados por la presencia de las células tumorales y se fotografiaron en un estereomicroscopio Leica MZ16 F equipado con una cámara digital DFC480 y el software ICM50 (Leica, Wetzlar, Germany). Los nuevos vasos se caracterizaban por situarse de forma radial respecto a la píldora de alginato y por tener un grosor muy inferior al resto de los vasos producidos de forma fisiológica.

Los resultados se analizaron de forma cuantitativa, atendiendo al promedio de los nuevos vasos inducidos por la presencia de las células tumorales, de forma cualitativa, otorgando una puntuación o score a cada CAM según la respuesta angiogénica que se observara: respuesta débil o nula (negativo), respuesta moderada (positivo) o respuesta aguda (muy positivo). Al igual que en el ensayo descrito en el apartado anterior, además de la formación de nuevos vasos, se deben tener en cuenta otras posibles observaciones como la presencia de respuestas inflamatorias o hemorragias.

MATERIAL Y MÉTODOS

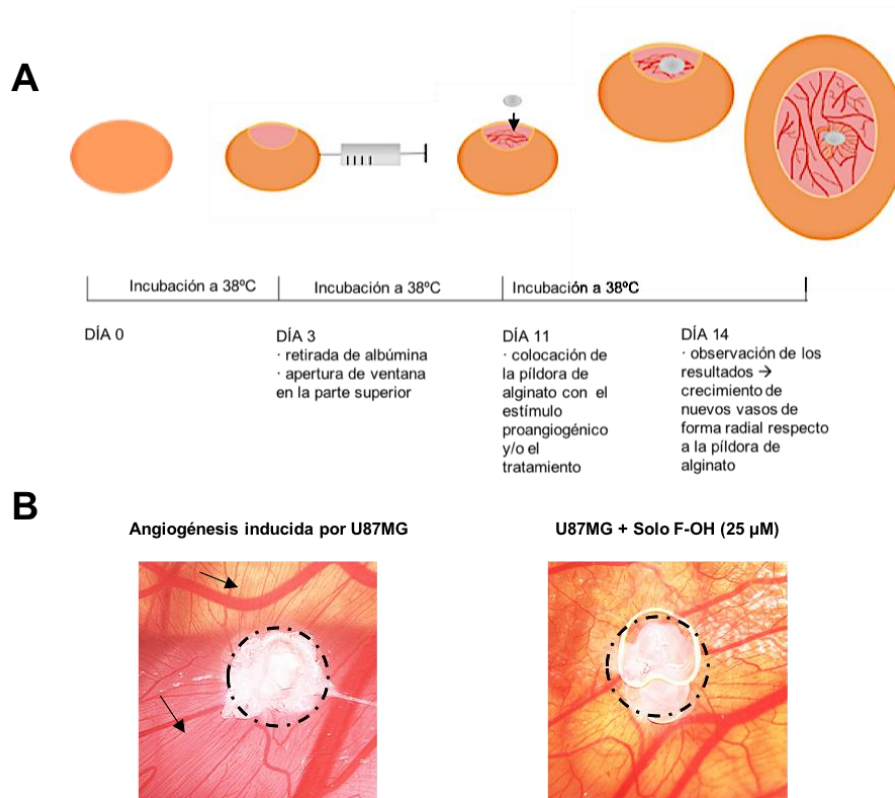


Figura 18. A. Esquema temporal del procedimiento para realizar el ensayo de xenotransplante de células tumorales en CAM de embriones de pollo. **B.** Fotografías representativas de un control positivo de inducción cuya píldora de alginato contiene células de glioblastoma U87MG y de un tratamiento cuya píldora contiene células de glioblastoma U87MG y el compuesto Solo F-OH (25 µM). Los círculos discontinuos señalan la posición de las píldoras de alginato, las flechas señalan vasos inducidos por la presencia de las células tumorales.

5.2 Ensayos realizados con el modelo del pez cebra

5.2.1 Análisis de la formación de vasos intersegmentales en embriones de pez cebra

Durante el desarrollo embrionario temprano del pez cebra se forma la vasculatura primitiva del embrión mediante vasculogénesis. Posteriormente el plexo vascular se va completando por procesos de angiogénesis, como los que se dan en la aorta dorsal para formar los vasos intersegmentales (ISV, *Intersegmental Vessels*). Al igual que el ensayo CAM, el ensayo de inhibición de la formación de ISVs en *D. rerio* (**Figura 19 A**) es ampliamente utilizado para la evaluación del potencial antiangiogénico de compuestos candidatos a fármacos (García-Caballero *et al.*, 2018).

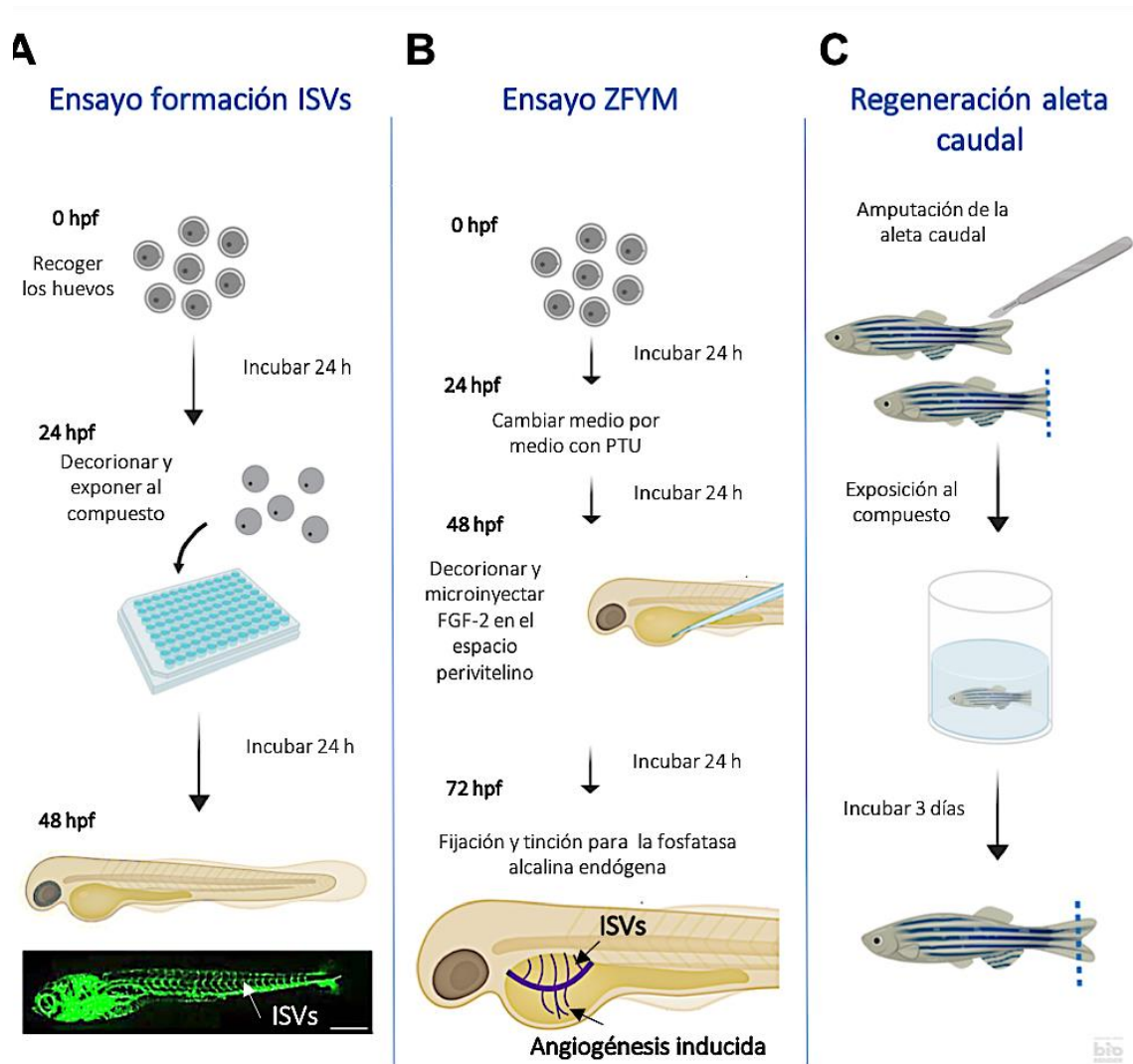


Figura 19. Esquematación de los diferentes ensayos realizados con el modelo pez cebra (*D. rerio*). **A.** Ensayo de formación de los vasos intersegmentales (ISVs) en embriones tratados durante 24 h con un compuesto antiangiogénico **B.** Ensayo de la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos ectópicos a partir de los vasos subintestinales (SIVs) en embriones mediante la microinyección de 2 ng de FGF-2 en el espacio perivitelino. **C.** Ensayo de la regeneración de la aleta caudal en ejemplares adultos.

Los embriones se obtuvieron mediante el apareamiento entre parejas de machos y hembras, que fueron divididos por separadores de plástico en peceras con una rejilla o doble fondo, impidiendo que los adultos pudieran comerse los huevos. La mañana siguiente se retiró el separador y se recogieron los huevos fecundados en una placa de Petri con medio para embriones E3 (NaCl 5 mM, KCl 0.17 mM, CaCl₂·2H₂O 0.33 mM, MgSO₄·7H₂O 0.33 mM). Los huevos se examinaron a la lupa y se eliminaron los no fecundados, que presentaban con un color blanco opaco, y la suciedad que pudiera aparecer. Se realizó un lavado con lejía diluida en agua del sistema al 0.5% durante 90 segundos seguido de tres lavados de 3 min con medio E3 y se incubaron 24 h a 28.5 °C. A las 24 hpf (horas post-fecundación) se retiró el corion, bien manualmente con la ayuda de pinzas y lupa. Una vez decorionados, se colocó un embrión por pocillo en placas de 96 en un volumen final de 100 µL de medio E3 con la concentración de

MATERIAL Y MÉTODOS

compuesto deseada. Se emplearon dos controles negativos, uno con medio E3 y otro con DMSO en la misma proporción que en la máxima concentración de compuesto ensayada. Como control positivo se empleó sunitinib 20 μM (Letamendia *et al.*, 2012).

Tras incubar 24 h, los embriones se anestesiaron con tricaina (0.02 mg/mL), se visualizaron y se fotografiaron cámara *Nikon DS-Ri2* acoplada a un microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse Ti* (Nikon, Tokyo, Japan) y utilizando el software *NIS-Elements* de Nikon. Los cambios fenotípicos debidos a una inhibición de la angiogénesis aparecían mayoritariamente al final de la región caudal y consistían en la falta o incompleta formación de los ISVs, así como la presencia de vasos muy finos y/o colapsados. Además, se grabaron vídeos con el quipo y el software mencionados, para valorar posibles defectos en el flujo de sangre a través de estos vasos.

5.2.2 Ensayo de inhibición de angiogénesis en el saco vitelino de embriones de peces cebra (ZFYM)

Los vasos subintestinales (SIVs, *Subintestinal Vessels*) se forman por angiogénesis a partir de la vena cardinal posterior durante el desarrollo embrionario del pez cebra, entre las 48 hpf y las 72 hpf. Para la realización de este ensayo se siguió el protocolo de ensayo de angiogénesis en la membrana vitelina en pez cebra (*ZFYM, Zebrafish Yolk Membrane assay*) descrito en Nicoli *et al.* (2009), microinyectando FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) en el espacio perivitelino y estudiando la capacidad que tienen los compuestos estudiados para bloquear la angiogénesis inducida por el FGF-2. En la **Figura 19 B** se muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo en este ensayo. Los embriones se obtuvieron por el método descrito en el apartado anterior.

A las 24 hpf el medio para embriones (50 mg/L de la mezcla de sales comercial *instant ocean*, 50 mg/L de bicarbonato, 95 mg/L de sulfato de magnesio y 0.2 mg/L de azul de metileno) se cambió por medio con feniltiourea (PTU, 1-phenyl-2-thiourea) al 0.003% para evitar la formación de pigmentos que interfirieran con la visualización de los resultados. Tras incubar otras 24 h, se procedió a la microinyección de FGF-2 en el espacio perivitelino de los embriones previamente decorionados y anestesiados (ver apartado 5.2.1). Se microinyectaron 2 nL de FGF-2 (1 ng/nL) disuelto en *Danieau Solution* (NaCl 1,7 M, KCl 21 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 18 mM, HEPES 150 mM) usando agujas de borosilicato y un microinyector *Picospritzer microinjector* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los embriones inyectados se colocaron en placas de 6 pocillos en ausencia (control negativo) o presencia del compuesto evaluado, disuelto en medio para embriones con PTU, durante 24 horas a 28 °C. A las 72 hpf, cuando los plexos subintestinales estaban completamente formados, se fijaron en una solución de PFA al 4% durante 2h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 5 min con PBS (NaCl 150 mM, KCl 23,6 mM, Na_2HPO_4 23,6 mM, NaH_2PO_4 1,5 mM), los embriones se deshidrataron en metanol al 100% durante 2 h a temperatura ambiente, se volvieron a

hidratar mediante incubaciones de 5 min a temperatura ambiente a concentraciones decrecientes de metanol (75, 50 y 25 %) y se lavaron 5 veces con PBS-T (PBS 1x con Tween20 al 0.1%). Tras tres incubaciones de 5 min a temperatura ambiente con el tampón NTMT (Tris-HCl 0.1 M pH 9.5; MgCl 50 mM; NaCl 0.1 M; Tween 20 0.1% en agua bidestilada esterilizada), se añadieron 3,5 μ L de BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine*) (Roche, SIGMA) y 2,5 μ L de NBT (*4-Nitro blue tetrazolium chloride*) (Roche, SIGMA) por cada mL de NTMT. Tras incubar 15 min a temperatura ambiente, la reacción se paró con varios lavados en PBS-T y añadiendo una gota de PFA al 4%. Las muestras se guardaron a 4 °C hasta el momento de su visualización y la toma de fotografías en un estereomicroscopio *Leica MZ16F* equipado con una cámara digital *DFC480* y el software *ICM50* (Leica, Wetzlar, Alemania).

En respuesta al FGF-2 inyectado, aparecen vasos sanguíneos formados a partir del plexo subintestinal y que se dirigen al punto de inyección. En presencia de un inhibidor de la angiogénesis, la respuesta inducida por el FGF-2 será menor o inexistente. Para la evaluación de los resultados se tuvo en cuenta cantidad de vasos ectópicos formados a partir del plexo debido al estímulo angiogénico (Nicoli *et al.*, 2009) valorándose como negativos (con falta de respuesta al estímulo proangiogénico), positivos (con una respuesta moderada consistente en pocos vasos, normalmente un solo vaso largo o 1-2 vasos normales) o muy positivos (con una fuerte respuesta consistente en numerosos vasos).

5.2.3 Ensayo de la regeneración de la aleta caudal de pez cebra

Este ensayo hace uso de la alta capacidad de regeneración tisular que presenta el pez cebra (Gemberling *et al.*, 2013). Esta especie es capaz de regenerar distintos tejidos, destacando el fenómeno de regeneración de la aleta caudal si ésta es amputada en el animal adulto. Durante la regeneración de la aleta se forma una masa de células indiferenciadas en el borde de la amputación denominada blastema. Estas células tienen una alta capacidad proliferativa y se diferenciarán para dar lugar a todos los componentes de la aleta caudal: tejido esquelético, tejido conectivo, tejido nervioso, epidermis pluriestratificada y nuevos vasos sanguíneos, para lo que se requiere una angiogénesis activa.

Para estudiar el efecto de los compuestos sobre la angiogénesis regenerativa de la aleta caudal, se utilizaron ejemplares adultos de pez cebra salvaje (**Figura 19 C**), que se anestesiaron con triclaína al 0,02 mg/mL y colocaron en un portaobjetos de cristal. Se realizó un corte transversal limpio en la parte más distal de la aleta caudal con un bisturí. Tomándose fotografías de la aleta (0 dpa – días post amputación –) con una cámara *Nikon DS-Ri2* acoplada a un microscopio *Nikon Eclipse Ti* (Nikon, Tokyo, Japan). Los peces se incubaron en las concentraciones correspondientes de compuesto o DMSO

MATERIAL Y MÉTODOS

en un volumen final de 100 mL durante 3 días a 28 °C y 12 h luz/oscuridad. Tras la incubación, los individuos volvieron a ser anestesiados y fotografiados.

6. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS

Una vez identificada la actividad antiangiogénica de los compuestos estudiados *in vitro* e *in vivo*, se procedió a estudiar el mecanismo de acción a nivel molecular por el cual éstos son capaces de ejercer su efecto. Para ello se analizaron mediante técnicas de biología molecular algunas vías de señalización y/o procesos intracelulares relacionados con la angiogénesis a los que podrían estar afectando los compuestos en las células endoteliales.

6.1 Estudio de la activación de rutas de señalización implicadas en la angiogénesis mediante *Western-blot*

La obtención de las muestras varió según la proteína detectada. Para las proteínas AKT y ERK 1/2 y sus formas fosforiladas, se sembraron BAEC en placas de 6 pocillos hasta la confluencia, se incubaron en condiciones de ayuno (sin suero) durante 16, se trataron con el compuesto 1h y las rutas de bioseñalización se activaron cambiando el medio por medio suplementado con FBS al 10% durante 10 min, dejando un control sin activar (en medio sin suero). Para FAK se sembraron HUVEC en P100 y se trataron 7 h con las concentraciones deseadas del compuesto.

En otros los casos las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se lisaron en tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato sódico 0.25 %, EDTA 1 mM) complementado con inhibidores de fosfatasa (ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 1 mM, β -glicerofosfato 30 mM) y de proteasas (*cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche, Mannheim, Alemania). Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se guardaron a -80 °C hasta su uso. En la **Figura 20** se muestra un esquema de procedimiento.

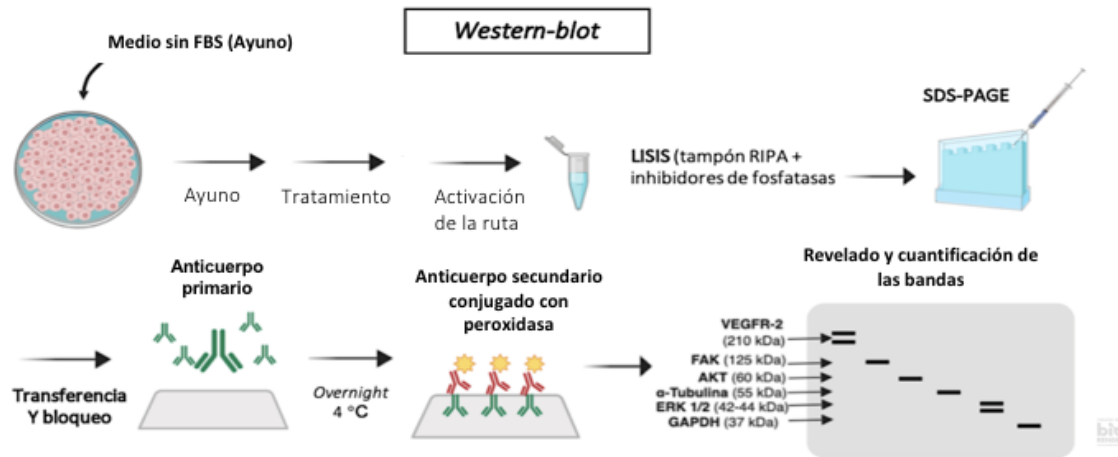


Figura 20. *Western-blot* para analizar el efecto de un compuesto sobre la activación de rutas de señalización de relevancia en angiogénesis.

Se cuantificó la cantidad de proteínas en cada muestra por el método Bradford (BioRad) respecto a una recta patrón de BSA, se mezclaron con tampón de carga desnaturante (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 60 mM, SDS 12 %, Glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, Azul de bromofenol 0.2 %) y se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C antes de su carga en los geles de electroforesis por SDS-PAGE a 100 V a temperatura ambiente usando como tampón de electroforesis Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %) a 100 V a 4 °C durante 1-2 h según el tamaño de la proteína.

Las membranas se bloquearon con una solución de BSA al 10 % en TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 137 mM, Tween-20 al 0.1 %) 1 h en agitación suave a temperatura ambiente y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos según las indicaciones de la **Tabla 5** en TBS-T con BSA al 2%. Tras tres lavados de 10 min en agitación con TBS-T, se incubaron con el anticuerpo secundario diluido según las indicaciones de la **Tabla 6** durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Además, para comprobar la equidad en la carga de proteína total, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios para detectar o bien α -tubulina (50 kDa) o GAPDH (37 kDa) 1h a temperatura ambiente. Después de otros tres lavados, se revelaron utilizando el reactivo *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Rockford, USA), según las indicaciones de la casa comercial. Se tomaron imágenes de quimioluminiscencia con el programa *Image Lab* en el dispositivo *Chemidoc XRS System* y el tamaño/intensidad de las bandas obtenidas se analizó con el programa *Image J*.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.2 Medida *in vitro* de la actividad tirosina quinasa de VEGFR2

Para estudiar el efecto de los compuestos sobre la actividad tirosina quinasa de VEGFR2 *in vitro* se utilizó el kit *VEGFR2(KDR) Kinase Assay Kit* (BPS Bioscience) (**Figura 21**). Los compuestos estudiados (o el vehículo, DMSO, en el caso del control negativo) se incubaron en presencia del dominio con actividad tirosina quinasa de VEGFR2 y de ATP (500 μM) durante 45 minutos a 30 °C. Tras este tiempo se añadió el reactivo luminiscente *Kinase-Glo MAX* (Promega) para detectar el ATP remanente en cada condición experimental y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Este reactivo se basa en la reacción de la luciferasa que, en presencia de ATP, cataliza el paso de luciferina a oxiluciferina con la obtención de luminiscencia. Si un compuesto inhibe la actividad tirosina quinasa de VEGFR2, se detectará una mayor cantidad de ATP y, por tanto, la señal de luminiscencia será mayor. Como control de inhibición, se utilizó sunitinib (Faivre *et al.*, 2007) a una concentración de 1 μM .

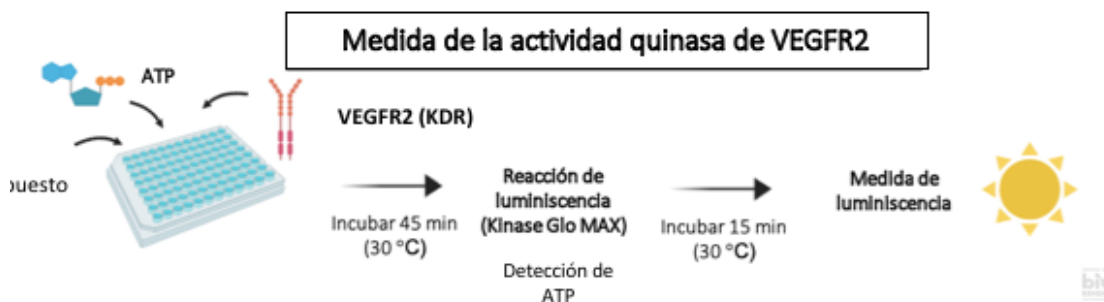


FIGURA 21. Medida del efecto de los compuestos sobre la actividad tirosina quinasa de VEGFR2.

6.3 Estudio de la expresión de determinados genes por PCR cuantitativa (rt-qPCR)

Mediante rt-qPCR cuantificamos la expresión de RNAm de determinadas moléculas relacionadas con la angiogénesis, evaluando así el efecto de los compuestos estudiados sobre esta expresión (**Figura 22**). Las células se crecieron en placas de 6 pocillos y una vez alcanzado el 85-90% de confluencia, se incubaron durante 7 h en ausencia o presencia del compuesto estudiado y se lisaron en 300 μL /pocillo del reactivo *TRI Reagent* (Merck). El ARN total se aisló mediante el kit *Direct-Zol RNA Miniprep* (Zymo Research, Irvine, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. La cantidad de ARN total extraída en cada muestra se determinó mediante un espectrofotómetro *Nanodrop One* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para realizar la retrotranscripción del RNAm a cDNA se utilizó *PrimeScriptTM RT Reagent Kit* (Takara Bio INC., Kusatsu, Japón) siguiendo las especificaciones del suministrador.

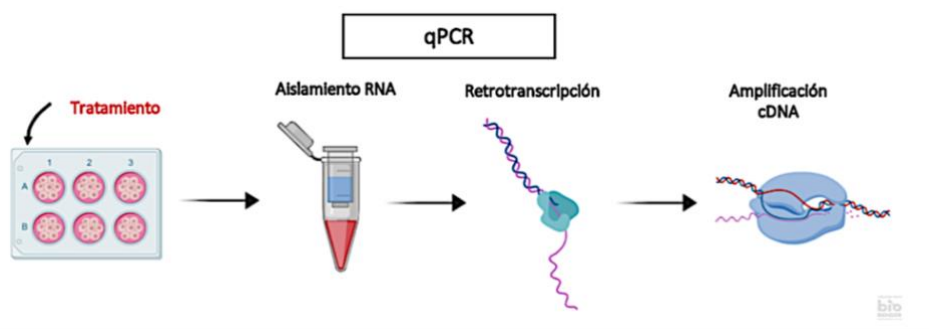


FIGURA 22. Esquematación del ensayo de PCR cuantitativa para analizar la expresión de ARN mensajero de una proteína de interés.

Para la amplificación del cDNA mediante rt-qPCR se utilizó el kit *SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNase H Plus) kit* (Takara Bio INC.) partiendo de 10 ng de cDNA por muestra y usando los cebadores correspondientes (**Tabla 7**). Cada reacción de amplificación se hizo por duplicado y se realizaron 3 réplicas experimentales independientes para cada condición. Como gen de referencia se usó la GAPDH. Las reacciones de rt-qPCR se llevaron a cabo en un sistema *Eco real-time PCR System* (Cultek). Finalmente se comparó la cantidad de cDNA amplificado en las muestras mediante el método de comparación de Ct (umbral de ciclo) o fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativizando a la expresión del gen de referencia para cada condición experimental, y se normalizaron los datos considerando el control sin tratamiento como el 100 % de expresión.

6.4 Análisis de moléculas de adhesión expuestas en la membrana de células endoteliales por citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer hasta alcanzar un 85-90% de confluencia, momento en el cual se incubaron durante 16 h en ausencia (control) o presencia de la concentración correspondiente de compuesto. Tras dos lavados con PBS, se despegaron con tripsina y se prepararon suspensiones celulares de $1 \cdot 10^6$ células/mL. De cada suspensión celular se separaron alícuotas de 100 μ L para proceder al marcaje con los anticuerpos a las diluciones indicadas en la **Tabla 5** durante 1 h en hielo y en oscuridad. Se incluyeron dos controles en el experimento, uno de células no tratadas y no marcadas, y uno de células no tratadas y marcadas. Después de 3 lavados con tampón de citometría (apartado 4.8), las muestras se analizaron en el citómetro *FACS VERSETM* con el programa *BD FACSuite Program Analysis Assay* (BD Biosciences) (**Figura 23**).

MATERIAL Y MÉTODOS

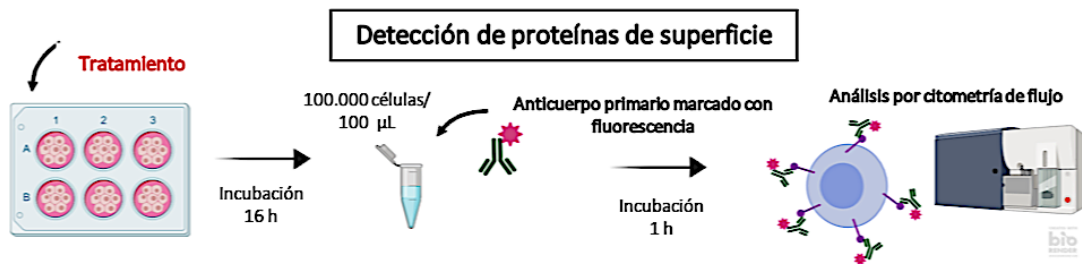


Figura 23. Detección de la exposición de proteínas de superficie por citometría de flujo.

6.5 Detección de proteínas del citoesqueleto en células endoteliales mediante inmunotinciones y marcaje fluorescente

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal tratados con gelatina al 0.5 % en placas de 6 pocillos a una densidad de 300.000 células /mL. Tras su adhesión al soporte, se incubaron en ausencia o presencia de la concentración de compuesto correspondiente durante 7 h o 16 h (según el experimento en cuestión) y se fijaron con PFA al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS, las células se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 0,5 % (15 min a temperatura ambiente) y se bloquearon con PBS-BSA 3% (10 min a temperatura ambiente). Tras incubación durante 1 h a temperatura ambiente en presencia de los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBS con BSA al 3% (Tabla 5), se lavaron 3 veces 5 min con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en PBS con BSA al 3% (Tabla 6) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad (Figura 24).

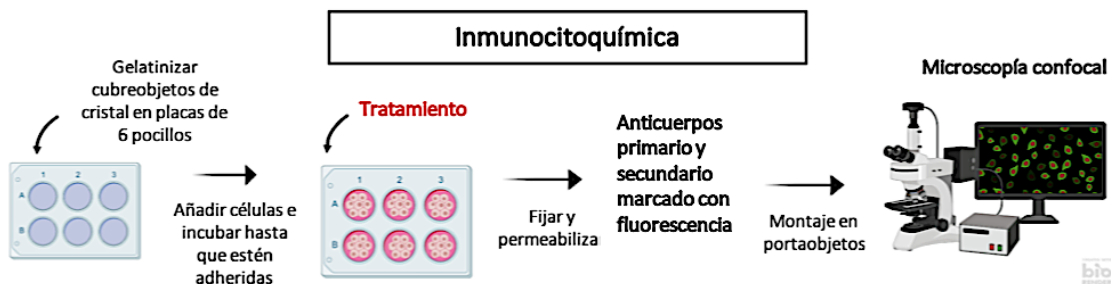


Figura 24. Inmunocitoquímica para visualizar componentes del citoesqueleto.

Para visualizar los filamentos de actina en las mismas muestras en las que se realizaron las inmunotinciones, una vez hibridadas con el anticuerpo secundario, las muestras se incubaron con faloidina-iFluor 488 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluida 1:1000 en PBS-BSA 1% durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Los núcleos se tiñeron durante 3 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con Hoechst 33258 (Excit./em. 345/478) diluido 1:1000 en PBS. Tras 3 lavados de 5 min con PBS, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia *Dako Fluorescence Mounting Medium* (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) y se guardaron a 4 °C hasta su visualización y toma de imágenes en el

microscopio confocal *Leica TCS SP5 II* (Leica, Wetzlar, Alemania) con el programa *Leica Application Suite*.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos se ha utilizado el test estadístico *T-test* para comparar los valores promedio \pm desviación estándar de cada tratamiento con el control correspondiente empleando los programas *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Softwares*, San Diego, California, EEUU) y *IBM SPSS Statistics 25* (*International Business Machines Corporation*, Nueva York, EEUU).

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE
UNA SERIE DE COMPUESTOS INTERMEDIARIOS DE LA
SÍNTESIS DE LAS *SOLOMONAMIDAS*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ANTECEDENTES DE LAS SOLOMONAMIDAS A Y B.

Las *solomonamidas A y B* son péptidos cíclicos aislados de *Theonella swinhoei*, una esponja de mar con una amplia distribución mundial y que forma parte de los arrecifes de coral en China, Indonesia, el Océano Índico, el Mar Rojo y el Golfo de Eilat (Gray, 1868; Burton y Rao, 1932; Ilan *et al.*, 2004; Lim y Tan, 2016).

T. swinhoei fue descrita por primera vez en 1868 por John Edward Gray y ha resultado ser fuente de numerosos compuestos de interés biomédico que presentan muy diversas propiedades biológicas con posibles aplicaciones terapéuticas. Entre las actividades biológicas de los compuestos aislados de *T. swinhoei*, cabe mencionar los efectos antiinflamatorios descritos para algunos de ellos, como las *perthamidas* (Festa *et al.*, 2009, 2012), el *theonellasterol* y el *conicasterol* (De Marino *et al.*, 2011 a), los *solomonesteroles A y B* (Festa *et al.*, 2010) o el *malainosterol A* (De Marino *et al.*, 2011 b). Además, algunos de estos metabolitos secundarios derivados de *T. swinhoei* son capaces de interactuar con receptores nucleares que se unen a elementos de respuesta a hormonas en el ADN, como son los receptores relacionados con el receptor de estrógenos (ERR, *Estrogen-Related Receptors*), el receptor X de pregnano (PXR, *Pregnane X Receptor*) y el receptor X farnesoide (FXR, *Farnesoid X Receptor*), que son importantes dianas terapéuticas en determinados tipos de cáncer y en enfermedades metabólicas e inflamatorias (Chen, 2008; Malrik *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2012; D'Áuria *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014).

Otra de las actividades biológicas descritas para algunos de los compuestos aislados de *T. Swinhoei*, es su efecto citotóxico frente a diferentes líneas tumorales y no tumorales. Es el caso del *theonellasterol K* (Guo *et al.*, 2012), algunos derivados de la *caliculina* (Steube *et al.*, 1998) y el *shinholiesterol A* y algunos de sus derivados (Li *et al.*, 2018), entre otros. En las *swinholidas* o la *hurghadolida A* estas actividades parecen estar mediadas por la disrupción del citoesqueleto de actina (Bubb *et al.*, 1995; Youssef y Mooberry, 2006; De Marino *et al.*, 2011c). Algunos de estos compuestos, incluyendo la *miraziridina A* (Tabares *et al.*, 2012), son inhibidores de proteasas, lo que sugiere su potencial uso en terapias contra ciertas enfermedades infecciosas (Patick y Potts, 1998; Agbowuro *et al.*, 2018). Para otros, se ha propuesto su uso como fármacos antivirales en enfermedades de gran impacto, como son las producidas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Oxford *et al.*, 1989; Subbaiah *et al.*, 2017) o el de la hepatitis C (De Leuw y Stephan, 2018). Finalmente, algunos de los compuestos aislados en esta esponja de mar han mostrado poseer actividad como anticoagulantes (Nakao *et al.*, 1995), fungicidas, (Carmely y Kashman, 1985; Youssef y Mooberry, 2006) o bactericidas (Matsunaga *et al.*, 2001).

Entre los numerosos compuestos encontrados en *T. swinhoei* con diferentes propiedades biológicas, en este trabajo hemos centrado la atención en las *solomonamidas A* y *B*, que reciben este nombre porque fueron aisladas de muestras de *T. swinhoei* recogidas en las islas Salomón, en el océano Pacífico (Winder *et al.*, 2011). Se trata de péptidos cíclicos formados por tres aminoácidos convencionales (D-Ala, Gly y L-Ser) y otros dos de gran novedad estructural, el ácido 4-amino(2'-amino-4'-hidroxifenil)-3,5-dihidroxi-2-metil-6-oxohexanoico (ADMOA) y su 5-desoxi derivado (AHMOA) (Kavitha y Chandrasekhar, 2015) (**Figura 25**).

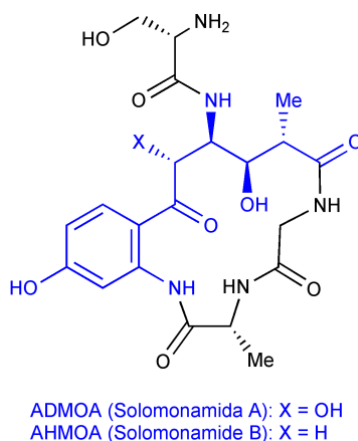


Figura 25. Estructura química de las *solomonamidas A* y *B*. En azul se destaca la parte de la estructura correspondiente a los aminoácidos inusuales ADMOA, en el caso de la *solomonamida A*, y AHMOA, en el caso de la *solomonamida B*.

Las originales e intrincadas estructuras tridimensionales de estos ciclopéptidos aumentan el interés en el estudio de su potencial terapéutico, derivado en última instancia de sus interacciones con las posibles dianas moleculares. La presencia de aminoácidos inusuales proporciona ciertas propiedades los péptidos que los contienen, como una mayor resistencia a la degradación por peptidasas y estabilidad derivada de las restricciones conformacionales y rigidez que aportan estos aminoácidos a la estructura (Lyu *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2004), propiedades a las que también contribuye su estructura cíclica (Cardillo *et al.*, 2006).

El uso de proteínas o péptidos con fines terapéuticos presenta una serie de limitaciones entre las que destacan su rápido metabolismo por las proteasas en el tracto gastrointestinal, su deficiente paso desde el intestino a la sangre o su rápida excreción (Veber y Freidinger, 1985). Sin embargo, la incorporación a sus estructuras de aminoácidos no proteínogénicos les confiere algunas ventajas entre las que se encuentran una mayor vida media derivada de su mayor estabilidad metabólica y resistencia a la degradación enzimática (Latham, 1999; Werle y Bernkop-Schnürch, 2006; Rogers y Suga, 2015), una mayor especificidad frente a la diana (Wals y Ova, 2014; Blaskovich, 2016) y la presencia de mejores características farmacocinéticas (Blaskovich, 2016), por ejemplo, en lo que se refiere al transporte a través de las membranas (Tsume

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

et al., 2014). Todo ello ha despertado el interés del uso de los aminoácidos no proteínogénicos en el desarrollo de nuevos fármacos, habiendo aumentado notablemente en los últimos años la producción sintética de proteínas o péptidos que contienen este tipo de aminoácidos, en particular para la producción de anticuerpos y antibióticos (Wals y Ovaa, 2014; Blaskovich, 2016; Huang y Liu, 2018).

