

Study of Bioactive Compounds Extracted From Natural Products with Effects on Angiogenesis, Inflammation and Tumor Development

Tesis doctoral

Junio, 2014

Casimiro Cárdenas García



**UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA**

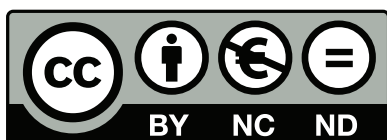
**Departamento de Biología Molecular y Bioquímica
Universidad de Málaga**



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Casimiro Cárdenas García

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

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

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

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

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

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



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento Biología Molecular y Bioquímica
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

Tesis Doctoral

**Study of Bioactive Compounds Extracted From Natural
Products with Effects on Angiogenesis, Inflammation and
Tumor Development.**

Casimiro Cárdenas García

Málaga, Junio de 2014

A mi familia, a los que están y a los que se fueron.
A mis amigos, a los de ahora y a los de siempre.

“Man is born or comes into the world ignorant; but he is furnished with the senses, so as to be impressed with the properties of things; ...But man goes farther, he has the power of receiving information of things that never impressed his senses.”

(John Hunter, *Essays and Observations*, volume I, *Introduction to Natural History*, 1856. -John Hunter acuñó el término “angiogénesis”, describiendo por primera vez este proceso-).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**Departamento Biología Molecular y Bioquímica
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga**

ANA RODRÍGUEZ QUESADA y MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES, ambos catedráticos del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN

Que CASIMIRO CÁRDENAS GARCÍA, Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral que lleva por título *Study of Bioactive Compounds Extracted From Natural Products with Effects on Angiogenesis, Inflammation and Tumor Development*.

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.

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

Málaga, junio de 2014

Fdo:

Ana Rodríguez Quesada

Miguel Ángel Medina Torres

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 9 |
| ABSTRACT | 13 |
| AGRADECIMIENTOS | 17 |
| ABREVIATURAS | 19 |
| INTRODUCCIÓN | 21 |
| 1. Fisiología de la angiogénesis. | 23 |
| 1.1 Activación endotelial. | 26 |
| 1.2 Degradación y remodelado de la matriz extracelular. | 30 |
| 1.3 Proliferación y migración. | 36 |
| 1.4 Estabilización vascular. | 39 |
| 2. La angiogénesis en la salud y la enfermedad. | 41 |
| 2.1 El “interruptor” angiogénico. | 41 |
| 2.2 La angiogénesis: un sello distintivo del cáncer. | 42 |
| 2.3 Microambiente tumoral, inflamación y angiogénesis. | 43 |
| 3. Metodología para la búsqueda de nuevos compuestos moduladores de la angiogénesis. | 45 |
| 4. La naturaleza como fuente de productos naturales con actividad anti-angiogénica. | 47 |
| 4.1 Compuestos estudiados en esta tesis. | 48 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 49 |
| HYPOTHESIS AND GENERAL AIMS | 53 |
| RESUMEN DE LOS RESULTADOS | 55 |
| SUMMARY OF THE RESULTS | 63 |

| | |
|-----------------------------|----|
| CONCLUSIONES FINALES | 69 |
| FINAL CONCLUSIONS | 73 |
| BIBLIOGRAFÍA | 75 |
| ANEXOS | 89 |

Anexo I: *Kahweol, a coffee diterpene with anti-inflammatory properties.*

Anexo II: *Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process.*

Anexo III: Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin.

Anexo IV: *Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene.*

Anexo V: *Insights on the antitumor effects of kahweol on human breast cancer: Decreased survival and increased production of reactive oxygen species and cytotoxicity.*

Anexo VI: Metodología de los ensayos realizados en la presente tesis.

RESUMEN

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Se trata de un proceso fisiológico natural que se pone en marcha en respuesta a la demanda de nutrientes por parte de los tejidos en desarrollo, tanto en el embrión como en el organismo adulto. Dado que la formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial para el crecimiento de los órganos durante el desarrollo embrionario, es durante esta etapa cuando hay una mayor actividad angiogénica. Sin embargo, en la etapa adulta la angiogénesis está limitada únicamente a procesos concretos relacionados con el ciclo reproductivo femenino y la reparación de tejidos.

Durante la angiogénesis, las células endoteliales, responsables de la formación de los nuevos vasos sanguíneos, responden a señales químicas procedentes de los tejidos en desarrollo, creando estructuras capilares que responderán a las nuevas necesidades de nutrición y excreción. Este es un proceso transitorio que está estrechamente regulado por moléculas activadoras e inhibitoras, de forma que cuando esas señales cesan el proceso se para. Los nuevos brotes capilares formados por las células endoteliales son estabilizados por células parietales (pericitos y células musculares lisas), dando madurez y funcionalidad a las nuevas estructuras vasculares, las cuales forman una red jerarquizada que se conformará de acuerdo a los requerimientos metabólicos de los órganos y tejidos a los que va a abastecer.

La confirmación por el grupo de Folkman de la hipótesis de que la eliminación de un estímulo angiogénico conduce a una regresión en la neovascularización permitió dilucidar que, a pesar de que la angiogénesis es un proceso continuo, puede ser dividida en una serie ordenada de subprocesos discretos que pueden ser tratados de forma independiente. En primer lugar ocurre la activación endotelial: un conjunto de señales angiogénicas procedentes del entorno endotelial, la mayoría de las veces ligandos solubles, difunden y activan a receptores específicos en las células endoteliales ocasionando una cascada de señales intracelulares que promueven cambios de expresión génica hacia un fenotipo angiogénico activado. Después sucede la degradación y remodelado de la matriz extracelular: las células endoteliales activadas producen enzimas que les permiten degradar la lámina basal sobre la que se asientan, desprender los pericitos adheridos e iniciar la invasión de la matriz extracelular adyacente, lo que les facilita la migración direccional hacia el origen del estímulo. A continuación, ocurre la proliferación y migración: las células endoteliales escapan de la pared vascular, cambian su forma, proliferan y migran guiadas por un gradiente de factores proangiogénicos, encadenándose unas a otras para formar la estructura inicial de los nuevos vasos. Finalmente sucede la estabilización vascular: las células

endoteliales se reorganizan formando tubos, secretan una nueva lámina basal y reclutan nuevas células parietales que estabilizan los vasos recién formados.

En el individuo adulto, salvo las mencionadas excepciones, la vasculatura permanece quiescente. Esa quiescencia se mantiene gracias a un delicado equilibrio local entre activadores e inhibidores endógenos. Sin embargo, cuando se produce un exceso de factores de crecimiento angiogénico el equilibrio se inclina a favor de la formación de nuevos vasos sanguíneos. De aquí surge la idea del “interruptor angiogénico”, que puede “encenderse”, cuando el equilibrio se vuelca a favor de una regulación al alza de los factores proangiogénicos, o “apagarse” si hay una regulación a la baja de dichos factores. Un cuerpo sano controla la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante el “encendido” o “apagado” del “interruptor angiogénico”.

Actualmente se sabe que la angiogénesis juega un papel determinante en la progresión tumoral, la invasión y la metástasis, siendo considerada como uno de los diez sellos distintivos del cáncer. Para que un tumor sólido pueda sobrepasar el tamaño crítico de 1-2 mm de diámetro y comenzar a expandirse necesita tener la capacidad de accionar y mantener encendido el “interruptor angiogénico”, induciendo la formación continua de nuevos vasos que ayuden a mantener el crecimiento tumoral. De esta forma, la angiogénesis puede posibilitar el paso desde un estado silente y avascular, en el que existe un equilibrio entre proliferación y muerte celular, hacia un estado de crecimiento exponencial, invasivo y metastásico.

Los productos naturales son compuestos orgánicos producidos por los organismos vivos y la actividad biológica de muchos de ellos ha dado pistas muy valiosas para el desarrollo de nuevos fármacos.

Nuestro grupo está activamente involucrado en la identificación de nuevos compuestos moduladores de la angiogénesis procedentes de fuentes naturales y en el estudio de sus efectos específicos sobre los diferentes pasos del proceso angiogénico. Para ello hemos seguido básicamente dos estrategias de búsqueda: una centrada en el cribado de compuestos de origen marino, que son obtenidos por una empresa colaboradora, el Instituto Biomar S.A., y sometidos por nosotros a un rastreo primario a partir del cual seleccionamos los más interesantes y valoramos su posible aplicación clínica; y otra estrategia similar, basada en el cribado de compuestos procedentes de la dieta y de la farmacopea tradicional mediterránea, principalmente.

A lo largo de esta tesis se estudiaron tres compuestos naturales. En primer lugar el ácido ursólico, un triterpenoide pentacíclico con efectos biológicos pleiotrópicos que ha mostrado poseer actividad antibacteriana, hepatoprotectora, inmunomoduladora, antiproliferativa y antitumoral, en el que se ha descrito previamente su actividad antiangiogénica sobre membrana corioalantoidea de pollo y sus efectos sobre la proliferación de células endoteliales de aorta bovina. En

segundo lugar, el aloe-emodina, una hidroxiantraquinona que se encuentra en el *Aloe vera*, así como en las hojas y raíces de otras plantas, que ha mostrado tener efectos antitumorales en diferentes tipos de cáncer. Y por último, el kahweol, un diterpeno presente en los granos de café tostado que permanece en cantidades considerables cuando se consume el café sin filtrar, en el que se han descrito ampliamente sus efectos protectores contra el estrés oxidativo y el daño en el DNA.

Durante el curso de esta tesis se han generado cuatro artículos de investigación y un capítulo de libro, aceptado recientemente para su publicación. A continuación se muestra un resumen de sus resultados y conclusiones.

En el primer trabajo de investigación, titulado *Effects of Ursolic Acid on Different Steps of the Angiogenic Process*, llevamos a cabo varios ensayos *in vivo* para confirmar el efecto inhibitor del ácido ursólico sobre la membrana corioalantoidea de pollo. Además, pusimos en marcha un conjunto de experimentos *in vitro* para identificar los pasos clave del proceso angiogénico que eran su diana. Estos ensayos incluyeron el análisis de los efectos del ácido ursólico sobre la proliferación de las células endoteliales, la degradación de la matriz extracelular, la migración, la invasión, y la tubulogénesis. Nuestros resultados permitieron concluir que el ácido ursólico tiene un efecto inhibitor sobre la angiogénesis *in vivo*, así como la capacidad para inhibir algunos de sus pasos clave *in vitro*, incluyendo la proliferación de las células endoteliales, la migración y la tubulogénesis. Sin embargo, al mismo tiempo, parece estimular otras etapas clave del proceso angiogénico, tales como la degradación de la matriz extracelular por la MMP-2 y la uroquinasa. Todo ello nos obliga a ser prudentes en relación con el potencial antiangiogénico del ácido ursólico.

En el segundo artículo, titulado *Evaluation of the anti-Angiogenic Effect of Aloe-Emodin*, se evaluaron las propiedades del aloe-emodina como un nuevo producto natural potencialmente antiangiogénico. Con este propósito se llevaron a cabo un ensayo *in vivo* y diferentes ensayos *in vitro* que permitieron comprobar sus efectos sobre la proliferación de las células endoteliales, la remodelación de la matriz extracelular, la migración, la invasión y la tubulogénesis. Por otra parte, también se evaluaron sus efectos fotocitotóxicos sobre las células tumorales. Nuestros resultados mostraron claramente que el aloe-emodina es un producto natural con propiedades antiangiogénicas y confirmaron su actividad antitumoral, previamente descrita. Por otra parte, se pusieron de manifiesto sus efectos fotocitotóxicos sobre las células tumorales. Todo esto pone de relieve las potenciales aplicaciones terapéuticas del aloe-emodina como antiangiogénico y como fármaco antitumoral y le apunta como un excelente candidato para la terapia fotodinámica.

Los objetivos del tercer artículo, titulado *Anti-Angiogenic and anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene*, fueron identificar los efectos del kahweol sobre la angiogénesis y sobre diferentes moléculas clave del

proceso inflamatorio. Para ello llevamos a cabo varios procedimientos experimentales que incluyeron: ensayos de angiogénesis *in vivo* (sobre membrana corioalantoidea de pollo y codorniz y en pez cebra fluorescente), el ensayo *ex vivo* del anillo aórtico de ratón, y el análisis *in vitro* de los efectos del kahweol sobre células endoteliales humanas, centrándonos en la evaluación de la proliferación y la viabilidad celular, la migración, la remodelación de la matriz extracelular y la tubulogénesis en Matrigel. Además, se determinaron dos marcadores de inflamación: los niveles de expresión de MCP-1 y los de secreción de COX-2. Nuestros resultados mostraron por primera vez que el kahweol es un compuesto antiangiogénico con efectos inhibidores sobre dos modelos experimentales de angiogénesis *in vivo* y uno *ex vivo*, inhibiendo además de forma específica diferentes pasos del proceso angiogénico. También revelamos el efecto inhibitorio del kahweol sobre la capacidad de las células endoteliales para remodelar la matriz extracelular, actuando sobre dos moléculas clave: las proteínas MMP-2 y uPA. La inhibición de la expresión de COX-2 y de la secreción de MCP-1 también mostró su capacidad antiinflamatoria. En resumen, nuestros resultados indicaron que el kahweol se comporta como un compuesto antiinflamatorio y antiangiogénico con potencial aplicación en la terapia antitumoral. Cabe señalar que nuestros datos son consistentes con el reciente meta-análisis epidemiológico que muestra que el consumo de café puede reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer.

En el cuarto artículo, titulado *Insights on the Antitumor Effects of Kahweol on Human Breast Cancer: Decreased Survival and Increased Production of Reactive Oxygen Species and Cytotoxicity*, se llevaron a cabo diferentes ensayos que pusieron a prueba los posibles efectos y la selectividad del kahweol sobre la proliferación y la supervivencia de las siguientes líneas tumorales: células de leucemia humana (HL-60), células de adenocarcinoma de colon (HT-29), células de fibrosarcoma (HT-1080), células de hepatoma (HepG2) y células de cáncer de mama sensibles (ZR75-1 y MCF-7) y no sensibles a estrógenos (MDA-MB-231). Nuestros resultados mostraron que el kahweol es capaz de inhibir el crecimiento de varios tipos de células tumorales humanas, disminuyendo sus tasas de proliferación y clonogenicidad e induciendo su apoptosis. Nuestros datos también indicaron que el efecto antitumoral del kahweol es particularmente importante en la línea celular de cáncer de mama humano no sensible a estrógenos MDA-MB-231, en la cual se induce la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Además, se muestra que el kahweol aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y la citotoxicidad de estas en células de cáncer de mama, pero no en células normales.

Por otra parte, se publicó un capítulo de libro bajo el título *Kahweol, a Coffee Diterpene with anti-Inflammatory Properties* en el libro *Coffee in Health and Disease Prevention* (Elsevier, Victor Preedy, 2014, London). En este capítulo se revisa en profundidad el estado actual del conocimiento sobre las propiedades antiinflamatorias del kahweol.

ABSTRACT

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is a natural physiological process that starts up in response to the demand for nutrients by developing tissues, both in the embryo and in the adult organism. Since the formation of new blood vessels is essential for the growth of organs during embryonic development, at this stage a persistent and maintained angiogenic activity is needed. In contrast, angiogenesis in adulthood is limited only to a few specific processes related to the female reproductive cycle, wound healing and tissue repair.

Endothelial cells are the main responsible for the formation of new blood vessels during angiogenesis. In response to chemical signals from developing tissues they create the capillary structures that will respond to the new needs of nutrition and excretion. This is a transient process that is closely regulated by a tight balance between positive (angiogenesis-stimulating factors) and negative (angiogenesis inhibitors) regulatory molecules. The new sprouts formed by endothelial cells are stabilized by perivascular cells (pericytes and smooth muscle cells), giving maturity and functionality to the new vascular structures, which form a hierarchical network that will be shaped according to metabolic requirements of organs and tissues.

Despite angiogenesis is a continuous process, it can be divided into an ordered series of discrete processes. Firstly, endothelial activation occurs: a set of signals from the endothelial angiogenic environment, often soluble ligands, diffuse and activate specific receptors in endothelial cells causing a cascade of intracellular signals that promote gene expression changes leading to the activation of the angiogenic phenotype by the endothelial cell. Then, extracellular matrix degradation and remodelling occurs: the activated endothelial cells produce enzymes that enable them to degrade the basal membrane, detaching the adhered pericytes and starting the invasion of adjacent extracellular matrix, and facilitating their directional migration toward the source of stimulus. Afterwards, endothelial cells escape from the vessel wall, change their shape, proliferate, and migrate guided by a gradient of proangiogenic factors, forming the initial structure of the new blood vessels. Finally, vascular stabilization occurs: endothelial cells organize themselves to form tubes, secrete a new basal lamina and recruit new parietal cells that stabilize newly formed vessels.

In adults, with the exceptions that have been previously mentioned, the vasculature remains quiescent. A delicate local balance between endogenous activators and inhibitors maintains this quiescence. However, when an excess of angiogenic growth factors occurs, the balance tilts in favour of the formation of

new blood vessels. This concept leads to the notion of the “angiogenic switch”, controlling the formation of new blood vessels in a healthy body through regulation of a series of "on" and "off" signals.

In 1971, Folkman suggested that the growth of malignant tumours depends on the angiogenic process. Since then, extensive research focused on studying the role of different angiogenic factors, their receptors, and their molecular pathogenesis in cancer. Currently, it is widely acknowledged that angiogenesis plays a role in tumor progression, invasion and metastasis, being considered one of the hallmarks of cancer. For a solid tumor to grow beyond a critical size of 1-2 mm in diameter, the "angiogenic switch" has to be turned on, inducing the continuous formation of new blood vessels and allowing the tumour to reach a state of exponential, invasive and metastatic growth.

Natural products, organic compounds produced by living organisms, are a valuable source of novel leads for the development of new drugs and play an important role to elucidate complex cellular mechanisms, leading to the identification of important targets for therapeutic intervention. Our group is actively involved in the identification of new modulators of angiogenesis from natural sources and in the study of their specific effects on the different steps of the angiogenic process. By means of primary and secondary screening assays, those natural products exhibiting relevant anti-angiogenic activities *in vitro* and *in vivo* are selected and further characterized in deep. As a source of compounds for this screening, either marine natural products, supplied by a partner company, or compounds from the diet and from the traditional Mediterranean pharmacopeia are used.

Throughout this thesis three compounds have been studied. First, ursolic acid, a pentacyclic triterpenoid, found in many medicinal plants and present in human diet, with pleiotropic biological effects including antibacterial, hepatoprotective, immunomodulatory, antiproliferative, anti-inflammatory and antitumor activities. Secondly, aloe-emodin, a hydroxyanthraquinone found in Aloe vera, as well as in leaves and roots of other plants, which has been shown to have antitumor effects in different types of cancer. And thirdly, kahweol, an anti-oxidant diterpene present in roasted coffee that remains in considerable amounts when coffee beverages are consumed unfiltered, showing anti-oxidant, anti-tumoral, chemoprotective and anti-inflammatory effects.

From this thesis four research papers and one book chapter, recently accepted for publication, have been generated. Their results and conclusions are showed below.

In the first research paper, entitled “Effects of Ursolic Acid on Different Steps of the Angiogenic Process”, *in vivo* assays to confirm the inhibitory effect of ursolic acid on the chicken chorioallantoic membrane neovascularization were carried out. Moreover, we started a set of *in vitro* experiments to identify the key steps of

the angiogenic process that could be the target of this compound. These trials included the analysis of the effect of ursolic acid on endothelial cell proliferation, extracellular matrix degradation, migration, invasion, and differentiation into a network of tubule-like structures. Our results show that ursolic acid has an inhibitory effect on angiogenesis *in vivo*, being able to inhibit key steps of angiogenesis *in vitro*, including endothelial cell proliferation, migration and differentiation into tube-like structures. The fact that at the same time it seems to stimulate other key stages of angiogenesis process, such as extracellular matrix degradation by MMP-2 and urokinase forces us to be cautious concerning the anti-angiogenic potential of ursolic acid.

In the second paper, entitled “Evaluation of the Anti-Angiogenic Effect of Aloe-Emodin”, aloe-emodin was evaluated as a new potential anti-angiogenic natural product. For this purpose an *in vivo* and different *in vitro* assays were carried out, to study its effects on endothelial cell proliferation, ECM remodelling potential, migration, invasion and differentiation to form tubule-like structures, which allowed to check their effects on endothelial cell proliferation, extracellular matrix remodelling, migration, invasion, and tubulogenesis. The differences observed between the effects of aloe-emodin on endothelial versus tumor cells open a window for its potential therapeutical application as either an anti-angiogenic or an anti-tumor drug. On the other hand, aloe-emodin photoexcitability and its demonstrated photocytotoxic effects on tumor cells suggest that aloe-emodin is a potential candidate drug for photodynamic therapy.

In the third paper, entitled “Anti-Angiogenic and anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene”, the effects of kahweol on two *in vivo* and one *ex vivo* model of angiogenesis and on several key steps of the process were described. They included its effects on endothelial cell “differentiation” to yield tubular-like structures, endothelial and tumor cell proliferation, apoptosis, and migration, as well as its effects on extracellular matrix remodelling enzyme activities of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). The kahweol anti-inflammatory potential through cyclooxygenase-2 (COX-2) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) was also investigated. Those data indicate that, indeed, kahweol behaves as an anti-inflammatory and anti-angiogenic compound, reinforcing its potential application for antitumor therapy. Furthermore, our data are consistent with the recent epidemiological meta-analysis showing that coffee consumption may reduce the risk of certain cancers.

In the fourth paper, entitled “Insights on the Antitumor Effects of Kahweol on Human Breast Cancer: Decreased Survival and Increased Production of Reactive Oxygen Species and Cytotoxicity”, different assays were carried out to evaluate the possible effects and selectivity of kahweol on cell proliferation and survival using a panel of different tumor cells: human leukaemia cells (HL-60), colon adenocarcinoma cells (HT-29), fibrosarcoma cells (HT-1080), hepatoma cells

ABSTRACT

(HepG2), estrogen receptor-positive (ZR75-1 and MCF-7) and estrogen receptor-negative breast cancer cells (MDA-MB-231). Our results showed that kahweol is able to inhibit the growth of several kinds of human tumor cells, decreasing their proliferation rates and clonogenicity and inducing apoptosis. The anti-tumor effect of kahweol was particularly relevant in the estrogen receptor-negative breast cancer cell line MDA-MB-231, in which it induced activation of the intrinsic apoptosis pathway. Furthermore, we showed that kahweol increases the production of reactive oxygen species and their cytotoxicity in breast cancer cells but not in normal cells.

Furthermore, a book chapter was published under the heading “Kahweol, a Coffee Diterpene with anti-Inflammatory Properties” in the book “Coffee in Health and Disease Prevention” (Elsevier, Victor Preedy, 2014, London). In this chapter, the current state of knowledge about anti-inflammatory properties of kahweol was reviewed in depth.

AGRADECIMIENTOS

Vayan por delante mis agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que han puesto la voluntad y han facilitado los medios necesarios para que los trabajos incluidos en esta tesis pudiesen llegar a buen término.

Tenía razón Goethe cuando dijo que “el destino nos concede nuestros deseos, pero sólo para poder darnos algo que está por encima de ellos”. Mi deseo fue realizar esta tesis, pero los principales “resultados y conclusiones” no están recogidos en su interior.

En primer lugar debo agradecer a Miguel Ángel y Ana, mis tutores y amigos, su confianza y generosidad. Ellos me ofrecieron su amistad y se comprometieron en la ardua tarea de iniciarme en la carrera científica con rigurosidad y entusiasmo.

Gracias a todos los compañeros del departamento, a los que están y a los que han ido pasando por él a lo largo de todos estos años (Salva, Betty, Gianni, Esther, Meli, Mariavi, Javi, Auxi, ...), siempre que he recurrido a ellos he obtenido la mejor respuesta y, de una manera u otra, han contribuido al desarrollo de esta tesis.

Agradezco al profesor Ramón Muñoz-Chápuli y a su grupo, especialmente a Rita, Juan Antonio y Elena, su ayuda con las CAM y la inmunohistoquímica.

Agradezco al profesor Manuel Marí Beffa, su aportación en los ensayos con pez cebra.

Gracias a Sarah Berndt y Guy Roland por instruirme en los ensayos de anillo aórtico durante mi corta estancia en la Universidad de Lieja.

Gracias al profesor Gunnar Pejler y a su grupo por acogerme durante tres fantásticos meses en Uppsala y especialmente a Gianni por su amistad e insuperable hospitalidad.

Gracias a mis compañeros del SCAI: Sergio, Eli, Valle, Laura, Augusto, Pedro, Marisa, Rocío, Lourdes..., de los que siempre he recibido apoyo y cariño. A David y Reme por su ayuda y disposición siempre que los he necesitado. Sin olvidar a Teo, que me facilitó desde la dirección la realización de mi licenciatura y mi posterior formación predoctoral.

Y, por supuesto, gracias a mi amada Eva y a mis hijos, Abel y Elías, por su paciencia y apoyo y por saber sufrir sin queja los “daños colaterales” de esta tesis.

ABREVIATURAS

ADAM: *A Disintegrin And Metalloproteinase domain.*

ADAMTS: *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs.*

Akt: el nombre de esta proteína no hace referencia a su función. También es conocida como PKB (*Protein Kinase B*).

Ang: angiopoyetina.

CCL2: *Chemokine (C-C) motif Ligand 2.* También conocido como MCP-1.