Numerosos péptidos que presentan la característica de contener en su estructura aminoácidos poco habituales y que no forman parte de proteínas se han aislado de diversos organismos, como bacterias, hongos, plantas u organismos marinos (Blaskovich, 2016), y determinados nichos ecológicos, como suelos o acuíferos (Popova y Kokshariva, 2016). En estos organismos, la actividad citotóxica de dichos péptidos les confiere protección frente a los depredadores (Yamane *et al.*, 2010). Se han descrito numerosas aplicaciones terapéuticas para este tipo de moléculas, bien sea como antibióticos, antifúngicos, herbicidas, insecticidas (Hubbard *et al.*, 2000; Yamane *et al.*, 2010; Blaskovich, 2016; Lamberth, 2016), antitumorales (DeWys y Hal, 1993; Tsume *et al.*, 2014) o como fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Kasperkiewicz *et al.*, 2012). Un buen ejemplo es la *mimosina*, un aminoácido no proteínogénico similar a la tirosina que presenta aplicaciones para la industria farmacéutica como antitumoral, la agroalimentaria como pesticida, o la cosmética (Nokihara *et al.*, 2012).

Por lo anteriormente expuesto, la presencia de péptidos con aminoácidos no proteínogénicos en las *solomonamidas A* y *B* les hace muy interesantes como potenciales agentes terapéuticos. Sin embargo, en la actualidad se tienen pocos datos acerca de la actividad biológica que presentan, ya que la limitada obtención de *T. Swinhoei* de su nicho natural hace que la disponibilidad de estos ciclopéptidos con aminoácidos inusuales sea muy escasa. A pesar de ello, se ha descrito que la *solomonamida A* es anti-inflamatoria en modelos *in vivo*, lo que se ha puesto de manifiesto tanto con la molécula natural aislada de la esponja de mar (Festa *et al.*, 2011), como con la sintetizada en el laboratorio (Jachak *et al.*, 2018). Los indicios sobre su actividad biológica y posibles aplicaciones terapéuticas, junto con la ya mencionada limitación del aislamiento de la molécula a partir de sus fuentes naturales, avivaron el interés por poner a punto métodos para su síntesis artificial. Los grupos de investigación del Dr. Srivari Chandrasekhar (CSIR-Indian Institute of Chemical Technology, Telengana, India) y del Dr. Srinivasa Reddy (Laboratorio Nacional de Química-CSIR, Pune, India), se aproximaron a la síntesis de los péptidos ADMOA (Kavitha y Chandrasekhar, 2015) y AHMOA (Kashinath *et al.*, 2012), para finalmente culminar la síntesis completa tanto de la *solomonamida A* (Jachak *et al.*, 2018) como de la *B* (Vasudevan *et al.*, 2014; Kashinath *et al.*, 2016).

2. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS PRECURSORES DE LAS SOLOMONAMIDAS EMPLEADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL

La novedad estructural de estos compuestos y a la importancia de tener acceso a suficiente material para explorar sus actividades biológicas, causaron que el grupo dirigido por el Dr. Francisco Sarabia del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga (colaboradores habituales con el grupo de investigación en que se ha realizado esta tesis doctoral) iniciara un programa sintético dirigido hacia su producción. Para ello, se planteó la reacción de metátesis de olefinas como vía para la construcción del sistema macrocíclico. En una primera fase se investigó esta estrategia sintética con sistemas sencillos, como los compuestos nombrados como **3** y **4** en la **Figura 26**, con el objetivo de avanzar hacia los productos naturales en una segunda fase de oxidación que incorporaría los grupos funcionales requeridos (Cheng-Sánchez *et al.*, 2018).

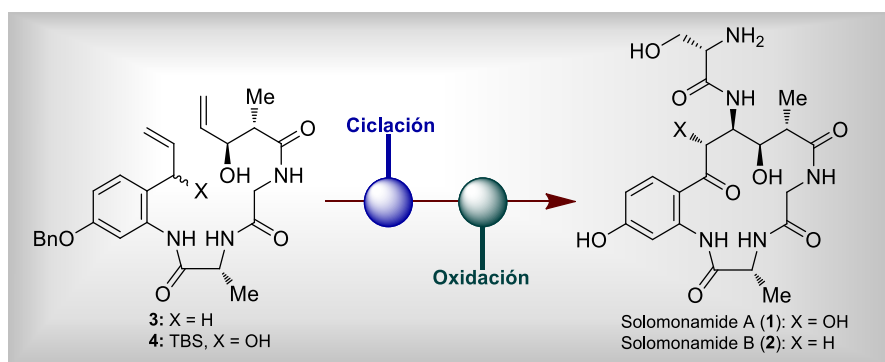


Figura 26. Resumen de la estrategia de síntesis de las *solomonamidas A* y *B* diseñada por Cheng *et al.* (2018).

Para la construcción del sistema macrocíclico se llevaron a cabo diferentes aproximaciones, basadas en la ciclación de los carbonos C4-C5, C5-C6 y C3-C4, aunque en el último caso no se obtuvo el mismo éxito que en los dos anteriores. Así, como se describe en la **Figura 27 A**, la aproximación basada en la ciclación de C4-C5 supuso la formación de un primer sistema cíclico desde la anilina, nombrada como **5** en la **Figura 27**, que, tras acoplamiento secuencial con el dipéptido **6** y el ácido **7**, condujo al precursor acíclico **8**. La acción del catalizador de rutenio de Hoveyda-Grubbs (**9**) rindió de forma muy eficiente el producto cíclico **10**, que fue uno de los productos seleccionados para la exploración de su actividad biológica y que posteriormente recibió el nombre de *solo-3*. De la misma forma, se exploró la ciclación en torno al enlace C5-C6 (**Figura 27 B**), para lo cual se preparó el precursor acíclico **14** siguiendo una estrategia sintética similar a la empleada en el caso anterior por acoplamiento secuencial de la anilina **11** con el dipéptido **6** y el ácido **12**. Igualmente, la ciclación por metátesis de olefinas de **14**, mediada por el catalizador de rutenio **9**, rindió de forma eficiente el compuesto **15**, tras romper el grupo protector de silicio con TBAF. Este compuesto **15** fue otro de los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

seleccionados para la exploración de su actividad biológica y recibió el nombre de *solo F-OH*.

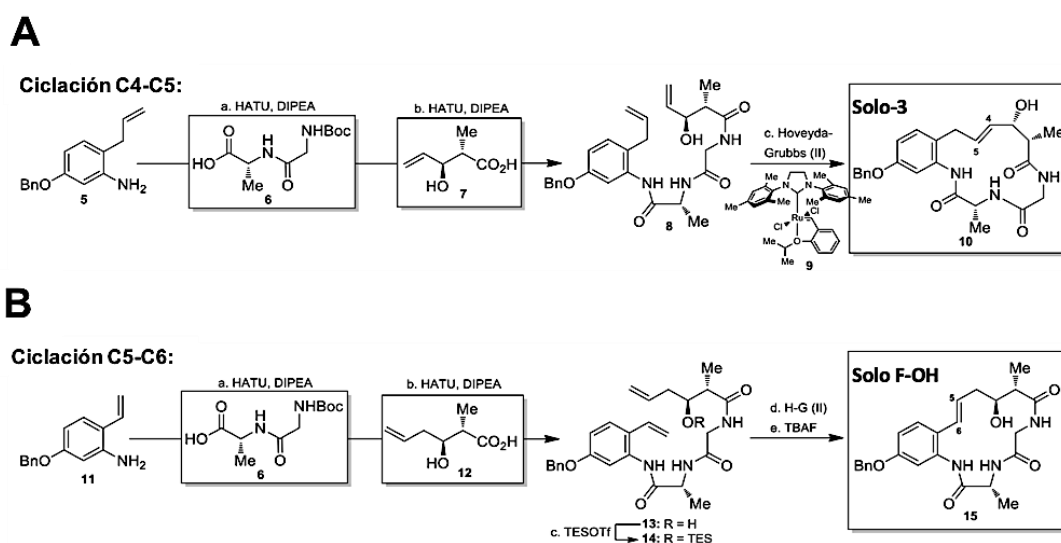


Figura 27. Diferentes aproximaciones llevadas a cabo por Cheng *et al.* (2018) para la obtención de los macrociclos. **A.** Acoplamiento secuencial de la anilina 5 con el dipéptido 6 y el ácido 7 y mediante la acción del catalizador de rutenio de Hoveyda-Grubbs tras la ciclación de C4-C5. **B.** Acoplamiento secuencial de la anilina 11 con el dipéptido 6 y el ácido 12 y, de nuevo, mediante la acción del catalizador de rutenio de Hoveyda-Grubbs.

La extensión de estas estrategias sintéticas a otros compuestos relacionados permitió la preparación de otros derivados cíclicos que, junto a los dos anteriormente mencionados, fueron sometidos a estudios biológicos para evaluar su posible aplicación como candidatos a fármacos antitumorales y/o antiangiogénicos. Su síntesis se describe en detalle en Cheng-Sánchez *et al.* (2018) y las estructuras de dichos derivados cíclicos, que nombraremos en esta memoria como *solo-1*, *solo-2*, *solo-3*, *solo-4*, *solo-5*, *solo-6*, *solo F-Bz* y *solo F-OH*, se recogen en la **Figura 28**.

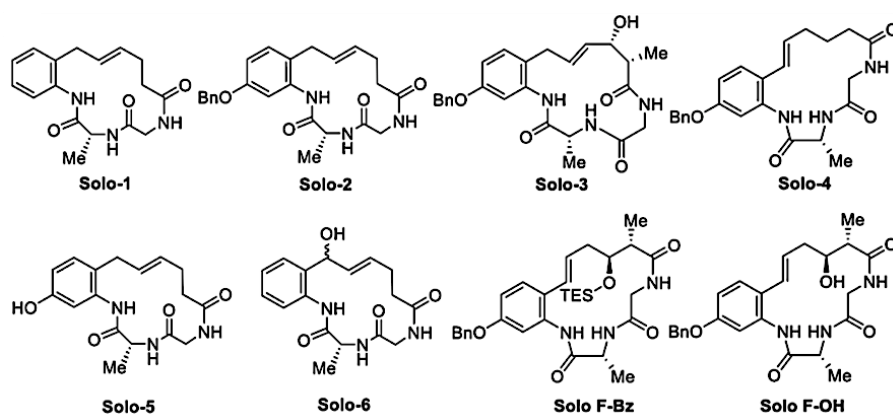


Figura 28. Estructura química de la serie de compuestos precursores de la *solomonamida A* seleccionados para el estudio de su actividad biológica.

3. EXPLORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PRECURSORES DE LAS SOLOMONAMIDAS

3.1 Efecto de los precursores sintéticos de las *solomonamidas* sobre el crecimiento de líneas tumorales y endoteliales *in vitro*

Como hemos comentado en el apartado anterior, algunos de los productos intermedios de reacción obtenidos a lo largo de la síntesis parcial de las *solomonamidas* desarrollada por el grupo del Dr. Sarabia, han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, con el objeto de estudiar sus posibles actividades biológicas. Estos compuestos fueron evaluados en primer lugar mediante un ensayo de viabilidad celular *in vitro* frente a un panel de líneas celulares tumorales, como primer indicio de su posible aplicación como fármacos antitumorales (resultados publicados en Cheng *et al.*, 2018).

La actividad inhibidora del crecimiento de diferentes líneas celulares tumorales y de las células endoteliales BAEC, se evaluó mediante el método del MTT, tal y como se describe en el apartado 4.1 de Material y Métodos. Con este ensayo se pudo estudiar la respuesta dependiente de dosis de las células frente a un amplio rango de concentraciones de los diferentes compuestos precursores de la *solomonamida A*. En la **Figura 29** se muestran curvas de supervivencia representativas del compuesto *solo F-OH* frente a las distintas líneas de células tumorales, altamente proliferativas, y la línea endotelial BAEC. Se puede apreciar que todas las líneas celulares crecen del mismo modo que el control hasta una concentración de *solo F-OH* cercana a 5 μM , donde las curvas comienzan a caer bruscamente hasta llegar a valores iguales o muy próximos al 0 % a concentraciones comprendidas entre 30 y 60 μM .

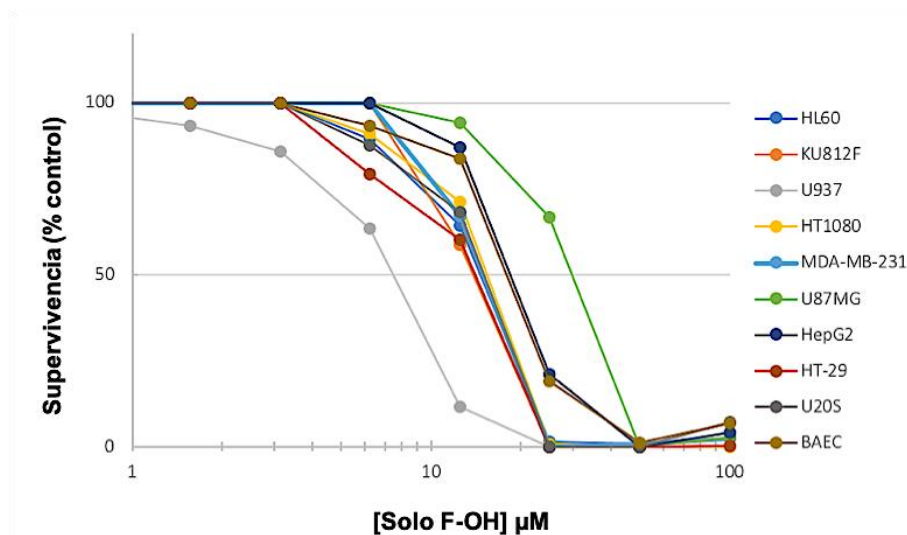


Figura 29. Curvas de supervivencia representativas de diferentes líneas tumorales y células endoteliales BAEC frente a concentraciones crecientes del compuesto *solo F-OH* obtenidas mediante el método MTT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de estas curvas, se calcularon los valores de la IC50, o concentración del compuesto que permite la supervivencia de un 50% de la población celular respecto al control sin tratamiento, al cual se le otorga el 100% de crecimiento. Este parámetro resulta de gran utilidad para comparar tanto la actividad que muestra los diferentes compuestos frente a una misma línea celular, como para estudiar el efecto de un mismo compuesto sobre diferentes tipos celulares o comprobar frente a qué compuesto es más sensible una determinada línea celular. Así, un menor valor de la IC50 se interpreta como una mayor sensibilidad al fármaco de las células empleadas en el ensayo.

Los valores de IC50 obtenidos para los diferentes compuestos en las distintas líneas celulares, se recogen en la **Tabla 9**. En esta tabla se puede observar que *solo F-OH* resultó ser mucho más activo que el resto de los compuestos en todos los tipos celulares, lo que se pone de manifiesto por sus menores valores de IC50, comprendidos entre 7 y 35 μM . En cuanto al resto de la serie de compuestos evaluados, la mayoría de ellos mostraron una IC50 superior a 50 o 100 μM , que fueron las máximas concentraciones de compuesto empleadas en este estudio. Como excepción, mostraron actividad citotóxica, aunque en menor medida que *solo F-OH*, el compuesto *solo-2*, con una IC50 de 43.8 μM en células endoteliales BAEC, el *solo-3*, con una IC50 de 17.2 μM en la línea HL-60, y el *solo-4*, que presentó unas IC50 de 69.6 μM , 20.5 μM y 31.1 μM en las líneas BAEC, HL60 y HT1080, respectivamente.

Tabla 9. En esta tabla se recoge la IC50 obtenidas para los diferentes compuestos que forma la serie de precursores de la *solomonamida A* seleccionados en un panel de 9 líneas tumorales y en la línea endotelial BAEC. Los resultados corresponden con la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

| | <i>solo-1</i> | <i>solo-2</i> | <i>solo-3</i> | <i>solo-4</i> | <i>solo-5</i> | <i>Solo-6</i> | <i>solo F-Bz</i> | <i>solo F-OH</i> |
|------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|---------------|------------------|------------------|
| HL60 | >50 | >50 | 17.2 \pm 6.6 | 20.5 \pm 5.2 | >50 | >50 | >50 | 14.7 \pm 4.4 |
| KU812F | >50 | n.d. | n.d. | >50 | >50 | >50 | >50 | 14.03 \pm 3.05 |
| U937 | >50 | n.d. | n.d. | >50 | >50 | >50 | >50 | 7.02 \pm 2.3 |
| HT1080 | >100 | >100 | >50 | 31.1 \pm 2.8 | >100 | >100 | >50 | 16.33 \pm 3.05 |
| MDA-MB-231 | >100 | >100 | >50 | >100 | >100 | >100 | >100 | 16.46 \pm 1.01 |
| U87MG | >100 | >100 | n.d. | >100 | >100 | >100 | >100 | 34.78 \pm 5.05 |
| HepG2 | >100 | >100 | n.d. | >100 | >100 | >100 | >100 | 18.96 \pm 1.51 |
| HT-29 | >100 | >100 | n.d. | >100 | >100 | >100 | >100 | 13.35 \pm 0.6 |
| U20S | >100 | >100 | n.d. | >100 | >100 | >100 | >100 | 12.94 \pm 3.1 |
| BAEC | >100 | 43.8 \pm 1.2 | >100 | 69.6 \pm 12.5 | >100 | >100 | >100 | 18.1 \pm 2.2 |

El compuesto solo F-OH produjo una disminución en el crecimiento de la población a concentraciones situadas en el rango micromolar bajo. La línea celular cuyo crecimiento poblacional en el ensayo de viabilidad celular por MTT se ve más afectada por la presencia de *solo F-OH*, es la línea de linfoma histiocítico U937 con una IC50 de 7.02 μM . Le siguen las líneas U20S (osteosarcoma), HT-29 (adenocarcinoma colorectal) y las líneas de leucemia HL60 (leucemia promielocítica humana) y KU812F (leucemia mielógena crónica). Estas líneas celulares mostraron una IC50 muy similar frente a *solo F-OH*, comprendida entre 13 y 14 μM , aproximadamente el doble que en U937. Lo mismo ocurre con las líneas MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo), HT1080 (fibrosarcoma) y HepG2 (carcinoma hepatocelular), cuyas IC50 se sitúan en un estrecho rango entre 16 y 18 μM . Finalmente, la línea celular que resultó ser menos sensible frente a este compuesto fue la de glioblastoma U87MG, donde el valor de IC50 corresponde a 35 μM , unas 5 veces mayor que en U937.

El efecto que produce *solo F-OH* sobre la viabilidad celular no se restringe únicamente a las células tumorales que se han mencionado en el párrafo anterior, sino que también es capaz de inhibir el crecimiento de las células endoteliales BAEC, con una IC50 de 18.1 μM . El hecho de que *solo F-OH* produzca su efecto en todos los tipos celulares en un rango de concentraciones muy reducido, indica que este compuesto no presenta especificidad para inhibir el crecimiento en una línea celular en concreto.

3.2 Selección de posibles inhibidores de la angiogénesis entre los precursores sintéticos de las *solomonamidas*

Con la finalidad de seleccionar los compuestos que mostrasen actividad antiangiogénica se realizó un *screening* o cribado primario haciendo uso del ensayo de formación de estructuras tubulares por parte de las células endoteliales depositadas sobre Matrigel, que se considera un modelo de las últimas etapas del proceso angiogénico (Staton *et al.*, 2004; Goodwin, 2009). El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.2 de Material y Métodos utilizando concentraciones no tóxicas de los compuestos.

En la **Figura 30** se muestra el efecto de la serie de precursores de la solomonamida A sobre la formación de dichas estructuras. Tras 5 horas de incubación, el control negativo de inhibición (DMSO) estas estructuras estaban perfectamente formadas, mientras que en el control positivo de inhibición (estaurosporina a una concentración de 2 μM), donde se producía una inhibición completa de la formación de estas estructuras. En cuanto a la serie de precursores de la *solomonamida A*, los resultados indican que es el compuesto *solo F-OH* el que posee una actividad mayor que el que el resto en este ensayo, siendo capaz de inhibir por completo la tubulogénesis sobre Matrigel a una concentración de 1 μM .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

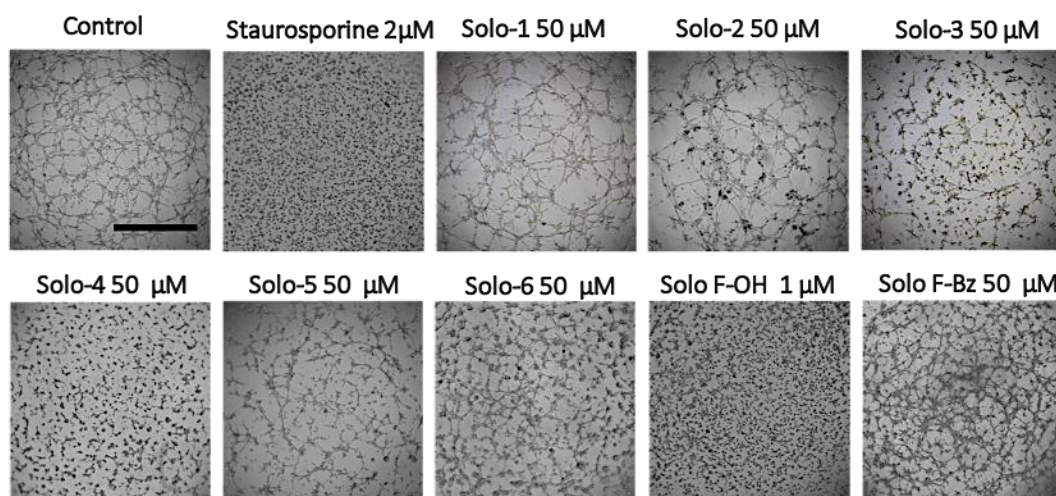


Figura 30. Efecto de la serie de precursores de la *solomonamida A* sobre la formación de estructuras tubulares. Fotografías representativas del control negativo de inhibición (DMSO) y del control positivo (estaurosporina 2 μM) y de los tratamientos indicados sobre la formación de estructuras similares a tubos por BAEC en Matrigel tras 5 h de incubación (Barra de escala = 1 mm).

Los resultados de las MIC y la IC₅₀ en BAEC para la serie de compuestos estudiada se recogen en la **Tabla 10**. La MIC de *solo F-OH* es notablemente inferior a la IC₅₀ del compuesto para estas células endoteliales, lo que permite descartar la suposición de que el efecto observado se pueda deber a la toxicidad del compuesto. En cuanto al resto de los compuestos ensayados, *solo-3* y *solo-4* también mostraron actividad en este ensayo, aunque a una concentración muy superior a la de *solo F-OH* (su MIC resultó ser 50 μM). Los restantes compuestos no mostraron actividad en este ensayo a concentración de 50 μM , límite superior de concentración establecido para este cribado primario.

Tabla 10. Tabla comparativa de los valores de IC₅₀ para BAEC obtenidos por el método MTT y de la concentración mínima necesaria (MIC) para inhibir la formación de estructuras similares a capilares de la serie completa de precursores de la *solomonamida A*.

| Compuesto | <i>solo-1</i> | <i>solo-2</i> | <i>solo-3</i> | <i>solo-4</i> | <i>solo-5</i> | <i>solo-6</i> | <i>solo F-Bz</i> | <i>solo F-OH</i> |
|---|---------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|------------------|------------------|
| IC ₅₀ BAEC (μM) | >100 | 43.8 \pm 1.2 | >100 | 69.6 \pm 12.5 | >100 | >100 | >100 | 18.1 \pm 2.2 |
| MIC (μM) | >50 | >50 | 50 | 50 | >50 | >50 | >50 | 1 |

4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ANGIOGÉNESIS *IN VITRO* DEL COMPUESTO *SOLO F-OH*

La actividad inhibidora de la angiogénesis del compuesto *solo F-OH*, seleccionado en el cribado primario anteriormente detallado, se caracterizó en mayor detalle mediante una serie de ensayos *in vitro* que simulan diferentes procesos clave en la angiogénesis,

así como mediante diversos ensayos *in vivo*. Estos resultados se recogen en el artículo de investigación que avala esta Tesis Doctoral (Carrillo *et al.*, 2019).

4.1 Efecto de *solo F-OH* sobre las estructuras tubulares preformadas.

En vista de la potente actividad inhibidora observada para el compuesto *solo F-OH* frente al resto de compuestos de la serie en el ensayo de formación de tubos sobre Matrigel, se realizó un ensayo de disrupción vascular con objeto de distinguir entre un efecto inhibitor en el proceso de formación de las estructuras y un efecto desorganizador de estructuras ya formadas.

Para ello, tras incubar las células endoteliales BAEC sobre el Matrigel y esperar a que formasen las estructuras bidimensionales, se añadió el *solo F-OH*, y tras 90 min se comprobó que el compuesto produjo la desorganización de estas estructuras una vez formadas, ni siquiera a una concentración 10 veces mayor de su MIC para la formación de éstas (**Figura 31**). En cambio, la combretastatina-4-fosfato a una concentración de 0.2 μM , utilizada como control positivo de disrupción vascular, produjo una desorganización completa de las estructuras tubulares formadas por las células BAEC.

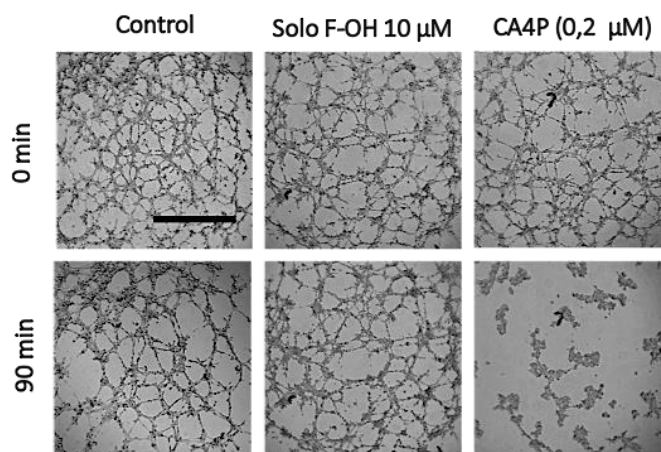


Figura 31. Efecto de *solo F-OH* sobre la integridad de las estructuras tubulares de BAEC. Fotografías representativas del control negativo (DMSO) y del control positivo (Combretastatina-4-fosfato 0,2 μM) y de *solo F-OH* a 10 μM añadidos a redes de estructuras similares a tubos ya formadas por BAEC en Matrigel tras 0 y 90 minutos de tratamiento. (Barra de escala = 1mm).

4.2 Efecto de *solo F-OH* sobre la migración de células endoteliales

El posible efecto del compuesto *solo F-OH* sobre la capacidad migratoria de las células BAEC a tiempos cortos se evaluó mediante el ensayo de cicatrización de la herida (*wound healing*). Así, tras la realización de una brecha o herida sobre una monocapa de células BAEC, se compararon las áreas que habían vuelto a ser ocupadas tras 4 y 7 h de incubación en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de compuesto. Los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resultados, presentados en la **Figura 32**, muestran que tras 4 h de incubación con el compuesto *solo F-OH* se apreciaron diferencias en la migración de las células BAEC en los pocillos tratados con 10 y 20 μM y el control sin tratamiento. Este efecto se hizo más notable a las 7 h de incubación, donde se observó un efecto dependiente de la concentración de *solo F-OH* con diferencias significativas para concentraciones de 10 y 20 μM (**Figura 32 C**).

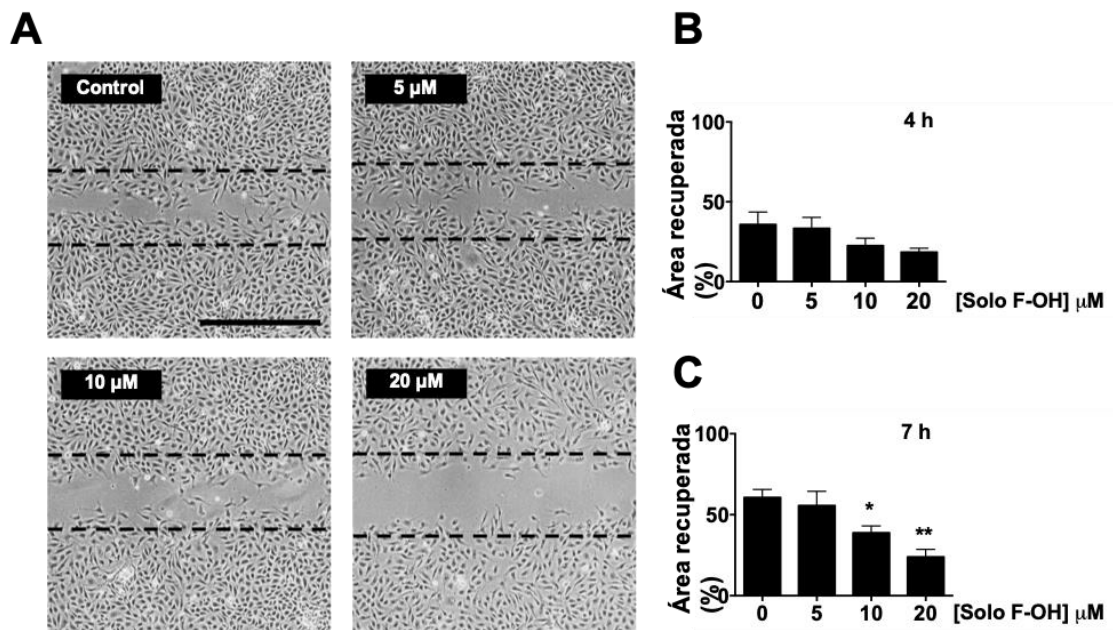


Figura 32. Inhibición de la migración de células BAEC por el compuesto *solo F-OH*. **A.** Fotografías representativas del ensayo de cicatrización de la herida a las 7 h de incubación en presencia de DMSO (control) o las concentraciones indicadas del compuesto. Las líneas discontinuas señalan el área libre de células a tiempo 0 h (Barra de escala = 500 μm). **B y C.** Cuantificación del área recubierta por las células expresada en % respecto al tiempo 0 h tras 4 y 7 h de incubación, respectivamente. Los datos expresan la media \pm SD para 3 experimentos independientes (*T-test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.3 Efecto de *solo F-OH* sobre la invasión de células endoteliales

Debido a que la formación de un nuevo vaso conlleva un cambio fenotípico en las células endoteliales que les permite invadir la MEC circundante, se analizó el efecto de *solo F-OH* sobre en este proceso. El estudio de la capacidad invasora de BAEC se llevó a cabo mediante el ensayo en cámara de Boyden modificada, en el que deben atravesar una matriz sólida en respuesta a un gradiente quimiotáctico.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 33**. Se realizaron dos controles de células sin tratar, uno se puso en presencia de medio con FBS, que actuó como quimioatrayente, y otro se puso en presencia de medio sin FBS. Mientras que en los controles estimulados con FBS se observan numerosas células que invadieron el Matrigel, en los controles expuestos a medio sin FBS las células no invadieron dicha matriz. Los

resultados obtenidos indican que *solo F-OH* es capaz de inhibir esta respuesta al estímulo quimiotáctico. La cuantificación del número de células invasoras (**Figura 33 B**) revela que el compuesto inhibe la invasión de un modo dependiente de la dosis, siendo significativo a 10 y a 20 μM , donde el resultado es similar al obtenido en los controles en ausencia de FBS.

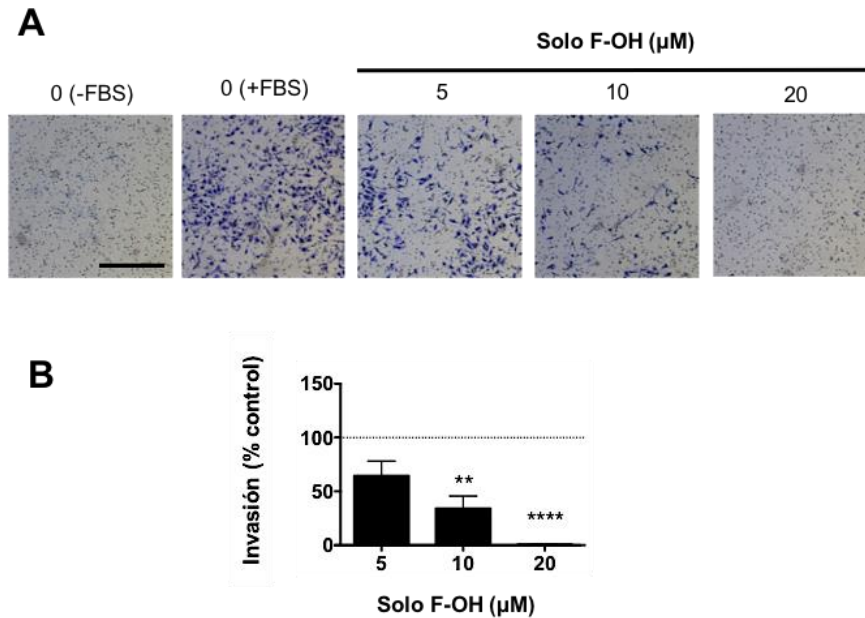


Figura 33. Efecto del compuesto *solo F-OH* sobre la capacidad de invasión de células BAEC **A**. Fotografías representativas del ensayo de invasión en cámara de Boyden modificada tras 16 h de incubación en las condiciones experimentales indicadas (Barra de escala= 500 μm). **B**. Recuento de las células invasoras en cada condición experimental considerando el 100% las muestras estimuladas con FBS en ausencia del compuesto. Los datos expresan la media \pm SD para 3 experimentos independientes (*T-test*: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

4.4 Efecto de *solo F-OH* sobre la capacidad proteolítica de las células endoteliales y tumorales

El efecto mostrado por el compuesto *solo F-OH* sobre la capacidad invasora de células BAEC podría estar relacionado con una menor capacidad proteolítica de las mismas. Para comprobarlo, se realizaron zimografías de gelatina, que permiten valorar los niveles de gelatinas producidas por las células y, en particular, los de MMP-2, expresada de forma constitutiva por las células endoteliales (Nguyen *et al.*, 2001).

Como se puede apreciar en la **Figura 34 A**, *solo F-OH* disminuye de forma significativa la actividad MMP-2 tanto en medios acondicionados como en extractos celulares de BAEC, produciendo en ambos casos un efecto dependiente de la dosis que es significativo a partir de 20 μM . Para averiguar si este era un efecto específico sobre las células endoteliales o, por el contrario, era un efecto generalizado, este ensayo se realizó también con línea celular de fibrosarcoma HT-1080, que expresa tanto MMP-2 como

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MMP-9. Los resultados fueron que en esta línea celular también se producía una disminución de la actividad proteolítica detectada en el gel de forma dependiente de la dosis, tanto para la MMP-2, que es significativa a partir de 20 μM en medios acondicionados y de 10 μM en extractos celulares, así como para MMP-9, que es significativa a partir de 5 μM en ambos tipos de muestras (**Figura 34 B**). Por tanto, el efecto producido por este compuesto sobre la capacidad de degradación de la MEC no es específico para células endoteliales, afectando además a otras gelatinasas, como es el caso de la MMP-9.

Finalmente, para comprobar si la disminución en la actividad MMP-2 se debía a un efecto directo sobre la actividad de la enzima, se utilizó una modificación del protocolo de zimografías de gelatina donde el compuesto fue añadido al tampón sustrato, de forma que sólo en este paso estaba presente el tratamiento, no en la incubación con las células. Como se aprecia en la **Figura 34 C**, la presencia de *solo F-OH* no produjo un efecto inhibitorio sobre la actividad de MMP-2 "in situ", apuntando a la posibilidad de un efecto modulador de su producción y/o secreción por parte de las células endoteliales.

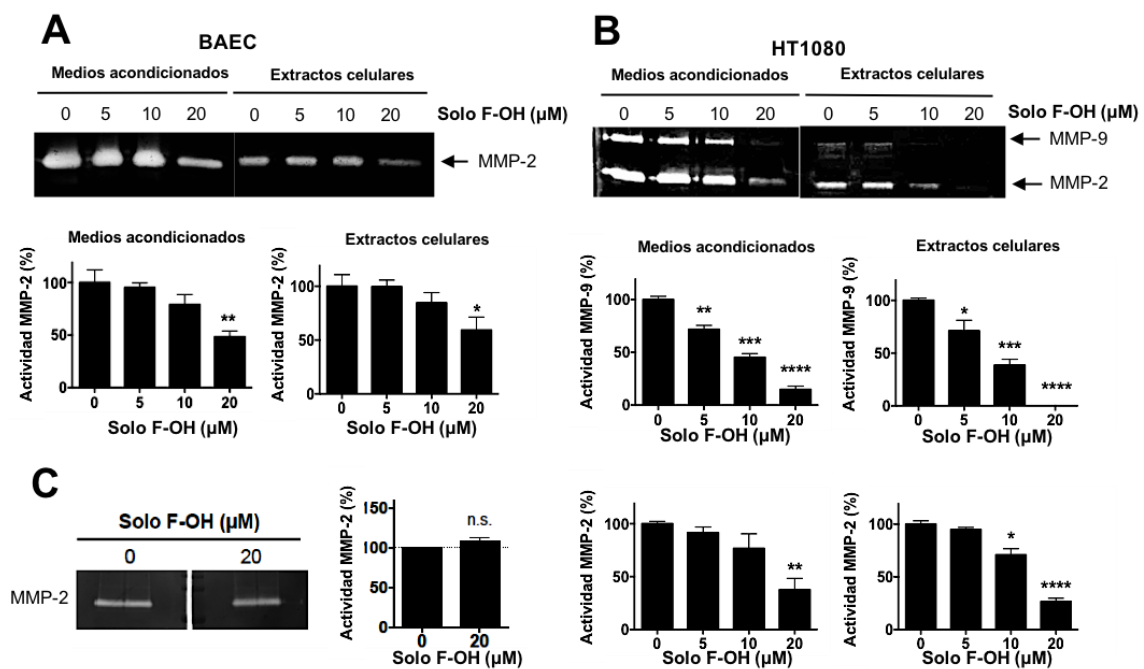


Figura 34. Efecto del compuesto *solo F-OH* sobre la capacidad de degradación de la MEC. **A.** Zimografías de gelatina en BAEC. Fotografías representativas de los gels y cuantificación de la actividad de MMP-2 en medios acondicionados y extractos celulares considerando el 100% la actividad detectada en control sin tratamiento. **B.** Zimografías de gelatina en HT1080. Fotografías representativas de los gels y cuantificación de la actividad de MMP-9 y MMP-2 en medios acondicionados y extractos celulares considerando el 100% la actividad detectada en el control sin tratamiento. **C.** Zimografías de gelatina de medios acondicionados de BAEC sin tratar donde los gels fueron sometidos a una incubación con el compuesto añadido al tampón sustrato para comprobar si el compuesto presentaba una actividad directa sobre la actividad MMP-2. Los datos expresan la media \pm SD para al menos 3 experimentos independientes (*T-test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4.5 Efecto de *solo F-OH* sobre el ciclo celular de células endoteliales y tumorales

Para comprobar si *solo F-OH* era capaz de producir algún tipo de efecto sobre el ciclo celular de BAEC, se realizó el análisis por citometría de flujo mediante la tinción con yoduro de propidio. Como se observa en la **Figura 35 A**, *solo F-OH* no produjo ningún cambio significativo en las proporciones en las que se distribuían las subpoblaciones Sub G1, G0/G1, S y G2/M de BAEC tras un tratamiento de 16 h a la concentración más alta utilizada en el resto de ensayos (20 μ M) con respecto a un control sin tratamiento. El cambio, el 2ME empleado como control positivo (Yue *et al.*, 1997), sí produjo una parada en la fase G2/M del ciclo celular y un aumento de la población en Sub G1, indicando una inducción de apoptosis por acción del compuesto.

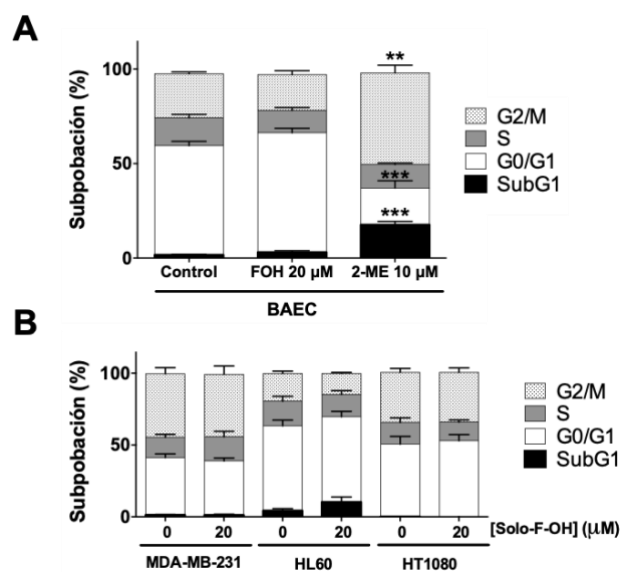


Figura 35. Efecto de *solo F-OH* sobre el ciclo celular en (A) células BAEC y (B) en las líneas tumorales MDA-MB-231, HL60 y HT1080. Como control positivo se utilizó 2-metoxiestradiol a 10 μ M. Los datos expresan la media \pm SD para al menos 3 experimentos independientes (*T-test*: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Además de analizar su efecto en BAEC, el ensayo del ciclo celular se realizó también utilizando otras líneas celulares: la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-23, la línea de leucemia promielocítica HL60 y la línea de fibrosarcoma HT1080, que se trataron durante 16 horas con una concentración 20 μ M del compuesto (algo superior a la IC50 de *solo F-OH* en estas líneas celulares, **Tabla 9**). Los resultados obtenidos mostraron que esta concentración de *solo F-OH* tampoco produjo un cambio significativo en las subpoblaciones del ciclo en estas células tumorales (**Figura 35 B**).

El hecho de que no se detectase un aumento significativo en la subpoblación en fase Sub G1, podría indicar que el tratamiento con el compuesto no había inducido fragmentación del DNA en las células, sugiriendo la ausencia de células en fases tardías de la apoptosis. Para comprobar si *solo F-OH* pudiese estar induciendo apoptosis en fases

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

más tempranas se empleó el ensayo de detección de fosfatidilserina con ficoeritrina-anexina V / 7-amino actinomicina D (PE-A V/7-AAD) mediante citometría de flujo. La medida de las muestras en el citómetro proporcionó unos diagramas que se dividen en cuatro cuadrantes; células sanas (sin marcaje), células en apoptosis temprana (marcadas solo con PE-A V), células en apoptosis tardía (marcaje doble positivo) y células en necrosis (marcadas solo con 7-AAD), como se observa en la **Figura 36**.

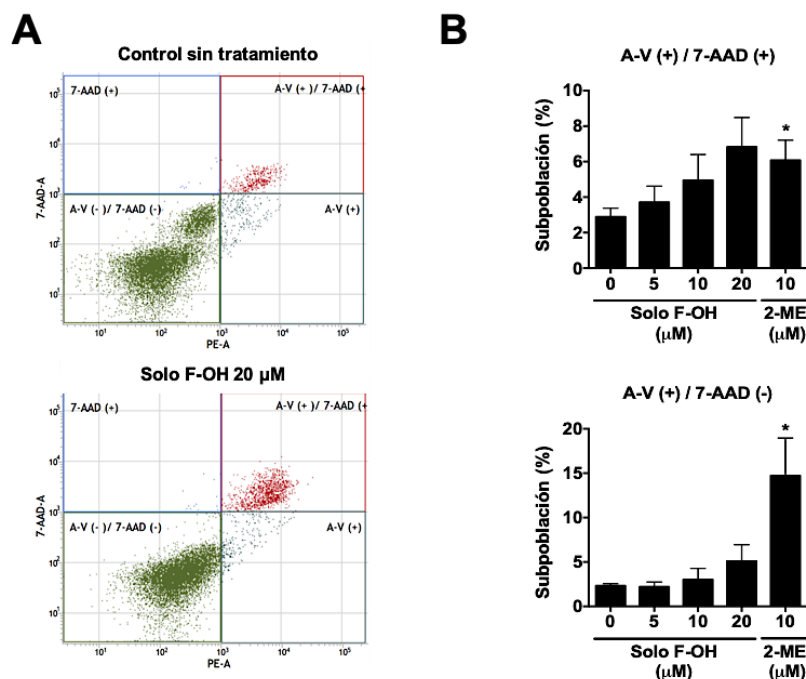


Figura 36. A. Diagramas representativos del ensayo de detección de apoptosis por citometría de flujo con Annexina V/7-AAD en células BAEC en ausencia (control) o presencia de *solo F-OH* 20 μM. B. Cuantificación de las subpoblaciones en apoptosis temprana y apoptosis tardía. Como control positivo se utilizó 2-Metoxiestradiol a 10 μM. Los datos expresan la media ± SD para 4 experimentos independientes (*T-test*: **p*<0.05).

En las muestras control, sin tratar con el compuesto, se comprobó que más del 95 % de la población se concentraba en el cuadrante inferior derecho, correspondiente con células sanas sin marcar, mientras que el 5 % restante se repartía a partes iguales entre los cuadrantes inferior y superior derechos, correspondientes a las células en apoptosis temprana y tardía respectivamente, y no aparecieron células en el cuadrante superior izquierdo, que corresponderían con células necróticas. De nuevo se utilizó 2-ME como control de inducción de apoptosis, que produjo un aumento en las subpoblaciones correspondientes a células en apoptosis temprana y tardía (**Figura 36 B**). Aunque había una cierta tendencia a incrementar el número de células en apoptosis temprana y tardía al aumentar la concentración de *solo F-OH*, estos cambios no fueron significativos respecto al control sin tratar.

5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ANGIOGÉNESIS *IN VIVO* DE SOLO F-OH

Para comprobar *in vivo* el potencial antiangiogénico que *solo F-OH* había mostrado *in vitro*, se evaluó su capacidad de interferir en la formación de vasos sanguíneos en dos modelos diferentes: en CAM de embriones de pollo, en los que la angiogénesis se activa de forma fisiológica, y en el saco vitelino de embriones de pez cebra estimulados con FGF-2, en los que la angiogénesis es inducida por un agente exógeno. Se exploró además el efecto de este compuesto en los ensayos de xenotransplante de células tumorales en CAM.

5.1 Efecto de *solo F-OH* sobre la membrana corioalantoidea de embriones de pollo

Como ya se ha comentado anteriormente, este el ensayo CAM es uno de los más utilizados para estudiar el efecto de los compuestos sobre la angiogénesis *in vivo*. En la **Figura 37** se muestra como en el control negativo, que contenía la misma cantidad de DMSO que la concentración más alta de compuesto, los vasos sanguíneos se desarrollaron por toda la CAM siguiendo un patrón de ramificación organizado y jerarquizado, mientras que en el control positivo, que contenía 3 nmol/disco de aeroplisinina-1, aparecían rebotes en los vasos periféricos o falta de vasos bajo el disco y en los alrededores, efectos que también se observaron en las CAM expuestas a *solo F-OH*.

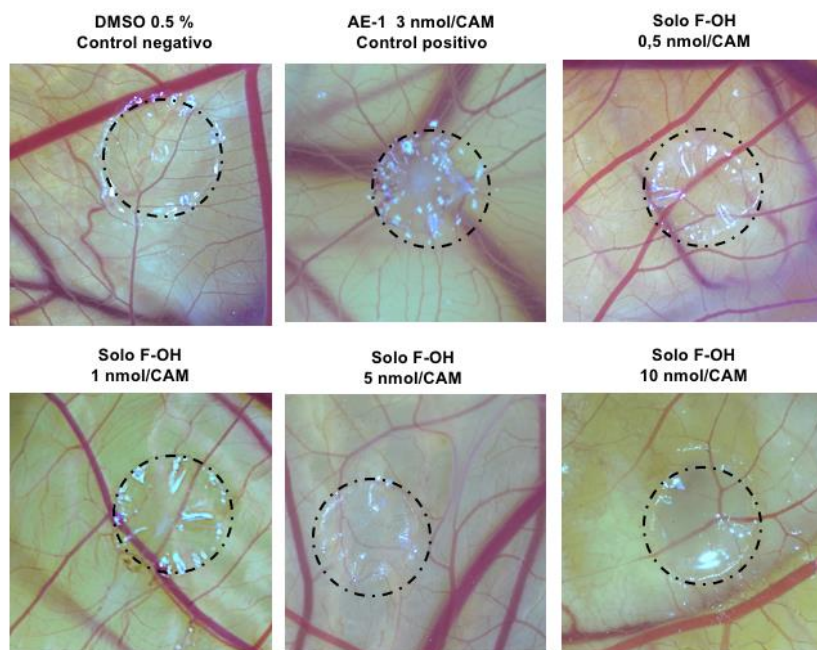


Figura 37. Efecto del compuesto *solo F-OH* sobre la angiogénesis en CAM de pollo. Fotografías representativas del control negativo de inhibición (DMSO 0.5 %) y del control positivo (3 nmol aeroplisinina-1/CAM) y de diferentes concentraciones de *solo F-OH*. Los círculos discontinuos señalan la posición de los discos de metilcelulosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con el compuesto *solo F-OH*, mostraron una relación dependiente de la dosis entre 0,1 y 10 nmol/disco, de tal modo que con una cantidad de 1 nmol/disco se observaban respuestas inhibitoras en más del 50 % de los individuos (**Tabla 11**). Estos resultados fueron evaluados por dos observadores diferentes.

Tabla 11. Efecto inhibitor de *solo F-OH* sobre la angiogénesis fisiológica en la CAM.

| Ensayo CAM | | |
|----------------------------|-----------------|--------------|
| nmol <i>solo F-OH</i> /CAM | Positivos/total | % Inhibición |
| 0 | 0/11 | 0 |
| 0.1 | 1/7 | 14 |
| 0.5 | 2/7 | 29 |
| 1 | 6/9 | 67 |
| 5 | 9/12 | 75 |
| 10 | 10/10 | 100 |

5.2 Efecto de *solo F-OH* sobre la angiogénesis inducida por el xenotransplante de células tumorales en membrana corioalantoidea de pollo

Gracias a la realización de una estancia en el grupo de investigación dirigido por el Dr. Marco Presta en la Sección de Oncología e Inmunología Experimental del Departamento de Medicina Molecular y Translacional (Università degli Studi di Brescia, Italia), se llevó a cabo el ensayo de xenotransplante de células tumorales en CAM de huevos de pollo fecundados. Para ello, se colocaron sobre la CAM unas píldoras de alginato al 6% que contenían en su interior $3 \cdot 10^4$ células/CAM de la línea de glioblastoma humano U87MG en ausencia o presencia el compuesto en evaluación a una concentración determinada, o medio de cultivo en el caso de los controles. Estas células presentan una alta capacidad de promover la angiogénesis, por lo que su presencia en la CAM supone un potente estímulo angiogénico.

Como muestra la **Figura 38**, tras 72 h de incubación, se observó que en la condición control (píldoras con células tumorales U87MG) la CAM mostraba una marcada respuesta angiogénica, manifestada en forma de numerosos vasos de calibre muy inferior al resto de los vasos producidos de forma fisiológica en la membrana, y que se dirigirían de forma radial hacia la píldora de alginato. Sin embargo, en los controles negativos de angiogénesis (píldoras libres de células) no apreciaba esa vasculatura. En aquellas CAM expuestas a píldoras con células U87MG y *solo F-OH* a 25 μ M disminuía en gran medida la inducción de la angiogénesis por parte de las células tumorales.

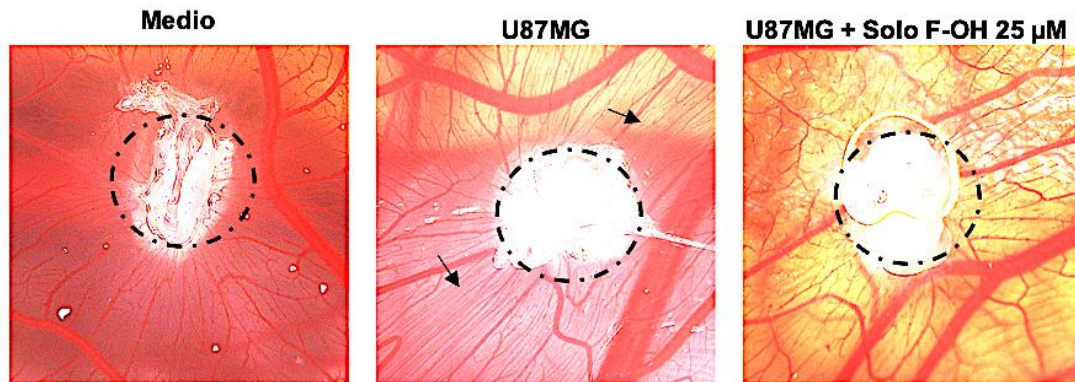


Figura 38. Fotografías representativas de la angiogénesis inducida en CAM por la presencia de células de glioblastoma U87MG ($2-3 \cdot 10^4$ células /CAM) en ausencia (izquierda) o presencia de *solo F-OH* a $25 \mu\text{M}$ (derecha). Los círculos discontinuos señalan la posición de las píldoras de alginato. Las flechas indican los vasos de neoformación inducidos por la presencia de las células tumorales.

Se realizó un doble análisis de estos resultados, cuya valoración aparece en la tabla **Tabla 12**. Por un lado, se evaluaron de forma cualitativa, otorgando una puntuación o *score* a cada CAM según la respuesta angiogénica observada (negativos y positivos) y, por otro lado, se realizó el recuento de los nuevos vasos inducidos por el estímulo proangiogénico. Los resultados sugieren que *solo F-OH* ejerce un efecto inhibitorio dependiente de la dosis sobre la angiogénesis inducida por las células tumorales U87MG, de modo que en presencia de una concentración del compuesto de $5 \mu\text{M}$ el recuento de estos nuevos vasos resultó ser similar al control con células sin tratar y no obtuvo resultado negativo, mientras que en presencia de $25 \mu\text{M}$, los datos obtenidos tras la valoración se asemejaban a los del control sin células.

Tabla 12. Efecto de *solo F-OH* sobre la angiogénesis inducida en el ensayo xenotransplante de células U87MG en CAM. Se realizó tanto una evaluación cuantitativa, realizando el recuento del número de nuevos vasos inducidos por la presencia de las células tumorales, como de forma cualitativa, clasificando las muestras en positivas o negativas en función de la respuesta angiogénica observada.

| Condiciones | Nuevos vasos (media \pm SD) | SCORE (%) | |
|--|----------------------------------|-------------|--------------|
| | | Negativos | Positivos |
| Medio | 16 ± 6.9 | 85.71 (6/7) | 14.29 (1/7) |
| U87MG | 41.4 ± 7.3 | 0.00 (0/7) | 100.00 (1/7) |
| U87MG + <i>Solo F-OH</i> $5 \mu\text{M}$ | 42.1 ± 4.5 | 0.00 (0/7) | 100.00 (7/7) |
| U87MG + FOH $25 \mu\text{M}$ | 26 ± 9.4 | 83.33 (5/6) | 16.67 (1/6) |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3 Efecto de *solo F-OH* sobre angiogénesis inducida en el plexo subintestinal de embriones de pez cebra

El tercero de los ensayos *in vivo* empleados para valorar la actividad antiangiogénica de *solo F-OH* fue el de angiogénesis en la membrana vitelina de embriones de pez cebra (ZFYM *assay*). En este ensayo, tal y como se describió en el apartado metodología, se empleó como estímulo antiangiogénico FGF-2.

Como se aprecia en la **Figura 39**, los embriones que siguieron un desarrollo normal, sin ser inyectados ni tratados con el compuesto, presentan plexos subintestinales con una forma característica de “cesta”, formada por vasos que salían del sistema digestivo hacia el vitelo y una vena longitudinal que conectaba estos vasos formando una estructura cerrada. Por su parte, aquellos embriones que fueron estimulados mediante la inyección de FGF-2, presentaron vasos ectópicos que salen de los plexos subintestinales hacia la zona donde se produjo la inyección del factor proangiogénico. Sin embargo, los embriones estimulados con FGF-2 y expuestos a distintas concentraciones de *solo F-OH* mostraron una respuesta reducida o una falta de respuesta a este estímulo proangiogénico, de forma que presentaban un menor número de vasos ectópicos o estos eran más pequeños y delgados que en el control no tratado, incluso una carencia de dichos vasos.

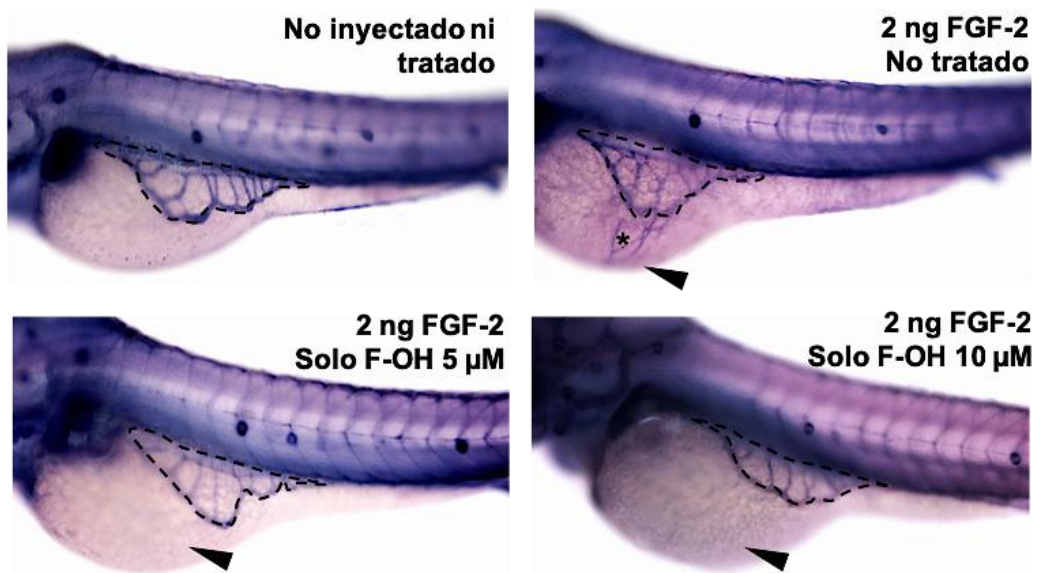


Figura 39. Efecto del compuesto *solo F-OH* sobre la angiogénesis inducida por la microinyección de 2 ng de FGF-2 en el espacio perivitelino en el ensayo ZFYM (*Zebrafish Yolk Membrane assay*). Los plexos subintestinales se señalan mediante líneas discontinuas. El asterisco indica los vasos ectópicos formados a partir de los SIVs debido a la estimulación por FGF-2. Las cabezas de flecha muestran el lugar de la microinyección.

Los resultados obtenidos se clasificaron como negativos (cuando se observó falta de respuesta al FGF-2), positivos (cuando se dio una respuesta moderada consistente en un solo vaso largo o 1-2 vasos de longitud media) o muy positivos, (en los casos en los que se apreció una respuesta fuerte al estímulo, consistente en numerosos vasos originados desde el plexo vascular). El resultado de esta valoración se resume en la **Tabla 13**, en la que se aprecia cómo al aumentar la dosis de *solo F-OH* descendía tanto el número de positivos como el de dobles positivos respecto al control, mientras que aumentaba el número de negativos.

Tabla 13. Efecto dependiente de la dosis de *solo F-OH* en el ensayo ZFYM. La tabla recoge los porcentajes de inhibición de la angiogénesis inducida por la microinyección de 2 ng FGF-2 en el espacio perivitelino de embriones de pez cebra. (- : sin respuesta al FGF-2), + : respuesta moderada, ++ : respuesta aguda).

| | | ZFYM assay | | |
|----------------------------|--------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| Microinyección de FGF-2 | <i>Solo F-OH</i> (μ M) | SCORE (%) | | |
| | | - / total (%) | + / total (%) | ++ / total (%) |
| No | 0 | 20/20 (100) | 0/20 (0) | 0/20 (0) |
| 2 ng | 0 | 5/21 (23.8) | 10/21 (47.6) | 6/21 (28.6) |
| 2 ng | 5 | 9/19 (47.4) | 7/19 (36.8) | 3/19 (15.8) |
| 2 ng | 10 | 13/23 (56.5) | 9/23 (39.1) | 1/23 (4.3) |

6. ESTUDIOS DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA DE *SOLO F-OH*

Una vez confirmada la actividad antiangiogénica *in vitro* e *in vivo* del *solo F-OH*, se exploró su posible mecanismo de acción mediante el estudio del efecto sobre dos de las rutas de señalización que juegan un papel más relevante tras la conexión del interruptor angiogénico, PI3K/AKT y ERK-MAPK (Muñoz-Chápuli *et al.*, 2004).

6.1 Efecto de *solo F-OH* sobre la activación de las vías de ERK-MAPK y PI3K/AKT en células endoteliales

Como se puede apreciar en la **Figura 40 A**, en células endoteliales sometidas a ayuno, se detectó un bajo nivel de formas fosforiladas de AKT y ERK 1/2. Sin embargo, tras su estimulación con FBS se incrementaba notablemente la proporción de proteína

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fosforilada frente al total de la proteína en cuestión, lo que pone de manifiesto la activación de las mencionadas rutas de señalización. Por otro lado, en presencia del compuesto a una concentración de 20 μM , disminuyó la activación de ambas vías con descenso en la ratio proteína fosforilada respecto a proteína total, llegando prácticamente al nivel de activación basal similar al control sin estimular con FBS (Figura 40 B).

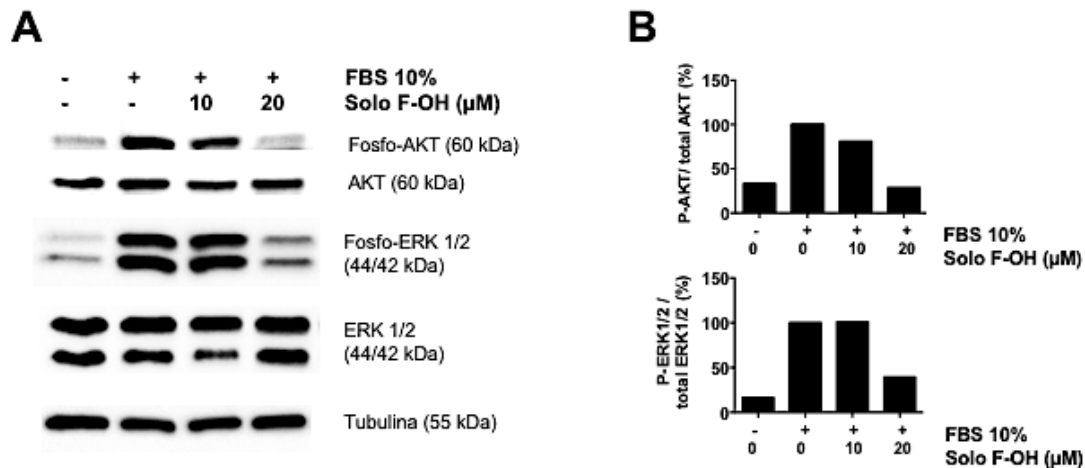


Figura 40. Efecto de *solo F-OH* sobre la activación de ERK 1/2 y AKT en BAEC. **A.** Fotografías representativas de *western-blots* para las formas fosforilada y total de ERK 1/2 y AKT bajo las condiciones experimentales indicadas. Como control de carga se utilizó la tubulina. **B.** Cuantificación de la activación de ERK 1/2 y AKT. Los datos expresan como la ratio (%) entre la forma fosforilada respecto al total de cada proteína (Media de dos experimentos independientes).

6.2 Efecto sobre la actividad quinasa de VEGFR2 *in vitro*

Como se ha comentado anteriormente, VEGFR2 juega un papel relevante en el encendido del interruptor angiogénico. Debido a ello, es una de las principales dianas farmacológicas en la terapia antiangiogénica, de forma que gran parte de los fármacos antiangiogénicos aprobados para su uso clínico son inhibidores de la actividad de este receptor.

La observación de que *solo F-OH* era capaz de interferir en la activación de las proteínas AKT y ERK 1/2, que están implicadas en la transducción de señales desencadenadas por la activación de VEGFR2, nos llevó a analizar la capacidad de este compuesto para inhibir su actividad tirosina quinasa. Los resultados mostrados en la **Figura 41** reflejan que, mientras que en el control positivo (sunitinib 1 μM) se inhibe por completo dicha actividad, la presencia de *solo F-OH* a 20 μM (máxima concentración usada para los ensayos con cultivos celulares) no disminuyó significativamente la actividad tirosina quinasa con respecto al control en ausencia de compuesto.

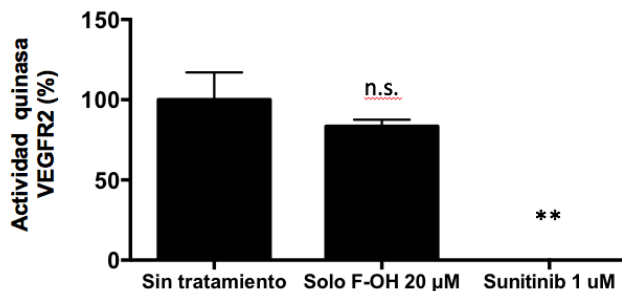


Figura 41. Efecto de *solo F-OH* sobre VEGFR2. Medida de la actividad quinasa *in vitro* de VEGFR2. Los datos están expresados como actividad del receptor, inversamente proporcional a la cantidad de ATP remanente. El control sin tratamiento es considerado como el 100% de actividad quinasa de VEGFR2 y como control positivo de inhibición se utilizó Sunitinib a 1 μM. Los valores expresan la media ± SD (n=4, T-test: **p<0.01, ns= no significativo).

7. DISCUSIÓN

Al igual que otros muchos compuestos de *T.swinhoei*, algunos de los precursores de síntesis de las *solomonamidas* analizados en este trabajo han mostrado actividad biológica con posibles aplicaciones terapéuticas. Los resultados de inhibición del crecimiento para evaluar la citotoxicidad y la posible actividad antitumoral de esta serie de compuestos realizados frente a un total de 9 líneas celulares pusieron de manifiesto que la molécula más activa era la denominada *solo F-OH*, capaz de inhibir el crecimiento de todas las líneas tumorales estudiadas a concentraciones situadas en el rango micromolar bajo, similares a las descritas para otros compuestos aislados de esponjas de mar con propiedades antitumorales y antiangiogénicas, como la aeroplisinina-1 (Koulman *et al.*, 1996; García-Vilas *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016) o las puupehenonas (Martínez-Poveda *et al.*, 2017).

Si se ordenan las líneas tumorales utilizadas en este ensayo según su tiempo de duplicación (TD), las más proliferativas serían las U937 (TD: 12-24 h, Chen *et al.*, 2005) y las U2OS (TD: 16-18 h, Graat *et al.*, 2006), mientras que las menos proliferativas serían las U87MG (TD: 34 h, Oraipoulou *et al.*, 2017). El resto, incluidas las células endoteliales BAEC, presentan unos tiempos de duplicación de entre 20 y 30 h (Castellot *et al.*, 1980; Birnie, 1988; Reile *et al.*, 1990; Furth *et al.*, 1992; Ohizumi *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 2013). Observando los valores de IC50 de *solo F-OH*, vemos que las líneas celulares que mostraron mayor sensibilidad al compuesto y, por tanto, una IC50 menor, eran las dos líneas con menor tiempo de duplicación (las más proliferativas). Además, la línea celular que presenta una IC50 mayor para el *solo F-OH*, U87MG, se corresponde con la línea con mayor tiempo de duplicación. Estos datos parecen indicar que el compuesto *solo F-OH* pudiera ejercer un efecto algo mayor sobre células más proliferativas.

Los resultados de la actividad de los compuestos sobre el crecimiento de las distintas líneas celulares indican una serie relaciones estructura-función. La bioactividad mostrada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

in vivo por la molécula completa de la *solomonamida A* es atribuida a la presencia del péptido inusual con aminoácidos no proteínogénicos ADMOA (Kavitha y Chandrasekhar, 2015). Al comparar las estructuras de la serie de precursores sometidos a este estudio con la molécula completa de la *solomonamida A*, se comprueba que la molécula con la estructura más parecida en cuanto al péptido ADMOA es el compuesto *solo F-OH* que, al mismo tiempo, es el que ha presentado una mayor actividad de toda la serie (**Figura 28**). Otros compuestos que han mostrado cierta actividad, aunque mucho menor que *solo F-OH*, frente al crecimiento de las diferentes líneas tumorales y la línea endotelial BAEC, son *solo-2*, *-3* y *-4*, siendo este último el que ha mostrado una mayor actividad, al inhibir el crecimiento de tres líneas celulares de las estudiadas en el panel a concentraciones menores de 50 μM . La estructura de estos tres compuestos es más compleja que otros de la serie y la vez más parecida a la molécula natural en ese orden (*Solo-2*>*-3*>*-4*). Todo esto en conjunto parece indicar que a medida que nos acercamos a la estructura de la molécula natural y, en particular, a la del péptido ADMOA, la actividad biológica que muestran los compuestos es mayor.

Por otro lado, la comparación de la actividad mostrada por las parejas de compuestos *solo-2/solo-4* y *solo-3/solo F-OH*, revela que la presencia de grupos funcionales, en particular el grupo hidroxilo, en el fragmento policétido presentes en *solo-3* y *solo F-OH* supone una mejora de la actividad en comparación, respectivamente, con *solo-2* y *solo-4*. Otro aspecto destacable en cuanto a la relación estructura-función es que, *solo-4* y *solo F-OH* presentan una mayor actividad frente a sus respectivas parejas, *solo-2* y *solo-3*, lo que podría deberse a la presencia de un doble enlace que les proporciona una disposición más plana en la molécula (**Figura 42**).

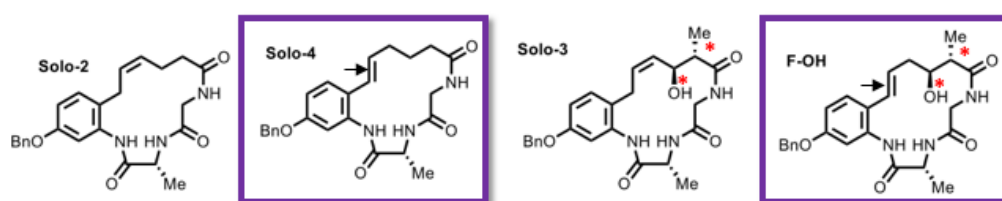


Figura 42. Relación estructura-función de los compuestos de la serie de precursores de la *solomonamida A* que mostraron una mayor actividad en el ensayo de citotoxicidad. Las flechas señalan la posición del doble enlace que les aporta una configuración más plana y los asteriscos señalan los grupos funcionales que se han relacionado con una mayor bioactividad.

En cuanto al potencial antiangiogénico de esta serie de compuestos, la evaluación de su capacidad para inhibir la formación de estructuras similares a tubos en Matrigel por parte de células endoteliales evidenció que el compuesto *solo F-OH* mostraba una actividad mucho mayor que el resto de compuestos de la serie, con una MIC de tan solo

1 μM , igual o menor que otros compuestos aislados de esponjas de mar con actividad inhibidora de la angiogénesis (Aoki *et al.*, 2006; Martínez-Poveda *et al.*, 2013, 2017). El resto de los compuestos de la serie produjeron una inhibición parcial de la formación de estructuras tubulares a las concentraciones ensayadas, a excepción de *solo-4*, que mostró una MIC de 50 μM , un valor muy superior al de *solo F-OH*. Hay que destacar que la MIC de *solo F-OH* en este ensayo es 18 veces menor al valor de su IC50 en BAEC, lo que indica que su actividad inhibidora de la formación de estructuras tubulares es un efecto independiente a su posible actividad citotóxica.

Estos resultados nos decidieron a estudiar con más detalle el potencial antiangiogénico del compuesto. En primer lugar, se descartó la actividad disruptiva vascular de *solo F-OH*, ya que no desorganizaba las estructuras tubulares formadas por las células endoteliales sobre Matrigel ni siquiera a una concentración que era un orden de magnitud mayor a la necesaria para inhibir la formación de dichas estructuras. Esto indica que el compuesto puede inhibir la formación de nuevos vasos sin producir la disrupción de los vasos preexistentes.

La activación de las células endoteliales durante la angiogénesis conlleva la adquisición de la capacidad de migrar hacia la fuente del estímulo angiogénico. Los resultados obtenidos con células BAEC ponen de manifiesto un efecto inhibitor de la migración de estas células a concentraciones no tóxicas de *solo F-OH*. Además, durante la angiogénesis las células endoteliales activan su capacidad de producir y secretar proteasas que degradan elementos de la matriz extracelular, posibilitando así la invasión de las células en el tejido durante la formación del nuevo vaso. Los resultados obtenidos del ensayo de invasión mostraron que en presencia de *solo F-OH* las células endoteliales reducían de forma significativa su capacidad de invasión, lo que puede estar debido, al menos en parte, al efecto de este compuesto sobre la secreción de MMP-2 por parte de las células endoteliales. La inhibición de la producción de MMP-2 por células endoteliales debida al tratamiento con *solo F-OH* podría contribuir doblemente al efecto antiangiogénico del compuesto, al inhibir una pieza clave tanto en la invasión de las células como en la liberación de factores proangiogénicos que se encuentran asociados a la MEC (Davis y Senger, 2005; Grant y Kallur, 2005; Neve *et al.*, 2014). MMP-2 es la principal MMP producida por células endoteliales, jugando un papel clave en la angiogénesis (Egeblad y Werb, 2002; Handsley y Edwards, 2005; Van Hinsbergh *et al.*, 2006). El descenso en su producción por las células endoteliales se ha relacionado tanto con la inhibición de la capacidad para formar estructuras similares a tubos, como con un descenso en la capacidad migradora de las células (Elkin *et al.*, 2000; Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002; Phillip *et al.*, 2003). No podemos descartar, por tanto, la relación entre la disminución en los niveles de MMP-2 en las células endoteliales tratadas con *solo F-OH* con la inhibición de su morfogénesis sobre Matrigel *in vitro* y su migración. Hay que señalar que la acción de *solo F-OH* sobre MMP-2 no parece ser específico de las células endoteliales, al observarse

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un efecto similar en los niveles de MMP-2 y MMP-9 producidas por las células tumorales HT1080. Finalmente, en base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que *solo F-OH* no es la inhibición de la actividad enzimática de MMP-2, sino que es un modulador de la síntesis o de la liberación de esta proteasa a la MEC.