CCR2: *C-C chemokine Receptor type 2.* Es el receptor de CCL2 (o MCP-1)

CE: célula endotelial.

COX-2: *Cyclooxygenase-2.* Ciclooxygenasa-2

EGF: *Epidermal Growth Factor.* Factor de crecimiento epidérmico.

Erk: *Extracellular signal-regulated kinases.* Quinasas reguladas por señales extracelulares.

FGF: *Fibroblast Growth Factor.* Factor de crecimiento de fibroblastos.

EGFL7: *Epidermal Growth Factor-Like domain-containing protein 7.* También conocida como VE-estatina (*Vascular Endothelial-statin*)

FIGF: *c-Fos-Induced Growth Factor.* Factor de crecimiento inducido por c-Fos, más conocido como VEGF-D.

Flk-1: *Fetal liver kinase-1.* Sinónimo de KDR y VEGFR-2.

Flt-1: *Fms-like tyrosil kinase-1.* Sinónimo de VEGFR-1.

Flt-4: *Fms-like tyrosil kinase-4.* Sinónimo de VEGFR-3.

HGF: *Hepatocyte Growth Factor.* Factor de crecimiento de hepatocitos.

HIF: *Hypoxia-Inducible Factor.* Factor inducible por hipoxia.

IL: interleuquina.

KDR: *Kinase Domain containing Receptor.* Sinónimo de Flk-1 y de VEGFR-2.

MAC: moléculas de adhesión celular.

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases.* Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MCP-1: *Monocyte Chemotactic Protein-1.* Proteína quimioatrayente de monocitos.

MEC: matriz extracelular.

MMPs: *Matrix Metalloproteinases*. Metaloproteinasas de matriz extracelular.

MT-MMPs: *Membrane-Type MMPs*. MMPs de membrana.

PAI: *Plasminogen-Activator Inhibitor*. Inhibidor del activador del plasminógeno.

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PECAM-1: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*. Molécula de adhesión de CEs y plaquetarias, también conocida como CD31 (*cluster of differentiation 31*).

PEDF: *Pigment Epithelium-Derived Factor*. Factor derivado del epitelio pigmentario.

PGE2: prostaglandina E2.

PEX: dominio c-terminal no catalítico hemopexina-c de la MMP-2.

PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*.

PIGF: *Placental Growth Factor*. Factor de crecimiento placentario.

RECK: *Reversión-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*.

SDF: *Stromal cell-Derived Factor*. Factor derivado de células estromáticas

TAMs: *Tumor-Associated Macrophages*. Macrófagos asociados al tumor.

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* . Factor de crecimiento transformante beta.

TIMPs: *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*. inhibidores tisulares de metaloproteinasas.

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α* . Factor de necrosis tumoral alfa.

tPA: *tissue Plasminogen Activator*. Activador tisular del plasminógeno.

TSP: trombospondina.

uPA: *urokinase-type Plasminogen Activator*. Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

uPAR: receptor de uPA.

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

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

VPF: *Vascular Permeability Factor*. Factor de permeabilidad vascular, más conocido como VEGF-A.

vWF: *von Willebrand Factor*. Factor de von Willebrand.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. El término “angiogénesis” fue usado por primera vez por John Hunter a finales del siglo XVIII para describir el desarrollo de las nuevas estructuras vasculares que aparecían durante el crecimiento de las astas de reno^[1], pero no fue hasta un siglo y medio más tarde, en 1935, cuando Arthur Tremain Hertig, estudiando el desarrollo de la placenta en simios, describió de nuevo el proceso angiogénico^[2]. Sin embargo, el interés en este campo no comenzó a crecer hasta que Judah Folkman, el verdadero pionero de la angiogénesis, propusiera por primera vez en 1971 en el *New England Journal of Medicine* la idea de la angiogénesis tumoral^[3]. Esta idea, aunque tardó casi una década en ser ampliamente aceptada por la comunidad científica, fue creciendo de manera exponencial hasta nuestros días, en los que el uso de inhibidores de angiogénesis constituye una práctica clínica diaria en las terapias del cáncer y otras enfermedades.

1. Fisiología de la angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fisiológico natural que se pone en marcha frente a la demanda de nutrientes y oxígeno por parte de los tejidos que se encuentran en desarrollo, tanto en la etapa embrionaria como en el organismo adulto. Dado que la formación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para el crecimiento de los órganos durante el desarrollo embrionario, es durante esta etapa cuando existe una mayor actividad angiogénica, mientras que en la etapa adulta la angiogénesis se ve limitada únicamente a procesos muy concretos relacionados con el ciclo reproductivo femenino y con la reparación de tejidos.

Durante la angiogénesis, las células endoteliales (CEs), responsables de la formación de los nuevos vasos sanguíneos, responden a las señales químicas procedentes de los tejidos en desarrollo creando estructuras capilares que darán respuesta a las nuevas necesidades de nutrición y excreción^[4]. Este es un proceso transitorio estrechamente regulado por moléculas activadoras e inhibidoras, de forma que cuando estas señales cesan el proceso se detiene. Los nuevos brotes capilares formados por las CEs son estabilizados por células parietales (pericitos y células musculares lisas), un proceso que da madurez y funcionalidad a las nuevas estructuras vasculares, las cuales formarán una red jerarquizada que se modelará en base a los requerimientos metabólicos de los órganos y tejidos que van a abastecer^[5].

De forma paralela a la angiogénesis se produce la *linfangiogénesis*, un proceso similar donde CEs del endotelio linfático preexistente, en respuesta a señales de crecimiento, proliferan, migran y forman finas estructuras vasculares^[6] que se encargarán de canalizar el líquido intersticial extravasado, las macromoléculas, los linfocitos y las células presentadoras de antígenos hacia los ganglios linfáticos y, finalmente, hacia la circulación general^[7,8]. A diferencia de las CEs de los vasos sanguíneos, las CEs linfáticas están poco recubiertas de pericitos y células musculares lisas y se asientan sobre una lámina basal incompleta^[9].

Para que la angiogénesis ocurra es necesario un lecho vascular previo sobre el que se originen los brotes vasculares. La formación de ese patrón vascular primitivo ocurre a lo largo del desarrollo embrionario a través de un proceso llamado *vasculogénesis*, durante el cual los precursores endoteliales (angioblastos), derivados del mesodermo embrionario, se reúnen para formar nuevos vasos sanguíneos que más tarde se extenderán mediante angiogénesis^[10]. A pesar de ello, la angiogénesis adulta puede llevar apareada el reclutamiento de progenitores endoteliales circulantes que entran a formar parte de la pared vascular en un proceso conocido como *vasculogénesis del adulto*^[11,12].

La confirmación por el grupo de Folkman de la hipótesis de que la eliminación de un estímulo angiogénico conduce a una regresión en la neovascularización^[13] permitió dilucidar que, a pesar de que la angiogénesis es un proceso continuo, puede ser dividida en una serie ordenada de subprocesos discretos que pueden ser tratados de forma independiente. A continuación se describen las diferentes etapas de esa secuencia de eventos en cascada que conducen a la formación de los nuevos vasos sanguíneos (figura 1).

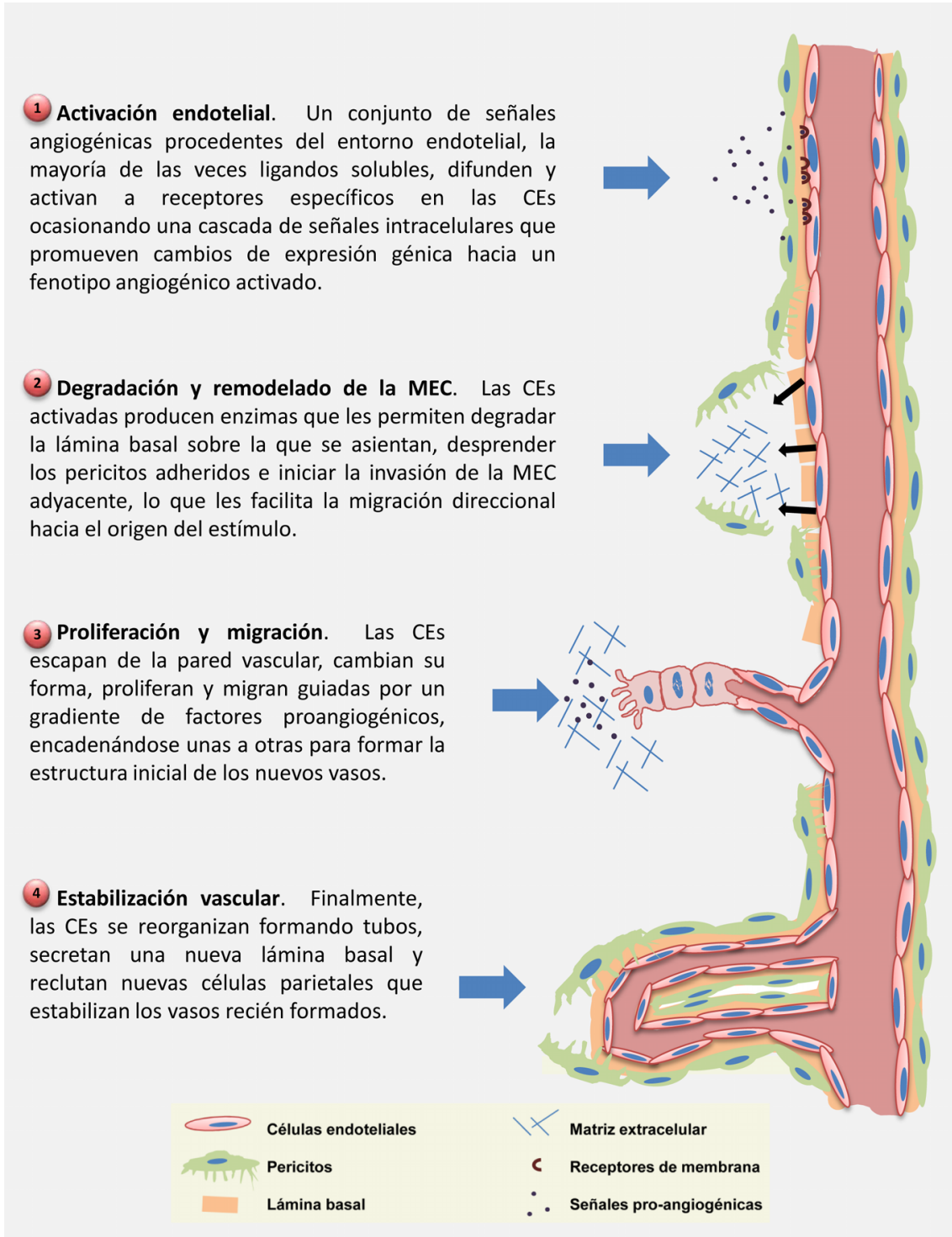


Figura 1. La cascada angiogénica: secuencia de eventos que conducen a la formación de los nuevos vasos sanguíneos.

1.1 Activación endotelial

El término “activación endotelial” describe una serie de cambios celulares y moleculares que conducen a las CE a iniciar la respuesta angiogénica.

1.1.1 La iniciación por hipoxia

La angiogénesis se origina en el contexto de una demanda de oxígeno y nutrientes por parte de áreas localizadas en las proximidades de los vasos. De hecho, el descenso de los niveles de oxígeno en los tejidos próximos (hipoxia) es el principal desencadenante de la activación del programa angiogénico. De esta forma, la hipoxia activa la transcripción de diferentes genes diana que ponen en marcha la producción de factores proangiogénicos, como los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGFs) y las citoquinas^[14,15], encendiendo el denominado “interruptor angiogénico”.

El principal regulador de la respuesta celular a hipoxia es el factor de transcripción HIF-1 (factor inducible por hipoxia), una proteína heterodimérica formada por una subunidad dependiente de oxígeno (HIF-1 α) y otra subunidad de localización nuclear expresada constitutivamente en la célula (HIF-1 β). En condiciones de normoxia la concentración de HIF-1 α se mantiene muy baja, debido principalmente a que tras su síntesis es rápidamente degradado; sin embargo, cuando los niveles de oxígeno descienden HIF-1 α se acumula, se trasloca al núcleo y se une a HIF-1 β , activando la transcripción de diferentes genes diana. Los niveles de expresión de HIF-1 α están finamente regulados mediante el control de su síntesis y degradación: el HIF-1 α sintetizado *de novo* en el citoplasma posee un dominio de degradación dependiente de oxígeno que le hace ser rápidamente señalado para su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma 26S^[16,17]. Además, existen otros mecanismos de regulación dependientes de hipoxia que controlan su traslocación al núcleo o potencian su unión al promotor^[18].

1.1.2 Factores de crecimiento angiogénico.

Los VEGFs y sus receptores

En 1983 Harold Dvorac y colaboradores descubrieron un potente factor angiogénico que denominaron factor de permeabilidad vascular (VPF), el cual propusieron como responsable de la permeabilidad de los vasos sanguíneos en la angiogénesis tumoral^[19]. Más tarde, en 1989, tres grupos, de manera independiente, retomaron la investigación en este campo. El mismo año Napoleone Ferrara purificó una nueva proteína angiogénica que denominó factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la cual mostró promover el crecimiento específico de las CE^[20]. Bastó apenas un año para hacerse evidente que VPF y VEGF eran la misma proteína^[21]. Actualmente se han identificado unos veinte

factores de crecimiento angiogénico diferentes, de los cuales los más conocidos y estudiados son los de la familia de los VEGFs.

Los VEGFs humanos son una familia de cinco polipéptidos secretados, con una estructura altamente conservada de puentes de cistina de unión a receptor similares a los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF). La familia de los VEGFs humanos incluye el VEGF-A (el miembro prototipo), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (también conocido como factor de crecimiento inducido por c-Fos, FIGF) y el factor de crecimiento placentario (PlGF)^[22,23]. Además, mediante corte y empalme alternativo, se generan diferentes isoformas de VEGF-A, VEGF-B y PlGF^[24]. El gen *VEGF-A* contiene 8 exones y 7 intrones y el corte y empalme alternativo de su pre-mRNA produce 9 isoformas diferentes, de las cuales el VEGF₁₆₅ es la isoforma predominante y biológicamente más activa^[25,26]. Por otro lado, el gen *VEGF-A* contiene elementos potenciadores de la respuesta a hipoxia (HREs) en su 5' y 3' UTRs que sirven para su regulación transcripcional mediante la unión de HIF-1^[27].

Existen tres receptores tirosín-quinasa que median la respuesta celular de todos los miembros de la familia VEGF: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3^[28].

El VEGFR-1, también llamado Flt-1 (del inglés: Fms-like tyrosil kinase-1), une a VEGF-A, VEGF-B y PlGF^[29]; pero, a pesar de su fuerte afinidad por VEGF-A, su actividad tirosín-quinasa es muy reducida y su activación no produce respuestas biológicas vigorosas^[30], por lo que se piensa que puede actuar como “receptor señuelo” secuestrando el ligando y regulando negativamente la unión al VEGFR-2. Además, mediante corte y empalme alternativo del *VEGFR-1*, se produce la forma soluble sVEGFR-1 que se une al VEGF-A, inhibiendo de esta forma su función^[31].

El VEGFR-2 (KDR/Flk-1, del inglés: Kinase Domain containing Receptor/Fetal liver kinase-1) une a VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D y a pesar de que su afinidad por el VEGF-A es bastante más baja que la del VEGFR-1, su actividad tirosín-quinasa es mucho más elevada, siendo el mediador más importante en la señalización angiogénica^[32]. Cuando VEGFR-2 es activado, estimula la supervivencia, la proliferación, la migración y la permeabilidad vascular de las CE, además de otros procesos que promueven la angiogénesis, a través de diferentes vías de señalización. Entre estas vías, tienen especial relevancia: por un lado, la que une a la fosfolipasa C γ activando la cascada PKC-Raf-MEK-Erk, que conduce a la síntesis de DNA; y por otro lado, la que activa la vía de señalización de PI3K y sus efectores corriente abajo, Akt y MAPK p38, implicados en la supervivencia y la proliferación celular^[33].

Además, hay que considerar que los diferentes ligandos de los VEGFRs pueden inducir distintas conformaciones del dominio intracelular del receptor, provocando modos distintos de asociación de las moléculas adaptadoras con sus consecuentes efectos en la transmisión de la señal. A esto se une que puede existir

un “cross-talk” entre los receptores debido a sinergias entre los ligandos específicos de VEGFR-1 y VEGFR-2^[34].

El VEGFR-3 (Flt-4) se expresa específicamente en la superficie de las células endoteliales linfáticas^[35], une a VEGF-C y VEGF-D y tiene un importante papel en el desarrollo del sistema vascular embrionario y más tarde en la linfangiogénesis adulta^[36]. Además, de igual modo que ocurre con *VEGFR-1*, el gen *VEGFR-2* también produce una isoforma soluble, sVEGFR-2, la cual posee gran afinidad por VEGF-C, ejerciendo un efecto antagonista de la linfangiogénesis mediante el secuestro de este ligando^[37,38].

Además, la unión a los VEGFRs es modulada por diferentes correceptores. Entre ellos, adquieren especial importancia las glicoproteínas de membrana neuropilina-1 (Nrp-1) y neuropilina-2 (Nrp-2)^[39]. Ambas proteínas actúan como correceptores no-quinasa de los VEGFs, cooperando además con receptores de otros factores de crecimiento, como c-Met y TGFR, lo cual las ha convertido en nuevas dianas potenciales para la terapia antiangiogénica^[40].

Otros factores de crecimiento angiogénico

Aunque la familia de los VEGFs constituye el grupo más relevante de moléculas bioseñalizadoras del endotelio vascular, existen otros factores de crecimiento angiogénico que desempeñan un papel no menos importante. Algunos de ellos, sus dianas en las CEs y sus efectos sobre la angiogénesis se presentan en la tabla 1.

| Factor de crecimiento | Receptor en las CEs | Efectos sobre las CEs^[41,42] |
|------------------------------|----------------------------|--|
| Ang-1 | Tie-2 | Estabiliza el endotelio inhibiendo la permeabilidad vascular. |
| Ang-2 | Tie-2 | Desestabiliza el endotelio favoreciendo la adquisición del fenotipo invasivo y la formación de nuevos brotes vasculares. |
| Angiogenina | - | Estimula la proliferación, migración, invasión y morfogénesis capilar ^[43] . |
| EGF | - | Induce la expresión de FGF-BP (proteína de unión a FGF), un activador de FGF-1 y FGF-2. |
| FGF-1, FGF-2 | FGFR-1-4 | Estimulan la proliferación, diferenciación, tienen efectos quimiotácticos e inhiben la apoptosis. |
| HGF | c-Met | Estimula la proliferación, migración, capacidad invasiva y morfogénesis capilar. |
| IL-1, IL-15, IL-16 | - | Efecto indirecto sobre las CEs induciendo VEGF en diferentes tipos celulares. |
| IL-8 | CXCR2 | Induce proliferación y migración. |
| IL-13 | - | Efecto quimiotáctico. |
| PDGF | - | Efecto quimiotáctico. Participa en la angiogénesis fisiológica del endometrio. |
| PLGF | VEGFR-1 | Participa en la angiogénesis placentaria. |
| SDF-1 | CXCR4 | Estimula proliferación, migración y diferenciación en tubos ^[44] . |
| TGF- β | - | Efecto angiogénico indirecto como quimioatrayente de células inflamatorias productoras de factores angiogénicos. |
| TNF- α | - | Estimula la respuesta inflamatoria promoviendo intensamente la angiogénesis de forma indirecta. |

Tabla 1. Resumen de algunos de los factores de crecimiento angiogénico más importantes, con sus dianas sobre las CEs y sus efectos más relevantes sobre la angiogénesis.

1.1.3 Inhibidores endógenos de la angiogénesis

Una angiogénesis mantenida y persistente en el tiempo derivaría inevitablemente en un proceso patológico grave. Por ello, la angiogénesis fisiológica debe estar finamente regulada desde su iniciación, durante su desarrollo y hasta la estabilización y maduración de los nuevos vasos. Para ello es necesario que existan moléculas inhibitoras de origen endógeno que mantengan un perfecto balance frente a los factores de crecimiento angiogénico.

Hasta ahora se han descrito al menos treinta proteínas o moléculas pequeñas que funcionan como inhibidores endógenos de la angiogénesis. Muchos de ellos son moléculas que se encuentran almacenadas y ancladas a la matriz extracelular (MEC) o fragmentos de grandes moléculas de la MEC que son liberados mediante proteólisis (matriquinas); el resto son un grupo heterogéneo de metabolitos de hormonas, factores de coagulación y proteínas del sistema inmune^[45]. En la tabla 2 se muestran algunos de los inhibidores endógenos más relevantes.

| Derivados de la MEC | Factores de coagulación | Otros |
|---------------------|---|-------------------|
| Arrestina | Angiostatina | 2-Metoxiestradiol |
| Canstatina | Antitrobina III | Condromodulina |
| Endorrepelina | Protrombina | PEX |
| Endostatina | Factor plaquetario-4 | Prolactina |
| Fibronectina | Factores de crecimiento y citoquinas | sFLT-1 |
| Fibulina | Interferones | TIMPs |
| TSP-1 y -2 | Interleuquinas | Troponina I |
| Tumstatina | PEDF | Vasostatina |

Tabla 2. Resumen de los inhibidores endógenos de la angiogénesis más relevantes, agrupados según su origen.

1.2 Degradación y remodelado de la matriz extracelular

Una vez iniciado el programa angiogénico, uno de los primeros eventos que acontece es la degradación de la lámina basal y de la MEC adyacente. La degradación de la MEC es un proceso clave que debe ser dirigido exquisitamente ya que implica la regulación de una complicada red de interacciones entre enzimas proteolíticas y factores inhibidores. Además, la MEC no es simplemente un andamiaje extracelular sino que actúa como un reservorio de moléculas biológicamente activas, como factores de crecimiento y citoquinas, las cuales participarán activamente durante el desarrollo de este complejo proceso^[46,47].

1.2.1 Metaloproteinasas de matriz extracelular.

Entre las proteasas que juegan un papel más importante en la degradación de la MEC durante la angiogénesis se encuentran las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), una amplia familia de endopeptidasas dependientes de zinc. Hasta la fecha han sido identificadas al menos 26 MMPs diferentes en vertebrados, de las cuales 23 se encuentran en humanos^[48].

La familia de las MMPs se puede dividir en dos grupos: MMPs solubles y MMPs de membrana^[49]. A su vez, su clasificación se suele realizar en base a su especificidad de sustrato, su similitud de secuencias y a la organización de sus dominios.

Dentro de las MMPs solubles, el grupo de las gelatinasas (las MMPs que digieren gelatina, colágeno desnaturalizado) requiere una especial atención ya que juegan un papel clave en la regulación de la angiogénesis. A este grupo pertenecen: la gelatinasa-A o MMP-2 (72 KDa) y la gelatinasa-B o MMP-9 (92 KDa)^[50].

La estructura básica de las MMPs consta de un “dominio mínimo MMP” formado por: 1- un dominio catalítico, que contiene el sitio de unión a Zn^{2+} , unido por tres moléculas de histidina, altamente conservadas; y 2- un propéptido, crucial para la regulación de las MMPs, que posee un residuo de cisteína cuyo grupo sulfhidrilo coordina con el Zn^{2+} en la hendidura del sitio activo impidiendo su actividad proteolítica (“interruptor de cisteína”), manteniendo a la pro-MMP en una forma latente (zimógeno). La rotura de esta unión cisteína-zinc es el primer paso que ocurre en la activación de las MMPs. Todas las MMPs (con la excepción de MMP-23), muestran además una región “bisagra” rica en prolina que une el dominio catalítico a un dominio hemopexina (PEX) C-terminal. El dominio PEX está formado por un plegamiento tipo “hoja β de cuatro palas” que influye en la especificidad de sustrato y en la unión a inhibidores titulares. Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 contienen además tres repeticiones de dominios fibronectina tipo II insertados en el dominio catalítico, los cuales permiten la unión a gelatina, colágeno y laminina^[51,52].

Por otro lado, algunas MMPs pueden actuar de forma cooperativa: las colagenasas MMP-1 y MMP-8 degradan las triples hélices fibrilares de colágeno, resultando fragmentos con la conformación en triple hélice desplegada, y las cadenas de colágeno α así formadas serán más tarde degradadas en oligopéptidos por las gelatinasas menos específicas (MMP-2 y MMP-9)^[53].

1.2.2 Regulación de las MMPs

Para que el proceso de remodelado de la MEC se lleve a cabo de forma exitosa, las MMPs deberán estar presentes en el momento justo, en el lugar adecuado y bajo la forma inhibida o activada apropiada. Para que esto ocurra, su regulación ha de ser muy precisa, lo cual se consigue por diferentes mecanismos, entre los que se incluyen: mecanismos de control transcripcional y postranscripcional, mecanismos de compartimentación celular, activación del zimógeno mediante activadores proteolíticos e inhibición mediante inhibidores endógenos^[54].

Activación de las MMPs

Excepto las MMPs activadas intracelularmente mediante furín-proteasas, la mayoría de MMPs son secretadas como zimógenos inactivos que deben ser activados en el espacio extracelular mediante el corte proteolítico del dominio N-terminal del propéptido, lo cual requiere de la acción de otras MMPs u otra clase de proteinasas que con frecuencia conducen a un complejo proceso en cascada.

Activación por MMPs de membrana:

Probablemente, la MMP-2 sea una de las metaloproteinasas determinantes para la adquisición del fenotipo angiogénico^[55]. La pro-MMP-2 no es activada mediante el mecanismo general de las proteasas sino que su activación se produce en la superficie celular mediante la acción de la mayoría de las MT-MMPs (MMPs de membrana), con la excepción de la MT4-MMP .

La activación de la pro-MMP-2 mediada por MT1-MMP ha sido ampliamente estudiada. Para que la activación ocurra se requiere la presencia de TIMP-2 (inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 2). La pro-MMP-2 forma un complejo con TIMP-2 a través de su dominio C-terminal, esto permite que el dominio inhibidor N-terminal de TIMP-2 se una a la MT1-MMP en la superficie celular. La pro-MMP-2 unida a la superficie celular es entonces activada por una MT1-MMP que se encuentra libre de TIMP-2^[56].

Activación por plasmina:

La plasmina es una potente serín-proteasa similar a la tripsina, que activa los precursores de las MMPs, iniciando así una cascada de degradación proteolítica. La plasmina se genera a partir de una proteína inactiva, el plasminógeno, mediante la acción del activador tisular del plasminógeno (tPA) unido a fibrina y del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), otra serín-proteasa que se une a un receptor de membrana celular específico (uPAR). El uPAR se encuentra unido a la membrana celular mediante un anclaje GPI que le proporciona la movilidad suficiente para concentrar su actividad en lugares concretos, encargándose de la fijación y activación del uPA, que es secretado al medio en forma inactiva (pro-uPA). De ese modo, tanto el plasminógeno como el uPA quedan asociados a membrana, creando una activación localizada de las pro-MMPs y en consecuencia un remodelado localizado de la MEC^[57,58].

Por esta vía se ha descrito la activación de muchas pro-MMPs, entre ellas la pro-MMP-9. Además, las MMPs activadas pueden participar en el procesamiento de otras MMPs (p.e., la MMP-3 activada puede activar sucesivamente a otra pro-MMP-1 y a la pro-MMP-9)^[51].

Por otro lado, los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI) intervienen impidiendo la conversión del plasminógeno en plasmina, inhibiendo de esta forma la activación de las MMPs. Los PAI pertenecen al grupo de las

serpinas (acrónimo de serine protease inhibitors), siendo los más importantes: PAI-1 y PAI-2, los cuales inhiben irreversiblemente la actividad proteasa^[58].

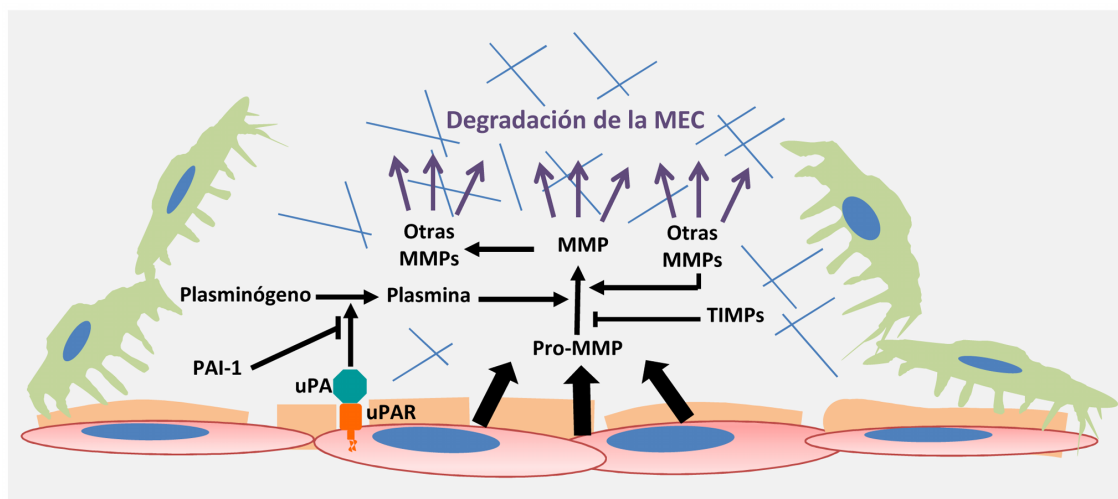


Figura 2: Representación esquemática del sistema uPA-plasmina-MMPs.

Además, el sistema uPA-plasmina-MMPs juega un papel primordial en la regulación de la activación del VEGF-A. Todas las isoformas de VEGF-A son proteínas secretadas; las isoformas más abundantes, VEGF-A₁₆₅ y VEGF-A₁₂₁, carecen de los residuos responsables de la capacidad de unión a heparina y son secretadas como homodímeros unidos covalentemente, mientras que otras isoformas de mayor tamaño no son tan fácilmente difusibles y además poseen residuos que le permiten quedar unidas a la membrana celular o secuestradas en la MEC^[59]. La liberación proteolítica de estos VEGFs es mediada por la plasmina^[60], el uPA^[61] y MMPs^[62].

Inhibidores endógenos de las MMPs

Inhibidores tisulares de las MMPs:

La actividad de las MMPs está fuertemente controlada por inhibidores endógenos como la α_2 -macroglobulina plasmática, una globulina sérica producida en el hígado, inhibidora general de endopeptidasas (serina-, cisteína-, aspártico- y metalo-proteasas)^[63]. Sin embargo, existen inhibidores endógenos específicos de las MMPs: los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs). Hasta la fecha, se han identificado cuatro tipos de TIMPs en vertebrados (TIMP-1, -2, -3 y -4), con diferente capacidad inhibidora frente a las distintas MMPs^[64].

Por otro lado, los TIMPs juegan un papel importante en otras funciones biológicas, independientemente de su actividad inhibidora de las MMPs. Se ha comprobado que los TIMPs pueden intervenir en la modulación del crecimiento celular y la supervivencia, actuando posiblemente a través de receptores de TIMP aún sin identificar^[65].

RECK:

Otra proteína con actividad inhibidora de MMPs es RECK (REversión-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs), una glicoproteína de membrana con anclaje GPI ampliamente expresada en tejidos humanos. A diferencia de lo que ocurre con los TIMPs, el anclaje GPI de RECK a la superficie celular le permite acceder a regiones de proteólisis focalizada^[66].

RECK es uno de los inhibidores endógenos de MMPs de descubrimiento más reciente. Se ha descrito como inhibidor de la actividad proteolítica de MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP^[67].

Trombospondinas:

Las trombospondinas son una familia de glicoproteínas multifuncionales de matriz. Se pueden subdividir en dos grupos bien definidos:

- Trombospondinas A, que tienen estructura homotrímica. Comprende a la Trombospondina 1 (TSP-1) y la trombospondina 2 (TSP-2).
- Trombospondinas B, que tienen estructura homopentamérica. A este grupo pertenecen las trombospondinas 3, 4 y 5, también denominadas COMP (cartilage oligomeric protein).

La TSP-1 es producida por plaquetas, endotelio, pericitos y células del sistema inmune; interacciona con numerosas proteasas, como plasminógeno, uroquinasa, trombina, elastasa y varias MMPs. La TSP-1 inhibe la activación de la pro-MMP-2 y la pro-MMP-9, mientras que la TSP-2 forma un complejo con la MMP-2 para potenciar su retirada mediante endocitosis mediada por receptores *scavenger*.

1.2.3 Contribución de las MMPs al proceso angiogénico

El papel de las MMPs es clave durante la angiogénesis, sin embargo su contribución al proceso puede ser tanto potenciador como inhibidor. Una excesiva degradación puede eliminar el soporte y las señales cruciales que las células endoteliales necesitan para la migración; por otro lado, una degradación insuficiente puede impedir que las células vasculares abandonen su nicho original. En la tabla 3 se muestran algunos de los efectos potenciadores e inhibidores de las MMPs sobre la angiogénesis ^[65, 68].

| Efectos potenciadores | Efectos inhibidores |
|---|---|
| Liberan factores de crecimiento angiogénico como VEGF, FGF-2 y TGF- β , secuestrados en la MEC. | Generan inhibidores endógenos, como endostatina, tumstatina, arrestina y canstatina, mediante el corte de ciertas cadenas de colágeno y plasminógeno. |
| Exponen sitios crípticos proangiogénicos de unión a integrinas. | Modulan receptores celulares cortando sus dominios de unión a ligando. |
| Potencian la pérdida de adhesión de los pericitos y regulan las adhesiones CE-célula y CE-MEC. | Algunas MMPs, como la MMP-9 convierten plasminógeno en angiostatina, un inhibidor angiogénico. |

Tabla 3: Resumen de los efectos potenciadores e inhibidores más importantes de las MMPs sobre la angiogénesis.

1.2.4 Otras metaloproteinasas con implicaciones en angiogénesis

Existen dos amplias familias adicionales de metaloproteinasas dependientes de cinc, de las cuales varios de sus miembros tienen importantes implicaciones en la actividad proteolítica periendothelial, las ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase domain) y las ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs).

Las ADAMs forman un grupo en humanos de al menos 25 proteínas, integrales y secretadas, implicadas en diferentes procesos biológicos entre los que se encuentra la angiogénesis^[69]. Las ADAMs unidas a membrana, una vez activadas, pueden cortar fragmentos de proteínas transmembranales próximas, liberando el ectodominio soluble desde la superficie celular^[70]. Este mecanismo no solo resulta en la inactivación de un receptor de membrana sino que la acción de algunas de ellas, como ADAM-10 y ADAM-17, puede generar nuevas moléculas bioactivas o activar receptores específicos implicados en angiogénesis, como Notch y Tie-1^[69]. Además, las ADAMs también pueden interactuar con proteínas de membrana a través de dominios no catalíticos que funcionan como ligandos para integrinas, participando activamente en la modulación de la adhesión célula-MEC^[71].

Un segundo grupo de metaloproteinasas homólogas son las ADAMTS. Se trata de proteínas secretadas que cuentan con 19 miembros en humanos, algunas de ellas con importantes implicaciones en angiogénesis; como la ADAMTS-1, que da lugar a la liberación de un conjunto de péptidos antiangiogénicos a partir de la trombospodina-1 y -2 procedente de la MEC^[72].

1.3 Proliferación y migración

Una vez que el endotelio ha sido activado y se ha puesto en marcha la maquinaria enzimática para degradar la membrana basal, las CEs escapan de la pared vascular, cambian su forma, proliferan y migran guiadas por un gradiente de factores proangiogénicos, encadenándose unas a otras para formar la estructura inicial de los nuevos vasos.

1.3.1 El fenotipo angiogénico

En un brote angiogénico en nacimiento se pueden reconocer tres fenotipos distintos de CEs: las células punta (también conocidas como células *tip*), las células tallo (también conocidas como células *stalk*) y las células falange (conocidas como células *phalanx*)^[73, 74]. Las células *tip* se caracterizan por su posición avanzada, sus largos filopodios y su comportamiento migratorio^[75]. Siguiendo a las células *tip* van las células *stalk*, que son altamente proliferantes, establecen uniones adherentes y estrechas para estabilizar el nuevo brote y forman el lumen del vaso naciente^[76]. Tras las células *stalk* aparecen las células *phalanx*, en contacto íntimo con los pericitos, que las mantienen en un estado estable y quiescente^[74].

Las células *tip* expresan la maquinaria proteolítica específica para la migración e invasión, donde la MT1-MMP juega el papel principal. En los vasos, la expresión de MT1-MMP está inhibida por la interacción pericito-CE, lo cual restringe la expresión de MT1-MMP únicamente a las células más adelantadas del brote, carentes de pericitos^[77]. Por el contrario, la proliferación celular queda confinada a la región *stalk*.

Aparte de las diferencias morfológicas y funcionales, los tres tipos de CEs muestran diferentes perfiles de expresión génica. Actualmente, la mayoría de los esfuerzos se dirigen a descifrar la relevancia funcional de esa expresión diferencial. El fenotipo de los tres tipos celulares es regulado por diferentes factores solubles y vías de señalización intracelular. Diferentes trabajos han ido dejando patente que durante el brote angiogénico las vías de señalización de VEGF y Notch están implicadas en la especialización del endotelio vascular en células *tip* y *stalk*^[78-80].

La distribución espacial en gradiente del VEGF-A regula la forma del brote, dirigiendo la migración de las células *tip* y determinando la proliferación de las células *stalk*^[81]. Bajo el estímulo de VEGF-A, la expresión de Dll4 (*Delta like ligand 4*) aumenta en las células *tip*. A su vez, el ligando Dll4 activa la vía de señalización Notch en las células *stalk* vecinas, suprimiendo el fenotipo de célula *tip*. La activación de la señalización Notch en las células *stalk* reduce la expresión de VEGFR-2 e incrementa los niveles de VEGFR-1 y sVEGFR-1, que actúan como regulador negativo de la formación de nuevas células *tip*^[82]. Por el contrario, la célula *tip* recibe baja señalización Notch, lo que le lleva a una elevada expresión de VEGFR-2 y una baja expresión de VEGFR-1^[83]. La expresión de bajos niveles de

VEGFR-2 conferirán desventaja a las células para ocupar una posición de célula *tip*, mientras que una expresión reducida de VEGFR-1 ofrecerá ventaja para ocupar esa posición^[82] (figura 3).

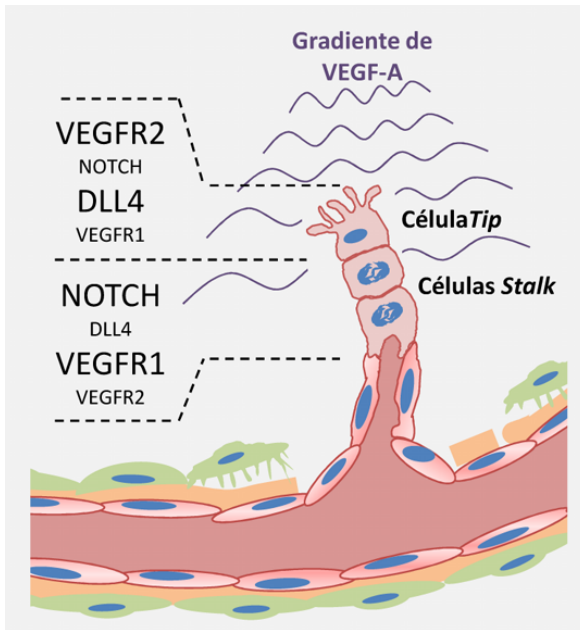


Figura 3. Un gradiente del VEGF-A dirige la migración de las células *tip* y determina la proliferación de las células *stalk*. Las vías de señalización de VEGF y Notch cooperan estrechamente para especificar el fenotipo *tip* y *stalk* en las CEs de los brotes.

De esta forma, las vías de señalización de VEGF y Notch cooperan estrechamente para especificar el fenotipo *tip* y *stalk* en las CEs de los brotes. Bajo el estímulo de VEGF las CEs de los vasos se activan y compiten mediante la vía de señalización Dll4/Notch por obtener la posición avanzada de célula *tip*. La señalización de Notch actúa como retroalimentación negativa sobre la señalización de VEGF, de forma que en esta “batalla por el liderazgo”, la CE que expresa más ligando Dll4 que sus vecinas adquiere el fenotipo *tip*^[84].

Además del gradiente de VEGF-A, existen otras señales que permiten la orientación correcta del brote angiogénico durante la migración. Entre estas señales, que muchas veces son comunes a las que guían a los axones hacia su diana^[85], se encuentran los siguientes ligandos y sus receptores: las semaforinas con sus receptores Nrp (descritas más arriba como correceptores de los VEGFRs); los Slits con sus receptores Robo (se ha encontrado un miembro de la familia de Robo específico de CEs, Robo4)^[86]; y las efrinas, proteínas transmembranales que se unen a sus receptores de tipo tirosín-quinasa Eph (la efrina-B2 y su receptor Eph4 han mostrado ser esenciales para la angiogénesis)^[87].

Por otro lado, la migración es un proceso muy dinámico que incluye la formación de adhesiones focales, la generación de fuerzas de tracción, la retracción celular y la pérdida de adhesión^[88]. Para que todo ello se lleve a cabo de forma correcta es necesaria la participación de un elevado número de elementos, entre los que cabe destacar dos grupos principales de proteínas: las que median la adhesión célula-célula (moléculas de adhesión celular) y las que median la interacción de estas con la MEC (integrinas).

1.3.2 integrinas

Las integrinas son receptores de membrana que pueden unirse a proteínas de la MEC o a otros receptores de adhesión de células vecinas. Además, a pesar de que tienen dominios citoplasmáticos relativamente cortos, juegan un papel muy activo en la detección, integración y distribución de gran número de señales a través de su acoplamiento con elementos del citoesqueleto o con moléculas de señalización intracelular. Estas señales regulan además de la migración otros eventos celulares requeridos para la angiogénesis, gracias a la capacidad que poseen para unirse a numerosos ligandos extracelulares y transmitir señales de una manera bidireccional^[89]. De esta forma, las integrinas no solo pueden regular la expresión y actividad de moléculas proangiogénicas, como factores de crecimiento o sus receptores, sino que además pueden regular factores antiangiogénicos, como fragmentos proteicos procedentes de la MEC^[90].

Las integrinas son receptores con al menos 24 miembros distintos generados por el emparejamiento entre 18 subunidades α y 8 subunidades β que dan lugar a heterodímeros con capacidad de unión a uno o más sustratos^[91]. De esta forma, algunas de ellas se unen a un solo ligando, como la $\alpha_v\beta_5$ que se une a vitronectina, mientras otras, como la $\alpha_v\beta_3$ une vitronectina, fibronectina, vWF, tenascina, osteopontina, fibrilina, fibrinógeno y trombospondina^[92].

Aunque las integrinas son ubicuas en todos los tejidos, existe una expresión diferencial entre los vasos sanguíneos de los brotes angiogénicos y los vasos sanguíneos quiescentes. La integrina $\alpha_v\beta_3$ se expresa en CEs activadas mientras no lo hace en CEs quiescentes^[93], lo cual la ha hecho muy útil como marcador del fenotipo angiogénico y muy atractiva como diana potencial de medicamentos antiangiogénicos. Otras integrinas α_v han mostrado ser particularmente importantes en angiogénesis, mediando diferentes tipos de respuestas celulares, como ocurre con la $\alpha_v\beta_5$ ^[92].

1.3.3 Moléculas de adhesión celular

El otro gran grupo de proteínas implicadas en la migración son las moléculas de adhesión celular (MAC). Existen dos familias principales de MAC, las cadherinas y las tipo inmunoglobulina.

Dentro de la familia de las cadherinas está la VE-cadherina, una proteína transmembrana de adhesión específica del endotelio que por su dominio extracelular interacciona con otras MAC del mismo tipo (unión homofílica), contribuyendo a las uniones célula-célula tipo adherente, mientras que por el dominio intracelular además de interaccionar con el citoesqueleto puede interaccionar también con moléculas señalizadoras e inducir la inhibición por contacto del crecimiento o afectar a la permeabilidad vascular^[94].

Dentro de las MAC tipo inmunoglobulina, la PCAM-1 (molécula de adhesión de CEs y plaquetarias), también conocida como CD31, conforma gran parte de las uniones intercelulares del endotelio vascular, constituyendo también una eficiente molécula señalizadora con diversas implicaciones en el proceso angiogénico^[95].

Por otro lado, merece una mención aparte la glucoproteína transmembrana CD34, que funciona como una molécula de adhesión célula-célula pero que sólo se expresa en las células *tip*^[96], por lo que podría constituir un excelente marcador del frente angiogénico activo.

1.4 Estabilización vascular

Una vez los nuevos vasos sanguíneos han estabilizado el aporte de nutrientes y oxígeno demandado por los tejidos, cesa la proliferación y migración de las CEs, se restauran las uniones intercelulares, se sintetiza nueva lámina basal y MEC, se forma la luz capilar y se produce el reclutamiento de células perivasculares que permite a las CEs volver a su estado quiescente^[97], un proceso conocido como arteriogénesis.

1.4.1 Tubulogénesis

La regulación de la tubulogénesis requiere la coordinación orquestada de múltiples vías de señalización molecular, que incluye a los receptores de superficie celular, a la MEC, a las moléculas de adhesión, al citoesqueleto y al transporte de vesículas^[98].

En cuanto a los receptores de superficie celular, se han descrito diferentes mecanismos implicados en la formación del lumen vascular. Uno de estos mecanismos es la distribución espacial del VEGF-A en torno a los cordones recién formados. La distribución en gradiente del VEGF-A dirige la migración de las células *tip*; pero este gradiente es diferente para cada una de las isoformas de VEGF-A dependiendo de las afinidades de estas por las proteínas de la MEC, de manera que las isoformas más difusibles, como el VGF-A₁₂₀, se pueden ir acumulando de manera no direccional en torno a los cordones de CEs recién formados, induciendo la formación del lumen^[81].

En relación a las moléculas de adhesión, la interacción de determinadas integrinas con la MEC es esencial para la morfogénesis tubular, ya que son el centro regulador de la polaridad y de la formación del lumen. Vital importancia adquieren también las cadherinas, comprometidas en mantener en localizaciones concretas las interacciones entre las células vecinas^[99].

Otro factor de importancia emergente en angiogénesis que, entre otras funciones, se ha identificado como modulador de la tubulogénesis es la proteína EGFL7 (epidermal growth factor-like domain-containing protein 7). La proteína

EGFL7 se expresa únicamente en CEs, tanto de fenotipo *tip* como *stalk*, y aunque su mecanismo de acción no es del todo conocido, se ha visto que una vez secretada se puede unir a la MEC, modulando su rigidez mediante la inhibición de la conversión de tropoelastina en elastina^[100].

1.4.2 Estabilización de los capilares

El brote angiogénico continúa creciendo hasta que las células *tip* de brotes adyacentes contactan, pierden su capacidad migratoria y forman anastomosis^[101]. Una vez restablecida de nuevo la lámina basal y estabilizada la pared vascular, las CEs de los nuevos vasos adquieren el fenotipo *phalanx*^[74].

Los pericitos representan el elemento estabilizador clave de los capilares recién formados^[69]. Existe un intercambio de señales entre las CEs y los pericitos que permite el reclutamiento de estos hacia la pared vascular: las CEs producen PDGF-BB que se une al PDGFR- β en la superficie de los pericitos, induciendo la migración y proliferación de los mismos; mientras que los pericitos liberan Ang-1 que se une al receptor Tie-2 de las CEs, mediando la interacción entre ambos y promoviendo de esa forma el paso a la quiescencia^[54]. Por otro lado, los pericitos contribuyen a la estabilización de los vasos mediante la inhibición de diferentes proteasas (p.e. el TIMP-3 producido por los pericitos inhibe la activación de la MMP-2 dependiente de MT-MMP^[102]).

Por otro lado, la presión y el flujo sanguíneo son dos variables físicas que las células pueden percibir. Una vez establecida la circulación a través de los capilares, las fuerzas hemodinámicas de cizalladura, además de mantener el lumen abierto y regular su diámetro^[103], contribuyen a la estabilización del vaso y a la supervivencia endotelial inhibiendo la apoptosis^[104].

2. La angiogénesis en la salud y la enfermedad

Como se ha comentado en el apartado anterior, la angiogénesis es un proceso natural necesario durante el desarrollo embrionario para expandir los plexos vasculogénicos^[97] y frecuente en la etapa postnatal para llevar a cabo determinados procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas, la reparación de tejidos tras una lesión, el incremento del flujo sanguíneo durante el ejercicio prolongado, la formación del cuerpo lúteo y la vascularización del endometrio durante el ciclo reproductivo femenino, así como la formación de la placenta durante el embarazo^[105, 106].

2.1 El “interruptor” angiogénico

En el individuo adulto, salvo las mencionadas excepciones, la vasculatura permanece quiescente^[107]. Esa quiescencia se mantiene gracias al delicado equilibrio local entre activadores e inhibidores endógenos. Sin embargo, cuando se produce un exceso de factores de crecimiento angiogénico el equilibrio se inclina a favor de la formación de nuevos vasos sanguíneos. De aquí surge la idea del



“interruptor angiogénico”, que puede “encenderse”, cuando el equilibrio se vuelca a favor de una regulación al alza de los factores proangiogénicos, o “apagarse” si hay una regulación a la baja de dichos factores^[108-110] (figura 4).

Figura 4. El “interruptor” angiogénico puede “encenderse” cuando el equilibrio se vuelca a favor de una regulación al alza de factores proangiogénicos, o “apagarse” si hay una regulación a la baja de dichos factores.

Un cuerpo sano controla la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante el “encendido” o “apagado” del “interruptor angiogénico”. Cuando el “interruptor” permanece anormalmente “encendido” la angiogénesis es excesiva y aparecen enfermedades como el cáncer, la

retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad, la artritis reumatoide y la psoriasis, entre otras muchas; cuando el “interruptor” permanece anormalmente “apagado”, la angiogénesis es insuficiente y aparecen patologías como las enfermedades de las arterias coronarias, el derrame cerebral y las heridas crónicas^[105].