La actividad inhibidora de la angiogénesis de *solo F-OH*, se confirmó mediante ensayos *in vivo*. Los resultados a la exposición de CAM de embriones de pollo a diferentes cantidades de *solo F-OH* mostraron que este compuesto es capaz de interferir en la aparición de nuevos vasos producidos por angiogénesis de forma fisiológica en la CAM durante el desarrollo del embrión a dosis incluso inferiores a descritas para otros compuestos antiangiogénicos en nuestro grupo de investigación (Castro *et al.*, 2004; Martínez-Poveda *et al.*, 2005; Cárdenas *et al.*, 2006, 2011; García-Caballero *et al.*, 2011). Además, *solo F-OH* no sólo fue capaz de inhibir la formación de nuevos vasos en un contexto fisiológico, como el proporcionado por el ensayo CAM, sino que también inhibió la angiogénesis inducida por la presencia de estímulos proangiogénicos exógenos, como el FGF-2 y los factores producidos por la línea tumoral U87MG.

En vista del efecto antiangiogénico mostrado por *solo F-OH*, se realizó una aproximación al estudio de su mecanismo de acción a nivel molecular. Durante la activación y la progresión de la angiogénesis muchas rutas de señalización celular intervienen en la regulación de los diferentes pasos del proceso, formando una compleja red de transmisión de señales que controlan finalmente la respuesta de la célula endotelial frente a un estímulo proangiogénico. Una estrategia terapéutica interesante para la inhibición de la angiogénesis es la interacción farmacológica con esta red señalizadora (Muñoz-Chápuli *et al.*, 2004).

Una de las vías esenciales durante la activación de la angiogénesis es la de PI3K/AKT, que controla procesos de proliferación, migración, diferenciación y morfogénesis en células endoteliales (Shiojima y Walsh, 2002; Somanath *et al.*, 2006). El efecto inhibidor de *solo F-OH* en la activación de esta ruta sugiere que la actividad antiangiogénica de este compuesto podría estar mediada precisamente por su efecto sobre la vía PI3K/AKT. Curiosamente, a pesar de que la vía PI3K/AKT interviene en el control de la supervivencia celular, la inhibición en dicha ruta provocada por *solo F-OH* no dio lugar a inducción de apoptosis en células endoteliales, tal y como mostraron los ensayos de ciclo celular y detección de Anexina V. Esto puede deberse a que, aunque la ruta de señalización mediada por AKT tiene un papel relevante en la supervivencia celular, en el control de este proceso también intervienen otras rutas de señalización (Muñoz-Chápuli *et al.*, 2004).

Además de la inhibición de la vía de PI3K/AKT, *solo F-OH* también produjo un descenso en la fosforilación de ERK1/2, componente de la ruta de ERK/MAPK, implicada en el control de la proliferación celular en células endoteliales estimuladas por una señal proangiogénica. El efecto inhibitor de *solo F-OH* en las dos rutas sugirió que el compuesto podría estar interfiriendo con la transmisión de señales proangiogénicas desde un elemento de la red situado por encima de ambas rutas y que fuese común a ellas (**Figura 43**).

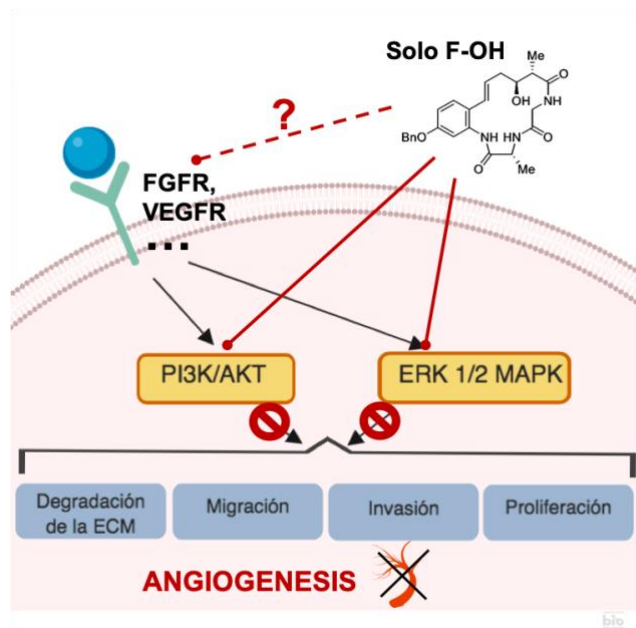


Figura 43. Esquema de la aproximación al mecanismo de acción de los efectos producidos por *solo F-OH*.

Dos de los sistemas de señalización más importantes implicados en angiogénesis son los de VEGF/VEGFR2 y FGF-2/FGFR (Muñoz-Chápuli *et al.*, 2004), siendo estos dos los principales candidatos a constituir la diana molecular del *solo F-OH*. Precisamente, este compuesto ha demostrado ser capaz de bloquear la angiogénesis *in vivo* inducida por FGF-2 exógeno, tal y como muestran los resultados del ensayo de ZFYM, sugiriendo que la señalización a través de esta ruta estaría inhibida por la presencia de *solo F-OH*. Para poder afirmar que la diana molecular de *solo F-OH* es el eje FGF-2/FGFR sería preciso realizar estudios dirigidos a comprobar esta hipótesis, en los cuales se analizase directamente la activación del receptor tras estimular las células endoteliales con FGF-2.

En cuanto al eje VEGF/VEGFR2, los estudios *in vitro* demostraron que *solo F-OH* no redujo de forma significativa la actividad tirosina quinasa del receptor VEGFR2, incluso usando la dosis del compuesto más alta utilizada en otros ensayos (20 μ M). Este modesto efecto producido por *solo F-OH* en la reducción de la actividad quinasa de VEGFR2 no explicaría la potente actividad antiangiogénica observada en los ensayos *in vivo* para este compuesto (consiguiendo un 50% de inhibición en el ensayo CAM a dosis menores de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1nmol/CAM). Aun así, existiría la posibilidad de que *solo F-OH* inhibiese la señalización a través de VEGFR2 en otro punto diferente a su actividad tirosina quinasa intrínseca, como por ejemplo interfiriendo con el sitio de unión del receptor a VEGF o generando un efecto inhibitor por unión alostérica a otras partes de la molécula. Para comprobar estas hipótesis habría que estudiar igualmente la activación del receptor en presencia de *solo F-OH*.

En resumen, el trabajo realizado para evaluar la actividad biológica de una serie de compuestos generados durante la síntesis parcial de las *solomonamidas*, reveló que algunos de estos precursores son moléculas bioactivas capaces de inhibir el crecimiento tanto de células tumorales como endoteliales. A medida que las estructuras de los compuestos se acercan a la estructura de la *solomonamida* natural, el potencial bioactivo del compuesto aumenta. El compuesto denominado *solo F-OH* es el más activo, mostrando una interesante capacidad de inhibir la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*, interfiriendo en procesos clave del proceso como son la proliferación, la migración, la invasión y la degradación de la matriz extracelular (resumidos en la **Figura 44**). Sus propiedades antiangiogénicas sugieren el potencial terapéutico de este compuesto, cuya estructura podría servir como modelo para el diseño y síntesis de otros con un potencial antiangiogénico mejorado. Los resultados también refuerzan la idea de que los productos marinos y sus derivados pueden ser buenos candidatos para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis.

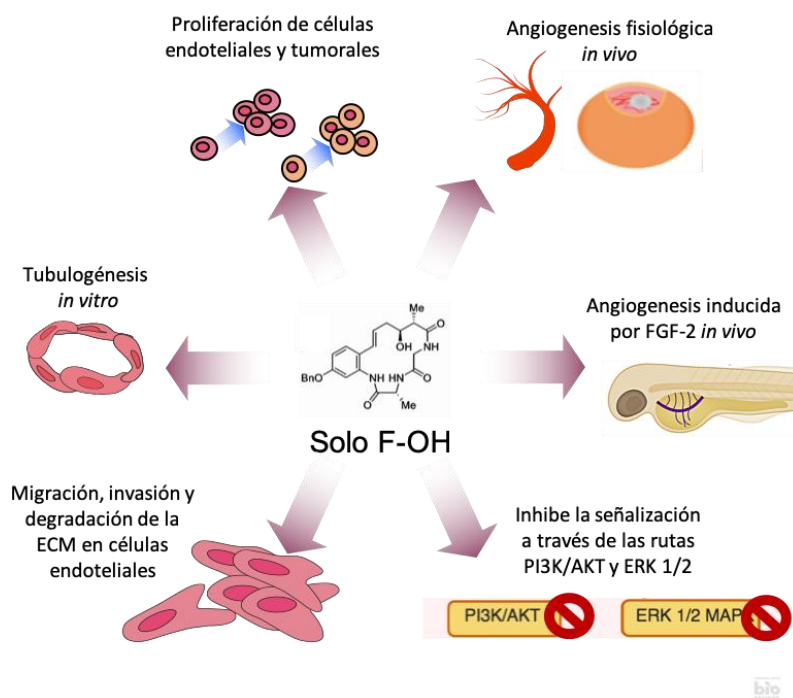


Figura 44. Resumen de actividad del compuesto *solo F-OH*. Inhibe el crecimiento de células endoteliales y tumorales *in vitro* y tiene actividad antiangiogénica tanto *in vivo*, ya sea una formación de vasos fisiológica o inducida por estímulos proangiogénicos como FGF-2, como *in vitro*, siendo capaz de interferir en procesos esenciales para la angiogénesis como son la degradación de la MEC, la migración y la invasión.

CAPÍTULO II

ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANÁLOGO SINTÉTICO DE LAS ESTRIGOLACTONAS GR-24 EN EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ANTECEDENTES SOBRE LAS ESTRIGOLACTONAS Y EL ANÁLOGO SINTÉTICO GR-24

1.1 Estructura y actividad biológica de las estrigolactonas y sus análogos sintéticos en plantas

Las estrigolactonas (SL) son un diverso grupo de hormonas vegetales muy conservadas evolutivamente. Estas fitohormonas son producidas por muchas especies de plantas y cada planta puede producir varios tipos de SL diferentes (Mayzlish-Gati *et al.*, 2015; Waters *et al.*, 2017). En cuanto a su estructura química, las SL son lactonas terpenoides derivadas de carotenoides cuya estructura consiste en sistemas de anillos ABC conectados por puentes enol éter a un anillo D butanólido (Xie *et al.*, 2010) (**Figura 45 A**). Se han descrito al menos 20 SL naturales o canónicas y numerosos análogos sintéticos (Xie *et al.*, 2013). Algunos derivados de las SL con actividad biológica no presentan el sistema de anillos ABC completo, pero todas tienen en común la presencia del anillo D, que parece ser esencial para que las moléculas mantengan su actividad. En base a diferencias estereoquímicas en los anillos A y B (posiciones 8b y 3a), las SL pueden clasificarse en dos grandes grupos: de tipo estrigol (ej. 5-desoxiestrigol) y de tipo orobanchol (ej. 4-desoxiorobanchol), denominadas así por haber sido descubiertas como inductoras de la germinación de las especies de plantas parásitas *Striga sp.* y *Orobanche sp.*, respectivamente. A pesar de estas diferencias, todas las SL naturales presentan el anillo D con la configuración 2'R (**Figura 45 A**).

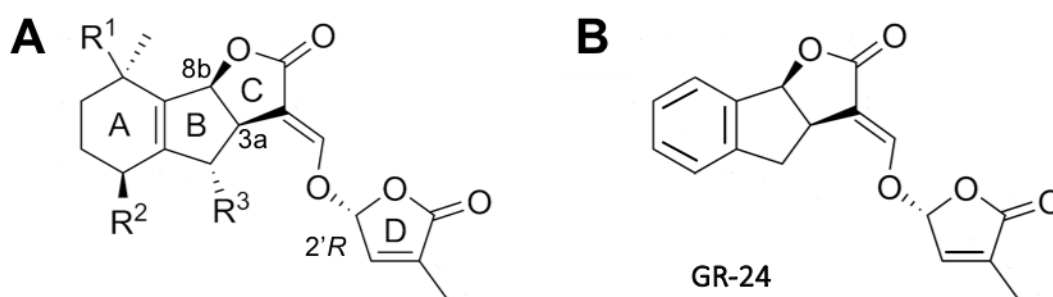


Figura 45. A. Estructura general de las estrigolactonas (SL). B. Estructura química de GR-24.

Uno de los análogos sintéticos de SL más utilizados en el ámbito de la agricultura y el desarrollo de plantas, sobre todo para la germinación de semillas es el compuesto GR-24 (Zwanenburg y Blanco, 2018), que recibe su nombre por haber sido sintetizado por primera vez por el grupo de Gerry Roseberry (Johnson *et al.*, 1981). Este compuesto presenta una estereoquímica similar al 5-desoxiestrigol en las posiciones 8b y 3a y, aunque se conoce que sólo el enantiómero 2'R presenta actividad similar a las SL naturales en plantas. La síntesis química de GR-24 ha dado lugar normalmente a una

mezcla racémica de los dos enantiómeros para la posición 2' (2'R y 2'S) (Waters *et al.*, 2017) (Figura 45 B).

Tanto las SL naturales como las sintéticas, tienen tres actividades biológicas principales en plantas: inducción de la germinación de las semillas en plantas parásitas, promoción del establecimiento de micorrizas (Besserer *et al.*, 2008; Akiyama *et al.*, 2010) e inhibición del crecimiento de ramificaciones laterales en raíces y brotes (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Rameau, 2010; Umehara *et al.*, 2008), afectando a la auto-renovación de las células meristemáticas (Hasan *et al.*, 2018) (Figura 46).

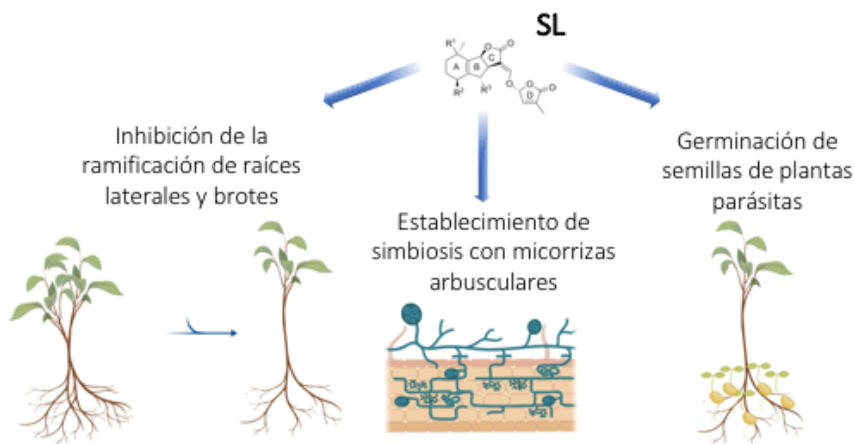


Figura 46. Esquema resumen de las actividades biológicas de las estrigolactonas (SL).

1.2 Actividad biológica de análogos de las SL con aplicaciones terapéuticas

Desde el descubrimiento del papel modulador de las citoquininas sobre quinasas controladoras del ciclo celular en células humanas (Vesely *et al.*, 1994; DeAzevedo *et al.*, 1997), el interés sobre el potencial terapéutico de las hormonas vegetales ha ido en aumento en la investigación biomédica. Otras fitohormonas con propiedades bioactivas son los brasinoesteroides y el ácido jasmónico, con actividad antitumoral por sus efectos en ciclo celular e inducción de apoptosis en las células de cáncer (Malíková *et al.*, 2008; Steigerová *et al.*, 2010; Cesari *et al.*, 2014). En cuanto a las SL, existen antecedentes muy interesantes que describen el potencial de algunos análogos sintéticos como agentes antitumorales. Por ejemplo, algunos análogos sintéticos de las SL, incluido GR-24, presentan actividad antitumoral *in vitro*, inhibiendo la proliferación e induciendo apoptosis en diversas líneas tumorales, mientras que en células no tumorales el efecto es mucho menor o inexistente (Pollock *et al.*, 2012, 2014). Además, GR-24 y otros análogos de SL producen una parada del ciclo celular en G2/M en células tumorales (Pollock *et al.*, 2012, 2014). Finalmente, existen evidencias *in vivo* de que algunos análogos de SL inhiben el crecimiento de tumores en un modelo de xenotransplante de cáncer de mama, afectando además a la integridad de los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

microtúbulos en dichas células tumorales *in vitro* (Mayzlish-Gati *et al.*, 2015). En cuanto a su mecanismo de acción, se ha observado que algunos análogos de SL promueven daños en el ADN, lo cual lleva a la aparición de roturas de doble cadena, a la vez que impiden su reparación (Croglia *et al.*, 2016).

Al margen de la posible actividad antitumoral del análogo de las SL GR-24 (Pollock *et al.*, 2012), estudios recientes han demostrado que este compuesto posee actividad antiinflamatoria, inhibiendo *in vitro* la liberación de citocinas inflamatorias (NO, TNF- α e IL-6) en macrófagos de ratón activados con LPS bacteriano y parece que este efecto podría estar mediado por la inhibición de las vías de señalización de NF- κ b y MAPK. Además de las evidencias *in vitro*, estos mismos estudios muestran cómo GR-24 presenta actividad antiinflamatoria *in vivo* en un modelo de inflamación en pez cebra (Zheng *et al.*, 2018). Además, se han descrito otras actividades de GR-24 *in vitro*, como son la modulación del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a insulina en células de músculo esquelético (Modi *et al.*, 2017), un efecto inhibitor de la adipogénesis (Modi *et al.*, 2018) o la promoción de una respuesta citoprotectora en macrófagos y hepatocitos (Tumer *et al.*, 2018) y en células de músculo esquelético (Modi y Kokkola, 2018).

En base a los antecedentes de los análogos sintéticos de las SL como compuestos antitumorales descritos anteriormente, GR-24 se incluyó en el panel de compuestos naturales y sintéticos sometidos a los ensayos de cribado de candidatos a inhibidores de angiogénesis mencionado en el apartado 7 de la introducción.

2. ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIANGIOGÉNICO DE GR-24 *IN VIVO*

2.1 Efecto del compuesto GR-24 en el ensayo de angiogénesis *in vivo* en la membrana corioalantoidea (CAM) de pollo

GR-24 fue seleccionado inicialmente mediante el ensayo *in vivo* de angiogénesis en CAM de pollo. Su notable actividad en este ensayo nos animó a estudiar en mayor profundidad la posible actividad antiangiogénica de este compuesto. En la **Figura 47** se puede observar que en los controles negativos, cuyos discos contenían DMSO (0.5 %) por ser el vehículo en el que estaba disuelto el compuesto GR-24, los vasos se desarrollaron de forma normal tanto bajo el disco como en los alrededores. Sin embargo, la presencia de aeroplisinina-1 (3 nmol/CAM), usada como control positivo, produjo efectos tales como la disminución del crecimiento de los vasos en el área bajo el disco o el crecimiento de forma centrífuga de los vasos periféricos). Como se aprecia en la **Figura 47**, la presencia de GR-24 (25 nmol/CAM) produjo efectos muy parecidos a los ya mencionados para el control positivo de inhibición.

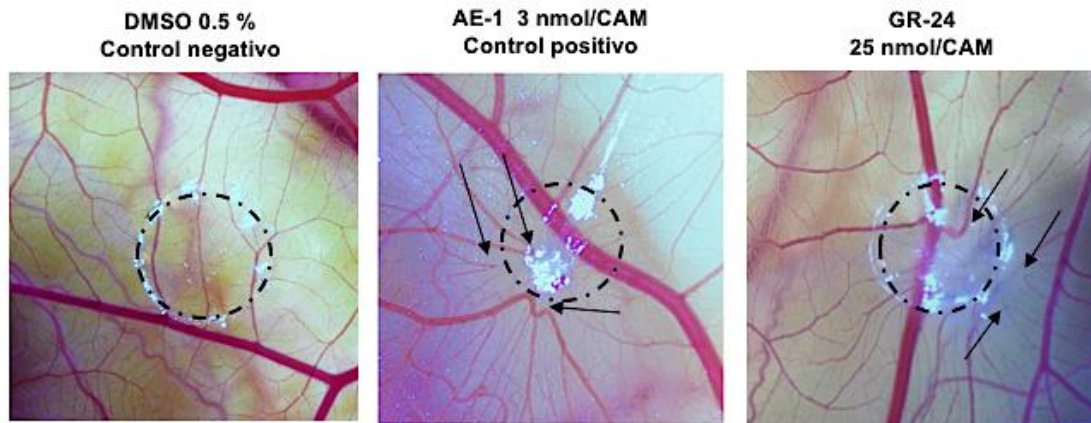


Figura 47. Efecto de GR-24 sobre la angiogénesis en CAM de pollo. Fotografías representativas del control negativo de inhibición (DMSO 0.5 %) y del control positivo (3 nmol aeroplisinina-1/CAM) y del tratamiento de GR-24 a 25 nmol/CAM sobre la angiogénesis fisiológica en la CAM. Las flechas señalan el crecimiento centrífugo de los vasos alrededor del disco.

Estos resultados fueron evaluados a ciegas por tres observadores distintos de una forma cualitativa, considerando positivas aquellas CAM donde los discos habían producido uno o más efectos antiangiogénicos. El resultado de esta valoración se recoge en la **Tabla 14**, donde se muestra que GR-24 inhibe la neovascularización de la CAM de forma dependiente de la dosis, resultando que a la dosis más alta ensayada (25 nmol/CAM) más del 90% de los casos fueron considerados positivos.

Tabla 14. Inhibición de la angiogénesis en la CAM de pollo por GR-24.

| nmol GR-24/CAM | Ensayo CAM | |
|----------------|-----------------|--------------|
| | Positivos/total | % Inhibición |
| 0 (DMSO 0.5 %) | 0/18 | 0 |
| 1 | 3/13 | 23.1 |
| 10 | 4/12 | 33.3 |
| 25 | 10/11 | 90.9 |

2.2 Efecto del compuesto GR-24 en la formación de vasos intersegmentales (ISV) en embriones de pez cebra

Continuando con la evaluación de la actividad antiangiogénica *in vivo* de GR-24, se analizó la capacidad de este compuesto para inhibir la formación de los ISV en embriones de la línea transgénica *Tg(fli:EGFP)y1* de pez cebra, que expresan la proteína verde fluorescente en la vasculatura. Estos vasos se comienzan a formar aproximadamente a las 20 hpf por angiogénesis partiendo desde la aorta ventral y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

dirigiéndose a la anastomosis dorsal (Torres-Vázquez *et al.*, 2004), suponiendo un buen modelo para el estudio de compuestos candidatos a fármacos antiangiogénicos.

En la **Figura 48** se muestran embriones incubados durante 24 h en las condiciones indicadas. En los controles negativos (DMSO 0.5 %) los ISVs se habían formado por completo, mientras que en el control positivo (sunitinib 20 μM) se aprecia claramente la falta de algún ISV o la presencia de vasos incompletos. De forma similar al control positivo, GR-24 produjo una inhibición de la angiogénesis en forma de interrupciones o falta de los ISV más distales en la región caudal del embrión, así como la presencia de vasos colapsados.

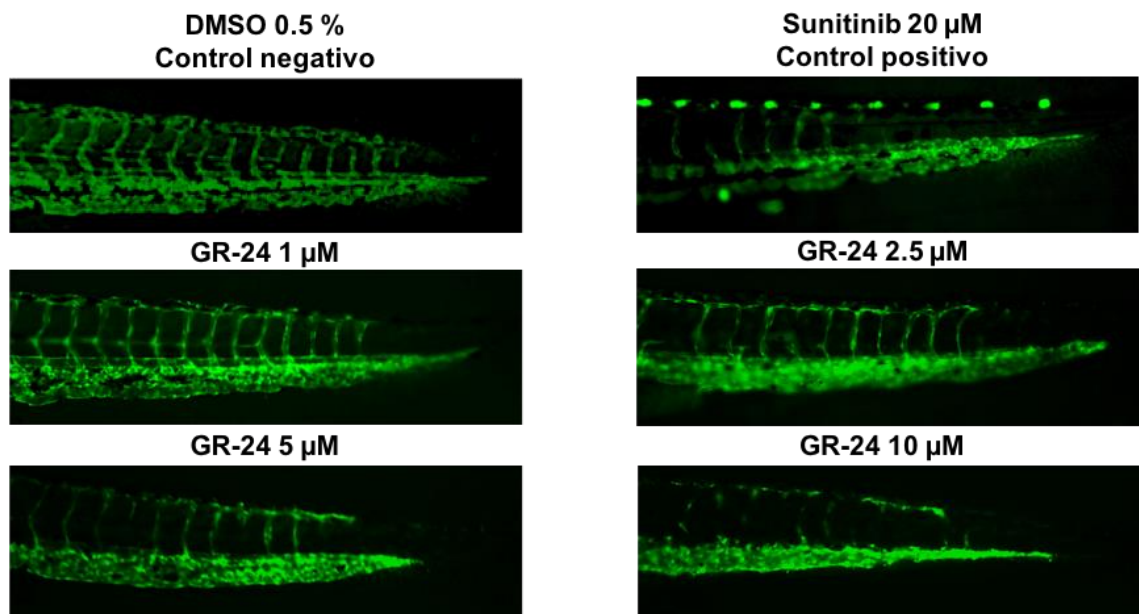


Figura 48. Efecto de GR-24 sobre la formación de vasos intersegmentales (ISVs) en embriones de pez cebra.

Como se muestra en la **Tabla 15**, que resume los resultados obtenidos con este modelo experimental, GR-24 inhibió claramente la formación de los ISV de forma dependiente de la dosis en un rango de concentraciones de 0,1 a 10 μM . La dosis necesaria para producir la inhibición de la formación de los ISV en el 50% de los casos se situó entre las concentraciones de 2,5 y 5 μM , mientras que a 10 μM se alcanzó el 100% de inhibición. Al igual que en el ensayo CAM, los resultados fueron evaluados a ciegas por tres observadores diferentes.

Tabla 15. Efecto de GR-24 sobre la formación de vasos intersegmentales (ISVs) en embriones de pez cebra.

| Ensayo formación ISVs | | |
|-------------------------|-----------------|--------------|
| GR-24 (μM) | Positivos/total | % Inhibición |
| 0 (DMSO 0.5 %) | 0/32 | 0 |
| 0.1 | 0/18 | 0 |
| 1 | 2/25 | 8 |
| 2.5 | 9/24 | 37.5 |
| 5 | 23/26 | 88.5 |
| 10 | 27/27 | 100 |

2.3 Efecto del compuesto GR-24 en la regeneración de la aleta caudal en individuos adultos de pez cebra

De forma complementaria, y para confirmar los resultados de inhibición de angiogénesis por GR-24, se analizó su efecto sobre la regeneración de la aleta caudal en ejemplares adultos de pez cebra. Como se aprecia en la **Figura 49**, pasados tres días de la amputación parcial de la aleta caudal, los individuos expuestos a DMSO 0.5 % (controles) habían regenerado la aleta en su totalidad, mientras que aquellos incubados en presencia de GR-24 10 μM mostraban un grado de regeneración parcial o inexistente. Esta imposibilidad de regenerar el tejido observada en los animales tratados con GR-24 podría deberse al efecto antiangiogénico del compuesto, impidiendo la formación de los nuevos vasos y, por tanto, la regeneración del tejido. Este resultado se repitió consistentemente en 6 de las 7 réplicas del experimento, indicando un porcentaje de inhibición del 85.7 %. En cambio, en los 7 individuos tratados con el vehículo (DMSO 0.5 %), se observó una regeneración completa.

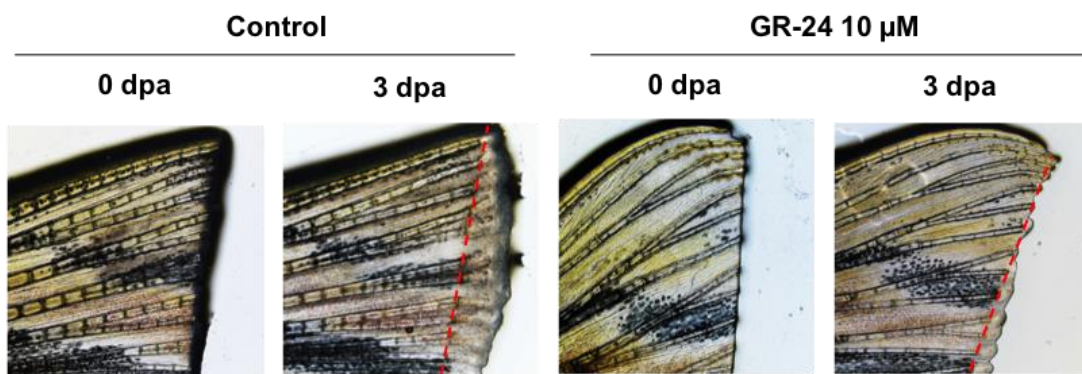


Figura 49. Ensayo de regeneración de la aleta caudal en ejemplares adultos pez cebra en ausencia (control, DMSO 0.5 %) o presencia de GR-24 a una concentración de 10 μM .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. ESTUDIOS *IN VITRO* DEL EFECTO DEL COMPUESTO GR-24 EN PASOS CLAVE DE LA ANGIOGÉNESIS

En vista del notable efecto antiangiogénico demostrado por el GR-24 en los ensayos *in vivo* se hizo uso de la batería de ensayos *in vitro* disponibles en el grupo para determinar cual o cuales procesos que tienen lugar durante la angiogénesis podrían verse modulados por GR-24.

3.1 Efectos del compuesto GR-24 sobre el crecimiento de células endoteliales y tumorales *in vitro*

Debido a que la proliferación de células endoteliales es un proceso necesario para que tenga lugar la formación de nuevos vasos, se estudió el posible efecto del compuesto GR-24 sobre el crecimiento de las células BAEC *in vitro* mediante el método del MTT.

En la **Figura 50 A** se muestra la curva de supervivencia de células endoteliales BAEC frente a concentraciones crecientes del compuesto. Para comprobar si este efecto sobre la supervivencia celular era específico de células endoteliales, se realizó este mismo ensayo con un panel de 7 líneas tumorales de distinta procedencia (**Figura 50 B**). Las formas de las curvas parecen indicar que la inhibición del crecimiento de estas poblaciones celulares por la presencia de concentraciones crecientes de GR-24 radica en un efecto citotóxico debido a la brusca caída en la supervivencia celular en un pequeño rango de concentraciones, a excepción de la línea HeLa, donde la curva está más suavizada indicando un posible efecto citoestático (**Figura 50**).

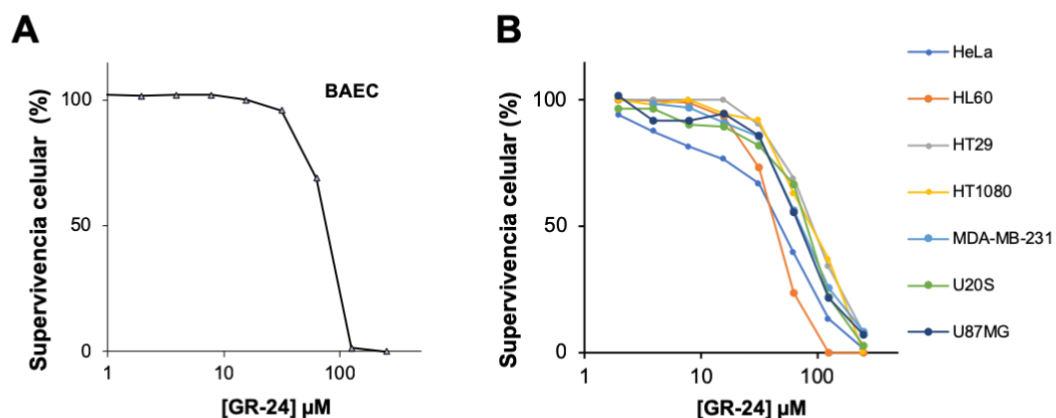


Figura 50. Curvas de supervivencia representativas en (A) BAEC y (B) las líneas tumorales indicadas frente a concentraciones crecientes de GR-24.

A partir de estas curvas de supervivencia se calcularon los valores de IC50 para cada tipo celular, que quedan recogidos en la **Tabla 16**. Todos los valores oscilan entre 40 y 90 μM , lo que no sugiere la existencia de un efecto selectivo del compuesto frente a ningún tipo celular.

Tabla 16. Valores de IC50 de GR-24 en las líneas celulares indicadas. Los datos expresan la media \pm SD de al menos tres experimentos diferentes.

| | IC50 (μM) |
|------------|------------------------|
| BAEC | 71,9 \pm 6,2 |
| HeLa | 49,4 \pm 0,5 |
| HL60 | 42,7 \pm 6,1 |
| HT29 | 93,2 \pm 6,3 |
| HT1080 | 78,98 \pm 18,4 |
| MDA-MB-231 | 86,47 \pm 6,87 |
| U20S | 64,8 \pm 13,2 |
| U87MG | 72,45 \pm 6,39 |

3.2 Efecto de GR-24 sobre el ciclo celular de células endoteliales y tumorales

Para intentar conocer algo más acerca del efecto producido por GR-24 sobre el ciclo celular, se realizaron estudios mediante la tinción con yoduro de propidio y el análisis por citometría de flujo en la línea endotelial BAEC y en la línea tumoral MDA-MB-231. Como se muestra en la **Figura 51 A y B**, los resultados obtenidos revelaron que GR-24 produce un incremento de la población de BAEC en la fase G_0/G_1 , con la consecuente disminución de población celular en las fases S y G_2/M . Estas diferencias con el control eran significativas a partir de 50 μM . No se detectó un aumento en la fase $\text{Sub}G_1$, correspondiente con la subpoblación de células con ADN fragmentado (indicio de apoptosis). Sin embargo, el efecto del compuesto sobre las células de carcinoma mamario MDA-MB-231, difería del observado para las células endoteliales. Los resultados de la **Figura 51 C y D** indican que, a concentraciones superiores a 75 μM , GR-24 causaba un aumento significativo de la subpoblación de células en G_2/M , de acuerdo con lo anteriormente descrito en la bibliografía (Pollock *et al.*, 2012). Al igual que para BAEC, no se encontraron indicios de una inducción de apoptosis por acción del compuesto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

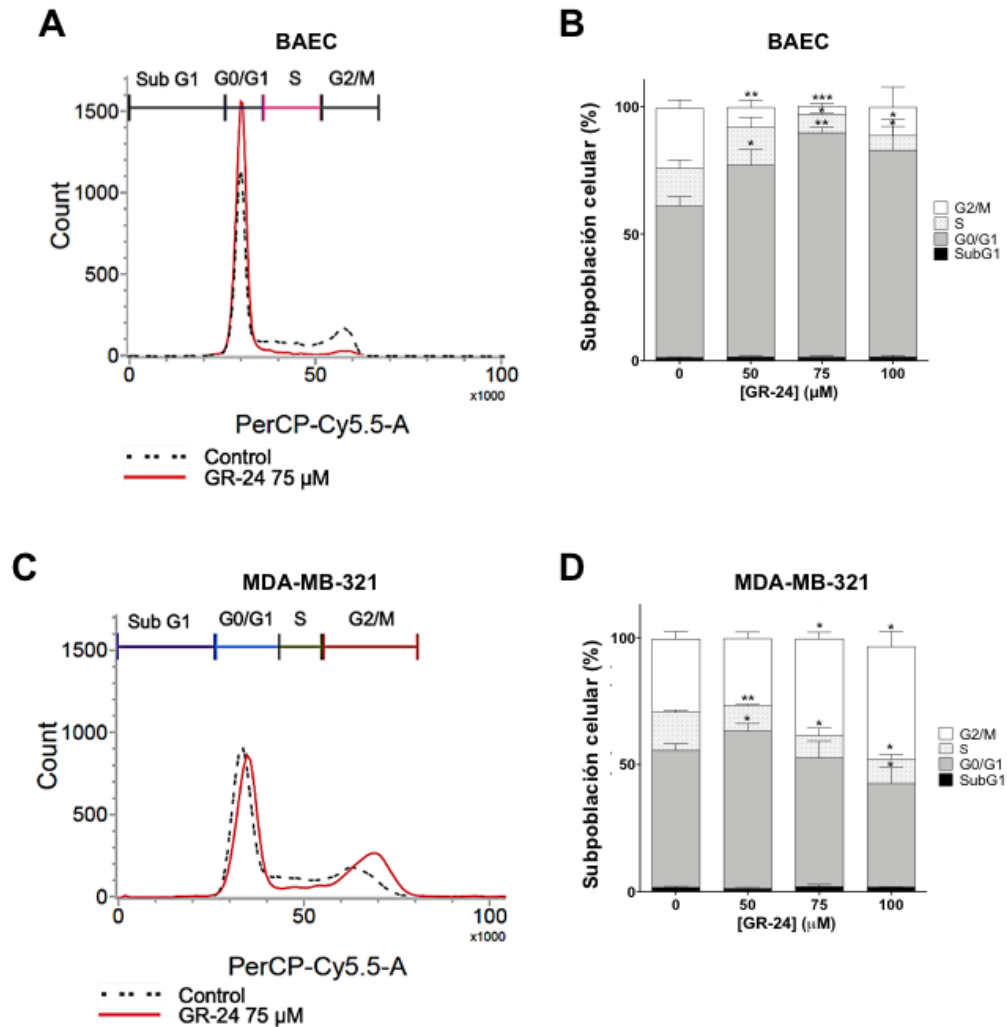


Figura 51. A. Diagrama representativo del efecto de GR-24 a 75 μ M en el ciclo celular de BAEC. B. Cuantificación de las diferentes subpoblaciones del ciclo celular en ausencia (control) o presencia de las concentraciones de GR-24 indicadas. C. Diagrama representativo del efecto de GR-24 a 75 μ M en el ciclo celulares de células de cáncer de mama MDA-MB-231. D. Cuantificación de las diferentes subpoblaciones del ciclo celular en ausencia (control) o presencia de las concentraciones de GR-24 indicadas. Los resultados de B y D son la media \pm SD de 3 experimentos independientes (*T*-test: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

3.3 Efectos del compuesto GR-24 sobre la formación de estructuras tubulares sobre Matrigel

Dado el efecto antiangiogénico *in vivo* del GR-24, se analizó su capacidad para interferir en la formación de estructuras endoteliales similares a tubos sobre Matrigel, correspondiente a la morfogénesis que tiene lugar en las etapas finales de la angiogénesis para conformar la estructura del nuevo vaso.