2.2 La angiogénesis: un sello distintivo del cáncer

Ya en 1971, Judah Folkman propuso la hipótesis de que el crecimiento tumoral es dependiente de angiogénesis^[3]. Actualmente, se sabe que la angiogénesis juega un papel determinante en la progresión tumoral, la invasión y la metástasis, y es considerada como uno de los diez sellos distintivos del cáncer (ver figura 5)^[111]. La masa tumoral, como ocurre con cualquier otro tipo de tejido, requiere del aporte de oxígeno y nutrientes, así como de una vía para la eliminación de los desechos metabólicos y el CO₂. Es por ello que para que un tumor sólido pueda sobrepasar el tamaño crítico de 1-2 mm de diámetro y comenzar a expandirse necesita tener la capacidad de accionar y mantener encendido el “interruptor angiogénico”, induciendo la formación continua de nuevos vasos que ayuden a mantener el crecimiento tumoral^[112, 113]. De esta forma, la angiogénesis puede posibilitar el paso de un estado silente y avascular, en el que existe un equilibrio entre proliferación y muerte celular, hacia un estado de crecimiento exponencial, invasivo y metastásico^[114].

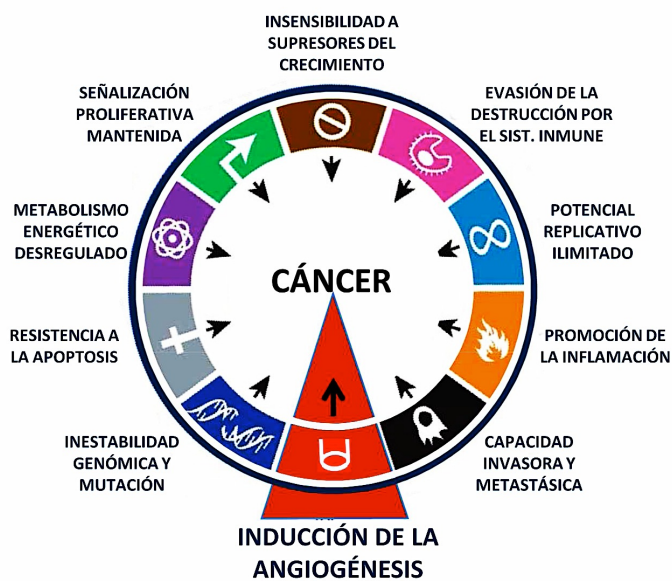


Figura 5. Actualmente, la angiogénesis es considerada como uno de los diez sellos distintivos del cáncer. Ilustración adaptada del artículo *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*; de Hanahan y Weinberg, en la revista *Cell*, 2011.

Tanto la hipoxia creada en el núcleo del tumor incipiente como las señales oncogénicas generadas por la masa tumoral pueden accionar el “interruptor angiogénico” regulando al alza la expresión de genes como el *VEGF*^[115] y señales proangiogénicas como los miembros de la familia *FGF*^[116], venciendo la barrera natural que suponen los inhibidores endógenos y poniendo en marcha el programa angiogénico en las CEs próximas.

2.3 Microambiente tumoral, inflamación y angiogénesis.

El papel del microambiente tumoral ya fue puesto de relieve por Stephen Paget a finales del siglo XIX mediante la hipótesis de “la semilla y el suelo”^[117]. Esta hipótesis, que hoy día tiene una renovada actualidad^[118], propone que la biología de un tumor solo puede ser entendida considerando tanto a las células tumorales (“semillas”) como al microambiente en el que se desarrollan (“suelo”). De esta forma, un nódulo tumoral se considera un complejo ecosistema formado por elementos celulares y no celulares. El compartimento celular comprende, además de a las propias células tumorales, a CEs, pericitos, células inflamatorias y células estromáticas; mientras que el compartimento no celular está representado por los elementos de la MEC.

Las células tumorales pueden secretar factores proangiogénicos así como mediadores para las células inflamatorias^[119]. Por otro lado, las células inflamatorias que infiltran el tumor contribuyen a la angiogénesis sintetizando y secretando quimioquinas que actúan reclutando CEs^[120]. Además, los tumores más agresivos están asociados a una dramática respuesta de células inflamatorias, especialmente de macrófagos y mastocitos^[121].

Las células tumorales también pueden producir quimioquinas y expresar sus receptores, como el receptor CCR2 y su ligando más importante, CCL2, también conocido como proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)^[122]. La MCP-1 ha mostrado ser esencial para la supervivencia y el crecimiento tumoral, actuando de forma autocrina sobre las propias células tumorales, ejerciendo un efecto proangiogénico sobre las CEs (que también expresan CCR2) y atrayendo a los monocitos e induciendo su diferenciación a macrófagos^[123]. A estos macrófagos que se encuentran infiltrados y rodeando a los tumores se les denomina macrófagos asociados al tumor (TAMs) y sus efectos pueden variar enormemente dependiendo de las señales que reciben de las células tumorales y de otros elementos del microambiente y su ubicación (en el centro hipóxico o en el frente invasivo del tumor)^[124]. Una aproximación complementaria a la terapia antiangiogénica ha sido tratar de utilizar la MCP-1 como diana para revertir el crecimiento tumoral, evitando el reclutamiento de TAMs^[125].

Las prostaglandinas son otros mediadores celulares que contribuyen al mantenimiento del microambiente inflamatorio cuya señalización se ha relacionado con el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la invasión y la metástasis^[126]. En la síntesis de prostaglandinas participa la ciclooxigenasa-2 (COX-2), una enzima inducible en diversos tipos celulares entre los que se encuentran las CEs y los monocitos/macrófagos. Además, La COX-2 se sobreexpresa en un gran número de tumores sólidos y hematológicos, siendo la prostaglandina E2 (PGE2) la más abundante entre las prostaglandinas producidas en tumores que expresan COX-2^[127]. De aquí la importancia que ha alcanzado el desarrollo de inhibidores que minimicen los efectos oncogénicos de la COX-2.

Además, la inflamación contribuye aportando otras moléculas bioactivas al microambiente tumoral, entre las que se encuentran factores de crecimiento, factores proangiogénicos y enzimas modificadoras de la MEC que promueven la angiogénesis^[111]. A esto se suma la sobreexpresión de determinadas proteasas en las células tumorales, entre las que se incluyen las MMPs, las ADAMs y las ADAMTs, las cuales alteran el balance proteolítico en el compartimento no celular, procurando un medio permisivo para la progresión, la invasión y la diseminación del tumor^[47].

3. Metodología para la búsqueda de nuevos compuestos moduladores de la angiogénesis.

Nuestro grupo de investigación está activamente involucrado en la identificación de nuevos compuestos moduladores de la angiogénesis. Para ello resulta muy útil disponer de una batería de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* que permitan evaluar los efectos concretos de los compuestos seleccionados sobre cada una de las etapas del proceso angiogénico. En la figura 6 se muestra un esquema de los ensayos *in vitro* llevados a cabo a tal efecto. En el anexo VI se detalla la metodología de estos y otros ensayos llevados a cabo para la realización de esta tesis.

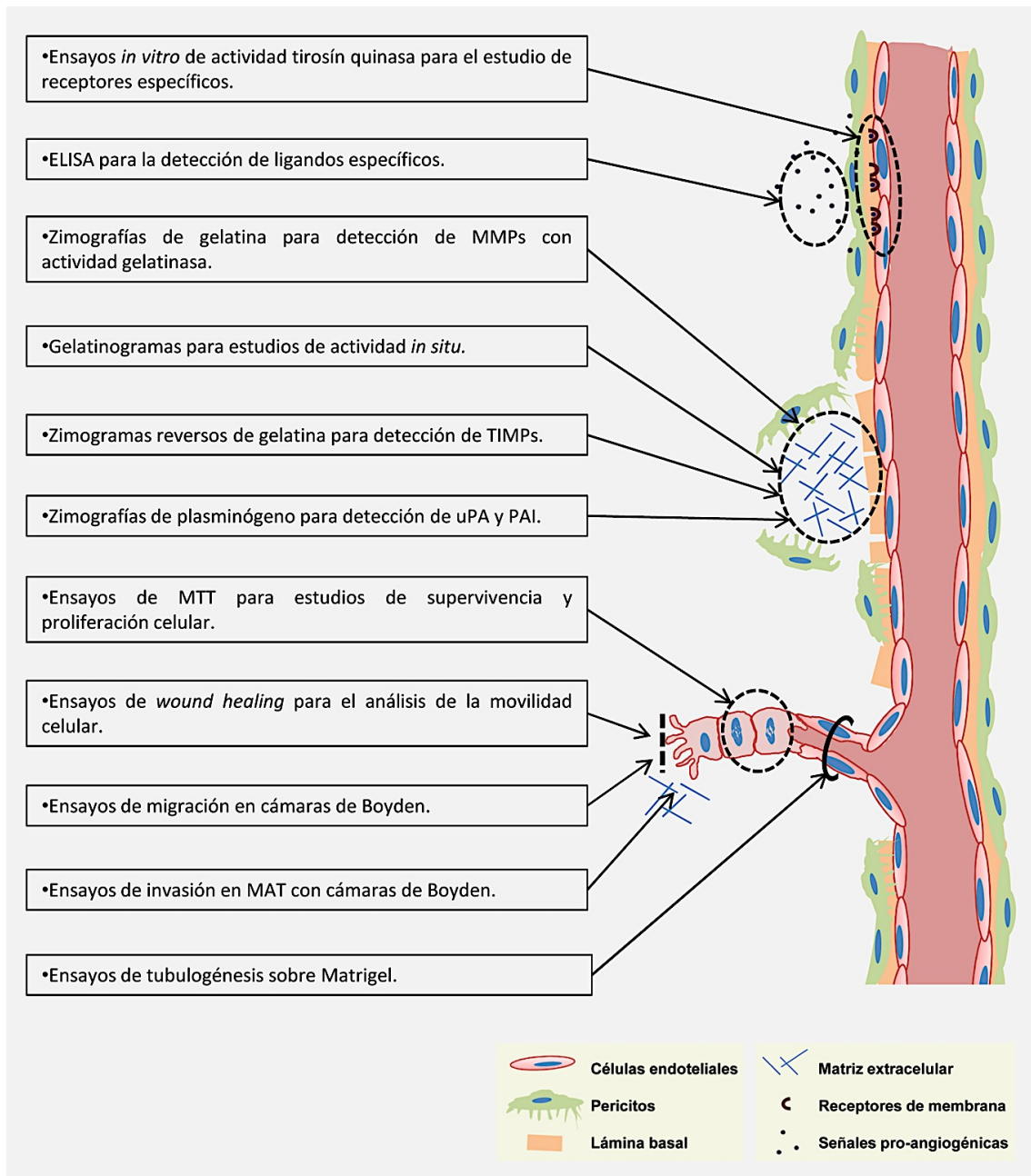


Figura 6. Esquema de los ensayos *in vitro* usados para llevar a cabo la búsqueda de nuevos compuestos moduladores de la angiogénesis. En el anexo VI se detalla la metodología de estos y otros ensayos llevados a cabo para la realización de esta tesis.

4. La naturaleza como fuente de productos naturales con actividad anti-angiogénica

Los productos naturales son compuestos orgánicos producidos por los organismos vivos y la actividad biológica de muchos de ellos ha dado pistas muy valiosas para el desarrollo de nuevos fármacos.

Los productos naturales se pueden dividir básicamente en tres categorías. En primer lugar están aquellos que juegan un papel central en el metabolismo y reproducción celular y son comunes en todos los organismos vivos, son los conocidos como metabolitos primarios. En segundo lugar están los compuestos poliméricos de elevado peso molecular tales como la celulosa, las ligninas y las proteínas que forman las estructuras celulares. Finalmente, se encuentran aquellos compuestos que pertenecen a un limitado número de especies a las cuales les confieren sus características distintivas, a estos compuestos se les denomina metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios con frecuencia tienen sus efectos biológicos sobre otros organismos y desempeñan algún papel ecológico en la regulación de interacciones entre plantas, microorganismos, insectos y otros animales, actuando como sustancias defensivas, atrayentes, feromonas, etc. Muchos de los constituyentes medicinales con actividad biológica son metabolitos secundarios. Se estima que aproximadamente el 40% de los medicamentos desarrollados hasta la fecha han tenido su origen en alguno de estos productos naturales^[128, 129].

Nuestro grupo está activamente involucrado en la identificación de nuevos compuestos moduladores de la angiogénesis procedentes de fuentes naturales y en el estudio de sus efectos específicos sobre los diferentes pasos del proceso angiogénico^[130-132]. Para ello hemos seguido básicamente dos estrategias de búsqueda: una centrada en el cribado de compuestos de origen marino, que son obtenidos por una empresa colaboradora, el Instituto Biomar S.A., y sometidos por nosotros a un rastreo primario a partir del cual seleccionamos los más interesantes y valoramos su posible aplicación clínica; y otra estrategia similar, basada en el cribado de compuestos procedentes de la dieta y de la farmacopea tradicional mediterránea, principalmente.

4.1 Compuestos estudiados en esta tesis

4.1.1 Ácido ursólico

El ácido ursólico (figura 7) es un triterpenoide pentacíclico miembro de la familia de los cicloescualenoides que se encuentra presente en muchas plantas de uso medicinal así como en diferentes elementos de la dieta humana (p.e., en plantas como el romero y el tomillo y en la piel de algunas frutas como las manzanas, las ciruelas y los arándanos)^[133, 134].

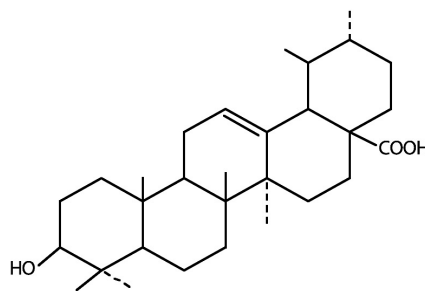


Figura 7. Ácido ursólico

4.1.2 Aloe emodina

La emodina es una antraquinona natural presente en algunas especies de *Penicillium* y en plantas de uso común en la medicina tradicional. El aloe-emodina es una hidroxiantraquinona presente en el *Aloe vera*, así como en las hojas y las raíces de otras plantas^[135], estructuralmente muy similar a la emodina (figura 8).

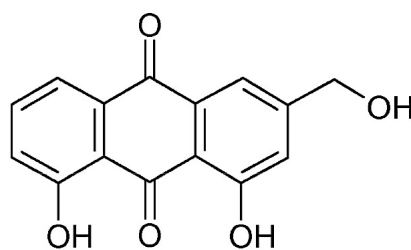


Figura 8. Aloe emodina

4.1.3 Kahweol

Es conocido que algunos alimentos contienen constituyentes que al ingerirse producen efectos beneficiosos sobre la salud. Así ocurre con el café, cuyas propiedades han sido ampliamente estudiadas, aunque su compleja composición, que incluye más de mil compuestos^[136], hace difícil esclarecer los mecanismos subyacentes a sus efectos biológicos. El café es una mezcla compleja de compuestos que posee cantidades considerables de ácidos clorogénicos y cafeína, además de ser una fuente importante de kahweol (figura 9), un diterpeno presentes en los granos de café tostado que permanece en cantidades considerables cuando se consume el café sin filtrar^[137].

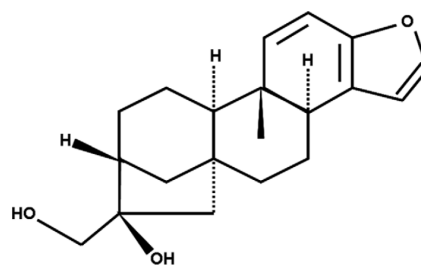


Figura 9. Kahweol

En el anexo I de la presente tesis se incluye el manuscrito titulado: *Kahweol, a coffe diterpene with anti-inflammatory properties*, donde se realiza una revisión en profundidad de los efectos antiinflamatorios del kahweol, aceptado para su publicación en el libro *Coffee in Health and Disease Prevention*, editado por Victor Preedy, del King's College London, School of Biomedical and Health Sciences, London, UK.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

1. Angiogénesis e inflamación son dos señas de identidad del cáncer que podrían ser utilizadas como objetivo simultáneo para el desarrollo de fármacos multidiana más eficaces en la terapia antitumoral.

2. La inhibición farmacológica de la angiogénesis basada en el bloqueo de una o varias de las funciones que las células endoteliales adquieren una vez que son activadas (adhesión, producción de proteasas, migración, invasión, proliferación, diferenciación, etc.) puede ser una alternativa para el tratamiento de las enfermedades dependientes de angiogénesis, incluido el cáncer.

3. Los productos naturales presentes en la dieta o usados en la farmacopea tradicional pueden constituir una fuente importante de nuevos compuestos con actividad antiangiogénica, antiinflamatoria y/o antitumoral.

2. Objetivos

1. Identificación de nuevos compuestos de origen natural con actividad antiangiogénica.

2. Caracterización de los efectos antiangiogénicos, antiinflamatorios y/o antitumorales de los compuestos seleccionados.

3. Identificación de los mecanismos de acción molecular de los compuestos más prometedores, centrándonos en las vías de señalización implicadas en la proliferación, supervivencia y apoptosis celular.

HYPOTHESIS AND GENERAL AIMS

1. Hypothesis

1. Angiogenesis and inflammation are two hallmarks of cancer that could be used as simultaneous targets for the development of more effective multi-target drugs in antitumor therapy.

2. Pharmacological inhibition of angiogenesis based on blocking one or more functions that endothelial cells acquire once they are activated (adhesion, protease production, migration, invasion, proliferation, differentiation, etc.) can be an excellent for angiogenesis-dependent diseases alternative treatment, including cancer.

3. Natural products present in the diet or used in the traditional pharmacopoeia can provide an important source of new compounds with anti-angiogenic, anti-inflammatory and/or anti-tumor activity.

2. Aims

1. Identification of new anti-angiogenic compounds from natural sources.

2. Characterization of the anti-angiogenic, anti-inflammatory and/or antitumor effects on the selected compounds.

3. Identification of the molecular mechanisms of action of the most promising compounds, by focusing on the signalling pathways involved in proliferation, cell survival and apoptosis.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Durante el desarrollo de esta tesis se han generado 4 artículos de investigación y un capítulo de libro, aceptado recientemente para su publicación. El contenido de todos ellos se resume a continuación.

Artículo 1:

Effects of Ursolic Acid on Different Steps of the Angiogenic Process

El ácido ursólico (AU) es un triterpenoide pentacíclico con efectos biológicos pleiotrópicos que ha mostrado poseer actividad antibacteriana, hepatoprotectora, inmunomoduladora, antiproliferativa y antitumoral. Además, se ha descrito previamente su actividad antiangiogénica sobre CAM de pollo y sus efectos sobre la proliferación de células BAE.

En este artículo llevamos a cabo ensayos *in vivo* para confirmar el efecto inhibitor del AU sobre la CAM y pusimos en marcha una batería de experimentos *in vitro* para identificar qué pasos clave del proceso angiogénico eran su diana. Estos ensayos incluyeron el análisis de los efectos del AU sobre la proliferación de las células endoteliales, la actividad degradativa de la MEC, la migración, la invasión y la tubulogénesis.

Nuestros resultados confirmaron que el AU inhibe la angiogénesis *in vivo* sobre CAM de embriones de pollo y que posee los siguientes efectos *in vitro* sobre las células endoteliales:

- Inhibe la proliferación en el mismo rango de concentración que otros compuestos naturales con propiedades antiangiogénicas.
- Inhibe la migración de manera dosis-dependiente.
- No tiene efectos significativos sobre la invasión en Matrigel.
- Produce un remarcable incremento de la expresión de MMP-2 y de uPA.
- Inhibe la tubulogénesis sin afectar a la viabilidad celular en el mismo rango de concentraciones que otros conocidos inhibidores.

De estos resultados se desprende que el AU tiene un efecto inhibitor sobre la angiogénesis *in vivo*, así como la capacidad de inhibir *in vitro* algunos de sus pasos clave, incluyendo la proliferación de células endoteliales, la migración y la diferenciación en estructuras tubulares. Sin embargo, al mismo tiempo, parece estimular otras etapas clave del proceso angiogénico, tales como la degradación de la MEC por la MMP-2 y la uroquinasa. Todo ello nos hace ser cautos a la hora de valorar el potencial antiangiogénico del AU.

Artículo 2:

Evaluation of the anti-Angiogenic Effect of Aloe-Emodin

El aloe-emodina (AE) es una hidroxiantraquinona que se encuentra en el *Aloe vera*, así como en las hojas y raíces de otras plantas, que ha mostrado tener efectos antitumorales en diferentes tipos de cáncer.

En este artículo se evaluó al AE como un nuevo producto natural potencialmente antiangiogénico. Para ello se realizó un ensayo *in vivo* y diferentes ensayos *in vitro* que permitieron comprobar sus efectos sobre la proliferación de las CE, el potencial de remodelación de la MEC, la migración, la invasión y la tubulogénesis. Por otra parte, también se evaluó su posible actividad fotobiológica para modular la supervivencia de las células tumorales.

En resumen, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- El AE inhibe la angiogénesis *in vivo* en el ensayo CAM de forma dosis-dependiente.
- El AE inhibe la proliferación tanto en CE como en células tumorales sin diferencias remarcables en cuanto al tipo celular o la tasa de proliferación.
- El AE es un débil inhibidor de la migración en CE, sin embargo no inhibe la migración en células tumorales.
- El AE no tiene efectos antiinvasivos relevantes sobre las CE ni sobre las células tumorales.
- El AE tiene efectos diferentes sobre las gelatinasas de CE y tumorales: incrementa la secreción de MMP-2 en CE, mientras que la disminuye en células tumorales.
- El AE es un potente inhibidor de la secreción de uroquinasa.
- El AE inhibe la tubulogénesis de CE sobre Matrigel.
- El AE produce un efecto fotocitotóxico sobre las células tumorales.

Nuestros resultados mostraron claramente que el AE es un producto natural con propiedades antiangiogénicas y confirmaron su actividad antitumoral previamente descrita. Por otro lado, desvelaron sus efectos fotocitotóxicos sobre células tumorales. Todo ello pone de manifiesto sus posibles aplicaciones terapéuticas como antiangiogénico y antitumoral y le hace ser un excelente candidato para aplicaciones en terapia fotodinámica.

Artículo 3:

Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene

El kahweol es un diterpeno presente en los granos de café tostado que permanece en cantidades considerables cuando se consume el café sin filtrar. Diferentes estudios epidemiológicos han asociado el café sin filtrar con una baja incidencia de determinados tipos de cáncer. Además, se han descrito ampliamente los efectos protectores del kahweol contra el estrés oxidativo y el daño en el DNA.

Este artículo tuvo como objetivo identificar los efectos del kahweol sobre la angiogénesis y sobre moléculas clave en el proceso inflamatorio. Para ello se llevaron a cabo diferentes procedimientos experimentales que incluyeron: ensayos de angiogénesis *in vivo* (sobre CAM de pollo y codorniz y ensayos de angiogénesis con pez cebra fluorescente), el ensayo *ex vivo* de anillo aórtico de ratón y el análisis *in vitro* de los efectos del kahweol sobre CEs humanas orientado al estudio de la proliferación y la viabilidad celular, la migración, la remodelación de la MEC y la tubulogénesis en Matrigel. Además, se determinaron dos marcadores de inflamación: los niveles de expresión de COX-2 y los niveles de MCP-1 secretada.

Nuestros resultados mostraron por primera vez que el kahweol es un compuesto antiangiogénico con efectos inhibidores sobre dos modelos experimentales de angiogénesis *in vivo* y uno *ex vivo*, con efectos inhibidores sobre diferentes pasos específicos del proceso angiogénico: la proliferación, la migración, la invasión y la tubulogénesis de las CEs. También pusimos de manifiesto el efecto inhibitor del kahweol sobre el potencial de las CEs para remodelar la MEC actuando sobre dos moléculas clave implicadas en el proceso, la MMP-2 y la uPA. Finalmente, se demostró el potencial antiinflamatorio de este compuesto a través de la inhibición de la expresión de la COX-2 y la secreción de MCP-1 en CEs.

En resumen, nuestros resultados indican que el kahweol se comporta como un compuesto antiinflamatorio y antiangiogénico con posibles aplicaciones en terapia antitumoral. Además, nuestros datos contribuyen a explicar sus efectos anticancerígenos descritos previamente y es congruente con el reciente meta-análisis epidemiológico que muestra que el consumo de café podría reducir el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer.

Artículo 4:

Insights on the Antitumor Effects of Kahweol on Human Breast Cancer: Decreased Survival and Increased Production of Reactive Oxygen Species and Cytotoxicity

Hasta la fecha, se habían publicado varios estudios poniendo de manifiesto los efectos antitumorales y proapoptóticos del kahweol sobre diferentes tipos de células cancerígenas, a pesar de ello no se había realizado un estudio comparativo de los efectos del kahweol sobre células tumorales humanas de distinto origen tisular; ese fue el objetivo principal de este artículo. Para ello se llevaron a cabo diferentes ensayos que pusieron a prueba los posibles efectos y la selectividad del kahweol sobre la proliferación y la supervivencia de las siguientes líneas tumorales: células de leucemia humana (HL-60), células de adenocarcinoma de colon (HT-29), células de fibrosarcoma (HT-1080), células de hepatoma (HepG2) y células de cáncer de mama sensibles (ZR75-1 y MCF-7) y no sensibles a estrógenos (MDA-MB-231).

Nuestros resultados mostraron que:

- El kahweol inhibe la proliferación de células tumorales de diferente origen tisular, disminuyendo sus tasas de proliferación y clonogenicidad de forma dosis-dependiente e induciendo su apoptosis.
- El kahweol inhibe intensamente la capacidad clonogénica de las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Además de la proliferación desregulada, la evasión de la apoptosis es otra característica clave del cáncer. En este trabajo investigamos los efectos proapoptóticos del kahweol sobre las diferentes líneas tumorales en estudio. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que:

- El kahweol tiene un potente efecto proapoptótico sobre las células MDA-MB-231 mediado a través de la vía intrínseca de la apoptosis, con la activación de las caspasas 3/7 y 9 y la liberación de citocromo c al citoplasma.

Por otro lado, dado que el Kahweol ha sido descrito como un compuesto antioxidante y nuestros resultados mostraron que compromete la supervivencia de las células de cáncer de mama, decidimos comprobar el efecto del kahweol sobre la citotoxicidad inducida por H₂O₂ y sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en células humanas de cáncer de mama y en células humanas normales. Los resultados mostraron que:

- El Kahweol incrementa la citotoxicidad inducida por H₂O₂ en las células humanas de cáncer de mama ensayadas, sensibles y no sensibles a

estrógenos, pero no en fibroblastos gingivales humanos normales. Además, potencia la producción de H₂O₂ en ambas líneas de cáncer de mama pero no en los fibroblastos humanos normales.

En resumen, nuestros resultados muestran que el kahweol es capaz de inhibir el crecimiento de varios tipos celulares de cáncer humano, disminuyendo sus tasas de proliferación y clonogenicidad e induciendo su apoptosis. Nuestros datos también indican que el efecto antitumoral del kahweol es particularmente relevante en las células de cáncer de mama no sensibles a estrógenos MDA-MB-231, en las cuales induce la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Por otro lado, mostramos que el kahweol incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y su citotoxicidad sobre células de cáncer de mama pero no sobre células normales.

Capítulo de libro:

Kahweol, a Coffee Diterpene with Anti-Inflammatory Properties (Coffee in Health and Disease Prevention, Victor Preedy, 2014, London)

En los últimos diez años un elevado número de estudios científicos han revelado que el kahweol es un compuesto bioactivo multidiana con propiedades antiinflamatorias y con un alto potencial farmacológico. En este trabajo se revisa en profundidad el estado actual del conocimiento acerca de las propiedades antiinflamatorias del kahweol, las cuales se resumen en los siguientes puntos:

- Inhibe tanto la actividad como la expresión de iNOS y COX-2 en macrófagos.
- Inhibe los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1, inducida por TNF α , en CEs.
- Protege contra el estrés oxidativo y el daño del ADN.
- Inhibe la activación de NF- κ B y STAT-1.
- Inhibe la secreción de MCP-1 en CEs humanas.
- Inhibe la angiogénesis *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.
- Es un compuesto bioactivo multidiana, antiinflamatorio y antiangiogénico, con gran interés farmacológico.

SUMMARY OF THE RESULTS

During the course of this thesis four research papers and one book chapter, recently accepted for publication, were generated. Their contents are summarized below.

Research paper 1:

Effects of Ursolic Acid on Different Steps of the Angiogenic Process

Ursolic acid (UA) is a pentacyclic triterpenoid with pleiotropic biological effects that has shown to have antibacterial, hepatoprotective, immunomodulatory, antiproliferative and antitumor activity. Its anti-angiogenic activity has also been previously described on chicken chorioallantoic membrane (CAM) and its effects on bovine aortic endothelial cells proliferation.

In this paper we carry out several *in vivo* assays to confirm the inhibitory effect of UA in the CAM. Moreover, we started a set of *in vitro* experiments to identify the key steps of the angiogenic process that were its targets. These trials included the analysis of effects of UA on endothelial cell proliferation, extracellular matrix (ECM) degradation, migration, invasion, and differentiation into a network of tubule-like structures.

Our results confirmed that UA inhibits *in vivo* angiogenesis on chick embryo CAM and has the following *in vitro* effects on endothelial cells:

- It inhibits proliferation in the same concentration range as those found for other natural compounds with anti-angiogenic properties.
- It inhibits migration in a dose-dependent manner.
- It has no significant effect on invasion in Matrigel.
- It causes a remarkable increase in the expression of MMP-2 and uPA proteins.
- It inhibits tubulogenesis without compromising cell viability in the same range of concentrations than other known inhibitors.

These results allow us to conclude that UA has an inhibitory effect on angiogenesis *in vivo*, as well as the ability to inhibit some of its key steps *in vitro*, including endothelial cell proliferation, migration and differentiation into tube-like structures. However, at the same time, it seems to stimulate other key stages of angiogenesis process, such as ECM degradation by MMP-2 and urokinase. All of this forces us to be cautious concerning the anti-angiogenic potential of UA.

Research paper 2:

Evaluation of the anti-Angiogenic Effect of Aloe-Emodin

Aloe-emodin (AE) is a hydroxyanthraquinone found in *Aloe vera*, as well as in leaves and roots of other plants, which has shown to have antitumor effects in different types of cancer.

In this article AE was evaluated as a new potential anti-angiogenic natural product. For this purpose an *in vivo* and different *in vitro* assays were carried out, which allowed check their effects on endothelial cell proliferation, ECM remodelling, migration, invasion, and tubulogenesis. Moreover, it was also evaluated their photocytotoxic effects on tumor cells.

In summary, the results obtained were as follows:

- AE inhibits *in vivo* angiogenesis on chick CAM assay in a dose-dependent manner.
- AE inhibits both endothelial cell and tumor cell proliferation, but remarkable differences were not found in cell types or proliferation rates.
- AE is a weak inhibitor of endothelial cell migration and it does not inhibit tumor cell migration.
- AE has no significant anti-invasive effects on endothelial or tumor cells.
- AE has different effects on endothelial and tumor cell gelatinases: induces a dose-dependent increase in the levels of MMP-2 in endothelial cell conditioned media, whereas these levels are decreased in tumor cells.
 - AE is a potent inhibitor of urokinase secretion.
 - AE inhibits tubulogenesis of endothelial cells on Matrigel.
 - AE produces a photocytotoxic effect on tumor cells.

Our results clearly showed that AE is a natural product with anti-angiogenic properties and they confirmed its antitumor activity previously described. Moreover, they revealed its photocytotoxic effects on tumor cells. All this highlights its potential therapeutic applications as both anti-angiogenic and antitumor drug, pointing to AE as an excellent candidate for photodynamic therapy.

Research paper 3:

Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene

Kahweol is a diterpene present in roasted coffee that remains in considerable amounts when coffee beverages are consumed unfiltered. Several epidemiological studies have associated unfiltered coffee with a low incidence of certain cancers. Kahweol protective effects against oxidative stress and DNA damage have been widely described.

The aim of this paper was to identify the effects of kahweol on angiogenesis and on different key molecules in the inflammatory process. To do this we carried out several experimental procedures including: *in vivo* angiogenesis assays (on chick and quail CAM, and in fluorescent zebra fish), the *ex vivo* mouse aortic ring assay, and *in vitro* analysis of the effects of kahweol on human endothelial cells, focusing on the evaluation of proliferation and cell viability, migration, ECM remodelling, and tubulogenesis in Matrigel. Furthermore, two markers of inflammation were determined: expression levels of COX-2 and MCP-1 secretion levels.

Our results showed for the first time that kahweol is an anti-angiogenic compound, with inhibitory effects on two *in vivo* and one *ex vivo* experimental models of angiogenesis, with specific inhibitory effects on different steps of the angiogenic process: proliferation, migration, invasion and endothelial cell tubulogenesis. We also revealed the inhibitory effect of kahweol on the ability of endothelial cells to remodelling ECM by acting on two key molecules involved in the process: the MMP-2 and uPA proteins. Finally, inhibiting COX-2 expression and MCP-1 secretion showed the anti-inflammatory ability of this compound.

In summary, our results indicate that kahweol behaves as an anti-inflammatory and anti-angiogenic compound with potential application in antitumor therapy. Furthermore, our data help to explain its anticancer effects previously described and are consistent with the recent epidemiological meta-analysis showing that coffee consumption may reduce the risk of certain cancers.

Research paper 4:

Insights on the Antitumor Effects of Kahweol on Human Breast Cancer: Decreased Survival and Increased Production of Reactive Oxygen Species and Cytotoxicity

Anti-tumor and pro-apoptotic effects of kahweol have been reported for several kinds of cancer cells. However, up to date, there is no report comparing kahweol effects on an array of different tumor cells. To contribute to fill this gap is a major aim of the present work. To do this, different assays were carried out

testing the possible effects and selectivity of kahweol on proliferation and survival of the following tumor cell lines: human leukaemia cells (HL-60), colon adenocarcinoma cells (HT-29), fibrosarcoma cells (HT-1080), hepatoma cells (HepG2), estrogen receptor-positive (ZR75-1 and MCF-7) and estrogen receptor-negative breast cancer cells (MDA-MB-231).

Our results showed that:

- Kahweol inhibits tumor cell proliferation, decreasing their growth rates and clonogenicity in a dose-dependent manner and inducing apoptosis.
- Kahweol shows a potent inhibitory effect on MDA-MB-231 human breast cancer cells in the soft-agar clonogenic assay.

In addition, since de-regulated proliferation and avoidance of apoptosis are two key hallmarks of cancer, we next investigated the effects of kahweol on tumor cell apoptosis. The results showed that:

- Kahweol exhibits a strong pro-apoptotic effect on MDA-MB-231 human breast cancer cells mediated via the intrinsic apoptosis pathway, the activation of caspases 3/7 and 9, and cytochrome c release to cytosol.

Furthermore, since kahweol has been reported as an anti-oxidant agent and our results showed that it compromises cell survival in breast cancer cells, we decided to test the effect of kahweol on H₂O₂ cytotoxicity and production. The results showed that:

- Kahweol increases H₂O₂-induced cytotoxicity in both estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive human breast cancer cells, but not in normal human gingival fibroblasts. Furthermore, it enhances H₂O₂ production in both tested breast cancer cell lines but not in the normal human fibroblasts.

In summary, our results show that kahweol is able to inhibit the growth of several kinds of human tumor cells, decreasing their proliferation rates and clonogenicity and inducing apoptosis. Our data also indicate that the anti-tumor effect of kahweol is particularly important in the estrogen receptor-negative breast cancer cell line MDA-MB-231, in which it induces activation of the intrinsic apoptosis pathway. Furthermore, we show that kahweol increases the production of reactive oxygen species and their cytotoxicity in breast cancer cells but not in normal cells.

Book chapter:***Kahweol, a Coffee Diterpene with Anti-Inflammatory Properties (Coffee in Health and Disease Prevention, Victor Preedy, 2014, London)***

In the last ten years a number of scientific studies have revealed that kahweol is a multi-targeted anti-inflammatory bioactive compound with high potential pharmacological interest.

In this chapter, the current state of knowledge about anti-inflammatory properties of kahweol is reviewed in depth. These are the summary points:

- Kahweol inhibits both iNOS activity and expression in macrophages.
- Kahweol inhibits both COX-2 activity and expression in macrophages.
- Kahweol inhibits the TNF α -induced expression levels of endothelial cell VCAM-1 and ICAM-1.
- Kahweol protects against oxidative stress and DNA damage.
- Kahweol inhibits NF- κ B and STAT-1 activation.
- Kahweol inhibits MCP-1 secretion by human endothelial cells.
- Kahweol inhibits *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* angiogenesis.
- Kahweol is a multi-targeted anti-inflammatory and anti-angiogenic bioactive compound with high pharmacological interest.

CONCLUSIONES FINALES

A partir de los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

En relación al objetivo 1:

Se ha confirmado el efecto inhibidor del ácido ursólico sobre la angiogénesis *in vivo* y se han identificado dos nuevos compuestos naturales con actividad antiangiogénica: el aloe-emodina y el kahweol.

En relación al objetivo 2:

1. Se han caracterizado los efectos antiangiogénicos del ácido ursólico.
2. Se han identificado las propiedades antiangiogénicas del aloe-emodina así como sus efectos antitumorales, modulables por acción de la luz.
3. Se han determinado las características antiangiogénicas y antiinflamatorias del kahweol.
4. Se han identificado las propiedades antiproliferativas y anticlonogénicas del kahweol sobre diferentes líneas de células tumorales, así como sus efectos proapoptóticos y sobre el estrés oxidativo en células de cáncer de mama.

En relación al objetivo 3:

1. Se ha descrito el efecto del kahweol sobre dos dianas moleculares implicadas en el proceso inflamatorio: la COX-2 y la MCP-1.
2. Se ha identificado la vía intrínseca de la apoptosis como responsable de los efectos proapoptóticos del kahweol sobre las células MDA-MB-231, mediados por la activación de las caspasas 3/7 y 9 y la liberación de citocromo c al citosol.

FINAL CONCLUSIONS

The results achieved allow us to draw the following conclusions:

Conclusions related to aim 1:

We have confirmed the inhibitory effect of ursolic acid on angiogenesis *in vivo* and we have identified two new natural compounds with anti-angiogenic activity: aloe-emodin and kahweol.

Conclusions related to aim 2:

1. We have characterized the anti-angiogenic effects of ursolic acid.
2. We have identified the anti-angiogenic properties and the anti-tumor effects of aloe-emodin, which are modulated by the action of light.
3. We have determined the anti-angiogenic and anti-inflammatory characteristics of kahweol.
4. We have identified the anti-proliferative and anti-clonogenic properties of kahweol on different tumor cell lines as well as their pro-apoptotic effects and their effects on oxidative stress in breast cancer cells.

Conclusions related to aim 3:

1. We have described the effect of kahweol on two molecular targets involved in inflammation: COX-2 and MCP-1.
2. We have identified the intrinsic apoptosis pathway as being responsible for the proapoptotic effects of kahweol on MDA-MB-231 cells, mediated by activation of caspase 3/7 and 9 and the release of cytochrome c into the cytosol.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Hunter, Lectures on the principles of surgery, in: J. Palmer (Ed.), The Works of John Hunter, London, 1787, pp. 368.
- [2] A. T. Hertig, Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey, Washington, 1935.
- [3] J. Folkman. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, N. Engl. J. Med. 285 (1971) 1182-1186.
- [4] R. Muñoz-Chápuli, A.R. Quesada, M. A. Medina. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells, Cell Mol. Life Sci. 61 (2004) 2224-2243.
- [5] P. Carmeliet. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, Nat. Med. 6 (2000) 389-395.
- [6] K. Koltowska, K.L. Betterman, N.L. Harvey, B.M. Hogan. Getting out and about: The emergence and morphogenesis of the vertebrate lymphatic vasculature, Development 140 (2013) 1857-1870.
- [7] Y. Cao. Opinion: Emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis, Nat. Rev. Cancer. 5 (2005) 735-743.
- [8] F. Bruyere, A. Noel. Lymphangiogenesis: In vitro and in vivo models, Faseb j. 24 (2010) 8-21.
- [9] M.H. Witte, C.L. Witte. Lymphatics and blood vessels, lymphangiogenesis and hemangiogenesis: From cell biology to clinical medicine, Lymphology 20 (1987) 257-266.
- [10] R. Muñoz-Chápuli. Evolution of angiogenesis, Int. J. Dev. Biol. 55 (2011) 345-351.
- [11] T. Asahara, H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, J.M. Isner. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization, Circ. Res. 85 (1999) 221-228.
- [12] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schattteman, J.M. Isner. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, Science 275 (1997) 964-967.

- [13] D.H. Ausprunk, K. Falterman, J. Folkman. The sequence of events in the regression of corneal capillaries, *Lab. Invest.* 38 (1978) 284-294.
- [14] P. Carmeliet, R.K. Jain. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature* 473 (2011) 298-307.
- [15] F. Kiefer, A.F. Siekmann. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis, *Cell Mol. Life Sci.* 68 (2011) 2811-2830.
- [16] W.G. Kaelin Jr. The von hippel-lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003) 2703-2711.
- [17] O. Aprelikova, G.V. Chandramouli, M. Wood, J.R. Vasselli, J. Riss, J.K. Maranchie, W.M. Linehan, J.C. Barrett. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors, *J. Cell. Biochem.* 92 (2004) 491-501.
- [18] P.J. Kallio, K. Okamoto, S. O'Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka, L. Poellinger. Signal transduction in hypoxic cells: Inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha, *Embo j.* 17 (1998) 6573-6586.
- [19] D.R. Senger, S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, H.F. Dvorak. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* 219 (1983) 983-985.
- [20] N. Ferrara, W.J. Henzel. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161 (1989) 851-858.
- [21] P.J. Keck, S.D. Hauser, G. Krivi, K. Sanzo, T. Warren, J. Feder, D.T. Connolly. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, *Science* 246 (1989) 1309-1312.
- [22] X. Li, U. Eriksson. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (2001) 421-426.
- [23] N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 581-611.
- [24] R. Roskoski Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62 (2007) 179-213.

- [25] C.J. Robinson, S.E. Stringer. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors, *J. Cell. Sci.* 114 (2001) 853-865.
- [26] D.I. Holmes, I. Zachary. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease, *Genome Biol.* 6 (2005) 209.
- [27] A. Minchenko, S. Salceda, T. Bauer, J. Caro. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene, *Cell. Mol. Biol. Res.* 40 (1994) 35-39.
- [28] L.A. Sullivan, R.A. Brekken. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition, *Mabs* 2 (2010) 165-175.
- [29] J.E. Park, H.H. Chen, J. Winer, K.A. Houck, N. Ferrara. Placenta growth factor. potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to flt-1 but not to flk-1/KDR, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25646-25654.
- [30] N. Ito, K. Huang, L. Claesson-Welsh. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins, *Cell. Signal.* 13 (2001) 849-854.
- [31] R.L. Kendall, K.A. Thomas. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 10705-10709.
- [32] B.I. Terman, M. Dougher-Vermazen, M.E. Carrion, D. Dimitrov, D.C. Armellino, D. Gospodarowicz, P. Bohlen. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187 (1992) 1579-1586.
- [33] M. Shibuya, L. Claesson-Welsh. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 549-560.
- [34] P. Carmeliet, L. Moons, A. Luttun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. VandenDriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K.H. Plate, J.M. Foidart, W. Schaper, D.S. Charnock-Jones, D.J. Hicklin, J.M. Herbert, D. Collen, M.G. Persico. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions, *Nat. Med.* 7 (2001) 575-583.

- [35] K. Pajusola, O. Aprelikova, J. Korhonen, A. Kaipainen, L. Pertovaara, R. Alitalo, K. Alitalo. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines, *Cancer Res.* 52 (1992) 5738-5743.
- [36] D.J. Dumont, L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman, K. Alitalo. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3, *Science* 282 (1998) 946-949.
- [37] R.J. Albuquerque, T. Hayashi, W.G. Cho, M.E. Kleinman, S. Dridi, A. Takeda, J.Z. Baffi, K. Yamada, H. Kaneko, M.G. Green, J. Chappell, J. Wilting, H.A. Weich, S. Yamagami, S. Amano, N. Mizuki, J.S. Alexander, M.L. Peterson, R.A. Brekken, M. Hirashima, S. Capoor, T. Usui, B.K. Ambati, J. Ambati. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth, *Nat. Med.* 15 (2009) 1023-1030.
- [38] H. Uehara, Y. Cho, J. Simonis, J. Cahoon, B. Archer, L. Luo, S.K. Das, N. Singh, J. Ambati, B.K. Ambati. Dual suppression of hemangiogenesis and lymphangiogenesis by splice-shifting morpholinos targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR), *Faseb j.* 27 (2013) 76-85.
- [39] H. Takahashi, M. Shibuya. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions, *Clin. Sci. (Lond)* 109 (2005) 227-241.
- [40] C. Grandclement, C. Borg. Neuropilins: A new target for cancer therapy, *Cancers (Basel)* 3 (2011) 1899-1928.
- [41] I.D. Pousa, J.P. Gisbert. Gastric angiogenesis and helicobacter pylori infection, *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 98 (2006) 527-541.
- [42] R. Muñoz-Chápuli, Regulación molecular de la angiogénesis, in: E. Alba and A. R. Quesada (Eds.), *Angiogénesis y Cáncer*, Málaga, 2009, pp. 154.
- [43] X. Gao, Z. Xu. Mechanisms of action of angiogenin, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 40 (2008) 619-624.
- [44] B.L. Hoh, K. Hosaka, D.P. Downes, K.W. Nowicki, E.N. Wilmer, G.J. Velat, E.W. Scott. Stromal cell-derived factor-1 promoted angiogenesis and inflammatory cell infiltration in aneurysm walls, *J. Neurosurg.* 120 (2014) 73-86.

- [45] D. Ribatti. Endogenous inhibitors of angiogenesis: A historical review, *Leuk. Res.* 33 (2009) 638-644.
- [46] M.D. Sternlicht, Z. Werb. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 463-516.
- [47] A. Noel, M. Jost, E. Maquoi. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface, *Semin. Cell Dev. Biol.* 19 (2008) 52-60.
- [48] V.W. van Hinsbergh, P. Koolwijk. Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead, *Cardiovasc. Res.* 78 (2008) 203-212.
- [49] S. Hernández-Barrantes, M. Bernardo, M. Toth, R. Fridman. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases, *Semin. Cancer Biol.* 12 (2002) 131-138.
- [50] S. Swarnakar, A. Mishra, S.R. Chaudhuri. The gelatinases and their inhibitors: The structure-activity relationships, *Exs* 103 (2012) 57-82.
- [51] M.A. Lafleur, M.M. Handsley, D.R. Edwards. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis, *Expert Rev. Mol. Med.* 5 (2003) 1-39.
- [52] J.E. Rundhaug. Matrix metalloproteinases and angiogenesis, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (2005) 267-285.
- [53] P. Vihinen, V.M. Kahari. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets, *Int. J. Cancer* 99 (2002) 157-166.
- [54] C.M. Ghajar, S.C. George, A.J. Putnam. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18 (2008) 251-278.
- [55] J. Fang, Y. Shing, D. Wiederschain, L. Yan, C. Butterfield, G. Jackson, J. Harper, G. Tamvakopoulos, M.A. Moses. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 3884-3889.
- [56] R. Visse, H. Nagase. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry, *Circ. Res.* 92 (2003) 827-839.
- [57] F. Blasi. uPA, uPAR, PAI-1: Key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol. Today* 18 (1997) 415-417.

- [58] M.S. Pepper. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 1104-1117.
- [59] J.E. Park, G.A. Keller, N. Ferrara. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF, *Mol. Biol. Cell* 4 (1993) 1317-1326.
- [60] B.A. Keyt, L.T. Berleau, H.V. Nguyen, H. Chen, H. Heinsohn, R. Vandlen, N. Ferrara. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7788-7795.
- [61] R. Flaumenhaft, D.B. Rifkin. The extracellular regulation of growth factor action, *Mol. Biol. Cell* 3 (1992) 1057-1065.
- [62] S. Lee, S.M. Jilani, G.V. Nikolova, D. Carpizo, M.L. Iruela-Arispe. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 681-691.
- [63] A.H. Baker, D.R. Edwards, G. Murphy. Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities, *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 3719-3727.
- [64] J.D. Raffetto, R.A. Khalil. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 346-359.
- [65] J.E. Rundhaug. Matrix metalloproteinases and angiogenesis, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (2005) 267-285.
- [66] J. Oh, R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R.M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D.B. Alexander, C. Ide, T.P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi, M. Noda. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis, *Cell* 107 (2001) 789-800.
- [67] J.C. Clark, D.M. Thomas, P.F. Choong, C.R. Dass. RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 675-683.

- [68] M.S. Pepper. Extracellular proteolysis and angiogenesis, *Thromb. Haemost.* 86 (2001) 346-355.
- [69] V.W. van Hinsbergh, P. Koolwijk. Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead, *Cardiovasc. Res.* 78 (2008) 203-212.
- [70] N.L. Tsakadze, S.D. Sithu, U. Sen, W.R. English, G. Murphy, S.E. D'Souza. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3157-3164.
- [71] L.C. Bridges, R.D. Bowditch. ADAM-integrin interactions: Potential integrin regulated ectodomain shedding activity, *Curr. Pharm. Des.* 11 (2005) 837-847.
- [72] N.V. Lee, M. Sato, D.S. Annis, J.A. Loo, L. Wu, D.F. Mosher, M.L. Iruela-Arispe. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2, *Embo j.* 25 (2006) 5270-5283.
- [73] F. De Smet, I. Segura, K. De Bock, P.J. Hohensinner, P. Carmeliet. Mechanisms of vessel branching: Filopodia on endothelial tip cells lead the way, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 639-649.
- [74] A.A. Blancas, L.E. Wong, D.E. Glaser, K.E. McCloskey. Specialized tip/stalk-like and phalanx-like endothelial cells from embryonic stem cells, *Stem Cells Dev.* 22 (2013) 1398-1407.
- [75] H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, C. Betsholtz. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia, *J. Cell Biol.* 161 (2003) 1163-1177.
- [76] E. Dejana, E. Tournier-Lasserre, B.M. Weinstein. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: Molecular basis and pathological implications, *Dev. Cell.* 16 (2009) 209-221.
- [77] I. Yana, H. Sagara, S. Takaki, K. Takatsu, K. Nakamura, K. Nakao, M. Katsuki, S. Taniguchi, T. Aoki, H. Sato, S.J. Weiss, M. Seiki. Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells, *J. Cell. Sci.* 120 (2007) 1607-1614.
- [78] A.F. Siekmann, N.D. Lawson. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries, *Nature* 445 (2007) 781-784.