En la **Figura 52** se aprecia como las células BAEC incubadas en presencia de DMSO (control negativo) adquirieron una disposición en forma de una red de estructuras tubulares, mientras que en presencia de estaurosporina (2 μM) se produjo una inhibición completa de este proceso. El tratamiento de las células endoteliales con diferentes concentraciones de GR-24 produjo una reducción en el número de estructuras formadas sobre Matrigel y en su grosor, observando una inhibición total del fenómeno a la dosis de 40 μM , valor establecido como su MIC en este ensayo.

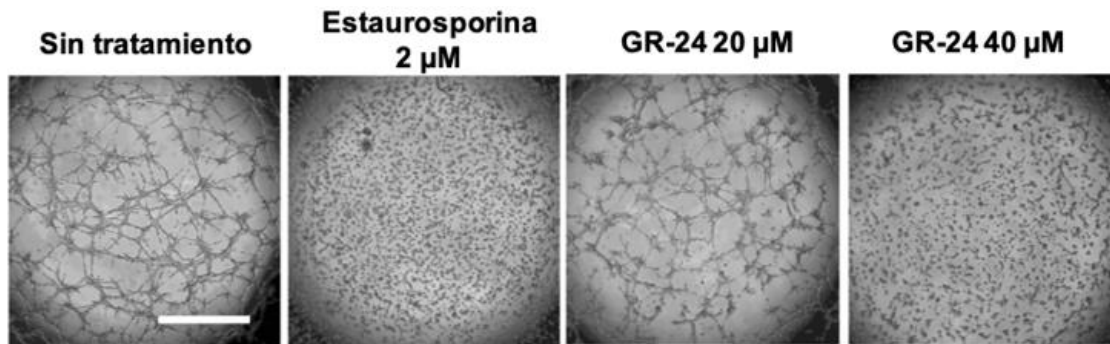


Figura 52. Efecto de GR-24 sobre la formación de estructuras tubulares *in vitro* tras 5 h de incubación (Barra de escala = 1 mm).

3.4 Efecto del compuesto GR-24 sobre las estructuras tubulares preformadas en el ensayo de disrupción vascular

Para determinar si, además de interferir con el proceso de formación de las estructuras tubulares sobre Matrigel, GR-24 también era capaz de desorganizar dichas estructuras comportándose como un disruptor vascular, se añadió el compuesto con posterioridad a la formación de éstas.

En la **Figura 53** se muestra como, transcurridos 90 minutos, los controles sin tratamiento (DMSO) continuaban formando dichas estructuras, mientras que, en el control positivo de disrupción, en el que se usó CA4P a una concentración de 0.2 μM , las estructuras se habían desorganizado por completo y las células aparecían formando agregados. Por su parte, se observó que GR-24, usado a la misma concentración determinada como MIC en el ensayo de formación de tubos (40 μM) no produjo ningún efecto desorganizador en la red de estructuras endoteliales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

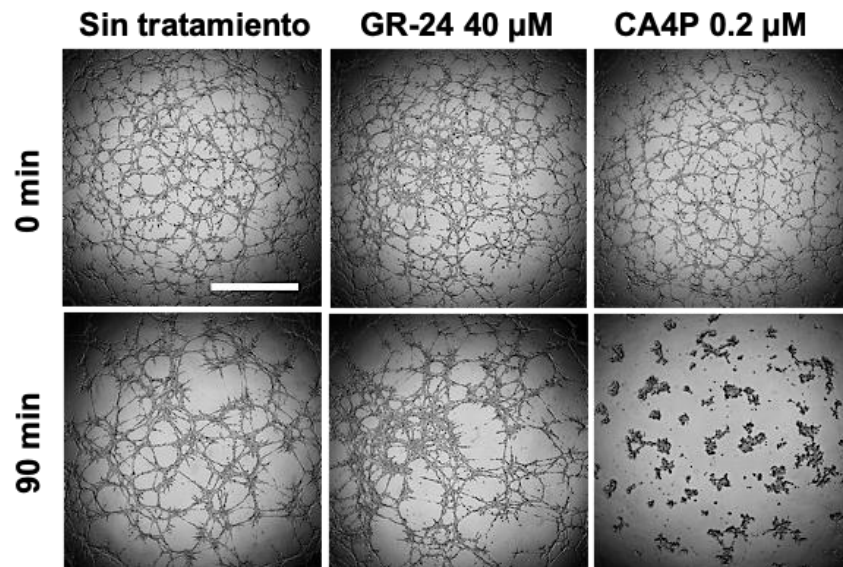


Figura 53. Efecto de GR-24 sobre la integridad de las estructuras tubulares de BAEC. Fotografías representativas del control negativo (DMSO) y del control positivo (Combretastatina-4-fosfato 0,2 μM) y de GR-24 a 40 μM . (Barra de escala = 1 mm).

3.5 Efecto del compuesto GR-24 sobre la capacidad de invasión de las células endoteliales

El paso de un fenotipo quiescente a un fenotipo activado en células endoteliales conlleva la adquisición de la capacidad de invadir la MEC circundante. Para evaluar los posibles efectos que GR-24 pudiera estar produciendo sobre este proceso, se realizaron ensayos en cámara de Boyden modificada, en el cual las células endoteliales debían atravesar una capa de Matrigel para llegar a la cámara inferior que contenía el agente quimiotáctico (FBS).

Como se puede observar en la **Figura 54**, en los controles de células en presencia de DMSO (vehículo del compuesto), la adición de FBS a la cámara inferior inducía el paso de una notable cantidad de células a través del Matrigel, mientras que en los controles sin tratar expuestos a medio sin FBS prácticamente no había invasión. La adición del compuesto GR-24 disminuyó, de una forma dependiente de la dosis, el número de células BAEC que atravesaron el filtro, el siendo este efecto significativo a partir de 50 μM (**Figura 54 B**).

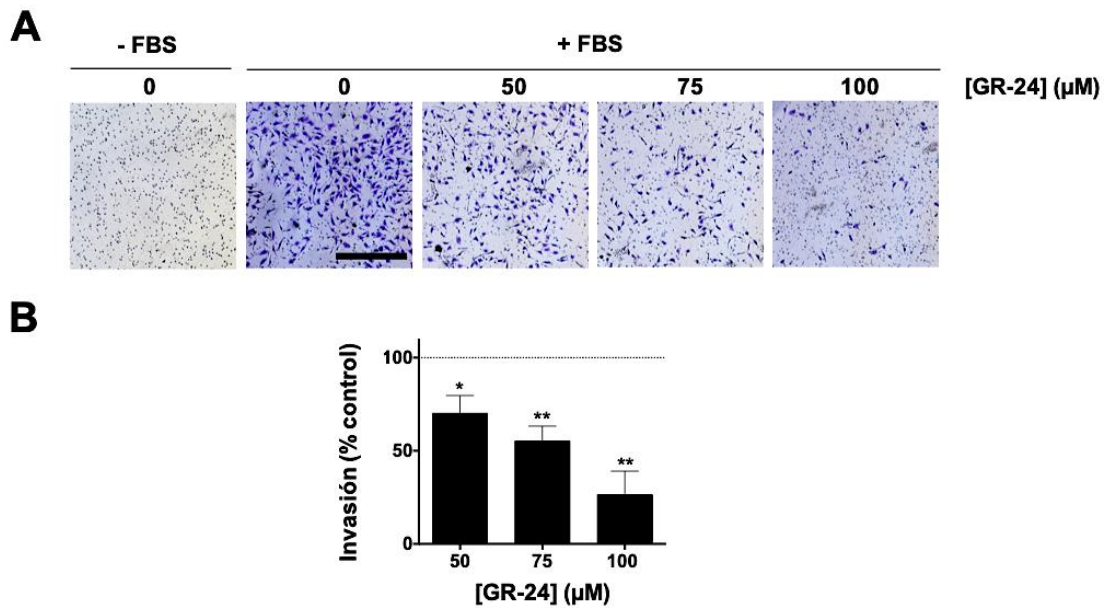


Figura 54. Efecto del compuesto GR-24 sobre la capacidad de invasión de BAEC. **A.** Fotografías representativas del ensayo de invasión en cámara de Boyden modificada tras 16 h de incubación en las condiciones indicadas (Barra de escala= 500 μm). **B.** Recuento de las células invasoras en cada condición, considerando el 100% las muestras estimuladas con FBS en ausencia del compuesto. Los datos expresan la media ± SD para 3 experimentos independientes (*T-test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.6 Efecto del compuesto GR-24 sobre la capacidad de degradación de la matriz extracelular

Para que las células puedan invadir el tejido circundante deben degradar la MEC circundante. En vista a los resultados obtenidos en el ensayo de invasión, se realizaron zimografías de gelatina para analizar la producción de MMP-2 en BAEC.

En la **Figura 55 A**, se observa que las bandas de degradación producidas por la presencia de MMP-2, tanto en extractos celulares como en medios acondicionados de BAEC, eran menores cuando las células habían sido tratadas con GR-24. Esta disminución resultó ser dependiente de dosis en ambos casos, obteniéndose diferencias significativas para concentraciones superiores a 25 μM en el caso de los extractos celulares. Para comprobar si este efecto era específico sobre células endoteliales o era un mecanismo general sobre cualquier tipo celular, se analizó la posible interferencia del compuesto sobre la producción de MMP-2 y MMP-9 por células MDA-MB-231. En este caso, GR-24 no produjo una disminución de MMP-2 ni de MMP-9, apuntando a un efecto específico sobre endotelio (**Figura 55 B**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

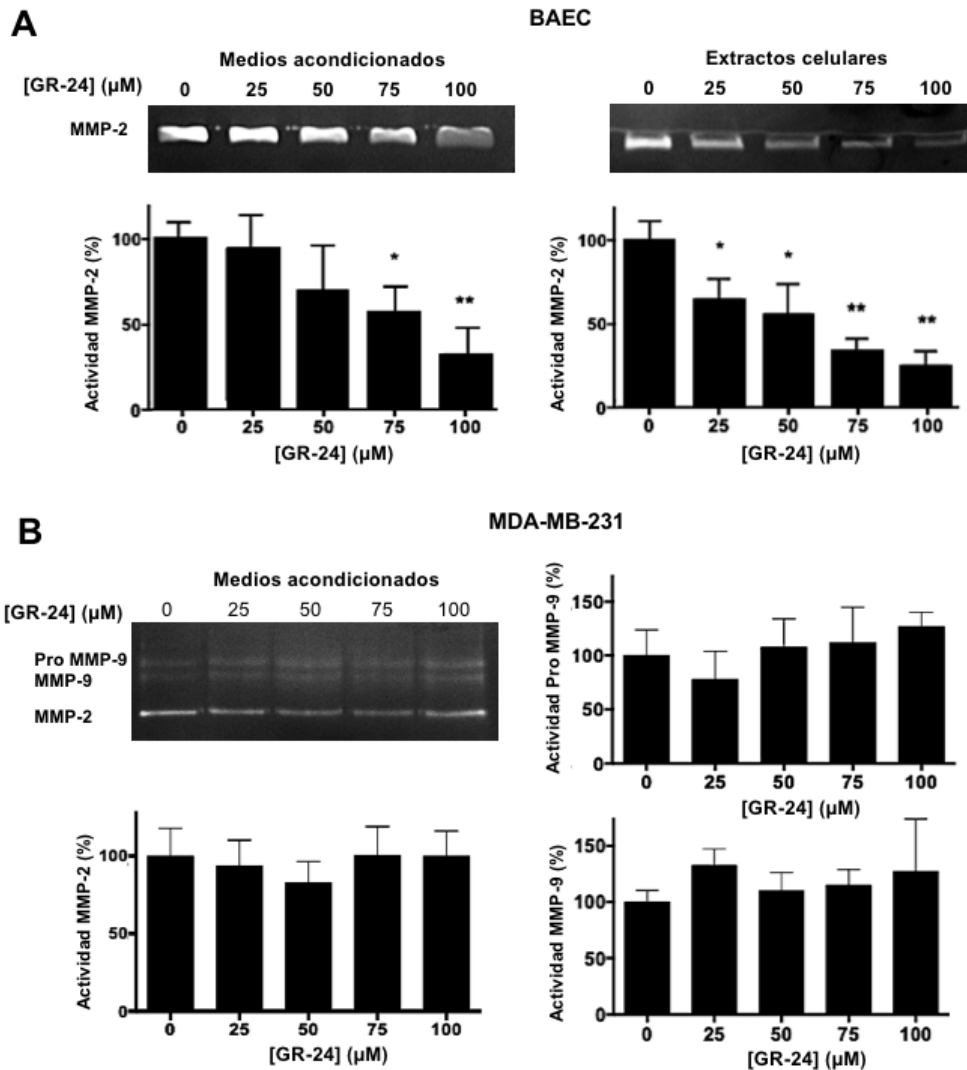


Figura 55. Efecto del compuesto GR-24 sobre la capacidad proteolítica de las células endoteliales y tumorales. **A.** Zimografías de gelatina en BAEC. Fotografías representativas de los geles y cuantificación de la actividad de MMP-2 en medios acondicionados y extractos celulares considerando el 100% la actividad detectada en control sin tratamiento. **B.** Zimografías de gelatina en MDA-MB-231. Fotografías representativas de los geles y cuantificación de la actividad de MMP-9 y MMP-2 en medios acondicionados considerando el 100% la actividad detectada en control sin tratamiento. Los datos expresan la media \pm SD para 3 experimentos independientes (*T-test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.7 Efecto del compuesto GR-24 sobre la migración de las células endoteliales

En estrecha relación con la invasión y la degradación de la MEC, las células endoteliales deben migrar hacia la fuente de señales proangiogénicas. Para profundizar en la caracterización del efecto antiangiogénico del GR-24, se analizó la capacidad de las células endoteliales para migrar en presencia del compuesto mediante el ensayo de cicatrización de la herida o *wound healing*.

La **Figura 56** muestra como GR-24 produjo una inhibición de la migración de BAEC en un modo dependiente de la dosis. Este efecto es apreciable ya a las 4h de incubación, con una inhibición de la migración de forma significativa a partir de 50 μM , aunque el efecto es más patente a las 7 h, donde a la máxima concentración ensayada las células endoteliales tan solo recubrieron un 6 % del área de la herida frente al 54 % recubierto en el control sin tratamiento.

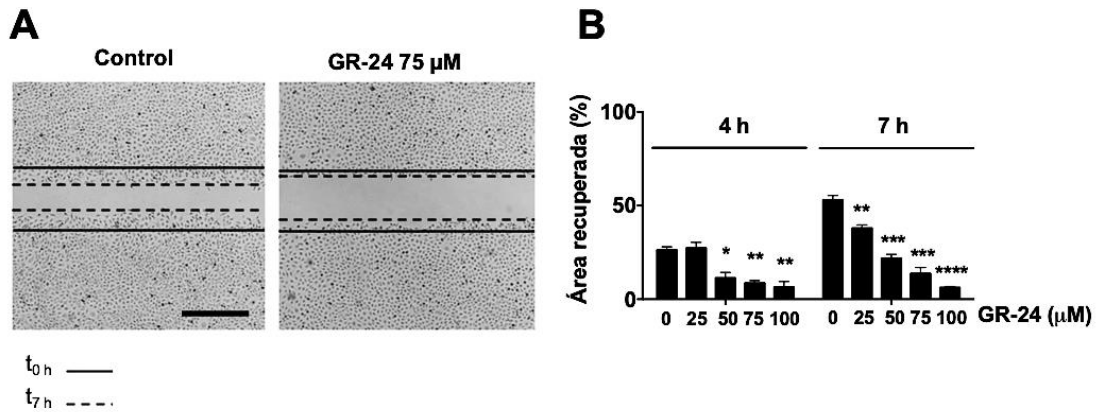


Figura 56. Inhibición de la migración de células BAEC por GR-24. **A.** Fotografías representativas del ensayo de cicatrización de la herida a las 7 h de incubación en el control (DMSO 0.5%) o GR-24 a 75 μM . Las líneas continuas señalan el área libre de células a tiempo 0 h y las discontinuas el frente de células a las 7 h (Barra de escala = 500 μm). **B.** Cuantificación de área recubierta por las células expresada en % respecto al tiempo 0 h. Los datos expresan la media \pm SD ($n=3$, *T-test*: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

A las 24 horas de tratamiento, y en presencia de mitomicina para asegurar que el área recubierta por las células se debía exclusivamente a la migración y no a la proliferación, la presencia de GR-24 no solo impidió el recubrimiento del área libre de células, sino que las BAEC en las concentraciones más altas (75 y 100 μM) estaban notablemente despegadas del fondo de los pocillos (**Figura 57**).

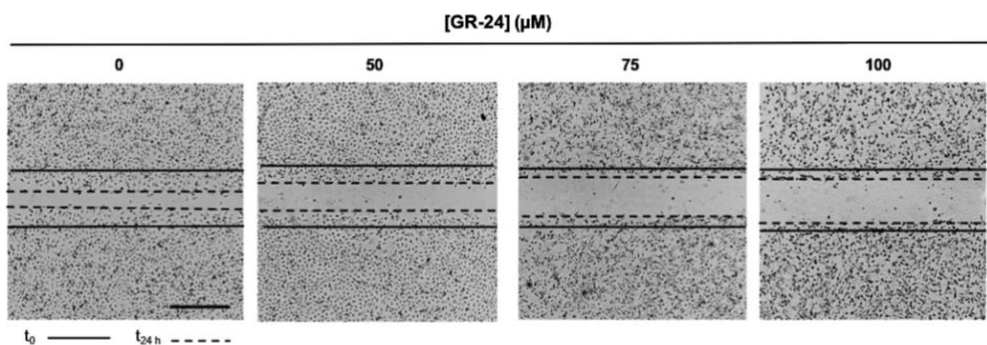


Figura 57. Fotografías representativas del ensayo de cicatrización de la herida a las 24 h de incubación en el control (DMSO 0.5%) o GR-24 a las concentraciones indicadas. Las líneas continuas señalan el área libre de células a tiempo 0 h y las discontinuas el frente de células a las 24 h. Nótese el efecto sobre la adhesión con la presencia de GR-24. (Barra de escala = 500 μm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.8 Efecto del compuesto GR-24 sobre la capacidad de adhesión a la MEC de las células endoteliales

Cuando las células endoteliales se activan y pierden su estado de quiescencia, el perfil de moléculas de adhesión que expresan y exponen en su superficie cambia, favoreciendo la migración a través de la MEC. En vista de las observaciones realizadas en el ensayo de cicatrización de la herida tras 24 h de incubación con GR-24, se estimó oportuno evaluar el posible efecto de este compuesto sobre la adhesión de las células endoteliales a elementos clave de la MEC, como son la fibronectina y el colágeno tipo I.

En la **Figura 58 A** se observa que GR-24 disminuyó la adhesión de las células BAEC a fibronectina y colágeno tipo I en relación al control sin tratar (DMSO). El recuento de las células adheridas en cada caso (representado en las **Figuras 58 B y C**), muestra que al usar como sustrato fibronectina, este efecto era significativo a concentraciones de 50 μM de GR-24, mientras que con colágeno tipo I, se obtuvieron diferencias significativas respecto al control a partir de 25 μM .

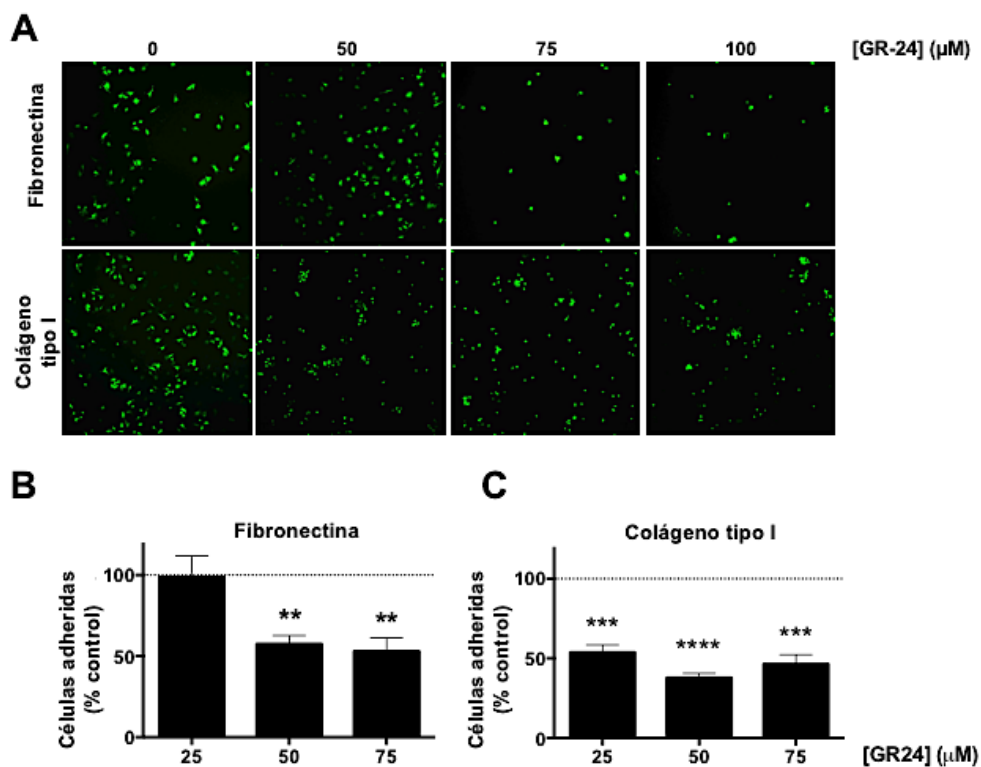


Figura 58. Efecto de GR-24 sobre la adhesión de BAEC a proteínas de la MEC. **A.** Fotografías representativas de las células marcadas con calceína-AM adheridas a fibronectina y a colágeno tipo I en las condiciones experimentales indicadas y (**B y C**) cuantificación de número de células adheridas en cada caso. Los datos están expresados en % respecto al control sin tratamiento y representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (*T-test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4. ESTUDIOS *IN VITRO* DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA DEL COMPUESTO GR-24

4.1 Efectos del compuesto GR-24 sobre la organización del citoesqueleto en células endoteliales

La dinámica del citoesqueleto es esencial para todos los procesos clave que tienen lugar durante la angiogénesis, incluidos la división y la migración celular. Debido a que GR-24 mostró un efecto sobre los procesos mencionados, junto con los antecedentes que describen un efecto de otros análogos de las SL sobre la integridad de los microtúbulos en las células MDA-MB-231 (Mayzlish-Gati *et al.*, 2015), se procedió al estudio del posible efecto de este compuesto sobre la organización de los elementos del citoesqueleto, microtúbulos y filamentos de actina. Las fotografías de microscopía confocal de la **Figura 59** muestran el resultado del marcaje para ambos en ausencia o presencia del compuesto.

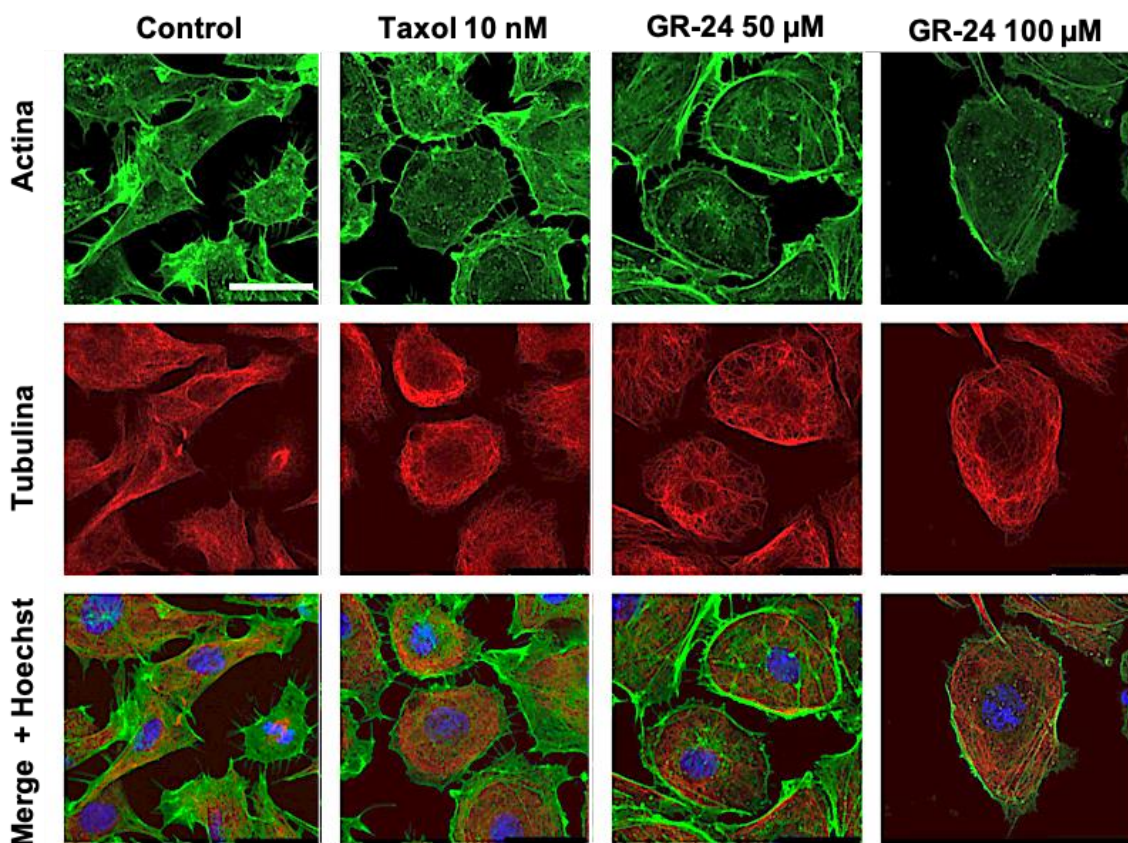


Figura 59. Fotografías representativas de microscopía confocal para la detección de microtúbulos (inmunocitoquímica para alfa-tubulina, rojo), filamentos de actina (marcaje con faloidina, verde) y núcleos (marcaje con Hoechst, azul) en las condiciones experimentales indicadas en monocapas de células BAEC tras 16 h de incubación. Las cabezas de flecha señalan acumulaciones de actina (Barra de escala = 25 μm). Se usó taxol 10 nM como control positivo y se realizaron 3 experimentos independientes para confirmar los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las células endoteliales sin tratar (DMSO), los microtúbulos (visualizados mediante marcaje con anti- α -tubulina) se disponían de un modo longitudinal a lo largo de la célula, mientras que en las tratadas con GR-24 el citoesqueleto de microtúbulos cambiaba completamente su organización, formando ovillos alrededor del núcleo. En este caso, la morfología de las células era más redondeada, al igual que se observó con el control positivo con taxol. Al marcar los filamentos de actina con faloidina, se comprobó que GR-24 causaba una disminución en la presencia de filamentos de estrés en el citoplasma frente una disposición mayoritaria de la actina en el borde de las células, formando acumulaciones puntuales, de forma similar al efecto observado con el taxol.

Repitiendo el estudio en condiciones similares a las usadas en el ensayo de cicatrización de la herida, se pudo comprobar que los efectos del GR-24 sobre el citoesqueleto de las células endoteliales se observaban de igual forma durante la migración (**Figura 60**). Esta última observación apuntaría a que la inhibición de la capacidad migratoria causada por GR-24 podría estar relacionada, al menos en parte, con los efectos producidos por este compuesto sobre el citoesqueleto celular.

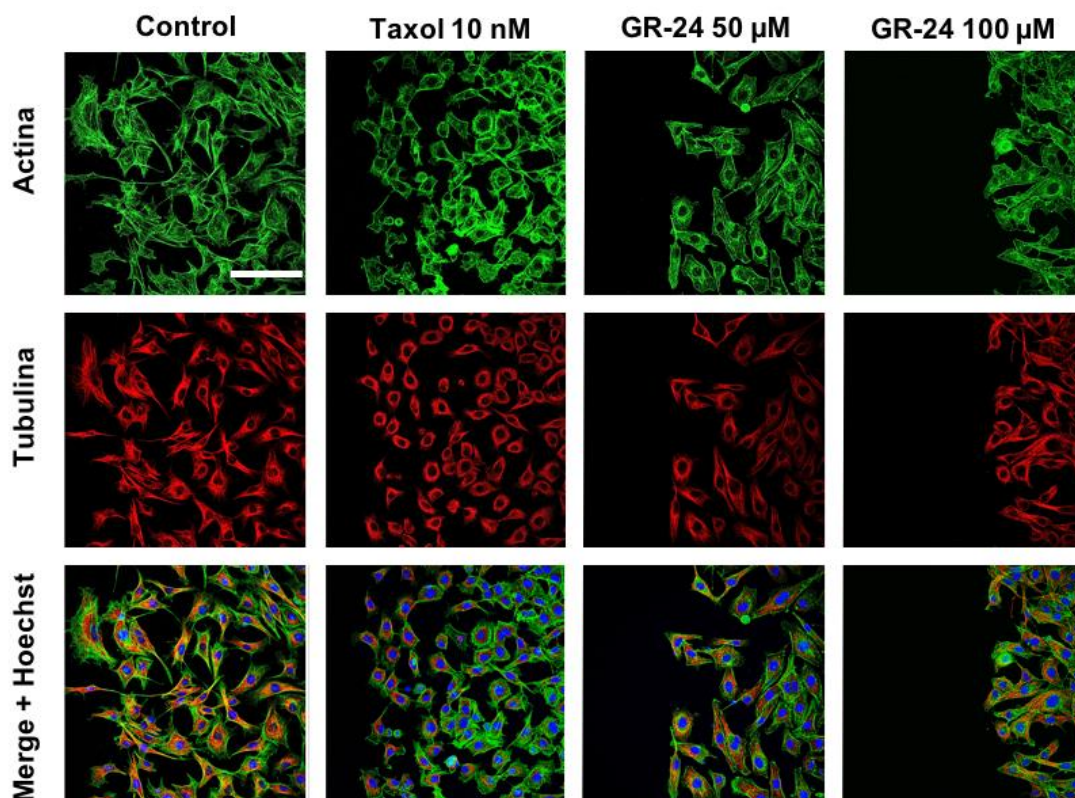


Figura 60. Fotografías representativas de microscopía confocal para la detección de los elementos del citoesqueleto tras 7 h de incubación en ausencia (control) o presencia de las concentraciones indicadas de GR-24 (Barra de escala = 100 μ m). Se usó taxol 10 nM como control positivo y se realizaron 3 experimentos independientes para confirmar los resultados.

4.2 Efecto del compuesto GR-24 sobre la activación de la ruta de señalización de FAK

Las adhesiones focales juegan un papel importante en la dinámica del citoesqueleto, y en ellas participan diversas proteínas, entre las cuales se encuentra FAK, que interviene en la regulación de la motilidad de las células endoteliales y tumorales, así como en su capacidad de adhesión y migración (Lee *et al.*, 2015). Con objeto de comprobar si FAK pudiera ser una diana molecular de GR-24, se analizó mediante inmunocitoquímica su distribución en células endoteliales BAEC tratadas con este compuesto. Como se observa en la **Figura 61**, GR-24 produjo una redistribución de FAK con respecto al control, de modo que pasaba de aparecer de forma generalizada por todo el citoplasma a localizarse fundamentalmente en el núcleo. Además, la doble tinción para visualizar FAK y el citoesqueleto de actina reveló que GR-24 reducía significativamente las acumulaciones puntuales de FAK asociadas a fibras de estrés en extensiones celulares, características de células en migración (**Figura 61 B**).

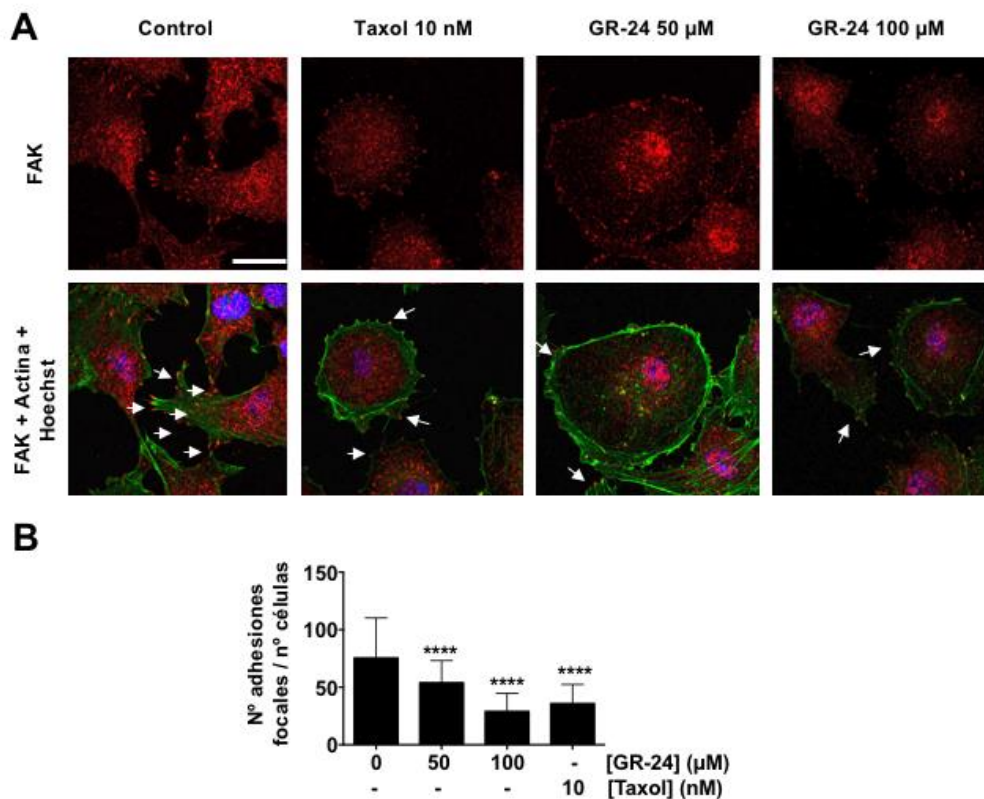


Figura 61. Efectos producidos por GR-24 sobre FAK. **A.** Fotografías representativas de microscopía confocal para la detección de FAK (rojo), filamentos de actina (verde) y núcleos (azul) tras 7 h de incubación. Las cabezas de flecha señalan acumulaciones de FAK formando adhesiones focales (Barra de escala = 20 μm). Se realizaron 3 experimentos independientes para confirmar los resultados. **B.** Cuantificación del número de adhesiones focales por célula en cada condición experimental. Los datos expresan la media ± SD para 3 experimentos independientes (*T*-test: *****p*<0.0001).

Mediante rt-qPCR y *Western-blot* se determinó que la expresión de FAK en células endoteliales tratadas con GR-24 estaba significativamente disminuida (**Figura 62**). Además de la disminución de la expresión, GR-24 redujo su fosforilación, apuntando a

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un efecto inhibitor de la señalización a través de esta vía en células endoteliales (Figura FAK 2 B-C).