- [79] L.K. Phng, H. Gerhardt. Angiogenesis: A team effort coordinated by notch, *Dev. Cell.* 16 (2009) 196-208.
- [80] R. Benedito, C. Roca, I. Sorensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger, R.H. Adams. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis, *Cell* 137 (2009) 1124-1135.
- [81] H. Gerhardt. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting, *Organogenesis* 4 (2008) 241-246.
- [82] L. Jakobsson, C.A. Franco, K. Bentley, R.T. Collins, B. Ponsioen, I.M. Aspalter, I. Rosewell, M. Busse, G. Thurston, A. Medvinsky, S. Schulte-Merker, H. Gerhardt. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 943-953.
- [83] R. Blanco, H. Gerhardt. VEGF and notch in tip and stalk cell selection, *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 3 (2013) a006569.
- [84] J. Krueger, D. Liu, K. Scholz, A. Zimmer, Y. Shi, C. Klein, A. Siekmann, S. Schulte-Merker, M. Cudmore, A. Ahmed, F. le Noble. Flt1 acts as a negative regulator of tip cell formation and branching morphogenesis in the zebrafish embryo, *Development* 138 (2011) 2111-2120.
- [85] P. Carmeliet, M. Tessier-Lavigne. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring, *Nature* 436 (2005) 193-200.
- [86] N.R. London, D.Y. Li. Robo4-dependent slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm, *Curr. Opin. Hematol.* 18 (2011) 186-190.
- [87] S.S. Gerety, H.U. Wang, Z.F. Chen, D.J. Anderson. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development, *Mol. Cell* 4 (1999) 403-414.
- [88] C.A. Erickson. Cell migration in the embryo and adult organism, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2 (1990) 67-74.
- [89] L. Contois, A. Akalu, P.C. Brooks. Integrins as "functional hubs" in the regulation of pathological angiogenesis, *Semin. Cancer Biol.* 19 (2009) 318-328.
- [90] E. Petitclerc, A. Boutaud, A. Prestayko, J. Xu, Y. Sado, Y. Ninomiya, M.P. Sarras Jr, B.G. Hudson, P.C. Brooks. New functions for non-collagenous domains of

human collagen type IV. novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 8051-8061.

- [91] Y. Takada, X. Ye, S. Simon. The integrins, *Genome Biol.* 8 (2007) 215.
- [92] S.M. Weis, D.A. Cheresh. α_V integrins in angiogenesis and cancer, *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 1 (2011) a006478.
- [93] P.C. Brooks, S. Stromblad, R. Klemke, D. Visscher, F.H. Sarkar, D.A. Cheresh. Antiintegrin $\alpha_v\beta_3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 1815-1822.
- [94] E. Dejana, C. Giampietro. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability, *Curr. Opin. Hematol.* 19 (2012) 218-223.
- [95] A. Woodfin, M.B. Voisin, S. Nourshargh. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 2514-2523.
- [96] M.J. Siemerink, I. Klaassen, I.M. Vogels, A.W. Griffioen, C.J. Van Noorden, R.O. Schlingemann. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures, *Angiogenesis* 15 (2012) 151-163.
- [97] V. Rivas, R. Carmona, R. Muñoz-Chápuli, M. Mendiola, L. Nogues, C. Reglero, M. Miguel-Martin, R. García-Escudero, G.W. Dorn 2nd, D. Hardisson, F. Mayor Jr, P. Penela. Developmental and tumoral vascularization is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 4714-4730.
- [98] M.L. Iruela-Arispe, G.J. Beitel. Tubulogenesis, *Development* 140 (2013) 2851-2855.
- [99] A.C. Zovein, A. Luque, K.A. Turlo, J.J. Hofmann, K.M. Yee, M.S. Becker, R. Fassler, I. Mellman, T.F. Lane, M.L. Iruela-Arispe. β_1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism, *Dev. Cell.* 18 (2010) 39-51.
- [100] D. Nichol, H. Stuhmann. EGFL7: A unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease, *Blood* 119 (2012) 1345-1352.
- [101] S.P. Herbert, D.Y. Stainier. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 551-564.

BIBLIOGRAFÍA

- [102] W.B. Saunders, B.L. Bohnsack, J.B. Faske, N.J. Anthis, K.J. Bayless, K.K. Hirschi, G.E. Davis. Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3, *J. Cell Biol.* 175 (2006) 179-191.
- [103] E.A. Jones, F. le Noble, A. Eichmann. What determines blood vessel structure? genetic prespecification vs. hemodynamics, *Physiology (Bethesda)* 21 (2006) 388-395.
- [104] S. Dimmeler, J. Haendeler, V. Rippmann, M. Nehls, A.M. Zeiher. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells, *FEBS Lett.* 399 (1996) 71-74.
- [105] P. Carmeliet. Angiogenesis in health and disease, *Nat. Med.* 9 (2003) 653-660.
- [106] A.G. Arroyo, M.L. Iruela-Arispe. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response, *Cardiovasc. Res.* 86 (2010) 226-235.
- [107] W.W. Li, K.E. Talcott, A.W. Zhai, E.A. Kruger, V.W. Li. The role of therapeutic angiogenesis in tissue repair and regeneration, *Adv. Skin Wound Care* 18 (2005) 491-500; quiz 501-2.
- [108] D. Hanahan, J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* 86 (1996) 353-364.
- [109] G. Bergers, L.E. Benjamin. Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 401-410.
- [110] P. Carmeliet. Angiogenesis in life, disease and medicine, *Nature* 438 (2005) 932-936.
- [111] D. Hanahan, R.A. Weinberg. Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell* 144 (2011) 646-674.
- [112] D. Hanahan, J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* 86 (1996) 353-364.
- [113] G. Bergers, L.E. Benjamin. Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 401-410.
- [114] P. Carmeliet. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nat. Med.* 6 (2000) 389-395.

- [115] N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 789-791.
- [116] V. Baeriswyl, G. Christofori. The angiogenic switch in carcinogenesis, *Semin. Cancer Biol.* 19 (2009) 329-337.
- [117] S. Paget. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133 (1889) 571.
- [118] N. Ribelles, A. Santonja, B. Pajares, C. Llacer, E. Alba. The seed and soil hypothesis revisited: Current state of knowledge of inherited genes on prognosis in breast cancer, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 293-299.
- [119] D. Ribatti, A. Vacca. Overview of angiogenesis during tumor growth, (2008) 161-168.
- [120] A.G. Dalglish, K. O'Byrne. Inflammation and cancer: The role of the immune response and angiogenesis, *Cancer Treat. Res.* 130 (2006) 1-38.
- [121] D. Ribatti, E. Crivellato. Immune cells and angiogenesis, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 2822-2833.
- [122] R.D. Loberg, C. Ying, M. Craig, L.L. Day, E. Sargent, C. Neeley, K. Wojno, L.A. Snyder, L. Yan, K.J. Pienta. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo, *Cancer Res.* 67 (2007) 9417-9424.
- [123] L. Izhak, G. Wildbaum, S. Jung, A. Stein, Y. Shaked, N. Karin. Dissecting the autocrine and paracrine roles of the CCR2-CCL2 axis in tumor survival and angiogenesis, *PLoS One* 7 (2012) e28305.
- [124] A. Sica, A. Mantovani. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 787-795.
- [125] S. Gazzaniga, A.I. Bravo, A. Guglielmotti, N. van Rooijen, F. Maschi, A. Vecchi, A. Mantovani, J. Mordoh, R. Wainstok. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 2031-2041.
- [126] M.T. Rizzo. Cyclooxygenase-2 in oncogenesis, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 671-687.

- [127] M. Baay, A. Brouwer, P. Pauwels, M. Peeters, F. Lardon. Tumor cells and tumor-associated macrophages: Secreted proteins as potential targets for therapy, *Clin. Dev. Immunol.* 2011 (2011) 565187.
- [128] J. R. Hanson, A. G. Davies, D. Phillips, *Natural products: The secondary metabolites*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, 2003.
- [129] L. Zhang, A. L. Demain, *Natural products: Drug discovery and therapeutic medicine*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005.
- [130] M. García-Caballero, M. Mari-Beffa, L. Canedo, M.A. Medina, A.R. Quesada. Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angiosuppressor that interferes with the akt pathway, *Biochem. Pharmacol.* 85 (2013) 1727-1740.
- [131] J.A. García-Vilas, A.R. Quesada, M.A. Medina. 4-methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 4063-4071.
- [132] B. Martínez-Poveda, J.A. García-Vilas, C. Cárdenas, E. Melgarejo, A.R. Quesada, M.A. Medina. The brominated compound aeroplysinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro- inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells, *PLoS One* 8 (2013) e55203.
- [133] J. Liu. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J. Ethnopharmacol.* 49 (1995) 57-68.
- [134] C. Ling, L. Jinping, L. Xia, Y. Renyong. Ursolic acid provides kidney protection in diabetic rats, *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 75 (2013) 59-63.
- [135] P.H. Huang, C.Y. Huang, M.C. Chen, Y.T. Lee, C.H. Yue, H.Y. Wang, H. Lin. Emodin and aloe-emodin suppress breast cancer cell proliferation through ER alpha inhibition, *Evid Based. Complement. Alternat Med.* 2013 (2013) 376123.
- [136] M.A. Spiller. The chemical components of coffee, *Prog. Clin. Biol. Res.* 158 (1984) 91-147.
- [137] G. Gross, E. Jaccaud, A.C. Huggett. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews, *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 547-554.

Kahweol, a coffee diterpene with anti-inflammatory properties

(Coffee in Health and Disease Prevention, Elsevier, Victor Preedy, 2014, London)

Casimiro Cárdenas, Ana R. Quesada and Miguel Ángel Medina

Este artículo está aceptado, pendiente de impresión y tiene reservados los derechos de autor.

Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process

Casimiro Cárdenas, Ana R. Quesada and Miguel Ángel Medina

Este artículo tiene reservados los derechos de autor.

Puede ser visitado en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.183>

Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin

Casimiro Cárdenas, Ana R. Quesada and Miguel Ángel Medina

Este artículo tiene reservados los derechos de autor.

Puede ser visitado en:

<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6399-6>

ANEXO IV

**Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of
Kahweol, a Coffee Diterpene**

Casimiro Cárdenas, Ana R. Quesada and Miguel Ángel Medina

Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene

Casimiro Cárdenas¹, Ana R. Quesada^{1,2}, Miguel A. Medina^{1,2*}

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

Abstract

Background: Epidemiological studies have shown that unfiltered coffee consumption is associated with a low incidence of cancer. This study aims to identify the effects of kahweol, an antioxidant diterpene contained in unfiltered coffee, on angiogenesis and key inflammatory molecules.

Methodology/Principal Findings: The experimental procedures included *in vivo* angiogenesis assays (both the chicken and quail chorioallantoic membrane assay and the angiogenesis assay with fluorescent zebrafish), the *ex vivo* mouse aortic ring assay and the *in vitro* analysis of the effects of treatment of human endothelial cells with kahweol in cell growth, cell viability, cell migration and zymographic assays, as well as the tube formation assay on Matrigel. Additionally, two inflammation markers were determined, namely, the expression levels of cyclooxygenase 2 and the levels of secreted monocyte chemoattractant protein-1. We show for the first time that kahweol is an anti-angiogenic compound with inhibitory effects in two *in vivo* and one *ex vivo* angiogenesis models, with effects on specific steps of the angiogenic process: endothelial cell proliferation, migration, invasion and tube formation on Matrigel. We also demonstrate the inhibitory effect of kahweol on the endothelial cell potential to remodel extracellular matrix by targeting two key molecules involved in the process, MMP-2 and uPA. Finally, the anti-inflammatory potential of this compound is demonstrated by its inhibition of both COX-2 expression and MCP-1 secretion in endothelial cells.

Conclusion/Significance: Taken together, our data indicate that, indeed, kahweol behaves as an anti-inflammatory and anti-angiogenic compound with potential use in antitumoral therapies. These data may contribute to the explanation of the reported antitumoral effects of kahweol, including the recent epidemiological meta-analysis showing that drinking coffee could decrease the risk of certain cancers.

Citation: Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA (2011) Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene. PLoS ONE 6(8): e23407. doi:10.1371/journal.pone.0023407

Editor: David L. McCormick, IIT Research Institute, United States of America

Received: February 4, 2011; **Accepted:** July 15, 2011; **Published:** August 9, 2011

Copyright: © 2011 Cárdenas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Our experimental work is supported by grants PS09/02216 and TRACE PT2008-0145 (Spanish Ministry of Science and Innovation, www.micinn.es, www.juntadeandalucia.es), and PIE P08-CTS-3759, CVI-6585, and funds from group BIO-267 (Andalusian Government). The "CIBER de Enfermedades Raras" (www.ciberer.es) is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III (Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: medina@uma.es

Introduction

Many different foods contain non-nutritional components that can have beneficial effects to the health [1]. This is the case of coffee, which includes more than a thousand of compounds [2]. One of these is kahweol (Figure 1), an antioxidant diterpene that remains in unfiltered coffee beverages, such as Turkish and Scandinavian coffee [3]. Epidemiological studies associate the consumption of unfiltered coffee with a low incidence of colon and liver cancer [4,5]. Furthermore, its preventive effects against oxidative stress and DNA damage are well described [6].

Angiogenesis is a hallmark of cancer, required for both cancer progression and metastasis [7]. Mechanistically, angiogenesis is a very complex process in which several key steps are involved [8]. In fact, when quiescent endothelial cells are activated by some proangiogenic signal, they change their phenotype to become highly proliferative and able to migrate, remodel the surrounding extracellular matrix (ECM) and finally to differentiate to form new

vessels. Any of these key steps can be a potential pharmacological target to inhibit angiogenesis and, hence, to treat angiogenesis-dependent diseases [9].

Our group is actively involved in the search for new modulators of angiogenesis from natural sources [10,11,12,13,14]. In the present study, the effects of kahweol on two *in vivo* and one *ex vivo* model of angiogenesis and on several key steps of the process are described. They include its effects on endothelial cell "differentiation" to yield tubular-like structures, endothelial and tumor cell proliferation, apoptosis, and migration, as well as its effects on extracellular matrix remodelling enzyme activities of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). We have also investigated kahweol antiinflammatory potential through cyclooxygenase-2 (COX-2) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) modulation. Our results reinforce the potential pharmacological interest of kahweol, as suggested by its anti-angiogenic and anti-inflammatory effects.

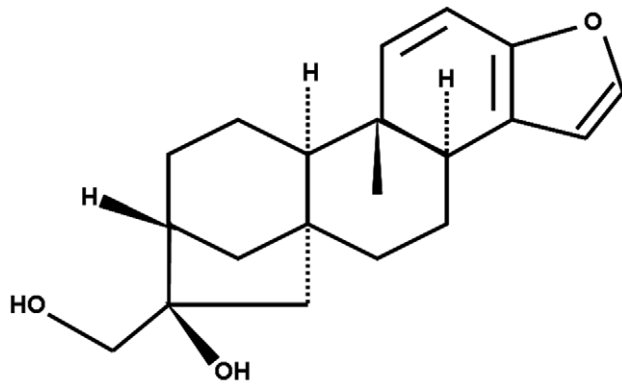


Figure 1. Chemical structure of kahweol.
doi:10.1371/journal.pone.0023407.g001

Results

Kahweol inhibits *in vivo* angiogenesis

The chicken chorioallantoic membrane (CAM) assay was used to determine the ability of kahweol to inhibit angiogenesis *in vivo*. Although 50 nmol of kahweol per CAM was required to observe *in vivo* inhibition of angiogenesis in 100% of treated eggs, as little as 10 nmol of kahweol was enough to induce clear inhibition of angiogenesis in 25% of the tested eggs in the CAM assay. Figure 2 (upper lane) shows that kahweol treatment induced disorganization and inhibition of the ingrowth of new vessels in the area covered by the discs containing the compound. It can also be observed that the peripheral vessels (relative to the position of the disc) grew centrifugally, avoiding the treated area, with an overall decrease in the vascular density.

A second experimental approach used to test the effects of kahweol on *in vivo* angiogenesis was the use of a model of transgenic zebrafish. Figure 2 (lower line) shows representative images of the effects of 75 μM kahweol for 24 h on intersegmental vessels of 3 days-post mating larvae. The results obtained showed a decrease in the width of some vessels and interruptions in other vessels. A quantitative analysis of these effects revealed that 85% of 75 μM kahweol-treated and 75% of 25 μM kahweol-treated larvae exhibited inhibited angiogenesis (results not shown). This inhibitory effect is unambiguously shown by video recording of blood flow. In the supplementary material, Video S1 shows clearly a continuous blood flow along intersegmental vessel of control zebrafish larvae. In contrast, Video S2 shows that larvae treated with 50 μM kahweol for 24 h exhibited no blood flow along intersegmental vessels.

Kahweol induces non-specific cell apoptosis in quail CAM

A modified CAM assay in the quail has been adopted in our laboratory, which makes possible to stain simultaneously endothelial cells and apoptotic nuclei [15]. Figure 2 (middle line) shows that 50 nmol kahweol induced apoptosis in a small percentage of cells but this effect did not seem to be endothelial cell specific, since only few apoptotic nuclei corresponded to endothelial cells.

Kahweol inhibits endothelial cell sprouting in the mouse aortic ring assay

A third line of evidence showing the potential of kahweol to inhibit overall angiogenesis is provided by the *ex vivo* model of the mouse aortic ring assay. Figure 3 shows that under control conditions the aortic ring was able to generate new vessel sproutings and that the density of these sproutings increased in the presence of

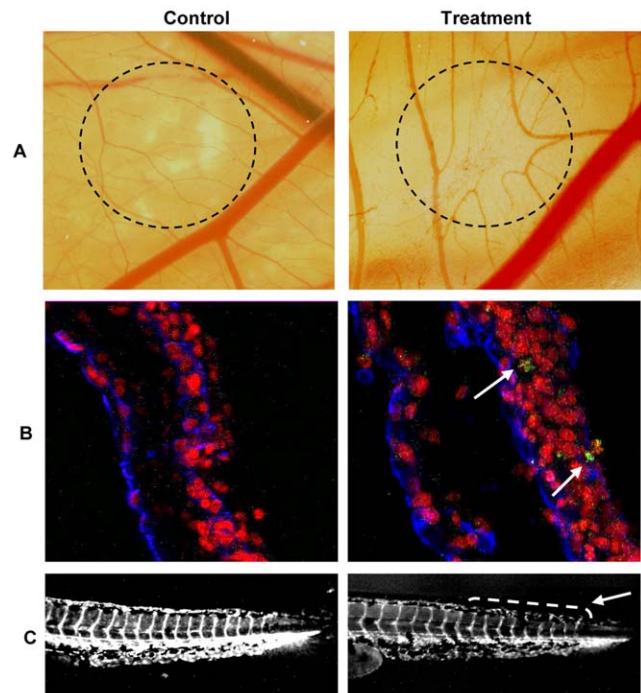


Figure 2. Kahweol inhibits *in vivo* angiogenesis and does not induce endothelial cell-specific apoptosis in the quail CAM assay. A) CAM assay. Dotted circles identify the position of the methyl cellulose discs after incubation, carried out as described in Materials and methods. In controls, methyl cellulose discs were prepared with the vehicle (DMSO). In treatments, methyl cellulose discs contained 50 nmol of kahweol. B) Detection of apoptosis in the quail CAM assay. Arrows point to apoptotic cells. C) Angiogenesis assay in the zebrafish model. The arrow points to the caudal region with narrower and disrupted intersegmental vessels in kahweol treated zebrafish embryos. doi:10.1371/journal.pone.0023407.g002

the proangiogenic agent VEGF. As Figure 3 shows, kahweol treatment inhibited endothelial cell sprouting (panel A), and this effect was observed along treatment from day 5 to 10 (panel B). Furthermore, a clear dose-response inhibition of microvessel formation was observed and quantified in treatments with kahweol. In fact, 5 μM kahweol was able to inhibit microvessel sprouting by 40%, whereas 25 μM kahweol almost completely inhibited this angiogenic response after 10 days of treatment (panel C).

Kahweol inhibits endothelial cell proliferation

Angiogenesis involves local proliferation of endothelial cells in response to an angiogenic stimulus. However, the desirable endothelial cell specificity of this effect is not a common feature [11].

Therefore, we studied the effects of kahweol on the growth of endothelial cells. Figure 4 shows the mean survival curves obtained with the MTT assay in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), under conditions of normal and low proliferation rates (20% and 2% of FBS). From these curves, estimated IC_{50} values were 50 ± 1 and 147 ± 7 μM for proliferative and non-proliferative HUVEC cells, respectively. This effect on cell survival was not endothelial cell-specific, since IC_{50} values for kahweol treatment of several human tumoral cell lines were similar to those obtained for HUVEC (results not shown).

Kahweol does not induce apoptosis on HUVEC

Cell growth is the result of the balance between their proliferation and death rates. Therefore, it would be advisable to

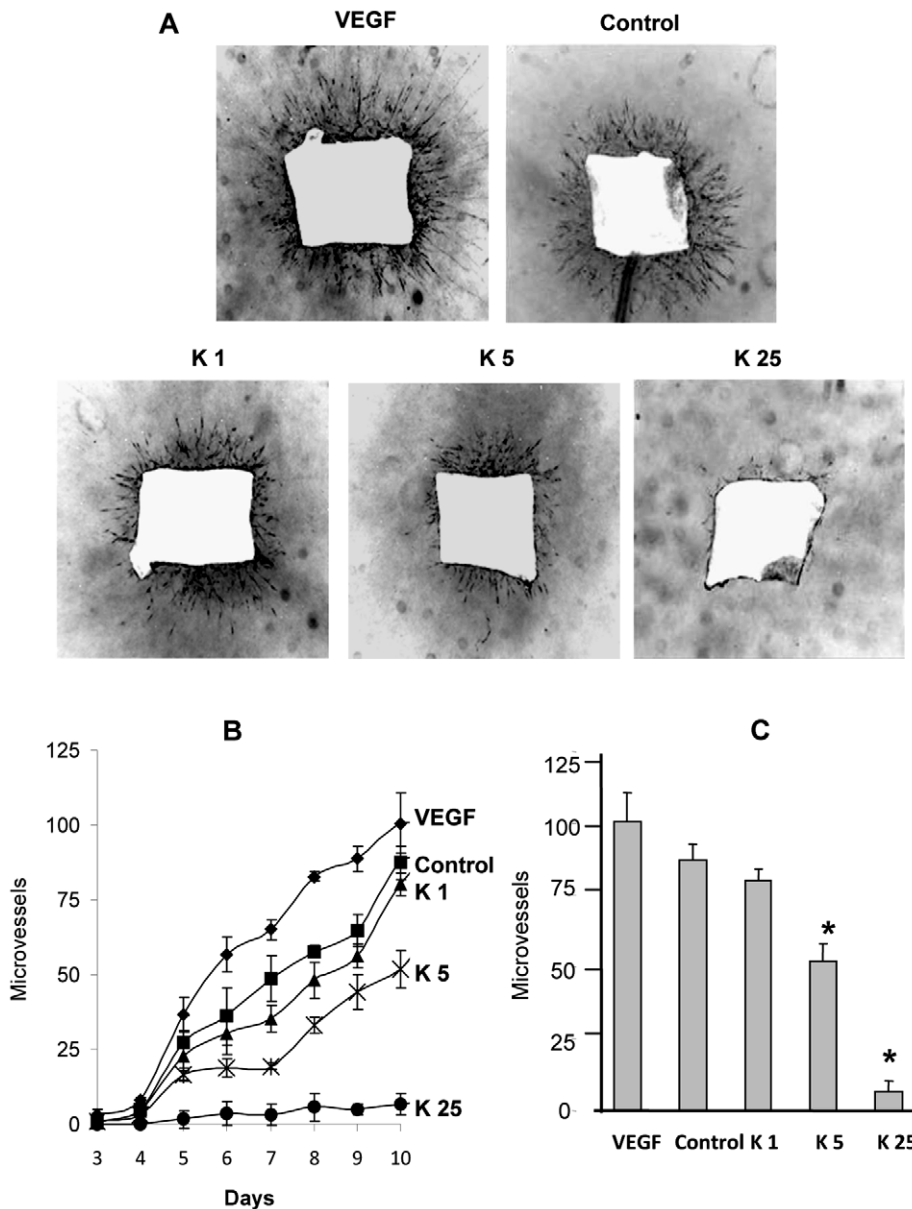


Figure 3. Kahweol inhibits endothelial cell sprouting from aortic rings in a dose-dependent manner. Aortic ring assay was performed as described in Materials and methods. A) Negative of photographs (x20) of aortic rings (lateral view) after 10 days of incubation in a 3D collagen gel overlaid with complete medium in the presence of 20 mg/mL VEGF, 0.05% DMSO (the vehicle taken as a control), or kahweol at 1, 5 and 25 μ M (K1, K5, K25, respectively). Experiments were repeated at least three times. B) Microvessel time course for the different treatments mentioned in A. Data are given as microvessel total count at different incubation times (spanning from 3 to to 10 days), and they are means \pm S.D. of three different experiments. C) Microvessel total count after 10 days of incubation. Data are given as microvessel total count, and they are means \pm S.D. of three different experiments. *Statistically significant ($p < 0.01$) as compared to control values, according to a two-tailed Student's *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0023407.g003

test the potential effects of kahweol on endothelial cell apoptosis. However, a treatment with 25 μ M kahweol was not able to induce apoptosis in HUVEC (results not shown). As a positive control, a treatment with 10 μ M 2-methoxyestradiol was used.

Kahweol inhibits tubule formation of endothelial cells on Matrigel

The final event during angiogenesis is the formation of a three-dimensional network of tubes by endothelial cells. *In vitro*, endothelial cells plated on Matrigel align themselves forming cords (Figure 5, C -, negative controls). Figure 5 shows the effect

of two different concentrations of kahweol in this assay after 6 h of treatment. As a positive control for total inhibition, 50 μ M suramin-treatment for 6 h was used (Figure 5, C+). The kahweol concentrations required to inhibit the differentiation of HUVEC cells did not affect their viability (results not shown).

Kahweol inhibits HUVEC endothelial cell migration

Cell migration is a key step shared by both angiogenesis and tumor progression. Figure 6 shows the effects of 75 μ M kahweol on endothelial cell migration, as determined by the "wound healing" assay, after 8 and 24 h of treatment. Quantitative

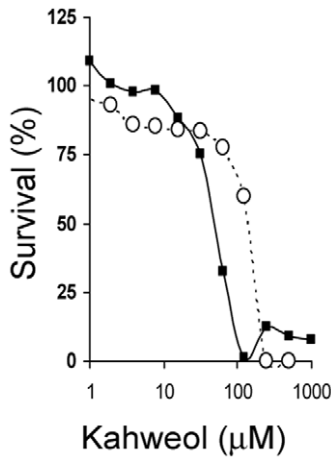


Figure 4. Kahweol inhibits endothelial cell proliferation. Survival curves of proliferative (squares) and non-proliferative (circles) HUVEC endothelial cells treated with kahweol. Concentrations are represented in logarithmic scale. Depicted data are means of values of three independent experiments (each one with quadruplicate samples). Standard deviation values (in all the cases lower than 20% of mean values) are not represented for the sake of clarity. doi:10.1371/journal.pone.0023407.g004

determination of the invaded area shows a significant 30 and 66% inhibitory effect of kahweol after 8 and 24 h of treatment, respectively.

Kahweol inhibits endothelial cell invasion

Cell invasion is another key step of angiogenesis. Data obtained on the effects of kahweol on endothelial cell invasion (as determined by a continuous fluorescent assay) clearly show that kahweol induces an anti-invasive effect in HUVEC in a dose-dependent manner (Figure 7). In fact, the rate of invasion was inhibited a 23, 33 and 52% (as compared to the rate of invasion for control, untreated cells) by 25, 50 and 75 μM kahweol treatments, respectively.

Kahweol inhibits endothelial cell MMP-2 and urokinase

MMP-2 and uPA are extracellular matrix remodeling enzymes expressed by endothelial cells and involved in angiogenesis.

Figure 8 (A) shows that kahweol inhibits HUVEC MMP-2 expression, with a clear dose response effect and complete inhibition by 50 μM kahweol. An *in situ* activity assay with HT-1080 gelatinases (Figure 8 B) shows that this is not a direct effect on the enzyme.

Figure 8 (C) shows that kahweol-treatment induces a dose-dependent decrease in the levels of urokinase in HUVEC conditioned media, with an almost complete inhibition at 50 μM kahweol.

Kahweol inhibits endothelial cell COX-2 expression and MCP-1 secretion

COX-2 is an important pro-inflammatory protein expressed at high levels in tumoral angiogenic vessels. Figure 9 (A and B) shows that kahweol inhibits in a dose dependent manner the expression of COX-2 protein by HUVEC.

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a key protein mediating inflammatory processes. Endothelial cells do express and secrete MCP-1. Figure 9 (C) shows that kahweol treatment also induced a dose-dependent inhibition on MCP-1 secretion by HUVEC.

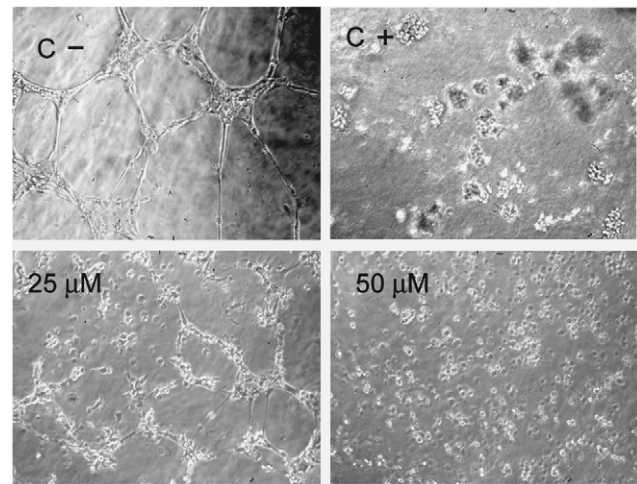


Figure 5. Kahweol inhibits tubule formation of endothelial cells on Matrigel in a dose-dependent manner. Data are representative of, at least, three independent experiments. (C-) Negative controls, HUVEC on Matrigel with no treatment. (C+) Positive controls, HUVEC on Matrigel treated with 50 μM suramin. doi:10.1371/journal.pone.0023407.g005

Discussion

Angiogenesis plays a key role in tumor growth, invasion and metastasis. However, the results obtained in the clinical treatment of cancer with approved antiangiogenic compounds show only limited -although significant- improvement [16,17]. It should be stressed that this first generation of antiangiogenic compounds targets the first step of VEGF biosignaling. As we have previously suggested, since tumor angiogenesis is very complex and involves a number of different cell types, a multi-target approach for the antiangiogenic treatment of cancer could be expected to produce better results [18]. Therefore, new multi-targeted compounds (or combinations of them) are urgently required to be introduced in the clinical setup. The results shown in the present study clearly indicate that kahweol is another natural anti-angiogenic compound with a wide spectrum of targets [10,11,12,19,20].

In the CAM assay, the inhibitory doses exhibited by kahweol are similar to those of other anti-angiogenic compounds found by us to inhibit angiogenesis in the CAM assay [10,19], and much lower than those of other anti-angiogenic compounds [21]. The global morphological features (including centrifugal growth of the peripheral vessels -relative to the position of the disc-, avoiding the treated area, with an overall decrease in the vascular density) elicited by kahweol treatment are also in agreement with those previously observed for other anti-angiogenic compounds. On the other hand, the present research work shows a confirmatory evidence of the potential of kahweol to inhibit *in vivo* angiogenesis, by using another completely independent model system, namely, that of genetically modified zebrafish. Furthermore, a third independent approach (the mouse aortic ring assay) confirms the high potential of kahweol to inhibit angiogenesis in a nice dose-dependent manner.

The CAM and zebrafish *in vivo* assays and the *ex vivo* mouse aortic ring assay clearly identify kahweol as a new anti-angiogenic compound, but gives no information on which specific steps of angiogenesis are targeted by this compound. To characterize an anti-angiogenic compound, it is advisable to study its effects on the different steps involved in angiogenesis. To get new, additional insights on the features of kahweol as an anti-angiogenic compound, we carried out a complete set of *in vitro* assays

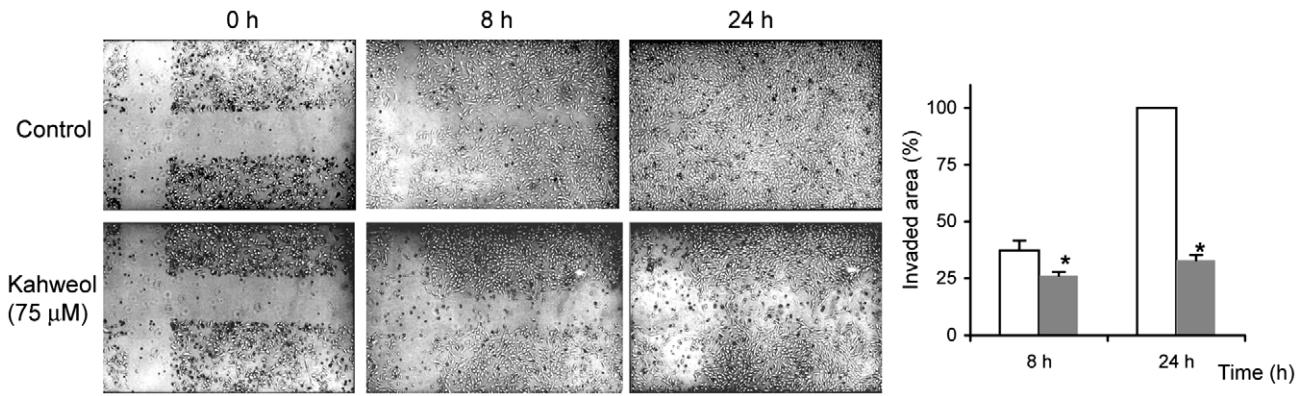


Figure 6. Kahweol inhibits endothelial cell migration. Photographs were taken on untreated (control) and 75 μM kahweol-treated HUVEC cells at 0, 8 and 24 h after “wounding”. Data are representative of, at least, three independent experiments. At the right, the counting of HUVEC migration into the “wounded” area at 8 and 24 h after “wounding” is depicted. Data are given as percentages of re-occupied “wounded” area and they are means ± S.D. of three different experiments. White bars are control values and grey bars correspond to treatments. *Statistically significant ($p < 0.01$) as compared to control values, according to a two-tailed Student’s *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0023407.g006

previously used by us to characterize the anti-angiogenic effects of other compounds from natural sources, including aeroplysinin-1, homocysteine, ursolic acid, puupehenone, hypericin, hyperforin and aloe-emodin, among others [11,12,13,19,20,21].

Angiogenesis involves local proliferation of endothelial cells in response to an angiogenic stimulus. In fact, several of the best characterized anti-angiogenic compounds were initially detected and selected for their capability to interfere with endothelial cell growth. This is the case of the extremely selective inhibitor of endothelial cell proliferation TNP-470, a synthetic analog of fumagillin with enhanced anti-angiogenic properties [22,23]. Many other natural anti-angiogenic compounds inhibit endothe-

lial cell proliferation [9,10,24,25]. However, the desirable endothelial cell specificity of this effect is not a common feature [11]. Our data obtained with the MTT assay suggest a non-specific cytotoxic effect of long term (3 days) treatments of both endothelial and tumor cells with micromolar concentrations of kahweol. Hence, kahweol seems to behave not only as a potential anti-angiogenic compound but also as a potential anti-tumoral compound, in agreement with previous observation from other groups [26]. On the other hand, IC₅₀ value for non-proliferative HUVEC was 3-fold that obtained for proliferative HUVEC, as expected.

Concerning the apoptosis assay, the negative effect on endothelial (HUVEC) cells is in agreement with our results in quail CAM. On the other hand, these data suggest that the potential effects of kahweol on apoptosis could exhibit certain cell specificity. Future studies in a wider range of tumor and endothelial cell types seem warranted.

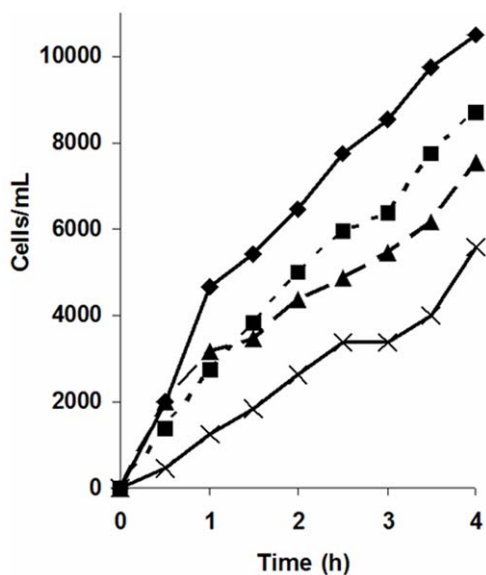


Figure 7. Kahweol inhibits HUVEC endothelial cell invasion in a dose-dependent manner. Invading controls and 25 and 75 μM kahweol-treated HUVEC cell count values are represented by using diamonds, squares and triangles, respectively. As negative controls, the number of untreated invading HUVEC to wells not containing chemoattractant was determined (crosses). Data are given as number of invading cells and they are means of two different assays (each one carried out in triplicate). doi:10.1371/journal.pone.0023407.g007

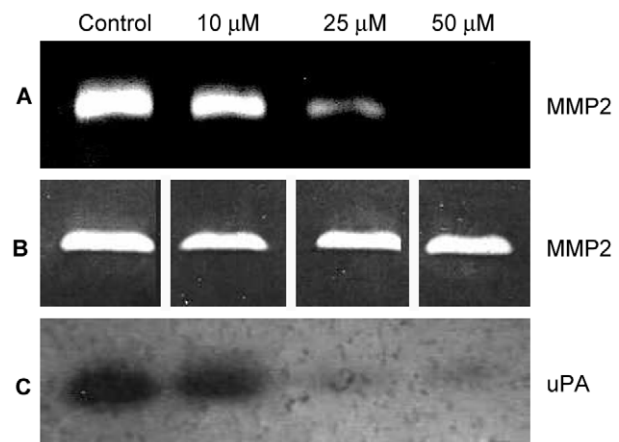


Figure 8. Kahweol inhibits HUVEC MMP-2 and uPA in a dose dependent manner. A) Gelatin zymography of MMP-2 in conditioned media of HUVEC after treatment with different kahweol concentrations. B) *In situ* determination of kahweol effects on HT-1080 gelatinases, as determined by gelatin zymography with the presence of kahweol in the incubation substrate buffer. C) Plasminogen zymography of HUVEC uPA after treatment with different kahweol concentrations. doi:10.1371/journal.pone.0023407.g008

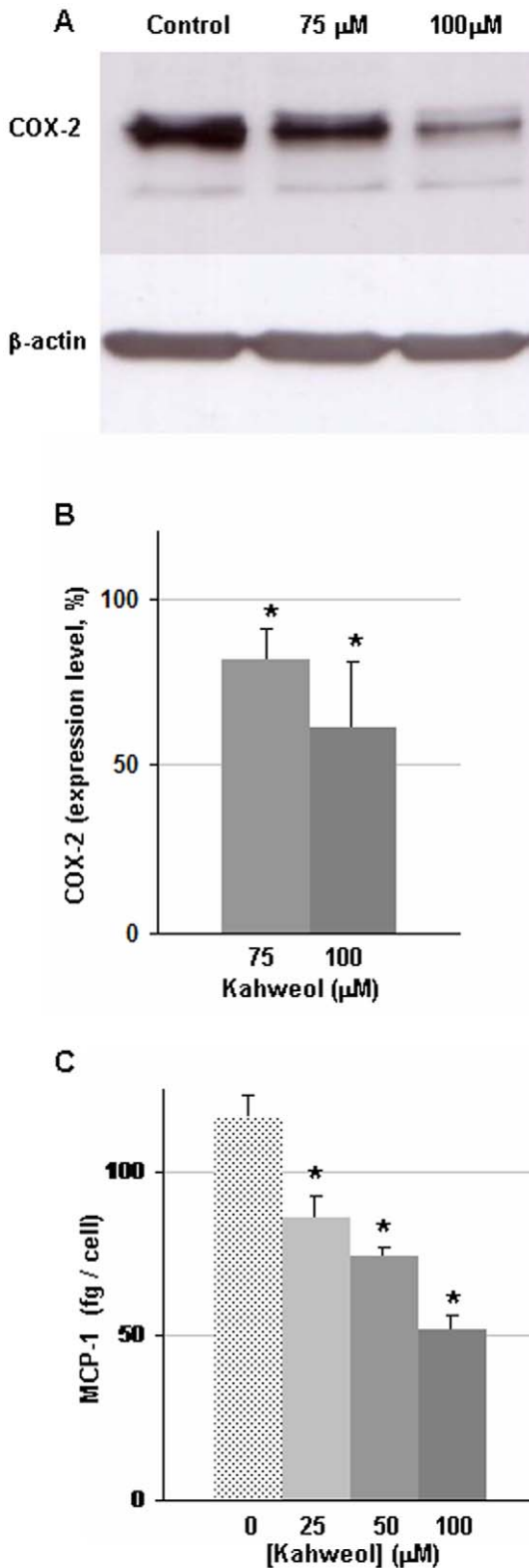


Figure 9. Kahweol inhibits HUVEC endothelial cell COX-2 expression and MCP-1 secretion in a dose-dependent manner.

A) Typical results of a Western blot assay using anti-COX-2 antibodies. B) Quantification of the normalized relative inhibitory effect. Data are given as percentage, taking the normalized levels of COX-2 in control cells as 100%, and they are means±S.D. of three different assays. C) Quantification of the amount of MCP-1 secreted by HUVEC after a 24 h treatment in the presence of different concentrations of kahweol. Data

are given as femtograms of secreted MCP-1 per cell, and they are means±S.D. of three different experiments. *Statistically significant ($p < 0.01$) as compared to control values, according to a two-tailed Student's *t*-test.
doi:10.1371/journal.pone.0023407.g009

The final event during angiogenesis is the organization of endothelial cells in a 3-D network of tubes. *In vitro*, endothelial cells plated on Matrigel align themselves forming cords, already evident a few hours after plating. The minimal inhibitory concentration for kahweol in this assay of “tubule-like” structures formation on Matrigel was 25 μM, in the range of concentrations at which other known antiangiogenic compounds produce this kind of effect [13,27]. Therefore, kahweol-treatment has another key target in this essential step of the angiogenesis process.

Migration of endothelial cells is required for angiogenesis to proceed. The results obtained in the “wound healing” assay clearly show that 75 μM kahweol is able to inhibit endothelial cell migration.

A key feature of endothelial cells switched to their angiogenic phenotype is their ability to invade the surrounding space. Our data also show that invasion is inhibited by kahweol. Since invasion is dependent on extracellular matrix remodeling capabilities, this inhibitory effect strongly suggested that the two key extracellular membrane remodeling enzymes expressed by endothelial cells, namely, MMP-2 and uPA could be other main key targets of the pharmacological action of kahweol on endothelial cells. Both proteases play key roles in angiogenesis, being involved in the positive proteolytic balance required for capillary sprout elongation and lumen formation during angiogenesis [28,29,30,31]. Matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2, MMP-9), commonly named gelatinases, are two key extracellular enzymes involved in ECM remodeling, which is an essential step required not only for angiogenesis, but also for metastasis [32,33,34]. uPA is a serine protease that is also involved in ECM remodeling related to angiogenesis and metastasis [35,36,37]. Our results in the zymographic assays for gelatinase and urokinase activities clearly showed that, in fact, kahweol was able to inhibit the expression of both MMP-2 and uPA, identifying them as two relevant molecular targets for kahweol.

On the other hand, the anti-oxidant nature of kahweol also points to its potential anti-inflammatory capabilities. Our results indicate that kahweol inhibits two key inflammatory mediators, COX-2 and MCP-1, which are also related with angiogenesis. It has been shown previously that kahweol exerts a suppressive effect on COX-2 expression in macrophages [38]. Recent studies have shown that COX-2 and MCP-1 receptor (CCR-2) induction in HUVEC is related to increased levels of VEGF and that specific antagonists of CCR2 decrease VEGF levels [39]. Furthermore, in COX-2 deficient mice a decrease in VEGF, and both reduced angiogenesis and tumor growth were observed [40]. These data indicate that both pro-inflammatory molecules are linked to tumor angiogenesis.

Altogether, our results demonstrate that kahweol is a potent anti-angiogenic compound both *in vitro* and *in vivo*, targeting some key steps shared with tumor progression, key molecules involved in ECM remodeling (MMP-2 and uPA), and key molecules involved in inflammation (COX-2 and MCP-1). All these effects may open a window for the potential therapeutical application of kahweol as an anti-angiogenic drug. In fact, recent epidemiological data show that coffee drinking diminishes the risk of some cancers [41,42]. Furthermore, the inhibitory effects of kahweol on COX-2 and MCP-1 reinforce the idea of kahweol being a multi-targeted

natural compound with high pharmacological potential. Further investigations with animal models seem warranted.

Materials and Methods

Ethics statement

All the manipulations of animals were carried out following the rules provided by the bioethical committee of the University of Málaga and permission according to RD1201/2005 provided by Consejería de Agricultura y Pesca (Andalusian Government). This study is part of a research project approved by the bioethical committee of the University of Málaga.

Material and reagents

Cell culture media were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA) and Cambrex (Walkersville, MD, USA). Fetal bovine serum (FBS) was a product of Harlan-Seralab (Belton, U.K.). Matrigel was purchased from Becton Dickinson (Bedford, MA, USA), and Calcein-AM was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Kahweol was supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Stock solution (10 mg/mL) was prepared in DMSO and stored in aliquots at -20°C . In all the assays, the vehicle (DMSO) was at less than 1% (v/v) and controls with the vehicle alone were carried out in parallel. Supplements and other chemicals not listed in this section were obtained from Sigma-Aldrich. Plastic ware for cell culture was supplied by NUNC (Roskilde, Denmark).

Cell cultures

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated by a modified collagenase treatment, as previously reported [43], and maintained as we described elsewhere [10]. HT-1080 fibrosarcoma cells were supplied by ATCC and maintained in culture as described by the provider. Culture media for tumor cells were supplemented with 10% FBS, whereas culture medium for HUVEC was supplemented with 20% FBS, with the exception of the experiment under low proliferation rate conditions (2% FBS).

In vivo angiogenesis CAM assay

The *in vivo* CAM assay was carried out as described elsewhere [21], using fertilised chick eggs, provided by Granja Santa Isabel (Córdoba, Spain). Briefly, eggs were incubated horizontally at 38°C in a humidified incubator, windowed by day 3 of incubation and processed by day 8. Kahweol stock solution was added to a 1% solution of methylcellulose in water, and 10 μL drops of this solution were allowed to dry on a Teflon-coated surface in a laminar flow hood. Then, the methylcellulose discs were implanted on the CAM, the eggs were sealed with adhesive tape and returned to the incubator for 48 h. Negative controls were always made with DMSO mixed with the methylcellulose. Six eggs were used for each tested dose of kahweol. After incubation, CAMs were examined under a stereomicroscope. The assay was scored as positive when two independent observers reported a significant reduction of vessels in the treated area.

In vivo angiogenesis assay with fluorescent zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) is being used as an easy *in vivo* study of angiogenesis and for the search of new modulators of angiogenesis [44]. Furthermore, the availability of transgenic lines of zebrafish exhibiting fluorescent blood vessels is allowing a rapid and precise analysis of vessels, thanks to the expression of a choral green fluorescent protein (G-RCFP) controlled by a promoter for VEGF-R2 [45].

One day after mating, eggs were transferred to a Petri dish, where they were treated with lye diluted to 0.5% in water for 90 s.

Then, they were washed 3 times for 3 min with water, and maintained for 24 h at 28.5°C . After this new incubation, chorion was retired and larvae were transferred to 96-well plates (a larva per well) with 0.1 mL of water per well in the presence of the indicated concentration of kahweol. After an additional 24 h incubation at 28.5°C , effects on blood vessels were observed with a binocular lens with filters for fluorescence and photographs were taken from relevant images.

Video images of blood flow thru intersegmental vessels were taken on the caudal region next to vitellus in 48 h larvae after 24 h of treatment in the absence (control, Video S1) or presence (Video S2) of 50 μM kahweol.

Detection of apoptosis in quail CAM

Apoptosis assays were carried out, after 24 h of incubation in the presence of kahweol, by staining of nuclei with Hoechst as described by us elsewhere [14].

Ex vivo mouse aortic ring assay

C57BL/6 mice (six weeks in age) were sacrificed by isofluran inhalation according to the local ethics committee. Thoracic aorta was carefully dissected and aortic rings were cultured in 3D collagen gels, as previously described [46]. Cultures were maintained at 37°C under controlled humid atmosphere (5% CO_2). The effects of kahweol, VEGF and the vehicle (DMSO) was tested by adding them to culture media at day zero. At different times of culture, rings were photographed under clear field illumination by using an inverted microscope with phase contrast Nikon Diaphot-TM (Nikon Corp., Tokyo, Japan). The angiogenic response was quantified by microvessel counting according to published criteria [47].

In vitro angiogenesis assays

Different *in vitro* assays were carried out in order to test the specific effects of kahweol treatment on several key steps of the angiogenic process in both endothelial and tumor cells. First of all, the MTT cell proliferation assay was carried out to determine the long term (after three days of incubation) cytotoxicity of kahweol and to evaluate its IC_{50} value for endothelial cells, as described by us elsewhere [10]. Subsequently, additional *in vitro* angiogenesis assays were carried out both in the absence and presence of kahweol in the range of concentrations of its IC_{50} value in the MTT assay. These assays included apoptosis assay, tube formation by endothelial cells on Matrigel, zymographic assays for the detection of gelatinases and urokinase in conditioned media of control and kahweol-treated cells, cell migration “wound healing” assay, and fluorescent cell invasion assays. All of them are extensively described by us elsewhere [10,12]. In all these *in vitro* assays, kahweol treatments were carried out under conditions (kahweol concentration and duration of treatment) that did produce no cytotoxic effect on cells. For zymographic assays, conditioned media and cell extracts were obtained as previously described by us [12]. The gelatinolytic assays were carried out in two different ways to obtain complementary information: firstly, cells were treated or not with the test compound and samples from these were submitted to gelatinase zymography to detect the effects of the kahweol treatment on the expression of gelatinase activities; secondly, in some experiments, samples from control, untreated HT-1080 fibrosarcoma cells were submitted to zymography and, after electrophoresis, different concentrations of kahweol were added to the substrate buffer to determine the potential direct effect of kahweol on gelatinase activity. In the invasion assay, fluorescence-labelled HUVEC cells are suspended in culture medium in the presence of different concentrations of kahweol and

in the absence of serum into FluoroBlok inserts whose filters were coated with Matrigel. These inserts are added to wells containing complete culture medium with 10% FBS as chemoattractant in 24-well fluorescence opaque plates allowing only monitoring of fluorescence from the bottom.