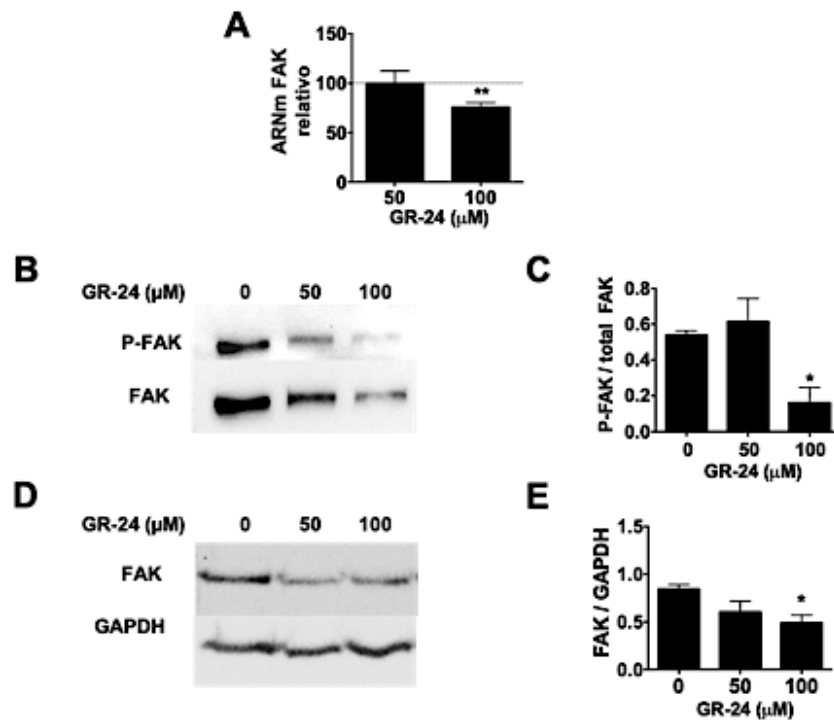


Figura 62. Efectos producidos por GR-24 sobre la expresión y activación de FAK. **A** Análisis de la expresión de ARNm de FAK en BAEC. **B-C.** Fotografías representativas y cuantificación de *western-blot* para las formas fosforilada y total de FAK tras 7 h de incubación bajo las condiciones experimentales indicadas. **D-E.** Fotografías representativas y cuantificación de *western-blot* para la forma total de FAK respecto a la GAPDH tras 7 h de incubación bajo las condiciones experimentales indicadas. Los datos expresan la media \pm SD para 3 experimentos independientes (*T*-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.3 Efecto del compuesto GR-24 sobre la exposición de moléculas de adhesión entre células endoteliales

El endotelio activado presenta una expresión reducida de determinadas moléculas de adhesión como son la cadherina del endotelio vascular (VE-cadherina o CD144) y la molécula de adhesión de células endoteliales/plaquetas-1 (PECAM-1 o CD31), ambas involucradas en las uniones intercelulares del endotelio quiescente (Favaloro, 1993; Giannotta *et al.*, 2013). Debido a los resultados obtenidos en el ciclo celular y a los efectos sobre la adhesión a la MEC y sobre FAK, se analizó mediante citometría de flujo si GR-24 producía algún efecto sobre la exposición de estas moléculas de adhesión en células endoteliales marcándolas, con anticuerpos específicos para dichas proteínas.

Los resultados, representados en la **Figura 63**, revelaron que la incubación con GR-24 aumentaba la presencia tanto de VE-cadherina (**Figura 63 A**) como de PECAM-1 (**Figura 63 B**) en la superficie de células BAEC. Esto, junto con los resultados anteriormente

mencionados, parece indicar que el compuesto está promoviendo que las células endoteliales activadas recuperen un fenotipo quiescente.

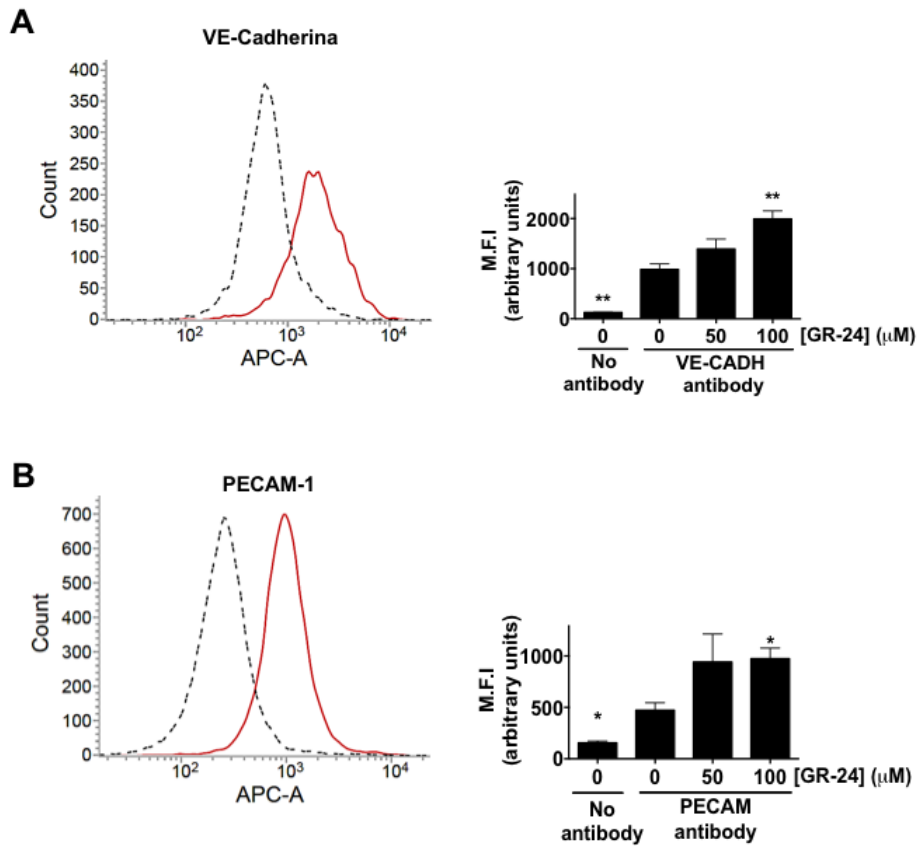


Figura 63. GR-24 promueve la expresión de moléculas de adhesión célula-célula características del endotelio. **A.** Diagrama representativo de la detección de VE-cadherina en BAEC por citometría de flujo y **(B)** su cuantificación tras los tratamientos señalados. **C.** Diagrama representativo de la detección de PECAM-1 en BAEC por citometría de flujo y **(D)** su cuantificación tras los tratamientos señalados. Los datos expresan la media \pm SD para 3 experimentos independientes (*T*-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.4 Efecto del compuesto GR-24 sobre la actividad quinasa de VEGFR2 *in vitro*

VEGFR2, principal diana de los fármacos antiangiogénicos, está involucrado en numerosos procesos de señalización intracelular. Entre ellos, interviene en la señalización mediada por FAK que, como se ha comprobado en este capítulo, se ve afectada por GR-24. Para comprobar si GR-24 estaba ejerciendo una acción directa sobre la actividad quinasa del receptor, se empleó un ensayo enzimático *in vitro* que demostró la falta de efecto de GR-24 sobre la actividad del dominio tirosina quinasa de VEGFR2 (**Figura 64**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

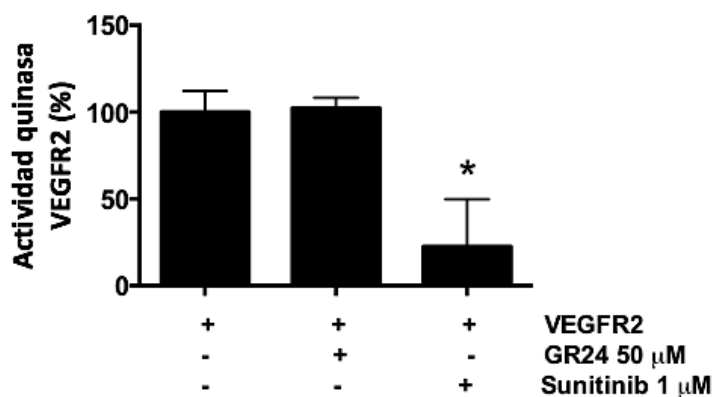


Figura 64. Efecto de GR-24 sobre la actividad quinasa de VEGFR2 *in vitro*. El control sin compuesto se consideró como el 100% de actividad quinasa de VEGFR2 y como control positivo de inhibición se utilizó sunitinib a 1 μ M. Los datos expresan la media \pm SD para 4 experimentos independientes (*T*-test: * $p < 0.05$).

5. DISCUSIÓN

Dentro del extenso conjunto de los fitoquímicos, las hormonas vegetales constituyen un interesante grupo de moléculas con propiedades bioactivas, presentando capacidad para interferir en procesos relacionados con el cáncer (Vesely *et al.*, 1994; De Azevedo *et al.*, 1997; Malíková *et al.*, 2008; Steigerová *et al.*, 2010; Cesari *et al.*, 2014). Algunos análogos sintéticos de las estrigolactonas (fitohormonas derivadas de compuestos carotenoides que modulan la ramificación de los brotes y la estructura de la raíz en plantas) han sido estudiadas en el contexto del cáncer, demostrando poseer potencial para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro* y de tumores en ratones (Pollock *et al.*, 2012, 2014; Mayzlish-Gati *et al.*, 2015; Croglio *et al.*, 2016).

El análogo sintético de las SL GR-24 ha sido ampliamente utilizado en investigación en el campo del desarrollo de plantas, pero sin embargo no se conoce mucho acerca de sus propiedades bioactivas en general y en el contexto del cáncer y el microambiente tumoral en particular. Aunque su potencial como fármaco antitumoral se había sugerido en anteriores estudios en base a sus efectos inhibidores *in vitro* del crecimiento de ciertas líneas de cáncer de mama y en cultivos de mamíferos (Pollock *et al.*, 2012), sus propiedades moduladoras en procesos asociados con el microambiente tumoral como la angiogénesis nunca se había estudiado. Tras su selección en un cribado para la detección de actividad antiangiogénica en compuestos naturales y sintéticos, GR-24 demostró tener capacidad para inhibir la angiogénesis en tres modelos diferentes *in vivo*. Los resultados del ensayo CAM revelaron una inhibición en la angiogénesis dependiente de la dosis de GR-24, al igual que ocurrió en el ensayo de la formación de los ISV en embriones de pez cebra. En estos dos ensayos las dosis necesarias para inhibir la angiogénesis en un 100% de los casos estuvo en el rango micromolar bajo, indicando que GR-24 poseía una notable actividad antiangiogénica.

Adicionalmente, en el ensayo de regeneración de la aleta caudal en ejemplares adultos de pez cebra se observó que GR-24 impedía la regeneración del tejido, probablemente debido a su actividad antiangiogénica, ya que la formación de nuevos vasos es indispensable para este proceso (Bayliss *et al.*, 2006). En los tres modelos *in vivo* mencionados, las dosis necesarias de GR-24 para inhibir la angiogénesis fueron similares o inferiores a las descritas por nuestro grupo de investigación para otros compuestos antiangiogénicos (Cárdenas *et al.*, 2011; García-Caballero *et al.*, 2013, 2014; García-Vilas *et al.*, 2013; 2017b).

La adquisición de la capacidad proliferativa por parte de las células endoteliales es un requisito indispensable para la angiogénesis. Los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT muestran que GR-24 inhibe el crecimiento de las células endoteliales con una IC50 situada en el rango micromolar, pudiendo este efecto contribuir a la actividad inhibidora de la angiogénesis detectada *in vivo*. Se observó además que el compuesto GR-24 era capaz de inhibir el crecimiento celular en un amplio panel de diferentes líneas tumorales (cáncer de mama, cérvix, colon, leucemia, fibrosarcoma, osteosarcoma y glioblastoma), presentando valores de IC50 situados en el mismo rango de concentraciones que el descrito para células endoteliales, lo que indica que GR-24 no es un inhibidor específico del crecimiento de estas células.

A pesar de que el efecto inhibidor de GR-24 sobre el crecimiento de células endoteliales es similar al observado en líneas tumorales, sí se observó una clara diferencia en cuanto a la modulación del ciclo celular al comparar los cambios producidos por el compuesto en la distribución de subpoblaciones de las distintas fases del ciclo celular en BAEC y MDA-MB-231. Así, mientras que en cultivos de células endoteliales BAEC el compuesto GR-24 produce un aumento del número de células en fase G₀/G₁, en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 aumentaba la subpoblación en G₂/M, tal y como estaba descrito en los antecedentes (Pollock *et al.*, 2012). En ninguno de los casos se observó un aumento en las subpoblaciones en subG₁, lo que hubiera sido indicativo de una inducción de apoptosis.

Las diferencias del efecto de GR-24 sobre el ciclo celular de las células endoteliales BAEC y las tumorales MDA-MB-231 concuerdan con el diferente efecto de otros análogos de las SL para células transformadas y no transformadas (Pollock *et al.*, 2012, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral no apoyan los que indican una posible actividad inductora de la apoptosis en MDA-MB-231 (Pollock *et al.*, 2012). Sería interesante confirmar esta observación mediante ensayos que detecten otros cambios celulares indicativos de la apoptosis.

Durante las etapas finales de la angiogénesis tiene lugar un fenómeno de morfogénesis que culmina en la formación del nuevo vaso por reorganización de las células endoteliales, las cuales adquieren de nuevo el fenotipo quiescente que poseían

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

antes de la activación de la angiogénesis (Carmeliet, 2005; Potente, 2011). Los resultados obtenidos mediante el ensayo de tubulogénesis de BAEC demuestran que GR-24 inhibe la formación de estructuras similares a tubos a concentraciones inferiores a su IC50. Cabe destacar que GR-24 no fue capaz de desorganizar estructuras endoteliales una vez que éstas ya se habían formado sobre Matrigel, lo que descarta un posible papel del compuesto como disruptor vascular. Estos datos sugieren que el GR-24 actuaría preferencialmente sobre las células endoteliales activadas y no sobre el endotelio quiescente, característico de los vasos ya formados.

Para desplazarse hacia el estímulo angiogénico, las células endoteliales deben secretar proteasas que degraden la membrana basal y la MEC, como es el caso de la MMP-2, una MMP característica de estas células que posibilita la invasión durante la angiogénesis pero también contribuye a su modulación mediante la liberación de factores angiogénicos asociados a la MEC (Egeblad y Werb, 2002; Handsley y Edwards, 2005; Van Hinsbergh *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos con GR-24 en el ensayo en cámara de Boyden de invasión a través de Matrigel muestran que dicho compuesto inhibe la capacidad invasora de las células endoteliales de manera significativa y dependiente de la dosis. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en las zimografías de gelatina, que mostraron la capacidad de GR-24 de disminuir la producción de MMP-2 por las células endoteliales. El hecho de que GR-24 no produjese un efecto inhibitorio sobre la MMP-2 y la MMP-9 en MDA-MB-231 refuerza la idea de que la actividad de este compuesto es diferente en células endoteliales y en células tumorales, ya planteada en base a los resultados obtenidos en el estudio del ciclo celular. Además, el descenso en la secreción de MMP-2 causado por compuestos antiangiogénicos se ha relacionado con la inhibición de la formación de estructuras tubulares sobre Matrigel y con la reducción de la capacidad migratoria en células endoteliales (Elkin *et al.*, 2000; Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002; Philip y Kundu, 2003).

Los ensayos de cicatrización de herida *in vitro* permitieron demostrar que este compuesto inhibe la migración de las células endoteliales a dosis menores de su IC50 en estas células. El efecto inhibitorio de la migración se había descrito previamente para otros análogos de SL sobre células tumorales (Mayzlish-Gati *et al.*, 2015), pero no para GR-24. La regulación de los mecanismos de adhesión celular posibilita el establecimiento de puntos de anclaje de las células con elementos de la MEC necesarios para que las células migren y formen nuevo vaso (Dorland y Huveneers, 2017). Los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión *in vitro* muestran que GR-24 inhibe la adhesión de las células endoteliales a fibronectina, uno de los componentes mayoritarios de la MEC, y a colágeno tipo I, cuya interacción con integrinas activa numerosas vías de señalización en estas células (Neve *et al.*, 2014). Es interesante señalar que ambos componentes de la MEC son importantes también durante la etapa final de morfogénesis que se da en la angiogénesis (Senger *et al.*, 2002; Davis y Senger, 2005), por lo que la inhibición de la adhesión celular a estos elementos por parte de GR-

24 podría afectar tanto a la capacidad de las células endoteliales para migrar como a la formación del nuevo vaso.

Las evidencias encontradas sobre el efecto inhibitor del compuesto GR-24 sobre varios de los pasos de la angiogénesis, apuntan a un mecanismo de acción que pudiera afectar a elementos celulares implicados en todos ellos. La organización y la dinámica del citoesqueleto de células endoteliales es esencial durante la angiogénesis, y los elementos del citoesqueleto han sido propuestos como una diana para los compuestos inhibidores de este proceso (Belotti *et al.*, 1996). Los microtúbulos y los filamentos de actina participan en la regulación del ciclo celular, la dinámica de adhesiones focales, la adhesión, el tráfico vesicular, la comunicación intercelular y la señalización intracelular (Wehrle-Haller e Imhof, 2003; Friedl y Wolf, 2009; Bayless y Johnson, 2011; Case y Waterman, 2015). Los efectos producidos por GR-24 sobre el citoesqueleto de microtúbulos y filamentos de actina en células BAEC son muy similares a los producidos por el taxol (Paclitaxel), usado en estos ensayos como control positivo por ser un conocido agente estabilizador de microtúbulos con propiedades antiangiogénicas (Belotti *et al.*, 1996; Bijman *et al.*, 2006). Así, el GR-24 afecta al citoesqueleto de actina induciendo una organización más redondeada en el citoplasma, con escasas o nulas extensiones (características de células migradoras) y con pocas fibras de estrés. En presencia de GR-24 los microtúbulos se disponen una estructura de ovillo en el citoplasma, una característica descrita en células expuestas a agentes estabilizadores de microtúbulos, y diferente a la producida por agentes desestabilizadores como la colchicina (Bayless y Johnson, 2011), cuyo tratamiento produce la aparición de la tubulina disgregada por el interior de la célula en lugar de formando filamentos. Este resultado sugiere GR-24 podría inducir la estabilización de los microtúbulos impidiendo así su dinámica, pero no generando su desorganización.

Además, el GR-24 y el taxol comparten otros efectos como, por ejemplo, el bloqueo del ciclo celular o la inhibición de la migración *in vitro* (Schiff y Horwitz, 1980; Kamath *et al.*, 2014). Curiosamente, el taxol produce defectos en el transporte vesicular a través de su efecto en los microtúbulos (Kamath *et al.*, 2014), característica que se ha descrito para GR-24 en plantas (Pandya-Kumar *et al.*, 2014), con lo que sería interesante estudiar si GR-24 afecta también al tráfico de vesículas en células endoteliales. Estos cambios producidos por GR-24 sobre los microtúbulos en células endoteliales se asemejan a los descritos para otros análogos de las SL en células tumorales (Mayzlish-Gati *et al.*, 2015). Los cambios en la organización del citoesqueleto inducidos por GR-24 podrían colaborar al efecto inhibitor del compuesto sobre los diferentes procesos involucrados en la angiogénesis estudiados mediante los ensayos *in vitro* en esta Tesis y su notable actividad antiangiogénica *in vivo*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La reorganización de los filamentos de actina y los microtúbulos en el citoplasma de las células endoteliales en respuesta a la presencia de GR-24 sugiere que podrían estar produciéndose cambios en las adhesiones focales a la MEC, en las que intervienen ambos elementos en conexión con las integrinas y otras proteínas esenciales durante el proceso de migración celular (Wehrle-Haller e Imhof, 2003; Friedl y Wolf, 2009; Case y Waterman, 2015). Los resultados mostrados en esta Tesis indican que GR-24 reduce el número de adhesiones focales en células endoteliales, así como la expresión de FAK en estas células, lo que podría contribuir a la inhibición de la migración celular observada en presencia del compuesto. FAK interviene en procesos de señalización intracelular mediada por las integrinas y por los receptores de diversos factores de crecimiento (Schaller *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1996; Brunton *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Frame *et al.*, 2010). En cáncer, se ha implicado en la modulación de diversos procesos asociados a la progresión tumoral, como la angiogénesis (Lee *et al.*, 2015), activando la migración *in vitro* (Gates *et al.*, 1994; Romer *et al.*, 1994) y demostrando un papel relevante en estudios de angiogénesis *in vivo* (Peng *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Braren *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos demuestran que GR-24 disminuye la activación de FAK, reduciendo la fosforilación en el residuo Tyr397 de la quinasa, lo que podría contribuir a explicar muchos de los efectos observados *in vitro* para dicho compuesto. Además, se ha descrito que FAK modula la proliferación de las células endoteliales (Gilmore y Romer, 1996) y que la disminución de su fosforilación provoca un retraso en el paso de la fase G1 a la S en el ciclo celular (Sechler y Schwarzbauer, 1998), lo cual podría explicar el efecto observado en células las endoteliales tratadas con GR-24, en las que el compuesto produjo una acumulación de células en fase G0/G1.

En base a estas observaciones, FAK se postula como una posible diana molecular de GR-24 en células endoteliales a través de la cual ejercería su actividad antiangiogénica. Sería necesario determinar si el compuesto actúa directamente sobre esta quinasa o sobre algún elemento que se encuentre por encima de FAK en algunos de los puntos activadores de la señalización, como podrían ser las integrinas o los receptores de los factores de crecimiento, como VEGFR2, del que se sabe que puede mediar la activación de FAK (Peach *et al.*, 2018) que, a su vez, promueve la transcripción del mencionado receptor (Sun *et al.*, 2018). Sería interesante por tanto comprobar si GR-24 es capaz de inhibir la señalización a través de la vía VEGF/VEGFR2 (**Figura 65**).

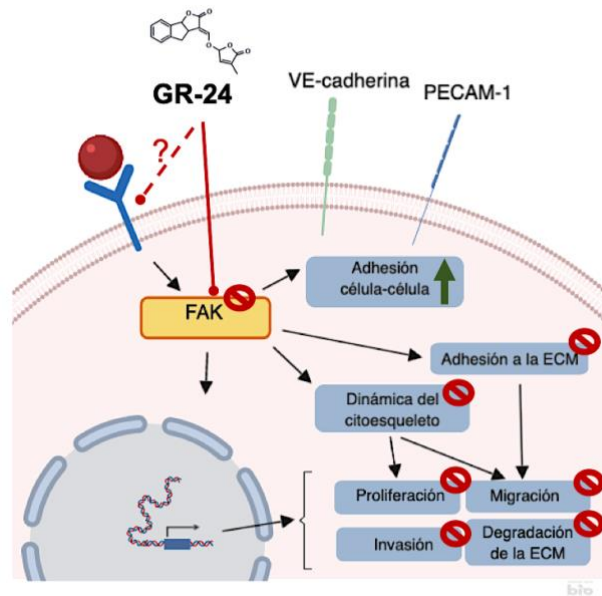


Figura 65. GR-24 inhibe la angiogénesis a través de una disminución en la expresión y activación de FAK. El efecto sobre la señalización mediada por FAK conlleva la inhibición de procesos indispensables para la angiogénesis como proliferación, migración, invasión, degradación y adhesión a la matriz extracelular, afecta a la dinámica del citoesqueleto y promueve la expresión o exposición en la superficie celular de moléculas características del endotelio quiescente como VE-cadherina o PECAM-1.

Muchos de los resultados presentados en esta Tesis acerca del efecto del compuesto GR-24 sobre las células endoteliales sugieren que este compuesto podría estar promoviendo un fenotipo quiescente en estas células. Tal es el caso del efecto diferencial de este compuesto en el ciclo celular de las células endoteliales, produciendo una acumulación de células en fase G0/G1. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual las células endoteliales adquieren el fenotipo quiescente (Schlereth *et al.*, 2018), sí se sabe que para el mantenimiento de la integridad vascular es necesario el correcto establecimiento de adhesiones célula-célula entre las células que forman los vasos. La VE-cadherina es una molécula de adhesión que forma parte de las uniones adherentes, esenciales para el mantenimiento de la integridad de los vasos (Gianotta *et al.*, 2013). Cuando las células endoteliales se activan en el inicio del proceso de angiogénesis, VE-cadherina se fosforila e internaliza (Lambeng *et al.*, 2005; Harris y Nelson, 2010), de forma que su expresión en la superficie celular está relacionada con un fenotipo quiescente y no con un fenotipo activado. Algo similar ocurre con PECAM-1 (CD31), cuya expresión aumenta en el endotelio quiescente (RayChaudhury *et al.*, 2001; Privratsky y Newman, 2014) y cuya presencia en la membrana plasmática de células endoteliales se correlaciona con una capacidad de migración reducida y con la inhibición de la angiogénesis (Wu y Sheibani, 2003). Los resultados obtenidos indican que se produce una mayor exposición en superficie de VE-cadherina y PECAM-1 en las células endoteliales tratadas con GR-24, lo cual, junto a la parada en el ciclo celular en G0/G1 y su nula actividad apoptogénica, señalan que este compuesto está induciendo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un estado de quiescencia en las células o impidiendo el paso al fenotipo activado, característico de la angiogénesis. Es interesante señalar que la expresión de VE-cadherina se relaciona con la señalización a través de FAK, de tal modo que en respuesta a la misma, VE-cadherina se fosforila e internaliza (Jean *et al.*, 2014). A su vez, se ha descrito que la expresión de PECAM-1 en células endoteliales confluentes *in vitro* disminuye la señalización a través de FAK y estabiliza las interacciones VE-cadherina/ β -catenina (Gratzinger *et al.*, 2003).

En resumen, el análogo sintético de las SL GR-24 posee una notable actividad antiangiogénica *in vitro* e *in vivo*, siendo capaz de inhibir varias etapas clave de la angiogénesis (Figura 66).

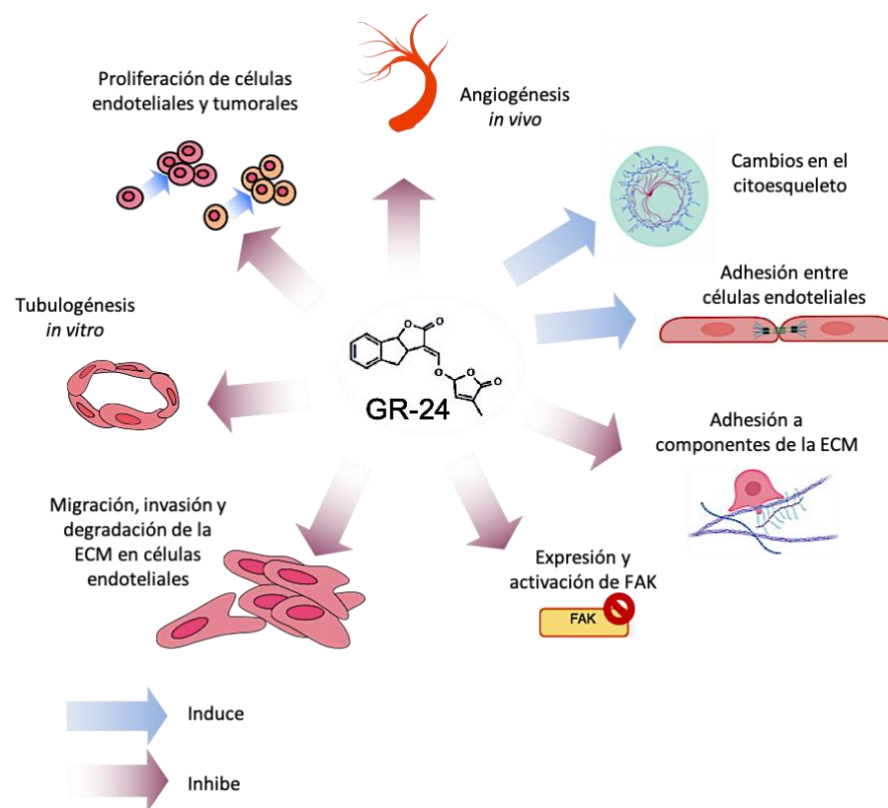


Figura 66. Resumen de la actividad del compuesto GR-24. Inhibe el crecimiento de células endoteliales y tumorales *in vitro* y tiene actividad antiangiogénica tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo capaz de interferir la señalización a través de la quinasa asociada a adhesiones focales (FAK) y produciendo cambios en el citoesqueleto, afectando a procesos esenciales para la angiogénesis como la degradación de la ECM, la migración, la invasión, y la adhesión a elementos de la matriz extracelular, e induce características del fenotipo endotelial quiescente.

Los efectos de GR-24 sobre el ciclo celular, la inhibición de la capacidad de las células endoteliales para migrar e invadir la MEC y el aumento en la exposición de VE-cadherina y PECAM-1 en la membrana de estas células, apuntan a que GR-24 ejercería su actividad antiangiogénica mediante la promoción del fenotipo quiescente en el endotelio. La reorganización del citoesqueleto observada en células endoteliales en respuesta a GR-

24 apoya esta idea, ya que los cambios inducidos son propios de células endoteliales no activadas. Los efectos observados sobre FAK y su activación apuntan a esta proteína como una posible diana molecular del compuesto GR-24 en células endoteliales, aunque no se descarta la posibilidad de que el compuesto interfiera con elementos situados por encima de FAK en la vía de señalización, como el receptor VEGFR2.

Aunque quedan muchos interrogantes por responder acerca del mecanismo de acción y las propiedades farmacocinéticas del compuesto, estudios recientes de ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) *in silico*, que indican su compatibilidad con su uso como fármaco (Tumer *et al.*, 2018), apoyan la posible utilidad del compuesto como un candidato a fármaco para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis.

NOTA REFERENTE AL CAPÍTULO II: Durante el periodo de evaluación de esta Tesis Doctoral se han realizado avances en lo referente al mecanismo de acción de GR-24, derivados de los comentarios y sugerencias de los revisores del manuscrito en la revista *Biochemical Pharmacology*, donde actualmente se encuentra bajo revisión. Los nuevos datos obtenidos, así como la mejora de algunas de las figuras, no están incluidos en este Capítulo, pero se recogen en el Anexo III de la presente memoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, y en relación a los Objetivos inicialmente planteados, presentamos las siguientes Conclusiones:

En relación al Objetivo 1:

- Se han identificado dos nuevos compuestos inhibidores de la angiogénesis, el intermediario en la síntesis de las solomonamidas *Solo F-OH* y el análogo sintético de las estrigolactonas GR-24. Ambos compuestos presentan una notable actividad antiangiogénica *in vivo* e inhiben etapas clave del proceso angiogénico, presentándose como candidatos a fármacos para el tratamiento de enfermedades dependientes de la angiogénesis.
- La posible utilidad de los mencionados compuestos para la terapia antitumoral se ve reforzada por su actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* de líneas celulares tumorales.

En relación al Objetivo 2:

- A pesar de que no se descarta la interacción del compuesto *Solo F-OH* en la señalización de la vía de VEGF/VEGFR2, la ruta de FGF-2/FGFR se postula como una posible diana para la actividad antiangiogénica de este compuesto, mediada por su inhibición de las vías de señalización de ERK/MAPK y PI3K/AKT.
- La actividad antiangiogénica del compuesto GR-24 parece estar relacionada con la inducción de un fenotipo quiescente en las células endoteliales. Este efecto, así como su inhibición de varias etapas del proceso angiogénico, podrían estar mediados por la interferencia del compuesto en la señalización a través de FAK en células endoteliales.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the present Doctoral Thesis, and in relation to the initially proposed aims, the following Conclusions are presented:

In relation to Objective 1:

- Two new inhibitors of angiogenesis have been identified, the intermediary in the synthesis of solomonamides *Solo F-OH* and the synthetic analogue of strigolactones GR-24. Both compounds present a remarkable antiangiogenic activity in vivo and inhibit key stages of the angiogenic process, what makes them promising drug candidates for the treatment of angiogenesis-related diseases.
- The potential application of this compounds in Oncology is reinforced by their capability to inhibit tumor cell growth in vitro.

In relation to Objective 2:

- Although an interaction of the compound *Solo F-OH* with the signaling of the VEGF/VEGFR2 pathway cannot be ruled out, the FGF-2/FGFR pathway is postulated as a possible target for the antiangiogenic activity of this compound, mediated by its inhibition of the ERK/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways.
- The antiangiogenic activity of GR 24 appears to be related to the induction of a quiescent phenotype in endothelial cells. This effect, as well as its inhibition of several stages of the angiogenic process, could be mediated by the compound's interference with the endothelial cells FAK signaling.

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Ghazaleh, R., Kabir, J., Jia, H., Lobo, M., & Zachary, I. (2001). Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochemical Journal*, 360(Pt 1), 255. DOI: 10.1042/0264-6021:3600255

Agbowuro, A. A., Huston, W. M., Gamble, A. B., & Tyndall, J. D. (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. *Medicinal research reviews*, 38(4), 1295-1331. DOI:10.1002/med.21475.

Ahmed, B., van Eijk, L. I., Bouma-ter Steege, J. C., van der Schaft, D. W., van Esch, A. M., Joosten-Achjanie, S. R., ... & Griffioen, A. W. (2003). Vascular targeting effect of combretastatin A-4 phosphate dominates the inherent angiogenesis inhibitory activity. *International journal of cancer*, 105(1), 20-25. DOI: 10.1002/ijc.11010.

Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknaes, M., Hektoen, M., ... & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71. DOI: 10.1038/oncsis.2013.35.

Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S. & Hayashi, H. (2010). Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant and Cell Physiology*, 51(7), 1104-1117. DOI: 10.1093/pcp/pcq058.

Akwii, R. G., Sajib, M. S., Zahra, F. T., & Mikelis, C. M. (2019). Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells*, 8(5), 471. DOI: 10.3390/cells8050471.

Al-Abd, A. M., Alamoudi, A. J., Abdel-Naim, A. B., Neamatallah, T. A., & Ashour, O. M. (2017). Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: potential pathways, therapy and current strategies—a review. *Journal of advanced research*, 8(6), 591-605. DOI: DOI: 10.1016/j.jare.2017.06.006.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Blood vessels and endothelial cells. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science.

Álvarez-Aznar, A., Muhl, L., & Gaengel, K. (2017). VEGF receptor tyrosine kinases: key regulators of vascular function. *Current topics in developmental biology*, 123, 433-482. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.10.001.

Annese, T., Tamma, R., Ruggieri, S., & Ribatti, D. (2019). Angiogenesis in Pancreatic Cancer: Pre-Clinical and Clinical Studies. *Cancers*, 11(3), 381. DOI:10.3390/cancers11030381.

Aoki, S., Naka, Y., Itoh, T., Furukawa, T., Rachmat, R., Akiyama, S. I., & Kobayashi, M. (2002). Lembehsterols A and B, novel sulfated sterols inhibiting thymidine phosphorylase,

BIBLIOGRAFÍA

from the marine sponge *Petrosia strongylata*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 50(6), 827-830. DOI: 10.1248/cpb.50.827.

(a) Aoki, S., Cho, S. H., Ono, M., Kuwano, T., Nakao, S., Kuwano, M., ... & Kobayashi, M. (2006). Bastadin 6, a spongean brominated tyrosine derivative, inhibits tumor angiogenesis by inducing selective apoptosis to endothelial cells. *Anti-Cancer Drugs*, 17(3), 269-278.

(b) Aoki, S., Watanabe, Y., Sanagawa, M., Setiawan, A., Kotoku, N., & Kobayashi, M. (2006). Cortistatins A, B, C, and D, anti-angiogenic steroidal alkaloids, from the marine sponge *Corticium simplex*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(10), 3148-3149. DOI: 10.1021/ja057404h.

(a) Aoki, S., Sanagawa, M., Watanabe, Y., Setiawan, A., Arai, M., & Kobayashi, M. (2007). Novel isomarabarican triterpenes, exhibiting selective anti-proliferative activity against vascular endothelial cells, from marine sponge *Rhabdastrella globostellata*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(14), 4818-4828. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.04.070.

(b) Aoki, S., Watanabe, Y., Tanabe, D., Arai, M., Suna, H., Miyamoto, K., ... & Kobayashi, M. (2007). Structure–activity relationship and biological property of cortistatins, anti-angiogenic spongean steroidal alkaloids. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(21), 6758-6762. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.08.017.

Arbiser, J. L., Klauber, N., Rohan, R., van Leeuwen, R., Huang, M. T., Fisher, C., ... & Byers, H. R. (1998). Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Molecular Medicine*, 4(6), 376-383.

Arroyo, A. G., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular research*, 86(2), 226-235. DOI: 10.1093/cvr/cvq049.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Rollinger, J. M. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.

Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G., & Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(3), 165. DOI:10.1038/nrm2639.

Bayless, K. J., & Johnson, G. A. (2011). Role of the cytoskeleton in formation and maintenance of angiogenic sprouts. *Journal of vascular research*, 48(5), 369-385. DOI: 10.1159/000324751.

- Bayliss, P. E., Bellavance, K. L., Whitehead, G. G., Abrams, J. M., Aegerter, S., Robbins, H. S., ... & Roberts, T. M. (2006). Chemical modulation of receptor signaling inhibits regenerative angiogenesis in adult zebrafish. *Nature chemical biology*, 2(5), 265. DOI: 10.1038/nchembio778.
- Bellou, S., Pentheroudakis, G., Murphy, C., & Fotsis, T. (2013). Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. *Cancer letters*, 338(2), 219-228. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.05.015.
- Bergers, G., & Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 592. DOI: 10.1038/nrc2442.
- Berndt, S., Issa, M. E., Carpentier, G., & Cuendet, M. (2018). A Bivalent Role of Genistein in Sprouting Angiogenesis. *Planta medica*, 84(09/10), 653-661. DOI: 10.1055/a-0587-5991.
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C. & Séjalon-Delmas, N. (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology*, 148(1), 402-413. DOI: 10.1104/pp.108.121400.
- Bhise, N. S., Shmueli, R. B., Sunshine, J. C., Tzeng, S. Y., & Green, J. J. (2011). Drug delivery strategies for therapeutic angiogenesis and antiangiogenesis. *Expert opinion on drug delivery*, 8(4), 485-504. DOI: 10.1517/17425247.2011.558082.
- Bijman, M. N., van Nieuw Amerongen, G. P., Laurens, N., van Hinsbergh, V. W., & Boven, E. (2006). Microtubule-targeting agents inhibit angiogenesis at subtoxic concentrations, a process associated with inhibition of Rac1 and Cdc42 activity and changes in the endothelial cytoskeleton. *Molecular cancer therapeutics*, 5(9), 2348-2357. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0242.
- Birnie, G. D. (1988). The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *The British journal of cancer. Supplement*, 9, 41. PMID: PMC2149104.
- Blanco, R., & Gerhardt, H. (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(1), a006569. DOI: 10.1101/cshperspect.a006569.
- Blaskovich, M. A. (2016). Unusual amino acids in medicinal chemistry. *Journal of medicinal chemistry*, 59(24), 10807-10836. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00319.

BIBLIOGRAFÍA

Braren, R., Hu, H., Kim, Y. H., Beggs, H. E., Reichardt, L. F., & Wang, R. (2006). Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. *J Cell Biol*, 172(1), 151-162. DOI: 10.1083/jcb.200506184.

Bocci, G., Di Paolo, A., & Danesi, R. (2013). The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis*, 16(3), 481-492. DOI: 10.1007/s10456-013-9334-0.

Brakenhielm, E., Cao, R., & Cao, Y. (2001). Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *The FASEB Journal*, 15(10), 1798-1800. DOI: 10.1096/fj.01-0028fje.

Bubb, M. R., Spector, I., Bershadsky, A. D., & Korn, E. D. (1995). Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 270(8), 3463-3466.

Buckley, C. D., Pilling, D., Henriquez, N. V., Parsonage, G., Threlfall, K., Scheel-Toellner, D., ... & Salmon, M. (1999). RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature*, 397(6719), 534. DOI: 10.1038/17409.

Burton, M., & Rao H. S. (1932). Report on the shallow-water marine sponges in the collection of the Indian Museum. Part I. *Records of the Indian Museum*, 34, 299–358.

Cárdenas, C., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2004). Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(2), 402-408. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.05.183.

Cárdenas, C., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2006). Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), 3083-3089. DOI: 10.1007/s00018-006-6399-6.

Cárdenas, C., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2011). Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PloS one*, 6(8), e23407. DOI: 10.1371/journal.pone.0023407.

Cardillo, G., Gentilucci, L., & Tolomelli, A. (2006). Unusual amino acids: synthesis and introduction into naturally occurring peptides and biologically active analogues. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 6(3), 293-304. DOI: 10.2174/138955706776073394.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6), 653. DOI: DOI: 10.1038/nm0603-653.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932. DOI: 10.1038/nature04478.

Carmely, S., & Kashman, Y. (1985). Structure of swinholide-A, a new macrolide from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron letters*, 26(4): 511-514. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)61925-1.

Carrillo, P., Martínez-Poveda, B., Cheng-Sánchez, I., Guerra, J., Tobia, C., López-Romero, J.M., ... & Quesada, A. R. (2019). Exploring the Antiangiogenic Potential of Solomonamide A Bioactive Precursors: In Vitro and in Vivo Evidences of the Inhibitory Activity of Solo F-OH During Angiogenesis. *Marine Drugs*, 17(4), 228. DOI: 10.3390/md17040228.

Case, L. B., & Waterman, C. M. (2015). Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nature Cell Biology*, 17(8),955-963. DOI:10.1038/ncb3191.

Castellot, J. J., Karnovsky, M. J., & Spiegelman, B. M. (1980). Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(10), 6007-6011. DOI: 10.1073/pnas.77.10.6007.

Castro, M. E., González-Iriarte, M., Barrero, A. F., Salvador-Tormo, N., Muñoz-Chápuli, R., Medina, M. Á., & Quesada, A. R. (2004). Study of puupehenone and related compounds as inhibitors of angiogenesis. *International journal of cancer*, 110(1), 31-38. DOI: 10.1002/ijc.20068.

Cao, W., Hu, C., Wu, L., Xu, L., & Jiang, W. (2016). Rosmarinic acid inhibits inflammation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by suppression of NF- κ B signaling in H22 tumor-bearing mice. *Journal of pharmacological sciences*, 132(2), 131-137. DOI: 10.1016/j.jphs.2016.09.003.

Cesari, I. M., Carvalho, E., Figueiredo Rodrigues, M., Mendonça, B. D. S., Amêdo, N. D., & Rumjanek, F. D. (2014). Methyl jasmonate: putative mechanisms of action on cancer cells cycle, metabolism, and apoptosis. *International journal of cell biology*, 2014:572097. DOI: 10.1155/2014/572097.

Chaqour, J., Lee, S., Ravichandra, A., & Chaqour, B. (2018). Abscisic acid—an anti-angiogenic phytohormone that modulates the phenotypical plasticity of endothelial cells and macrophages. *Journal of Cell Science*, 131(3), jcs210492. DOI: 10.1242/jcs.210492.

Chavakis, E., & Dimmeler, S. (2002). Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(6), 887-893. DOI: 10.1161/01.ATV.0000017728.55907.A9.

BIBLIOGRAFÍA

Chen, H. C., Chan, P. C., Tang, M. J., Cheng, C. H., & Chang, T. J. (1998). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25777-25782. DOI: 10.1074/jbc.273.40.25777.

Chen, X., Zuckerman, S. T., & Kao, W. J. (2005). Intracellular protein phosphorylation in adherent U937 monocytes mediated by various culture conditions and fibronectin-derived surface ligands. *Biomaterials*, 26(8), 873-882. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.002.

Chen, T. (2008). Nuclear receptor drug discovery. *Current opinion in chemical biology*, 12(4), 418-426. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.07.00.

Chen, W., Xia, P., Wang, H., Tu, J., Liang, X., Zhang, X., & Li, L. (2019). The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis. *Journal of cell communication and signaling*, 1-11. DOI: 10.1007/s12079-019-00511-z.

Cheng, J., Shah, Y. M., & Gonzalez, F. J. (2012). Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 33(6), 323-330. DOI: 10.1016/j.tips.2012.03.003

Cheng-Sánchez, I., Carrillo, P., Sánchez-Ruiz, A., Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., Medina, M. A., ... & Sarabia, F. (2018). Exploring the Ring-Closing Metathesis for the Construction of the Solomonamide Macrocyclic Core: Identification of Bioactive Precursors. *The Journal of organic chemistry*, 83(10), 5365-5383. DOI: 10.1021/acs.joc.7b02988.

Crivellato, E. (2011). The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5), 365-375. DOI: 10.1387/ijdb.103214ec.

Croglio, M. P., Haake, J. M., Ryan, C. P., Wang, V. S., Lapier, J., Schlarbaum, J. P., ... & Agama, K. (2016). Analogs of the novel phytohormone, strigolactone, trigger apoptosis and synergize with PARP inhibitors by inducing DNA damage and inhibiting DNA repair. *Oncotarget*, 7(12), 13984 -14001. DOI: 10.18632/oncotarget.7414.

Cross, M. J., & Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in pharmacological sciences*, 22(4), 201-207. DOI: 10.1016/S0165-6147(00)01676-X.

Cross, M. J., Hodgkin, M. N., Roberts, S., Landgren, E., Wakelam, M. J., & Claesson-Welsh, L. (2000). Tyrosine 766 in the fibroblast growth factor receptor-1 is required for FGF-stimulation of phospholipase C, phospholipase D, phospholipase A (2), phosphoinositide

3-kinase and cytoskeletal reorganisation in porcine aortic endothelial cells. *J Cell Sci*, 113(4), 643-651.

Czirok, A., & Little, C. D. (2012). Pattern formation during vasculogenesis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 96(2), 153-162. DOI: 10.1002/bdrc.21010.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231-241. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80405-5.

Davis, G. E., & Senger, D. R. (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circulation Research*, 97(11), 1093-1107. DOI: 10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3.

Dejana, E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 98(9), 1949-1953. DOI: 10.1172/JCI118997.

De Leuw, P., & Stephan, C. (2018). Protease inhibitor therapy for hepatitis C virus-infection. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 19(6), 577-587. DOI: 10.1080/14656566.2018.1454428.

a. De Marino, S., Ummarino, R., D'Auria, M. V., Chini, M. G., Bifulco, G., Renga, B., ... & Zampella, A. (2011). Theonellasterols and conicasterols from *Theonella swinhoei*. Novel marine natural ligands for human nuclear receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 54(8), 3065-3075. DOI: 10.1021/jm200169t.

b. De Marino, S., Sepe, V., D'Auria, M. V., Bifulco, G., Renga, B., Petek, S., ... & Zampella, A. (2011). Towards new ligands of nuclear receptors. Discovery of malaitasterol A, an unique bis-secosterol from marine sponge *Theonella swinhoei*. *Organic & biomolecular chemistry*, 9(13), 4856-4862. DOI: 10.1039/c1ob05378g.

c. De Marino, S., Festa, C., D'Auria, M.V., Cresteil, T., Débitus, C., Zampella, A. (2011). Swinholide J, a potent cytotoxin from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Marine Drugs*, 9, 1133–1141, DOI:10.3390/md9061133.

De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 17(8), 457. DOI: 10.1038/nrc.2017.51.

de Sousa Mesquita, A. P., de Araújo Lopes, S., Pernambuco Filho, P. C. A., Nader, H. B., & Lopes, C. C. (2017). Acquisition of anoikis resistance promotes alterations in the Ras/ERK

BIBLIOGRAFÍA

and PI3K/Akt signaling pathways and matrix remodeling in endothelial cells. *Apoptosis*, 22(9), 1116-1137. DOI: 10.1007/s10495-017-1392-0.

DeWys, W. D., & Hall, T. C. (1973). Anti-tumor effect of the amino acid mimosine. *European Journal of Cancer* (1965), 9(4), 281-283. DOI: 10.1039/c1ob05378g.

Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., García-Suárez, M. P., Sáez, F. J., Gutiérrez, E., Valladares, F., ... & Madrid, J. F. (2017). Morphofunctional basis of the different types of angiogenesis and formation of postnatal angiogenesis-related secondary structures. *Histology and histopathology*, 32(12), 1239-1279. DOI: 10.14670/HH-11-923.

Domingues, I., Rino, J., Demmers, J. A., De Lanerolle, P., & Santos, S. C. R. (2011). VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PloS one*, 6(9), e25668. DOI: 10.1371/journal.pone.0025668.

Dorland, Y. L., & Huveneers, S. (2017). Cell–cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(2), 279-292. DOI: 10.1007/s00018-016-2325-8.

Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161-74. DOI: 10.1038/nrc745.

Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 617-625. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.08.010.

Eklund, L., Kangas, J., & Saharinen, P. (2017). Angiopoietin–Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. *Clinical Science*, 131(1), 87-103. DOI: 10.1042/CS20160129.

Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., Raymond, E. (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(9), 734-745. DOI: 10.1038/nrd2380.

Fallah, J., & Rini, B. I. (2019). HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development. *Current oncology reports*, 21(1), 6. DOI: 10.1007/s11912-019-0752-z.

Fan, T. P., Yeh, J. C., Leung, K. W., Yue, P. Y., & Wong, R. N. (2006). Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(6), 297-309. DOI: 10.1016/j.tips.2006.04.006.

- Farnoodian, M., Wang, S., Dietz, J., Nickells, R. W., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2017). Negative regulators of angiogenesis: important targets for treatment of exudative AMD. *Clinical Science*, 131(15), 1763-1780. DOI: 10.1042/CS20170066.
- Favaloro, E. J. (1993). Differential expression of surface antigens on activated endothelium. *Immunology and cell biology*, 71(6), 571-581. DOI:10.1038/icb.1993.63.
- Feher, M., & Schmidt, J. M. (2003). Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43(1), 218-227. DOI: 10.1021/ci0200467.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9(6), 669. DOI: 10.1038/nm0603-669.
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(6), 789-791. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.179663.
- Festa, C., De Marino, S., Sepe, V., Monti, M., Luciano, P.; D'Auria, M.V., ... & Zampella, A. (2009). Perthamides C and D, two new potent anti-inflammatory cyclopeptides from a Solomon Lithistid sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron*, 65(50), 10424-10429. DOI: 10.1016/j.tet.2009.10.026
- Festa, C., De Marino, S., D'Auria, M. V., Bifulco, G., Renga, B., Fiorucci, S., ... & Zampella, A. (2010). Solomonsterols A and B from *Theonella swinhoei*. The first example of C-24 and C-23 sulfated sterols from a marine source endowed with a PXR agonistic activity. *Journal of medicinal chemistry*, 54(1), 401-405. DOI: 10.1021/jm100968b.
- Festa, C., De Marino, S., Sepe, V., D'Auria, M. V., Bifulco, G., Débitus, C., ... & Zampella, A. (2011). Solomonamides A and B, new anti-inflammatory peptides from *Theonella swinhoei*. *Organic letters*, 13(6), 1532-1535. DOI: 10.1021/ol200221n.
- Festa, C., De Marino, S., D'Auria, M.V., Monti, M., Bucci, M., Velleco, V., ... & Zampella, A. (2012). Anti-inflammatory cyclopeptides from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron*, 68(13), 2851-2857. DOI: 10.1016/j.tet.2012.01.097.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453. DOI: 10.1038/nrc1098.
- Fogli, S., Del Re, M., Rofi, E., Posarelli, C., Figus, M., & Danesi, R. (2018). Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. *Eye*, 32(6), 1010. DOI: 10.1038/s41433-018-0021-7.

BIBLIOGRAFÍA

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182-1186. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108.

Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L. (1995). Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376, 66-70. DOI: 10.1038/376066a0.

Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R., & Schweigerer, L. (1993). Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 2690-2694. DOI: 10.1073/pnas.90.7.2690.

Frame, M. C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D., & Eck, M. J. (2010). The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(11), 802-814. DOI: 10.1038/nrm2996.

Friedl, P., & Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 129-135. DOI: 10.1007/s10555-008-9174-3.

Fujita, M., Nakao, Y., Matsunaga, S., Seiki, M., Itoh, Y., Yamashita, J., ... & Fusetani, N. (2003). Ageladine A: An Antiangiogenic Matrixmetalloproteinase Inhibitor from the Marine Sponge *Agelas nakamurai*. *Journal of the American Chemical Society*, 125(51), 15700-15701. DOI: 10.1021/ja038025w.

Furth, E. E., Sprecher, H., Fisher, E. A., Fleishman, H. D., & Laposata, M. (1992). An in vitro model for essential fatty acid deficiency: HepG2 cells permanently maintained in lipid-free medium. *Journal of lipid research*, 33(11), 1719-1726.

García-Caballero, M., Marí-Beffa, M., Medina, M. A., & Quesada, A. R. (2011). Dimethylfumarate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo: a possible role for its antipsoriatic effect?. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(6), 1347-1355. DOI: 10.1038/jid.2010.416.

García-Caballero, M., Marí-Beffa, M., Cañedo, L., Medina, M. Á., & Quesada, A. R. (2013). Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angiosuppressor that interferes the Akt pathway. *Biochemical pharmacology*, 85(12), 1727-1740. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.04.007.

García-Caballero, M., Cañedo, L., Fernández-Medarde, A., Medina, M.Á., Quesada, A.R. (2014). The marine fungal metabolite, AD0157, inhibits angiogenesis by targeting the Akt signaling pathway. *Marine Drugs*, 12(1), 279-299. DOI:10.3390/md12010279.

García-Caballero, M., Quesada, A. R., Medina, M. A., & Mari-Beffa, M. (2018). Fishing anti (lymph) angiogenic drugs with zebrafish. *Drug discovery today*, 23(2), 366-374. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.10.018.

García-Vilas, J. A., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2013). 4-methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(17), 4063-4071. DOI: 10.1021/jf303062h.

García-Vilas, J., Martínez-Poveda, B., Quesada, A., & Medina, M. (2016). Aeroplysinin-1, a sponge-derived multi-targeted bioactive marine drug. *Marine drugs*, 14(1), 1. DOI: 10.3390/md14010001.

(a) García-Vilas, J. A., Pino-Ángeles, A., Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., & Medina, M. Á. (2017). The noni anthraquinone damnacanthal is a multi-kinase inhibitor with potent anti-angiogenic effects. *Cancer letters*, 385, 1-11. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.10.037.

(b) García-Vilas, J. A., Quesada, A. R., & Medina, M. Á. (2017). Hydroxytyrosol targets extracellular matrix remodeling by endothelial cells and inhibits both ex vivo and in vivo angiogenesis. *Food chemistry*, 221, 1741-1746. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.111.

García-Vilas, J., Martínez-Poveda, B., Quesada, A., & Medina, M. (2018). (+)-Aeroplysinin-1 Modulates the Redox Balance of Endothelial Cells. *Marine drugs*, 16(9), 316. DOI: 10.3390/md16090316.

Gemberling, M., Bailey, T. J., Hyde, D. R., & Poss, K. D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*, 29(11), 611-620. DOI: 10.1016/j.tig.2013.07.003.

Giannotta, M., Trani, M., & Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental cell*, 26(5), 441-454. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.08.020.

Gilmore, A. P., & Romer, L. H. (1996). Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Molecular biology of the cell*, 7(8), 1209-1224.

Goldman, C. K., Kendall, R. L. & Cabrera, G. (1998). Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, mortality rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 95(15), 8795-8800. DOI: 10.1073/pnas.95.15.8795.

BIBLIOGRAFÍA

Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., ... & Bouwmeester, H. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, *455*(7210), 189. DOI: 10.1038/nature07271.

Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., & Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, *87*(17), 6624-6628. DOI: 10.1073/pnas.87.17.6624.

Goodwin, A. M. (2007). In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular research*, *74*(2-3), 172-183. DOI: 10.1016/j.mvr.2007.05.006.

Gospodarowicz, D., Moran, J., Braun, D., & Birdwell, C. R. (1976). Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: fibroblast growth factor as a survival agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *73*(11), 4120-4124.

Graat, H. C. A., Witlox, M. A., Schagen, F. H. E., Kaspers, G. J. L., Helder, M. N., Bras, J., ... & Van Beusechem, V. W. (2006). Different susceptibility of osteosarcoma cell lines and primary cells to treatment with oncolytic adenovirus and doxorubicin or cisplatin. *British journal of cancer*, *94*(12), 1837. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603189.

Grant, M. A., & Kallur, R. (2005). Structural basis for the functions of endogenous angiogenesis inhibitors. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, *70*, 399-417. Cold Spring Harbor Laboratory Press. DOI: 10.1101/sqb.2005.70.017.

Gratzinger, D., Barreuther, M., & Madri, J. A. (2003). Platelet–endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial migration through its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Biochemical and biophysical research communications*, *301*(1), 243-249. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)02982-0.

Gray, J. E. (1868). Note on Theonella, a new genus of coralloid sponges from Formosa. In *Proceedings of the Zoological Society of London*, *37*, 565.

Guo, N. H., Krutzsch, H. C., Inman, J. K., & Roberts, D. D. (1997). Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer research*, *57*(9), 1735-1742.

Guo, J. K., Chiang, C. Y., Lu, M. C., Chang, W. B., & Su, J. H. (2012). 4-Methylenesterols from a Sponge *Theonella swinhoei*. *Marine drugs*, *10*(7), 1536-1544. DOI: 10.3390/md10071536.

Gururaj, A. E., Belakavadi, M., Venkatesh, D. A., Marmé, D., & Salimath, B. P. (2002). Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochemical and biophysical research communications*, 297(4), 934-942. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)02306-9.

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*, 86(3), 353-364. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Handsley, M. M., & Edwards, D. R. (2005). Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International journal of cancer*, 115(6), 849-860. DOI: 10.1002/ijc.20945.

Harris, E. S., & Nelson, W. J. (2010). VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 651-658. DOI:10.1016/j.ceb.2010.07.006.

Hasan, M. N., Razvi, S. S., Kuerban, A., Balamash, K. S., Al-Bishri, W. M., Abulnaja, K. O., ... & Kumosani, T. A. (2018). Strigolactones—a novel class of phytohormones as anti-cancer agents. *Journal of pesticide science*, 43(3), 168-172. DOI: 10.1584/jpestics.D17-090.

Heo, S. H., Choi, Y. J., Ryoo, H. M., & Cho, J. Y. (2010). Expression profiling of ETS and MMP factors in VEGF-activated endothelial cells: role of MMP-10 in VEGF-induced angiogenesis. *Journal of cellular physiology*, 224(3), 734-742. DOI: 10.1002/jcp.22175.

Huang, S. S., & Zheng, R. L. (2006). Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer letters*, 239(2), 271-280. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.08.025.

Huang, H., Xu, Y., Zhu, J., & Li, J. (2014). Recent advances in non-steroidal FXR antagonists development for therapeutic applications. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(19), 2175-2187. DOI: 10.2174/1568026614666141112101840.

Huang, T., Sun, L., Yuan, X., & Qiu, H. (2017). Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget*, 8(48), 84546-84558. DOI: 10.18632/oncotarget.19165.

Huang, Y., & Liu, T. (2018). Therapeutic applications of genetic code expansion. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), 150-158. DOI: 10.1016/j.synbio.2018.09.003.

BIBLIOGRAFÍA

Hubbard, B. K., Thomas, M. G., & Walsh, C. T. (2000). Biosynthesis of Lp-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics. *Chemistry & biology*, 7(12), 931-942. DOI: 10.1016/S1074-5521(00)00043-0.

Igura, K., Ohta, T., Kuroda, Y., & Kaji, K. (2001). Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer letters*, 171(1), 11-16. DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00443-8.

Imamura, T. (2014). Physiological functions and underlying mechanisms of fibroblast growth factor (FGF) family members: recent findings and implications for their pharmacological application. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(7), 1081-1089. DOI: 10.1248/bpb.b14-00265.

Iruela-Arispe, M. L., Bornstein, P., & Sage, H. (1991). Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 5026-5030. DOI: 10.1073/pnas.88.11.5026.

Iruela-Arispe, M. L. & Davis, G. E. Cellular and Molecular Mechanisms of Vascular Lumen Formation. *Developmental Cell*, 16, 222–231 (2009). DOI: 10.1016/j.devcel.2009.01.013.

Jachak, G. R., Athawale, P. R., Agarwal, H., Barthwal, M. K., Lauro, G., Bifulco, G., & Reddy, D. S. (2018). Total synthesis of the potent anti-inflammatory natural product solomonamide A along with structural revision and biological activity evaluation. *Organic & biomolecular chemistry*, 16(47), 9138-9142. DOI: 10.1039/c8ob02713g.

Jean, C., Chen, X. L., Nam, J. O., Tancioni, I., Uryu, S., Lawson, C., ... & Turowski, P. (2014). Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol*, 204(2), 247-263. DOI: 10.1083/jcb.201307067.

Jensen, L., & Cao, Y. (2017). Angiogenesis: General Concepts. In *Angiogenesis-Based Dermatology* (pp. 1-26). Springer, London. DOI:10.1007/978-1-4471-7314-4_1.

Jeong, S. J., Inagaki, M., Higuchi, R., Miyamoto, T., Ono, M., Kuwano, M., & Van Soest, R. W. (2003). 1, 3-Dimethylisoguaninium, an antiangiogenic purine analog from the sponge *Amphimedon paraviridis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 51(6), 731-733. DOI: 10.1248/cpb.51.731.

Jung, J. E., Kim, H. S., Lee, C. S., Park, D. H., Kim, Y. N., Lee, M. J., ... & Chung, M. H. (2007). Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 28(8), 1780-1787. DOI: 10.1093/carcin/bgm130.

- Kamath, K., Smiyun, G., Wilson, L. & Jordan, M. A. Mechanisms of inhibition of endothelial cell migration by taxanes. *Cytoskeleton*, *71*, 46–60 (2014). DOI:10.1002/cm.21153.
- Kanjoormana, M., & Kuttan, G. (2010). Antiangiogenic activity of ursolic acid. *Integrative Cancer Therapies*, *9*(2), 224-235. DOI: 10.1177/1534735410367647.
- Karar, J., & Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*, *4*, 51. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00051.
- Kashinath, K., Vasudevan, N., & Reddy, D. S. (2012). Studies toward the Synthesis of Potent Anti-inflammatory Peptides Solomonamides A and B: Synthesis of a Macrocyclic Skeleton and Key Fragment 4-Amino-6-(2'-amino-4'-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-2-methyl-6-oxohexanoic Acid (AHMOA). *Organic letters*, *14*(24), 6222-6225. DOI: 10.1021/ol303149k.
- Kashinath, K., Jachak, G. R., Athawale, P. R., Marelli, U. K., Gonnade, R. G., & Reddy, D. S. (2016). Total synthesis of the marine natural product solomonamide B necessitates stereochemical revision. *Organic letters*, *18*(13), 3178-3181. DOI: 10.1021/acs.orglett.6b01395.
- Kasperkiewicz, P., Gajda, A. D., & Drag, M. (2012). Current and prospective applications of non-proteinogenic amino acids in profiling of proteases substrate specificity. *Biological Chemistry*, *393*(9), 843-51. DOI: 10.1515/hsz-2012-0167.
- Kavitha, N., & Chandrasekhar, S. (2015). Scalable synthesis of the unusual amino acid segment (ADMOA unit) of marine anti-inflammatory peptide: solomonamide A. *Organic & biomolecular chemistry*, *13*(22), 6242-6248. DOI:10.1039/c5ob00481k.
- Kayashima, T., & Matsubara, K. (2012). Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *76*(1), 115-9. DOI: 10.1271/bbb.110584.
- Kendall, R. L., & Thomas, K. A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, *90*(22), 10705-10709. DOI: 10.1073/pnas.90.22.10705.
- Khan, A. Q., Kuttikrishnan, S., Siveen, K. S., Prabhu, K. S., Shanmugakonar, M., Al-Naemi, H. A., ... & Uddin, S. (2018). RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies. In *Seminars in cancer biology*, *4*, 1-13. DOI 10.1016/j.semcancer.2018.03.001.

BIBLIOGRAFÍA

Kibbey, M. C. (1994). Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *Journal of tissue culture methods*, 16(3-4), 227-230.

Kim, D., & Chung, J. (2002). Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35(1), 106-115. DOI: 10.5483/BMBRep.2002.35.1.106 .

(a) Kim, J. H., Lee, B. J., Kim, J. H., Yu, Y. S., & Kim, K. W. (2009). Anti-angiogenic effect of caffeic acid on retinal neovascularization. *Vascular pharmacology*, 51(4), 262-267. DOI: 10.1016/j.vph.2009.06.010.

(b) Kim, J. H., Lee, B. J., Yu, Y. S., Kim, M. Y., & Kim, K. W. (2009). Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21 (WAF1) expression. *European journal of pharmacology*, 615(1-3), 150-154. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.05.015.

Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006502. DOI: 10.1101/cshperspect.a006502.

Kojima-Yuasa, A., Hua, J. J., Kennedy, D. O., & Matsui-Yuasa, I. (2003). Green tea extract inhibits angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells through reduction of expression of VEGF receptors. *Life sciences*, 73(10), 1299-1313. DOI: 10.1016/S0024-3205(03)00424-7.

Kong, D., Yamori, T., Kobayashi, M., & Duan, H. (2011). Antiproliferative and antiangiogenic activities of smenospongine, a marine sponge sesquiterpene aminoquinone. *Marine drugs*, 9(2), 154-161. DOI: 10.3390/md9020154.

Kotoku, N., Hiramatsu, A., Tsujita, H., Hirakawa, Y., Sanagawa, M., Aoki, S., & Kobayashi, M. (2008). Structure-Activity Relationships Study of Bastadin 6, an Anti-Angiogenic Brominated-Tyrosine Derived Metabolite from Marine Sponge. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 341(9), 568-577. DOI: 10.1002/ardp.200700231.

Kotoku, N., Arai, M., & Kobayashi, M. (2016). Search for anti-angiogenic substances from natural sources. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64(2), 128-134. DOI: 10.1248/cpb.c15-00744.

Koulman, A., Proksch, P., Ebel, R., Beekman, A. C., van Uden, W., Konings, A. W., ... & Woerdenbag, H. J. (1996). Cytotoxicity and mode of action of aeropylsinin-1 and a related

dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of natural products*, 59(6), 591-594. DOI: 10.1021/np960167z.

Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R. & Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of Cell Biology*, 107(4), 1589–1598. PMID: PMC2115245.

Lai, H. C., Chao, W. T., Chen, Y. T., & Yang, V. C. (2004). Effect of EGCG, a major component of green tea, on the expression of Ets-1, c-Fos, and c-Jun during angiogenesis in vitro. *Cancer letters*, 213(2), 181-188. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.04.031.

Lambeng, N., Wallez, Y., Rampon, C., Cand, F., Christé, G., Gulino-Debrac, D., ... & Huber, P. (2005). Vascular endothelial–cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circulation research*, 96(3), 384-391. DOI: 10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f.

Lamberth, C. (2016). Naturally occurring amino acid derivatives with herbicidal, fungicidal or insecticidal activity. *Amino Acids*, 48(4), 929-940. DOI: 10.1007/s00726-016-2176-5.

Larsson, H., Klint, P., Landgren, E., & Claesson-Welsh, L. (1999). Fibroblast growth factor receptor-1-mediated endothelial cell proliferation is dependent on the Src homology (SH) 2/SH3 domain-containing adaptor protein Crk. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25726-25734.

Lavie, G., Mandel, M., Hazan, S., Barliya, T., Blank, M., Grunbaum, A., ... & Solomon, A. (2005). Anti-angiogenic activities of hypericin in vivo: potential for ophthalmologic applications. *Angiogenesis*, 8(1), 35-42. DOI: 10.1007/s10456-005-3828-3.

Latham, P. W. (1999). Therapeutic peptides revisited. *Nature biotechnology*, 17(8), 755. DOI: 10.1038/11686.

Lawler, P. R., & Lawler, J. (2012). Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and-2. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(5), a006627. DOI: 10.1101/cshperspect.a006627.

Lawson, N. D., & Weinstein, B. M. (2002). In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Developmental biology*, 248(2), 307-318. DOI: 10.1006/dbio.2002.0711.

Lee, H., Park, D., & Yoon, M. (2013). Korean red ginseng (*Panax ginseng*) prevents obesity by inhibiting angiogenesis in high fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Food and chemical toxicology*, 53, 402-408. DOI: 10.1016/j.fct.2012.11.052.

BIBLIOGRAFÍA

Lee, B. Y., Timpson, P., Horvath, L. G., & Daly, R. J. (2015). FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, *146*, 132-149. DOI:10.1016/j.pharmthera.2014.10.001.

Lee, J. W., Ko, J., Ju, C., & Eltzschig, H. K. (2019). Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine*, *51*(6), 68. DOI: 10.1038/s12276-019-0235-1.

Letamendia, A., Quevedo, C., Ibarbia, I., Virto, J. M., Holgado, O., Diez, M., ... & Callol-Massot, C. (2012). Development and validation of an automated high-throughput system for zebrafish in vivo screenings. *PloS one*, *7*(5), e36690. DOI: 10.1371/journal.pone.0036690.

Li, W., Wang, H., Kuang, C. Y., Zhu, J. K., Yu, Y., Qin, Z. X., ... & Huang, L. (2012). An essential role for the Id1/PI3K/Akt/NFkB/survivin signalling pathway in promoting the proliferation of endothelial progenitor cells in vitro. *Molecular and cellular biochemistry*, *363*(1-2), 135-145. DOI: 10.1007/s11010-011-1166-x.

Li, J., Tang, H., Kurtán, T., Mándi, A., Zhuang, C. L., Su, L., ... & Zhang, W. (2018). Swinhoeisterols from the South China Sea Sponge *Theonella swinhoei*. *Journal of natural products*, *81*(7), 1645-1650. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00281.

Lim, S. C., & Tan, K. S. (2016). Description of a new species of sponge encrusting on a sessile gastropod in the Singapore Strait. *Raffles Bulletin of Zoology*, *34*, 97–103.

Lin, M. T., Yen, M. L., Lin, C. Y., & Kuo, M. L. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Molecular pharmacology*, *64*(5), 1029-1036. DOI: 10.1124/mol.64.5.1029.

Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., & Alitalo, K. (2009). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current opinion in cell biology*, *21*(2), 154-165. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.12.012.

López-Jiménez, A., García-Caballero, M., Medina, M. Á., & Quesada, A. R. (2013). Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *European journal of nutrition*, *52*(1), 85-95. DOI: 10.1007/s00394-011-0289-x.

Lu, K., Bhat, M., & Basu, S. (2016). Plants and their active compounds: natural molecules to target angiogenesis. *Angiogenesis*, *19*(3), 287-295. DOI: 10.1007/s10456-016-9512-y.

Lu, H., Zhou, X., Kwok, H. H., Dong, M., Liu, Z., Poon, P. Y., ... & Ngok-Shun Wong, R. (2017). Ginsenoside-Rb1-Mediated Anti-angiogenesis via Regulating PEDF and miR-33a through

the Activation of PPAR- γ Pathway. *Frontiers in pharmacology*, 8, 783. DOI: 10.3389/fphar.2017.00783.

Lyu, P. C., Sherman, J. C., Chen, A., & Kallenbach, N. R. (1991). Alpha-helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5317-5320. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5317.

Maffucci, T., Raimondi, C., Abu-Hayyeh, S., Dominguez, V., Sala, G., Zachary, I., & Falasca, M. (2009). A phosphoinositide 3-kinase/phospholipase C γ 1 pathway regulates fibroblast growth factor-induced capillary tube formation. *PLoS one*, 4(12), e8285. DOI: 10.1371/journal.pone.0008285.

Maj, E., Papiernik, D., & Wietrzyk, J. (2016). Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity. *International journal of oncology*, 49(5), 1773-1784. DOI: 10.3892/ijo.2016.3709.

Malíková, J., Swaczynová, J., Kolář, Z., & Strnad, M. (2008). Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*, 69(2), 418-426. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.07.028.

(b) Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2005). Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. *European journal of pharmacology*, 516(2), 97-103. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.03.047.

(a) Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2005). Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *International journal of cancer*, 117(5), 775-780. DOI: 10.1002/ijc.21246.

Martínez-Poveda, B., García-Vilas, J. A., Cardenas, C., Melgarejo, E., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2013). The brominated compound aerophysinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. *PLoS one*, 8(1), e55203. DOI: 10.1371/journal.pone.0055203.

Martínez-Poveda, B., Quesada, A., & Medina, M. A. (2017). Pleiotropic role of puerpehenones in biomedical research. *Marine drugs*, 15(10), 325. DOI: 10.3390/md15100325.

Matsunaga, S., Nishimura, S., & Fusetani, N. (2001). Two New Antimicrobial Lysoplasmalyngositolins from the Marine Sponge *Theonella s. winhoei*. *Journal of natural products*, 64(6), 816-818. Doi: 10.1021/np0100439.

BIBLIOGRAFÍA

Mavria, G., Vercoulen, Y., Yeo, M., Paterson, H., Karasarides, M., Marais, R., ... & Marshall, C. J. (2006). ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer cell*, *9*(1), 33-44. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.12.021.

Mayzlish-Gati, E., Laufer, D., Grivas, C. F., Shaknof, J., Sananes, A., Bier, A., ... & Levi, O. (2015). Strigolactone analogs act as new anti-cancer agents in inhibition of breast cancer in xenograft model. *Cancer biology & therapy*, *16*(11), 1682-1688. DOI: 10.1080/15384047.2015.1070982.

McColl, B. K., Baldwin, M. E., Roufail, S., Freeman, C., Moritz, R. L., Simpson, R. J., ... & Achen, M. G. (2003). Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(6), 863-868. DOI: 10.1084/jem.20030361.

Medina, M. Á., Muñoz-Chápuli, R., & Quesada, A. R. (2009). Receptores del VEGF y angiogénesis. En Alba, E. y Quesada, A. R. (Ed.). (2009). *Angiogénesis y Cáncer. TACTICS MD, S.L.* ISBN: 978-84-691-5241-6.

Mehbub, M., Lei, J., Franco, C., & Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine drugs*, *12*(8), 4539-4577. DOI: 10.3390/md12084539.

Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*, *17*(3), 499-509. DOI: 10.1007/s10456-014-9428-3.

Modi, A., Tassi, F., Susca, R. R., Vai, S., Rizzi, E., De Bellis, G., ... & Caramelli, D. (2017). Complete mitochondrial sequences from Mesolithic Sardinia. *Scientific reports*, *7*, 42869. DOI: 10.1038/srep42869.

Modi, S., Yaluri, N., & Kokkola, T. (2018). Strigolactone GR24 and pinosylvin attenuate adipogenesis and inflammation of white adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, *499*(2), 164-169. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.095.

Modi, S. R., & Kokkola, T. (2018). Strigolactone GR24 upregulates target genes of the cytoprotective transcription factor Nrf2 in skeletal muscle. *F1000Research*, *7*. DOI: 10.12688/f1000research.16172.2.

Monboisse, J. C., Oudart, J. B., Ramont, L., Brassart-Pasco, S., & Maquart, F. X. (2014). Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1840*(8), 2589-2598. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.12.029.

Moreno-Jiménez, I., Hulsart-Billstrom, G., Lanham, S. A., Janeczek, A. A., Kontouli, N., Kanczler, J. M., ... & Oreffo, R. O. (2016). The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering. *Scientific reports*, 6, 32168. DOI: 10.1038/srep32168.

Muñoz-Chápuli, R., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2004). Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(17), 2224-2243. DOI: 10.1007/s00018-004-4070-7.

Muñoz-Chápuli, R. (2009). Regulación molecular de la angiogénesis. En Alba, E. y Quesada, A. R. (Ed.). (2009). *Angiogénesis y Cáncer. TACTICS MD, S.L.* ISBN: 978-84-691-5241-6.

Muñoz-Chápuli, R. (2011). Evolution of angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5), 345-351. DOI: 10.1387/ijdb.103212r.

Murakami, M., Effenbein, A., & Simons, M. (2007). Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis. *Cardiovascular research*, 78(2), 223-231. DOI:10.1093/cvr/cvm086.

Nakao, Y., Matsunaga, S., & Fusetani, N. (1995). Three more cyclotheonamides, C, D, and E, potent thrombin inhibitors from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 3(8), 1115-1122. DOI: 10.1016/0968-0896(95)00106-Q.

Nakao, Y., Yoshida, S., Matsunaga, S., Shindoh, N., Terada, Y., Nagai, K., ... & Fusetani, N. (2006). Azumamides A–E: Histone deacetylase inhibitory cyclic tetrapeptides from the marine sponge *Mycale izuensis*. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(45), 7553-7557. DOI: 10.1002/anie.200602047.

Nakao, Y., Narazaki, G., Hoshino, T., Maeda, S., Yoshida, M., Maejima, H., & Yamashita, J. K. (2008). Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(9), 2982-2984. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.03.053.

Neve, A., Cantatore, F. P., Maruotti, N., Corrado, A., & Ribatti, D. (2014). Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *BioMed research international*, 2014. DOI: 10.1155/2014/756078.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.

BIBLIOGRAFÍA

Nguyen, M., Arkell, J., & Jackson, C. J. (2001). Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 33(10), 960-970. DOI: 10.1016/S1357-2725(01)00007-3.

Nicoli, S., De Sena, G. & Presta, M. (2009). Fibroblast growth factor 2-induced angiogenesis in zebrafish: The zebrafish yolk membrane (ZFYM) angiogenesis assay. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, 2061–2068. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00432.x.

Nokihara, K., Hirata, A., Sogon, T., & Ohyama, T. (2012). Preparative scale isolation, purification and derivatization of mimosine, a non-proteinogenic amino acid. *Amino acids*, 43(1), 475-482. DOI: 10.1007/s00726-011-1104-y.

Nyberg, P., Xie, L., & Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer research*, 65(10), 3967-3979. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2427.

Oda, N., Abe, M., & Sato, Y. (1999). ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin $\beta 3$. *Journal of cellular physiology*, 178(2), 121-132. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199902)178:2<121::AID-JCP1>3.0.CO;2-F.

Ohizumi, I., Tanemura, M., & Kaihoh, S. (1995). A novel styryl diphenylamine derivative reverts the transformed phenotype of human fibrosarcoma HT1080 cells. *British journal of cancer*, 72(5), 1219. DOI: 10.1038/bjc.1995.489.

Oikawa, T.; Shimamura, M.; Ashing, H.; Nakamura, O.; Kanayasu, T.; Morita, I.; Murota, S.I. (1992). Inhibition of angiogenesis by staurosporine, a potent protein kinase inhibitor. *The Journal of Antibiotics*, 45(7), 1155–1160. DOI: 10.7164/antibiotics.45.1155.

Okada, H., Takemura, G., Suzuki, K., Oda, K., Takada, C., Hotta, Y., ... & Zaikokuji, R. (2017). Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions. *Critical Care*, 21(1), 261. DOI: 10.1186/s13054-017-1841-8.

Oraiopoulou, M. E., Tzamali, E., Tzedakis, G., Vakis, A., Papamatheakis, J., & Sakkalis, V. (2017). In vitro/in silico study on the role of doubling time heterogeneity among primary glioblastoma cell lines. *BioMed research international*, 2017. DOI: 10.1155/2017/8569328.

O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., ... & Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *cell*, 88(2), 277-285. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81848-6.

Oxford, J. S., Coates, A. R. M., Sia, D. Y., Brown, K., & Asad, S. (1989). Potential target sites for antiviral inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 23(suppl_A), 9-27.

Pandya-Kumar, N., Shema, R., Kumar, M., Mayzlish-Gati, E., Levy, D., Zemach, H., ... & Koltai, H. (2014). Strigolactone analog GR24 triggers changes in PIN2 polarity, vesicle trafficking and actin filament architecture. *New Phytologist*, 202(4), 1184-1196. DOI:10.1111/nph.12744.

Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(5), C947-C970. DOI: 10.1152/ajpcell.00389.2001.

Park, S., Kim, J. H., Kim, J. E., Song, G. Y., Zhou, W., Goh, S. H., ... & Oh, S. (2016). Cytotoxic activity of aeropylsinin-1 against colon cancer cells by promoting β -catenin degradation. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 66-72. DOI: 10.1016/j.fct.2016.04.019.

Patick, A. K., & Potts, K. E. (1998). Protease inhibitors as antiviral agents. *Clinical microbiology reviews*, 11(4), 614-627. DOI: 10.1128/CMR.11.4.614

Peach, C., Mignone, V., Arruda, M., Alcobia, D., Hill, S., Kilpatrick, L., & Woolard, J. (2018). Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at VEGFR2. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1264. DOI: 10.3390/ijms19041264.

Peng, X., Ueda, H., Zhou, H., Stokol, T., Shen, T. L., Alcaraz, A., ... & Guan, J. L. (2004). Overexpression of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells promotes angiogenesis in transgenic mice. *Cardiovascular research*, 64(3), 421-430. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.07.012.

Perdicaris, S., Vlachogianni, T., & Valavanidis, A. (2013). Bioactive natural substances from marine sponges: New developments and prospects for future pharmaceuticals. *Nat. Prod. Chem. Res*, 1(3), 2329-6836. DOI: 10.4172/2329-6836.1000115.

Philip, S., & Kundu, G. C. (2003). Osteopontin induces nuclear factor κ B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I κ B α /IKK signaling pathways, and curcumin (diferulolylmethane) down-regulates these pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14487-14497. DOI: 10.1074/jbc.M103334200.

Phng, L. K., & Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell*, 16(2), 196-208. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.01.015.

BIBLIOGRAFÍA

Pollock, C. B., Koltai, H., Kapulnik, Y., Prandi, C., & Yarden, R. I. (2012). Strigolactones: a novel class of phytohormones that inhibit the growth and survival of breast cancer cells and breast cancer stem-like enriched mammosphere cells. *Breast cancer research and treatment*, *134*(3), 1041-1055. DOI: 10.1007/s10549-012-1992-x.

Pollock, C. B., McDonough, S., Wang, V. S., Lee, H., Ringer, L., Li, X., ... & Kapulnik, Y. (2014). Strigolactone analogues induce apoptosis through activation of p38 and the stress response pathway in cancer cell lines and in conditionally reprogramed primary prostate cancer cells. *Oncotarget*, *5*(6), 1683-98. DOI:10.18632/oncotarget.1849.

Popova, A. A., & Koksharova, O. A. (2016). Neurotoxic non-proteinogenic amino acid β -N-methylamino-L-alanine and its role in biological systems. *Biochemistry (Moscow)*, *81*(8), 794-805. DOI: 10.1134/S0006297916080022.

(a) Porcù, E., Salvador, A., Primac, I., Mitola, S., Ronca, R., Ravelli, C., ... & Viola, G. (2016). Vascular disrupting activity of combretastatin analogues. *Vascular pharmacology*, *83*, 78-89. DOI: 10.1016/j.vph.2016.05.006.

(b) Porcù, E., Persano, L., Ronca, R., Mitola, S., Bortolozzi, R., Romagnoli, R., ... & Viola, G. (2016). The novel antitubulin agent TR-764 strongly reduces tumor vasculature and inhibits HIF-1 α activation. *Scientific reports*, *6*, 27886. DOI: 10.1038/srep27886.

Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, *146*(6), 873-887. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.039.

Privratsky, J. R., & Newman, P. J. (2014). PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research*, *355*(3), 607-619. DOI:10.1007/s00441-013-1779-3.

Qin, S., Li, A., Yi, M., Yu, S., Zhang, M., & Wu, K. (2019). Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, *12*(1), 27. DOI: 10.1186/s13045-019-0718-5.

Quesada, A. R., Medina, M. Á. & Muñoz-Chápuli, R. (2004). Angiogénesis. *Servicio de Publicaciones Universidad de Málaga*. EAN 9788497470353.

Quesada, A. R., Muñoz-Chápuli, R., & Medina, M. A. (2006). Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Medicinal research reviews*, *26*(4), 483-530. DOI: 10.1002/med.20059.

Quiney, C., Billard, C., Mirshahi, P., Fourneron, J. D., & Kolb, J. P. (2006). Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells. *Leukemia*, *20*(4), 583. DOI: 10.1038/sj.leu.2404134.

Rameau, C. (2010). Strigolactones, a novel class of plant hormone controlling shoot branching. *Comptes rendus biologiques*, 333(4), 344-349. DOI:10.1016/j.crv.2010.01.012.

Rárová, L., Zahler, S., Liebl, J., Kryštof, V., Sedlák, D., Bartůněk, P., ... & Strnad, M. (2012). Brassinosteroids inhibit in vitro angiogenesis in human endothelial cells. *Steroids*, 77(13), 1502-1509. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.08.011.

Rárová, L., Sedlák, D., Oklestkova, J., Steigerová, J., Liebl, J., Zahler, S., ... & Strnad, M. (2018). The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 178, 263-271. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.01.005.

RayChaudhury, A., Elkins, M., Kozien, D., & Nakada, M. T. (2001). Regulation of PECAM-1 in endothelial cells during cell growth and migration. *Experimental Biology and Medicine*, 226(7), 686-691.

Reile, H., Birnböck, H., Bernhardt, G., Spruß, T., & Schönenberger, H. (1990). Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture. *Analytical biochemistry*, 187(2), 262-267.

Ribatti, D., Urbinati, C., Nico, B., Rusnati, M., Roncali, L., & Presta, M. (1995). Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Developmental biology*, 170(1), 39-49. DOI: 10.1006/dbio.1995.1193.

Ribatti, D. (2009). Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leukemia research*, 33(5), 638-644. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.11.019.

Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology*, 372(2), 157-165. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.09.018.

Ribatti, D. (2018). Interleukins as modulators of angiogenesis and anti-angiogenesis in tumors. *Cytokine*, S1043-4666(18)30410-1. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.10.022.

Ribeiro, A., Abreu, R. M., Dias, M. M., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2018). Antiangiogenic compounds: well-established drugs versus emerging natural molecules. *Cancer letters*, 415, 86-105. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.12.006.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *nature*, 386(6626), 671. DOI: 10.1038/386671a0.

BIBLIOGRAFÍA

Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 11(1), 73-91. DOI: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.

Rodríguez-Nieto, S., González-Iriarte, M., Carmona, R., Muñoz-Chápuli, R., Medina, M. A., & Quesada, A. R. (2002). Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *The FASEB Journal*, 16(2), 261-263. DOI: 10.1096/fj.01-0427fje.

Rogers, J. M., & Suga, H. (2015). Discovering functional, non-proteinogenic amino acid containing, peptides using genetic code reprogramming. *Organic & biomolecular chemistry*, 13(36), 9353-9363. DOI: 10.1039/c5ob01336d.

Romer, L. H., McLean, N., Turner, C. E., & Burridge, K. (1994). Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 5(3), 349-36.

Rothmeier, A. S., Ischenko, I., Joore, J., Garczarczyk, D., Fürst, R., Bruns, C. J., ... & Zahler, S. (2009). Investigation of the marine compound spongistatin 1 links the inhibition of PKC α translocation to nonmitotic effects of tubulin antagonism in angiogenesis. *The FASEB journal*, 23(4), 1127-1137. DOI: 10.1096/fj.08-117127.

Roskelley, C. D., Williams, D. E., McHardy, L. M., Leong, K. G., Troussard, A., Karsan, A., ... & Roberge, M. (2001). Inhibition of tumor cell invasion and angiogenesis by motuporamines. *Cancer research*, 61(18), 6788-6794. PubMed: 11559552.

Saito, Y., Mori, S., Yokote, K., Kanzaki, T., Saito, Y., & Morisaki, N. (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for the activation process of focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224(1), 23-26. DOI: 10.1006/bbrc.1996.0978 .

Sato, K., Mochizuki, M., Saiki, I., Yoo, Y., Samukawa, K., & Azuma, I. (1994). Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of Panax ginseng, ginsenoside-Rb2. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17(5), 635-639.

Sato, Y. (2001). Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell structure and function*, 26(1), 19-24. DOI: 10.1247/csf.26.19.

Sato, Y. (2006). Update on endogenous inhibitors of angiogenesis. *Endothelium*, 13(2), 147-155. DOI: 10.1080/1062332060069110.

Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-

dependent binding of pp60src. *Molecular and cellular biology*, 14(3), 1680-1688. DOI: 10.1128/MCB.14.3.1680.

Schlereth, K., Weichenhan, D., Bauer, T., Heumann, T., Giannakouri, E., Lipka, D., ... & Plass, C. (2018). The transcriptomic and epigenetic map of vascular quiescence in the continuous lung endothelium. *Elife*, 7, e34423. DOI: 10.7554/eLife.34423.

Schiff, P., & Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(3), 1561-1565.

Schimmel, L., & Gordon, E. (2018). The precise molecular signals that control endothelial cell-cell adhesion within the vessel wall. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1673-1680. DOI: 10.1042/BST20180377.

Schempp, C. M., Kiss, J., Kirkin, V., Averbek, M., Simon-Haarhaus, B., Kremer, B., ... & Simon, J. C. (2005). Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor in vitro and in vivo. *Planta medica*, 71(11), 999-1004. DOI: 10.1055/s-2005-871303.

Sechler, J. L., & Schwarzbauer, J. E. (1998). Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25533-25536. DOI: 10.1074/jbc.273.40.25533.

Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Streit, M., Koteliansky, V. E., de Fougères, A. R., & Detmar, M. (2002). The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *The American journal of pathology*, 160(1), 195-204. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64363-5.

Sengupta, S., Toh, S. A., Sellers, L. A., Skepper, J. N., Koolwijk, P., Leung, H. W., ... & Fan, T. P. D. (2004). Modulating angiogenesis: the yin and the yang in ginseng. *Circulation*, 110(10), 1219-1225. DOI: 10.1161/01.CIR.0000140676.88412.CF.

Senthilkumar, K., Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S. K. (2013). Antiangiogenic effects of marine sponge derived compounds on cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 1097-1108. DOI: 10.1016/j.etap.2013.09.014.

Shen, T. L., Park, A. Y. J., Alcaraz, A., Peng, X., Jang, I., Koni, P., et al. (2005). Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 169(6), 941-952. DOI: 10.1083/jcb.200411155.

Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium*, 13(2), 63-69. DOI: 10.1080/10623320600697955.

BIBLIOGRAFÍA

Shim, J. S., Lee, H. S., Shin, J., & Kwon, H. J. (2004). Psammaplin A, a marine natural product, inhibits aminopeptidase N and suppresses angiogenesis in vitro. *Cancer letters*, 203(2), 163-169. DOI: 10.1016/j.canlet.2003.08.036.

Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., & Klagsbrun, M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 223(4642), 1296-1299. DOI: 10.1126/science.6199844.

Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(10), 611-625. DOI: 10.1038/nrm.2016.87.

Singh, A. K., Sidhu, G. S., Deepa, T., & Maheshwari, R. K. (1996). Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell. *Cancer Letters*, 107(1), 109-115. DOI: 10.1016/0304-3835(96)04357-1.

Shiojima, I., & Walsh, K. (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation research*, 90(12), 1243-1250. DOI: 10.1161/01.RES.0000022200.71892.9F.

Sipkema, D., Franssen, M. C., Osinga, R., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2005). Marine sponges as pharmacy. *Marine biotechnology*, 7(3), 142. DOI: 10.1007/s10126-004-0405-5.

Staton, C. A., Stribbling, S. M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N. J., & Lewis, C. E. (2004). Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International journal of experimental pathology*, 85(5), 233-248. DOI: 10.1111/j.0959-9673.2004.00396.x.

Somanath, P. R., Razorenova, O. V., Chen, J., & Byzova, T. V. (2006). Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell cycle*, 5(5), 512-518. DOI: 10.4161/cc.5.5.2538.

Steigerová, J., Oklešťková, J., Levková, M., Rárová, L., Kolář, Z., & Strnad, M. (2010). Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-biological interactions*, 188(3), 487-496. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.09.006.

Steube, K. G., Meyer, C., Proksch, P., Supriyono, A., Sumaryono, W., & Drexler, H. G. (1998). A new calyculin derivative from the sponge *Theonella swinhoei* is a novel and potent inhibitor of tumor cell proliferation. *Anticancer research*, 18(1A), 129-137.

Stratman, A. N., Davis, M. J., & Davis, G. E. (2011). VEGF and FGF prime vascular tube morphogenesis and sprouting directed by hematopoietic stem cell cytokines. *Blood*, 117(14), 3709-3719. DOI: 10.1182/blood-2010-11-316752.

- Subbaiah, M. A., Meanwell, N. A., & Kadow, J. F. (2017). Design strategies in the prodrugs of HIV-1 protease inhibitors to improve the pharmaceutical properties. *European journal of medicinal chemistry*, *139*, 865-883. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.044.
- Sun, Q., Heilmann, J., & König, B. (2015). Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties—a review from the chemical point of view. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *11*(1), 249-264. DOI: 10.3762/bjoc.11.28.
- Sun, S., Wu, H. J., & Guan, J. L. (2018). Nuclear FAK and its kinase activity regulate VEGFR2 transcription in angiogenesis of adult mice. *Scientific reports*, *8*(1), 2550. DOI: 10.1038/s41598-018-20930-z.
- Swadi, R., Mather, G., Pizer, B. L., Losty, P. D., See, V., & Moss, D. (2018). Optimising the chick chorioallantoic membrane xenograft model of neuroblastoma for drug delivery. *BMC cancer*, *18*(1), 28. DOI: 10.1186/s12885-017-3978-x.
- Tabares, P., Degel, B., Schaschke, N., Hentschel, U., & Schirmeister, T. (2012). Identification of the protease inhibitor miraziridine A in the Red sea sponge *Theonella swinhoei*. *Pharmacognosy research*, *4*(1), 63. DOI: 10.4103/0974-8490.91047.
- Takada, N., Omae, M., Sagawa, F., Chi, N. C., Endo, S., Kozawa, S., & Sato, T. N. (2017). Re-evaluating the functional landscape of the cardiovascular system during development. *Biology open*, *6*(11), 1756-1770. DOI: 10.1242/bio.030254.
- Takahashi, T., Ueno, H., & Shibuya, M. (1999). VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, *18*(13), 2221. DOI: 10.1038/sj.onc.1202527.
- Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., & Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular research*, *65*(3), 550-563. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.12.002.
- Tang, F. Y., Nguyen, N., & Meydani, M. (2003). Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule. *International journal of cancer*, *106*(6), 871-878. DOI: 10.1002/ijc.11325.
- Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A., & Giavazzi, R. (1990). Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *The Journal of cell biology*, *111*(2), 765-772. DOI: 10.1083/jcb.111.2.765.

BIBLIOGRAFÍA

Thaloor, D., Singh, A. K., Sidhu, G. S., Prasad, P. V., Kleinman, H. K., & Maheshwari, R. K. (1998). Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 9(4), 305-312.

Thoms, C., Ebel, R., & Proksch, P. (2006). Activated chemical defense in *Aplysina* sponges revisited. *Journal of chemical ecology*, 32(1), 97-123. DOI: 10.1007/s10886-006-9355-x.

Tonini, T., Rossi, F. & Claudio, P. P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 22, 6549–6556 (2003). DOI: 10.1038/sj.onc.1206816.

Tsume, Y., Incecayir, T., Song, X., Hilfinger, J. M., & Amidon, G. L. (2014). The development of orally administrable gemcitabine prodrugs with D-enantiomer amino acids: enhanced membrane permeability and enzymatic stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(3), 514-523. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.12.009.

Tumer, T. B., Yilmaz, B., Ozleyen, A., Kurt, B., Tok, T. T., Taskin, K. M., & Kulabas, S. S. (2018). GR24, a synthetic analog of Strigolactones, alleviates inflammation and promotes Nrf2 cytoprotective response: In vitro and in silico evidences. *Computational biology and chemistry*, 76, 179-190. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2018.07.014.

Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., ... & Kyojuka, J. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195-200. DOI: 10.1038/nature07272.

Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024.

Van Beijnum, J. R., Nowak-Sliwinska, P., Huijbers, E. J., Thijssen, V. L., & Griffioen, A. W. (2015). The great escape; the hallmarks of resistance to antiangiogenic therapy. *Pharmacological reviews*, 67(2), 441-461. DOI: 10.1124/pr.114.010215.

Van Hinsbergh, V. W., Engelse, M. A., & Quax, P. H. (2006). Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(4), 716-728. DOI: 10.1161/01.ATV.0000209518.58252.17.

Varinska, L., Mirossay, L., Mojziso, G., & Mojzis, J. (2010). Antiangiogenic effect of selected phytochemicals. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(1), 57-63. DOI: doi.org/10.1691/ph.2010.9667.

- Varricchi, G., Loffredo, S., Galdiero, M. R., Marone, G., Cristinziano, L., Granata, F., & Marone, G. (2018). Innate effector cells in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Current opinion in immunology*, *53*, 152-160. DOI: 10.1016/j.coi.2018.05.002.
- Vasudev, N. S., & Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, *17*(3), 471-494. DOI: 10.1007/s10456-014-9420-y.
- Vasudevan, N., Kashinath, K., & Reddy, D. S. (2014). Total Synthesis of Deoxy-solomonamide B by Mimicking Biogenesis. *Organic letters*, *16*(23), 6148-6151. DOI: 10.1021/ol503011g.
- Veber, D. F., & Freidinger, R. M. (1985). The design of metabolically-stable peptide analogs. *Trends in Neurosciences*, *8*, 392-396. DOI: 10.1016/0166-2236(85)90140-7.
- Vesely, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., ... & Meijer, L. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European journal of biochemistry*, *224*(2), 771-786. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x
- Vincent, L., Kermani, P., Young, L. M., Cheng, J., Zhang, F., Shido, K., ... & Bohlen, P. (2005). Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *The Journal of clinical investigation*, *115*(11), 2992-3006. DOI: 10.1172/JCI24586.
- Wals, K & Ovaa, H. (2014). Unnatural amino acid incorporation in E. coli: current and future applications in the design of therapeutic proteins. *Frontiers in chemistry*, *2*, 15. DOI: 10.3389/fchem.2014.00015.
- Wang, B., Zou, Y., Li, H., Yan, H., Pan, J. S., & Yuan, Z. L. (2005). Genistein inhibited retinal neovascularization and expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor 1 α in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics*, *21*(2), 107-113. DOI: 10.1089/jop.2005.21.107.
- Waters, M. T., Gutjahr, C., Bennett, T., & Nelson, D. C. (2017). Strigolactone signaling and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, *68*, 291-322. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042916-040925.
- Wehrle-Haller, B., & Imhof, B. A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *35*(1), 39-50. DOI: 10.1016/S1357-2725(02)00071-7.

BIBLIOGRAFÍA

Werle, M., & Bernkop-Schnürch, A. (2006). Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino acids*, 30(4), 351-367. DOI: 10.1007/s00726-005-0289-3.

Williams, D. E., Craig, K. S., Patrick, B., McHardy, L. M., van Soest, R., Roberge, M., & Andersen, R. J. (2002). Motuporamines, Anti-Invasion and Anti-Angiogenic Alkaloids from the Marine Sponge *Xestospongia e xigua* (Kirkpatrick): Isolation, Structure Elucidation, Analogue Synthesis, and Conformational Analysis. *The Journal of organic chemistry*, 67(1), 245-258. DOI: 10.1021/jo016101c.

Winder, P. L., Pomponi, S. A., & Wright, A. E. (2011). Natural Products from the Lithistida: A Review of the Literature since 2000. *Marine Drugs*, 9(12), 2643-2682. DOI: 10.3390/md9122643.

Wise, L. M., Inder, M. K., Real, N. C., Stuart, G. S., Fleming, S. B., & Mercer, A. A. (2012). The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cellular microbiology*, 14(9), 1376-1390. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01802.x.

Wolf, K., Hu, H., Isaji, T., & Dardik, A. (2018). Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics. *Journal of vascular surgery*, 69(1), 253-262. DOI: 10.1016/j.jvs.2018.06.195.

Wu, J., & Sheibani, N. (2003). Modulation of VE-cadherin and PECAM-1 mediated cell-cell adhesions by mitogen-activated protein kinases. *Journal of cellular biochemistry*, 90(1), 121-137. DOI:10.1002/jcb.10600.

Wu, J., Ke, X., Wang, W., Zhang, H., Ma, N., Fu, W., ... & Zhang, Z. (2016). Aloe-emodin suppresses hypoxia-induced retinal angiogenesis via inhibition of HIF-1 α /VEGF pathway. *International journal of biological sciences*, 12(11), 1363. DOI: 10.7150/ijbs.16334.

Xie, X., Yoneyama, K., & Yoneyama, K. (2010). The strigolactone story. *Annual review of phytopathology*, 48, 93-117. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114453.

Xie, X., Yoneyama, K., Kisugi, T., Uchida, K., Ito, S., Akiyama, K., ... & Yoneyama, K. (2013). Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Molecular plant*, 6(1), 153-163. DOI: 10.1093/mp/sss139.

Yamaguchi, H., & Wang, H. G. (2001). The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*, 20(53), 7779. DOI: 10.1038/sj.onc.1204984.

Yamakawa, S., Asai, T., Uchida, T., Matsukawa, M., Akizawa, T., & Oku, N. (2004). (-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis. *Cancer letters*, *210*(1), 47-55. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.03.008.

Yamane, H., Konno, K., Sabelis, M., Takabayashi, J., Sassa, T., & Oikawa, H. (2010). *Chemical Defence and Toxins of Plants. Journal of Hospital Infection - J HOSP INFECT*, *4*, 339-385. DOI: 10.1016/B978-008045382-8.00099-X.

Yang, X., Liaw, L., Prudovsky, I., Brooks, P. C., Vary, C., Oxburgh, L., & Friesel, R. (2015). Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Current atherosclerosis reports*, *17*(6), 31. DOI: 10.1007/s11883-015-0509-6.

Youssef, D. T., & Mooberry, S. L. (2006). Hurghadolide A and Swinholide I, Potent Actin-Microfilament Disrupters from the Red Sea Sponge *Theonella swinhoei*. *Journal of natural products*, *69*(1), 154-157. DOI: 10.1021/np050404a.

Yu, H., Daura, X., & Van Gunsteren, W. F. (2004). Molecular dynamics simulations of peptides containing an unnatural amino acid: dimerization, folding, and protein binding. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, *54*(1), 116-127. DOI: 10.1002/prot.10502.

Yu, X., Zhu, J., Mi, M., Chen, W., Pan, Q., & Wei, M. (2012). Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Medical Oncology*, *29*(1), 349-357. DOI: 10.1007/s12032-010-9770-2.

Yue, T. L., Wang, X., Loudon, C. S., Gupta, S., Pillarisetti, K., Gu, J. L., ... & Feuerstein, G. Z. (1997). 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression. *Molecular pharmacology*, *51*(6), 951-962. DOI: 10.1124/mol.51.6.951.

Yuliawati, D., Mintaroem, K., & Sutrisno, S. (2018). Inhibitory effect of genistein on MMP-2 and MMP-9 expression through suppressing NF-κB activity in peritoneum of murine model of endometriosis. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, *7*(6), 261. DOI: 10.4103/2305-0500.246344.

Zachary, I. (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochemical Society Transactions*, *31*(6), 1171-1177. DOI: 10.1042/bst0311171.

Zhang, J., DeFelice, A. F., Hanig, J. P., & Colatsky, T. (2010). Biomarkers of endothelial cell activation serve as potential surrogate markers for drug-induced vascular injury. *Toxicologic pathology*, *38*(6), 856-871. DOI: 10.1177/0192623310378866.

BIBLIOGRAFÍA

Zhang, G., Wang, R., Cheng, K., Li, Q., Wang, Y., Zhang, R., & Qin, X. (2017). Repulsive Guidance Molecule a inhibits angiogenesis by Downregulating VEGF and Phosphorylated Focal adhesion Kinase In Vitro. *Frontiers in neurology, 8*, 504. DOI: 10.3389/fneur.2017.00504.

Zhang, C., Wang, N., Tan, H. Y., Guo, W., Li, S., & Feng, Y. (2018). Targeting VEGF/VEGFRs pathway in the antiangiogenic treatment of human cancers by traditional chinese medicine. *Integrative cancer therapies, 17*(3), 582-601. DOI: 10.1177/1534735418775828.

Zhao, Y., & Adjei, A. A. (2015). Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor. *The oncologist, 20*(6), 660-673. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0465.

Zwanenburg, B., & Blanco-Ania, D. (2018). Strigolactones: new plant hormones in the spotlight. *Journal of experimental botany, 69*(9), 2205-2218. DOI: 10.1093/jxb/erx487.

ANEXOS

Exploring the Ring-Closing Metathesis for the Construction of the Solomonamide Macrocyclic Core: Identification of Bioactive Precursors

Iván Cheng-Sánchez,[†] Paloma Carrillo,[‡] Antonio Sánchez-Ruiz,[§] Beatriz Martínez-Poveda,[‡] Ana R. Quesada,[‡] Miguel A. Medina,[‡] Juan M. López-Romero,[†] and Francisco Sarabia^{*,†,‡,§}

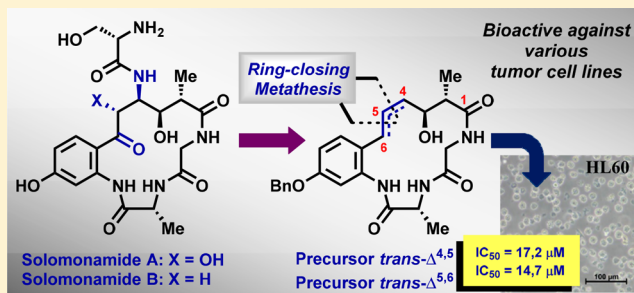
[†]Department of Organic Chemistry; Faculty of Sciences, University of Malaga, Campus de Teatinos s/n, 29071, Malaga, Spain

[‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of Malaga, Campus de Teatinos s/n, 29071, Malaga, Spain

[§]Organic Chemistry Section, Faculty of Pharmacy, University of Castilla-La Mancha, Avda Dr. José María Sánchez Ibáñez s/n, 02008, Albacete, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: New synthetic strategies directed toward the novel cyclopeptides solomonamides have been explored utilizing an olefin metathesis as the key reaction. In the various strategies investigated, we worked on minimally oxidized systems, and the olefin metathesis reaction demonstrated efficiency and validity for the construction of the macrocyclic core. The described synthetic strategies toward the solomonamides are well suited for the subsequent access to the natural products and represent flexible and diversity-oriented routes that allow for the generation of a variety of analogues via oxidative transformations. In addition, preliminary biological evaluations of the generated solomonamide precursors revealed antitumor activity against various tumor cell lines.



1. INTRODUCTION

Recently isolated from the marine sponge *Theonella swinhoei*, the solomonamides A (1) and B (2) (Figure 1) are natural

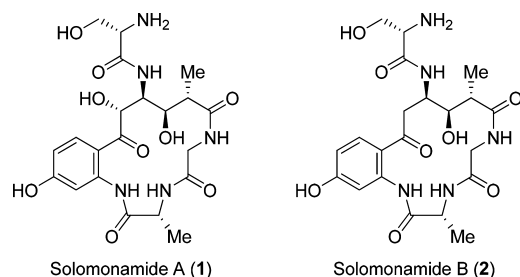


Figure 1. Originally assigned structures of the solomonamides.

products with interesting and promising biological properties.¹ Structurally characterized by unprecedented cyclopeptidic-type frameworks, these natural products have become potential leads for drug discovery and join a broad and impressive family of other bioactive natural products provided by this marine sponge.² An exhaustive spectroscopic analysis of both compounds has resulted in the elucidation of their intricate cyclic structures, revealing the presence of three conventional amino acids (D-Ala, Gly, and L-Ser) and an unprecedented 4-amino(2'-amino-4'-hydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-2-methyl-6-







oxohexanoic acid (ADMOA) and its corresponding 5-deoxy derivative (AHMOA) for solomonamides A and B, respectively. Assignment of the absolute configurations of ADMOA and AHMOA required additional studies, involving a combination of spectroscopic and theoretical studies (QM J based analysis and DFT $J/^{13}\text{C}$ calculations), which resulted in the proposal of the depicted absolute configurations as the most likely. Biologically, solomonamide A (1) displayed potent anti-inflammatory activity, causing a significant 60% reduction of inflammation in an animal model of edema at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Unfortunately, the extreme scarcity of the solomonamides has precluded a thorough biological evaluation. In fact, the anti-inflammatory activity of solomonamide B (2) was not evaluated due to limited amounts. The unique and unprecedented structures of the solomonamides, together with their intriguing biological properties, have generated intense synthetic activity.³ For example, the Reddy group⁴ has recently reported a total synthesis of a deoxy analogue of solomonamide B⁵ together with an array of simple unfunctionalized analogues,⁶ culminating with a total synthesis of the natural solomonamide B,⁷ which has led to a revision of the initially proposed structure as will be detailed later.

Received: November 27, 2017

Published: April 20, 2018

Article

Exploring the Antiangiogenic Potential of Solomonamide A Bioactive Precursors: In Vitro and In Vivo Evidences of the Inhibitory Activity of Solo F-OH During Angiogenesis

Paloma Carrillo ^{1,2}, Beatriz Martínez-Poveda ^{1,2,*}, Iván Cheng-Sánchez ³, Jessica Guerra ⁴, Chiara Tobia ⁴, J. Manuel López-Romero ³, Francisco Sarabia ³, Miguel Ángel Medina ^{1,2,5} and Ana R. Quesada ^{1,2,5}

¹ Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga, Andalucía Tech, 29071 Málaga, Spain; pcarrillo@uma.es (P.C.); medina@uma.es (M.Á.M.); quesada@uma.es (A.R.Q.)

² IBIMA (Biomedical Research Institute of Málaga), 29071 Málaga, Spain

³ Department of Organic Chemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga, Andalucía Tech, 29071 Málaga, Spain; cheng@uma.es (I.C.-S.); jmromero@uma.es (J.M.L.-R.); frsarabia@uma.es (F.S.)

⁴ Department of Molecular and Translational Medicine, Experimental Oncology and Immunology, School of Medicine, University of Brescia, 25125 Brescia, Italy; j.guerra@unibs.it (J.G.); chiara.tobia@unibs.it (C.T.)

⁵ CIBER of Rare Diseases, Group U741 (CB06/07/0046), 29071 Málaga, Spain

* Correspondence: bmpoveda@uma.es; Tel.: +34-952-13-7135

Received: 5 March 2019; Accepted: 12 April 2019; Published: 15 April 2019



Abstract: Marine sponges are a prolific source of bioactive compounds. In this work, the putative antiangiogenic potential of a series of synthetic precursors of Solomonamide A, a cyclic peptide isolated from a marine sponge, was evaluated. By means of an in vitro screening, based on the inhibitory activity of endothelial tube formation, the compound Solo F-OH was selected for a deeper characterization of its antiangiogenic potential. Our results indicate that Solo F-OH is able to inhibit some key steps of the angiogenic process, including the proliferation, migration, and invasion of endothelial cells, as well as diminish their capability to degrade the extracellular matrix proteins. The antiangiogenic potential of Solo F-OH was confirmed by means of two different in vivo models: the chorioallantoic membrane (CAM) and the zebrafish yolk membrane (ZFYM) assays. The reduction in ERK1/2 and Akt phosphorylation in endothelial cells treated with Solo F-OH denotes that this compound could target the upstream components that are common to both pathways. Taken together, our results show a new and interesting biological activity of Solo F-OH as an inhibitor of the persistent and deregulated angiogenesis that characterizes cancer and other pathologies.

Keywords: Solomonamide A; marine sponge; endothelial cells; angiogenesis; cancer

1. Introduction

Marine sponges are considered as a rich source of new potential bioactive compounds. In living sponges, these compounds are mainly secondary metabolites, whose natural functions include defense against predators and competition with other sessile species. The increasing interest for sponge-isolated compounds in biomedical and pharmaceutical research derives from the potential clinical applications exhibited by them, according to their antitumoral, anti-inflammatory, antiangiogenic, and/or antimicrobial properties reported [1–7].

Several compounds isolated from the marine sponge *Theonella swinhoei* have been studied because of their interesting bioactive properties. Such is the case of the potent anti-inflammatory

Title: The strigolactone analog GR-24 inhibits angiogenesis *in vivo* and *in vitro* by a mechanism involving cytoskeletal reorganization and VEGFR2 signalling.

Authors:

Paloma Carrillo^{1, 2}, Beatriz Martínez-Poveda^{1, 2*}, Miguel Ángel Medina^{1, 2, 3}, Ana R. Quesada^{1, 2, 3}.

Author Affiliation:

¹Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga, Andalucía Tech, Spain.

²IBIMA (Biomedical Research Institute of Málaga), Málaga. Spain.

³CIBER of Rare Diseases, Group U741 (CB06/07/0046), 29071 Málaga, Spain.

***Corresponding author:** Beatriz Martínez Poveda

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga. Campus de Teatinos s/n, CP29071; Málaga, Spain. (+34)952137135; bmpoveda@uma.es

Author Contribution: Conception and design of the work, B.M.-P, M.A.M. and A.R.Q.; Acquisition of data, P.C.; Analysis of data, P.C., B.M.-P, M.A.M. and A.R.Q.; Draft version of the manuscript, P.C., and B.M.-P.; Revision, editing and final approval of the manuscript, B.M.-P, M.A.M. and A.R.Q. Funding acquisition: M.A.M. and A.R.Q.

Competing Interests' Statement: Non