Expression of COX-2

Subconfluent HUVEC cultures were stimulated with PMA (50 ng/mL) for 4 h in the absence (controls) or presence of different concentrations of kahweol. After incubation, cells were washed twice with cold PBS and then lysed with cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate and 5 mg/mL of a protease inhibitors mixture). Cells were scrapped, and maintained within a microfuge tube in ice for 15 min. Afterwards, extracts were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4°C. Supernatants were stored at -80°C until the moment of analysis. These samples were denatured for 5 min at 95°C and submitted to SDS-PAGE. After electrophoresis, samples were electro-transferred to nitrocellulose PROTRAN membranes, blocked with 5% dried skimmed milk in 50 mM Tris pH 8.4, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20 (Tris buffered saline-Tween 20, TBS-T), and incubated overnight in the presence of an anti-COX-2 (at a dilution of 1:500) or anti-beta actin (at a dilution of 1:3500) monoclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology and Sigma, respectively). After three washing steps with TBS-T, a horseradish peroxidase antibody (diluted 1:10,000 in blocking buffer) was used as secondary antibody. After 1h of incubation at room temperature, samples were developed using the enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare).

Determination of secreted MCP-1

Conditioned media from untreated and kahweol treated HUVEC cells for 24 h were obtained. The secreted MCP-1

present in these conditioned media was quantified by using a MCP-1 human Biotrak Easy ELISA (GE Healthcare), following supplier's instructions.

Statistics and image analysis

All quantitative data are expressed as means \pm standard deviation (S.D.). Two-tailed Student's *t*-test was used for evaluations of pair of means, to establish which groups differed from the control group. Quantitative analysis of images was performed with the NIH Image 1.6 Program.

Supporting Information

Video S1 Blood flow thru intersegmental vessels in control, untreated 48 h zebrafish larvae.

(AVI)

Video S2 Blood flow thru intersegmental vessels in 48 h zebrafish larvae treated for 24 h with 50 μ M kahweol.

(AVI)

Acknowledgments

We would like to thank the assistance provided by Sarah Berndt and Guy Roland (Laboratory of Tumor and Development Biology, Université de Liège) in the implementation of the aortic ring assays and the technical help of Miss Melissa García-Caballero (Universidad de Málaga) in the preparation of videos.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ARQ MAM. Performed the experiments: CC. Analyzed the data: CC ARQ MAM. Wrote the paper: ARQ MAM.

References

- Bellisle F, Diplock AR, Hornstra G, Koletzko B, Roberfroid M, et al. (1998) Functional food in Europe. *British Journal of Nutrition* 80: S1–S93.
- Spiller MA (1984) The chemical components of coffee. *Prog Clin Biol Res* 158: 91–147.
- Bengis RO, Anderson RJ (1932) The chemistry of coffee bean. I. Concerning the unsaponifiable matter of the coffee bean oil. Extraction and properties of kahweol. *J Biol Chem* 97: 99–113.
- Giovanucci E (1998) Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *Am J Epidemiol* 147: 1043–1052.
- Larsson SC, Wolk A (2007) Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 132: 1740–1745.
- Lee KJ, Jeong HG (2007) Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. *Toxicol Lett* 173: 80–87.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
- Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Medina MA (2004) Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 2224–2243.
- Quesada AR, Muñoz-Chápuli R, Medina MA (2006) Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Rev* 26: 483–530.
- Rodríguez-Nieto S, González-Iriarte M, Carmona R, Muñoz-Chápuli R, Medina MA, et al. (2002) Antiangiogenic activity of aeropylsinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *Faseb J* 16: 261–263.
- Castro ME, González-Iriarte M, Barrero AF, Salvador-Tormo N, Muñoz-Chápuli R, et al. (2004) Study of puerphenone and related compounds as inhibitors of angiogenesis. *Int J Cancer* 110: 31–38.
- Martínez-Poveda B, Quesada AR, Medina MA (2005) Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int J Cancer* 117: 775–780.
- Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA (2006) Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloec-emodin. *Cell Mol Life Sci* 63: 3083–3089.
- Martínez-Poveda B, Muñoz-Chápuli R, Rodríguez-Nieto S, Quintela JM, Fernández A, et al. (2007) IB05204, a dichloropyridodithienotriazine, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 6: 2675–2685.
- González-Iriarte M, Carmona R, Pérez-Pomares JM, Macías D, Medina MA, et al. (2003) A modified chorioallantoic membrane assay allows for specific detection of endothelial apoptosis induced by antiangiogenic substances. *Angiogenesis* 6: 251–254.
- Medina MA, Muñoz-Chápuli R, Quesada AR (2007) Challenges of antiangiogenic cancer therapy: trials and errors, and renewed hope. *J Cell Mol Med* 11: 374–382.
- Quesada AR, Medina MA, Muñoz-Chápuli R, Ponce AL (2010) Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies. *Curr Pharm Des* 16: 3932–3957.
- Quesada AR, Medina MA, Alba E (2007) Playing only one instrument may be not enough: limitations and future of the antiangiogenic treatment of cancer. *Bioessays* 29: 1159–1168.
- Martínez-Poveda B, Quesada AR, Medina MA (2005) Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. *Eur J Pharmacol* 516: 97–103.
- Rodríguez-Nieto S, Chavarria T, Martínez-Poveda B, Sánchez-Jiménez F, Quesada AR, et al. (2002) Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 497–500.
- Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA (2004) Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 402–408.
- Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, et al. (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348: 555–557.
- Rodríguez-Nieto S, Medina MA, Quesada AR (2001) A re-evaluation of fumagillin selectivity towards endothelial cells. *Anticancer Res* 21: 3457–3460.
- Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K (2001) Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* 171: 11–16.
- Shimamura M, Hazato T, Ashino H, Yamamoto Y, Iwasaki E, et al. (2001) Inhibition of angiogenesis by humulone, a bitter acid from beer hop. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 220–224.
- Kim HG, Hwang YP, Jeong HG (2009) Kahweol blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Toxicol Lett* 187: 28–34.
- Kim MS, Lee YM, Moon EJ, Kim SE, Lee JJ, et al. (2000) Anti-angiogenic activity of torilin, a sesquiterpene compound isolated from *Torilis japonica*. *Int J Cancer* 87: 269–275.
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327–336.

29. Binder BR, Mihaly J, Prager GW (2007) uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost* 97: 336–342.
30. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52–67.
31. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG (2010) Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 20: 161–168.
32. Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1990) Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111: 743–755.
33. Stetler-Stevenson WG (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103: 1237–1241.
34. Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161–174.
35. Rabbani SA (1998) Metalloproteinases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. *In Vivo* 12: 135–142.
36. Mazar AP, Henkin J, Goldfarb RH (1999) The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis* 3: 15–32.
37. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, et al. (2003) Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 60: 463–473.
38. Kim JY, Jung KS, Jeong HG (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett* 569: 321–326.
39. Futagami S, Hiratsuka T, Shindo T, Hamamoto T, Tatsuguchi A, et al. (2008) COX-2 and CCR2 induced by CD40 ligand and MCP-1 are linked to VEGF production in endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78: 137–146.
40. Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2003) Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition. *Oncogene* 22: 8021–8030.
41. Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A (2009) Coffee drinking and risk of endometrial cancer—a population-based cohort study. *Int J Cancer* 125: 2413–2417.
42. Nkondjock A (2009) Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. *Cancer Lett* 277: 121–125.
43. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589–1598.
44. Serbedzija GN, Flynn E, Willett CE (1999) Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis* 3: 353–359.
45. Cross LM, Cook MA, Lin S, Chen JN, Rubinstein AL (2003) Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 911–912.
46. Masson VV, Devy L, Grignet-Debrus C, Bernt S, Bajou K, et al. (2002) Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol Proced Online* 4: 24–31.
47. Nicosia RF, Ottinetti A (1990) Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 63: 115–122.



Correction: Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene

Casimiro Cárdenas, Ana R. Quesada, Miguel A. Medina

Published: November 01, 2011 • DOI: 10.1371/annotation/38262cc6-07cc-4074-8ce7-2181d4d0fbd

The correct Reference 45 is: 45. Lawson ND, Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 248:307–318.

Citation: Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA (2011) Correction: Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene. *PLoS ONE* 6(11): 10.1371/annotation/38262cc6-07cc-4074-8ce7-2181d4d0fbd. doi:10.1371/annotation/38262cc6-07cc-4074-8ce7-2181d4d0fbd

Published: November 01, 2011

Copyright: © 2011 . This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing interests: No competing interests declared.

ANEXO V

Insights on the antitumor effects of kahweol on human breast cancer: Decreased survival and increased production of reactive oxygen species and cytotoxicity

Casimiro Cárdenas, Ana R. Quesada and Miguel Ángel Medina

Este artículo tiene reservados los derechos de autor.

Puede ser visitado en:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.026>

METODOLOGÍA

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Aislamiento y cultivo de células endoteliales de aorta bovina (BAEC) | 3 |
| Aislamiento y cultivo de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) | 5 |
| Ensayo de proliferación celular con MTT | 9 |
| Tinción de núcleos con colorante de Hoechst | 11 |
| Zimografía de gelatina | 13 |
| Gelatinograma de actividad in situ | 17 |
| Gelatinograma reverso | 19 |
| Zimografía de plasminógeno | 23 |
| Ensayo de “herida” (<i>wound-healing</i>) | 27 |
| Ensayo de migración en cámara de Boyden | 29 |
| Ensayo de invasión en cámara de Boyden modificada | 33 |
| Ensayo de tubulogénesis sobre Matrigel | 35 |
| Ensayos sobre membrana corioalantoidea (CAM) de embriones de pollo | 37 |
| Ensayos de apoptosis endotelial sobre CAM de embriones de codorniz | 39 |
| Ensayo in vivo de pez cebra fluorescente | 43 |
| Ensayo de anillo aórtico de ratón | 45 |
| Ensayo clonogénico en agar blando (<i>soft agar</i>) | 49 |

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE AORTA BOVINA

El cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina (BAEC) constituye un modelo experimental sencillo, accesible y de bajo coste; muy útil para ensayos de cribado que requieren disponer de un gran volumen de células endoteliales en cultivo.

Materiales

- Tubos de 50 ml.
- Bridas plásticas de pequeñas estériles.
- Frascos de cultivo T-25.

Reactivos

- Alcohol 70%.
- Tampón fosfato salino (PBS).
- Penicilina / estreptomycin 5.000 U/ml / 5.000 U/ml.
- Anfotericina B 250 µg/ml.
- Hielo.
- Colagenasa P (Boehringer).
- MgCl₂•6H₂O.
- CaCl₂•2H₂O.
- DMEM (1 g/l de glucosa).
- L-glutamina 200 mM.
- Suero fetal de ternera (FBS).
- Gelatina.

Preparación del material y los reactivos

PBS-antibióticos:

- 1 l PBS.
- 20 ml penicilina/estreptomycin.
- 10 ml Anfotericina B.

Colagenasa P (Boehringer) 1 mg/ml en PBS:

- MgCl₂•6H₂O (0,1 mg/ml).
- CaCl₂•2H₂O (0,172 mg/ml).
- Esterilizar por filtración.
- Activar incubando durante 1 hora en un baño a 37 °C.

Medio de cultivo para BAEC:

- 500 ml DMEM (1 g/l de glucosa).
- 5 ml Penicilina/estreptomycin.
- 2,5 ml Anfotericina B.
- 5 ml L-glutamina.
- 10% Suero fetal de ternera (FBS).

Frascos T-25 gelatinizados

- Preparar PBS con gelatina al 0,3%, autoclavar y dejar enfriar.
- Añadir 500 µl a cada frasco T-25 e incubar 30 min. a 37 °C.
- Aspirar la gelatina sobrante.

Equipamiento

- Material de disección estéril (tijeras, pinzas, bisturí, pinzas de Kocher).
- Cabina de bioseguridad.
- Baño termostatzado.
- Centrífuga.

Procedimiento

Disección de la aorta

1. En la sala de despiece del matadero, localizar el arco aórtico de una ternera recién sacrificada, y diseccionar unos 15 cm de aorta con material estéril (pinzas, tijeras y bisturí) procurando que las arterias intercostales sean lo más largas posible.
2. Lavar externamente con alcohol 70% e introducirlo en un recipiente con PBS suplementado con antibióticos.
3. Mantener en frío sobre hielo y trasladarlo lo antes posible al laboratorio.

Aislamiento de las células endoteliales

1. Una vez en el laboratorio preparar un campo estéril en el interior de una campana de bioseguridad.
2. Limpiar la grasa de la pieza y lavar con abundante PBS.
3. Ligar las arterias intercostales con bridas plásticas estériles y pinzar uno de los extremos con unas pinzas de Kocher.
4. Rellenar el interior con solución de Colagenasa.
5. Obturar el otro extremo e incubar a 37 °C durante 10 minutos, no más.
6. Masajear suavemente y liberar el pinzamiento para vaciar el contenido de la arteria sobre un tubo de 50 ml. Presionar longitudinalmente para vaciar todo el contenido.
7. Centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.
8. Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 ml de medio de cultivo para BAEC.
9. Sembrar en frascos T-25 pretratados con PBS-gelatina 0,3%.

Subcultivo de las BAEC

Mantener las células en placas o frascos de cultivo a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Subcultivar mediante las técnicas habituales de cultivo a una razón de 1:5 cuando se observe un 90-100% de confluencia (2-3 veces por semana).

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO

Los cultivos primarios de células endoteliales humanas aisladas de la vena del cordón umbilical (HUVEC) constituyen uno de los mejores modelos in vitro para la investigación en humanos de patologías relacionadas con las células endoteliales.

Materiales

- Gasas estériles.
- Bandeja.
- Agujas de acero con punta roma.
- Pinzas de Hoffman.
- Pinzas de Kocher.
- Llaves de dos pasos.
- Jeringas de 50 ml.
- Tubos de 50 ml.
- Frascos de cultivo T25.

Reactivos

- Alcohol 70%.
- Tampón fosfato salino (PBS).
- Penicilina / estreptomina 5.000 U/ml / 5.000 U/ml.
- Anfotericina B 250 µg/ml.
- Colagenasa P (Boehringer).
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.
- Medio 199.
- L-glutamina 200 mM.
- Suero fetal de ternera (FBS).
- HEPES.
- Heparina.
- ECGS (Endothelial Cell Grow Supplement).
- Gelatina.

Preparación del material y los reactivos

Medio de transporte

Medio 199 suplico con:

- Penicilina (100 U/ml).
- Estreptomina (100 µg/ml).
- Anfotericina B (2,50 µg/ml).

Solución de Colagenasa

Preparar 25 ml/cordón de PBS suplementado con:

- Colagenasa P (Boehringer) 1 mg/ml.
- MgCl₂•6H₂O (0,1 mg/ml).
- CaCl₂•2H₂O (0,172 mg/ml).
- Esterilizar por filtración.
- Activar incubando durante 1 hora en un baño a 37 °C.

Medio de cultivo para HUVEC:

Medio 199 suplico con:

- HEPES (10 mM).
- Heparina (100 µg/ml).
- ECGS (30 µg/ml).
- Penicilina (50 U/ml).
- Estreptomicina (50 µg/ml).
- Anfotericina B (1,25 µg/ml).
- L-glutamina (2 mM).
- 20% de suero fetal de ternera (FBS).

Frascos T-25 gelatinizados

- Preparar PBS con gelatina al 0,3%, autoclavar y dejar enfriar.
- Añadir 500 µl a cada frasco T25 e incubar 30 min. a 37 °C.
- Aspirar la gelatina excedente.

Equipamiento

- Material de disección estéril (tijeras, pinzas, bisturí, pinzas de Kocher).
- Cabina de bioseguridad.
- Baño termostaticado.
- Centrífuga.
- Incubador con CO₂.

Procedimiento

Obtención de los cordones umbilicales

La obtención de cordones umbilicales exige una procedencia de madres donantes sanas que no padezcan ninguna enfermedad infecto-contagiosa, que no presenten pinzamientos ni punciones y con una longitud ideal de unos 15-20 cm.

Los fragmentos de cordón umbilical deben dejarse exangües tras su obtención, recorriéndolos de un extremo a otro presionando longitudinalmente con los dedos, y deben conservarse a 4 °C en frascos estériles con medio de transporte.

Aislamiento de las células endoteliales

1. Una vez en el laboratorio, preparar un campo estéril en el interior de una campana de bioseguridad.
2. Comprobar que la vena umbilical está exangüe.
3. Limpiar externamente los extremos de los cordones con gasas estériles impregnadas en etanol al 70% y colocar sobre una bandeja.
4. Localizar el orificio de la vena (más grueso que los dos orificios arteriales).
5. Insertar suavemente y sin forzar una aguja de acero con punta roma hasta la empuñadura.
6. Fijar con una pinza Hoffman.
7. Conectar la aguja a una llave de dos pasos y a ésta una jeringa de 50 ml con PBS para limpiar los restos de sangre del conducto venoso.
8. Inyectar aire para retirar el PBS del interior.
9. Inyectar lentamente la solución de colagenasa hasta que comience a gotear por el extremo opuesto.
10. Cuando la solución de colagenasa comience a gotear obturar con una pinza de Kocher y terminar de rellenar la vena hasta que se observe una ligera turgencia.
11. Cerrar la llave de paso e incubar a 37 °C durante 30 min.
12. Quitar la pinza del extremo y vaciar el contenido de la vena en un tubo de 50 ml y centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm. (si los cordones son cortos se pueden usar 2 ó 3 por tubo).
13. Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 ml de medio de cultivo para HUVEC.
14. Trasvasar la suspensión celular obtenida a un frasco de cultivo de 25 cm² pretratado con gelatina e incubar durante 24 h.
15. Retirar el medio, lavar las células suavemente con PBS, con objeto de eliminar los glóbulos rojos restantes, y añadir medio fresco.

Subcultivo de las HUVEC

Mantener las células en placas o frascos de cultivo pretratados con gelatina, a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Subcultivar rutinariamente a una razón de 1:5 cuando se observe un 90-100% de confluencia.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON MTT

Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción del tetrazolio (MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) a formazán insoluble, un producto coloreado de tonalidad azul que puede ser solubilizado mediante disolventes orgánicos y cuantificado espectrofotométricamente. La reducción del MTT es llevada a cabo por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas de forma que la viabilidad celular es proporcional a la densidad óptica del formazán producido.

Materiales y reactivos

- Medio de cultivo apropiado al tipo celular.
- Compuesto a ensayar.
- MTT.
- PBS.
- Tubos de 15 ml.
- Filtro de 0,2 μm y jeringa de 5 ml.
- Isopropanol.
- HCl 35%.

Preparación de los reactivos

Solución de MTT 5 mg/ml:

Para 5 ml:

- Añadir 25 mg de MTT a 5 ml de PBS.
- Agitar y esterilizar por filtración.

Isopropanol ácido (HCl 0,04 N):

Para 500 ml:

- 1,765 ml de HCl 37%.
- Enrasar hasta 500 ml con isopropanol.

Equipamiento

- Pipeta multicanal.
- Cabina de bioseguridad.
- Incubador de CO₂.
- Espectrofotómetro de microplacas para lecturas a 550 nm y 630 nm.

Procedimiento

1. Preparar la suspensión celular. Para BAEC preparar una suspensión celular de 6×10^4 células/ml en medio de cultivo⁽¹⁾ (de esta forma, quedarán 3.000 células/pocillo). Para otros tipos celulares la cantidad puede ser diferente⁽²⁾.
2. En una microplaca de 96 pocillos añadir por cuadruplicado:

- a) Para el blanco:
 - 100 µl de medio.
 - b) Para el control:
 - 50 µl de medio.
 - 50 µl de suspensión celular.
 - c) Para los tratamientos:
 - Preparar los pocillos que sean necesarios, con 50 µl de medio cada uno, conteniendo una concentración conocida del agente a ensayar preparada mediante diluciones seriadas en el medio.
 - 50 µl de suspensión celular.
3. Incubar durante 3 días a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.
 4. Añadir 10 µl por pocillo de la solución de MTT.
 5. Incubar durante 4 h.
 6. Solubilizar el precipitado cristalino con 150 µl por pocillo de la solución de isopropanol ácido.
 7. Determinar la densidad óptica a 550 nm con referencia a 630 nm en un espectrofotómetro para microplacas.

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como % de supervivencia respecto al control sin tratar. Es muy útil el cálculo de la concentración inhibidora 50 (IC₅₀), concentración del compuesto que permite la supervivencia del 50% de la población celular.

Notas

- (1) Cuando se quieran analizar BAEC en estado poco proliferante se preparará una suspensión celular madre de 6x10⁵ células/ml. Además, el medio de cultivo se suplementará con un 2% de FBS en lugar del 10%.
- (2) Para HUVEC se ponen 4.000 células/pocillo. Para ensayos con HUVEC poco proliferantes, 40.000 células/pocillo. Para células tumorales adherentes (p.e., MDA-MB-231) suelen ponerse 2.000 células/pocillo y para células tumorales en suspensión (tipo HL-60) suelen ponerse 5.000 células/pocillo.

TINCIÓN DE NÚCLEOS CON COLORANTE DE HOECHST

El Hoechst es un colorante fluorescente con gran afinidad por las secuencias ricas en adenina-timina del ADN. Cuando el colorante está unido al ADN y es excitado con luz ultravioleta produce una emisión característica en el rango del azul, lo cual permite detectar la apoptosis celular mediante la simple observación de la cromatina condensada y la formación de vesículas picnóticas.

Materiales

- Portaobjetos con pocillos desmontables adaptados para cultivos celulares (con 8 pocillos de paredes extraíbles).
- Cubreobjetos.

Reactivos

- Medio de cultivo apropiado para el tipo celular.
- Compuesto a ensayar.
- PBS.
- Formalina.
- Colorante de Hoechst.
- Medio de montaje.

Preparación de los reactivos

Solución de Hoechst

- Preparar la cantidad necesaria diluyendo el Hoechst a 1:1000 en PBS.

Equipamiento

- Cabina de bioseguridad.
- Incubador de CO₂.
- Microscopio de fluorescencia (excitación con u.v. y emisión en el azul).

Procedimiento

Cultivo:

1. Cultivar las células sobre los portaobjetos desmontables poniendo en cada pocillo 100 μ l de una suspensión celular procedente de una placa semiconfluyente.
2. Añadir 300 μ l de medio a cada pocillo (volumen final: 400 μ l/pocillo).
3. Incubar durante 24 h para conseguir un cultivo semiconfluyente.
4. Aspirar el medio y añadir medio fresco en el que se habrá disuelto el compuesto que vamos a ensayar a las concentraciones requeridas.
5. Incubar durante 24 h.

Tinción:

1. Aspirar el medio de los pocillos.
2. Marcar los límites de los pocillos por detrás del porta con un rotulador indeleble y retirar las paredes extraíbles.
3. Lavar con PBS.
4. Cubrir con formalina e incubar 20 min. a 4 °C.
5. Lavar 2 veces con PBS.
6. Añadir el Hoechst diluido e incubar durante 1 min. en oscuridad.
7. Lavar 2 veces con PBS y secar con cuidado sacudiendo el porta.
8. Montar los portas cubriéndolos con dos gotas de medio de montaje, poniéndoles un cubreobjetos y dejándolos secar aproximadamente 1 h a temperatura ambiente protegidos de la luz.
9. Observar al microscopio de fluorescencia.
10. Guardar a 4 °C en oscuridad.

Notas

Para las células no adherentes:

1. Realizar los cultivos y tratamientos en placas multipocillo.
2. Trasvasar las suspensiones celulares a tubos de centrífuga.
3. Centrifugar y lavar con PBS.
4. Fijar añadiendo formalina e incubando 20 min. a 4 °C en el mismo tubo.
5. Centrifugar y lavar dos veces con PBS.
6. Añadir el Hoechst diluido e incubar durante 1 min. en oscuridad.
7. Centrifugar y lavar dos veces con PBS.
8. Tras la última centrifugación resuspender en 10-15 µl de medio de montaje evitando las burbujas.
9. Dispensar en portas y cubrir con portaobjetos dejándolos secar aproximadamente 1 h a temperatura ambiente protegidos de la luz.
10. Observar al microscopio de fluorescencia.
11. Guardar a 4 °C en oscuridad.

ZIMOGRAFÍA DE GELATINA

La capacidad migratoria e invasiva de las células en los tejidos depende de la capacidad de éstas para degradar la lámina basal y remodelar la matriz extracelular, procesos estrechamente ligados a la producción de proteasas. Las metaloproteasas de matriz extracelular con actividad gelatinasa, MMP-2 (72 kD) y MMP-9 (92 kD), secretadas por las células en los medios o presentes en los extractos celulares, pueden ponerse de manifiesto en zimogramas de gelatina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) a 4°C bajo condiciones no reductoras.

Materiales

Reactivos

Tampón de lisis.

- Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4
- 0,2% (p/v) de Tritón X-100
- aprotinina 200 KIU/ml.

SDS 10%

- 10 mg de SDS en 100 ml de agua destilada.

Gelatina 0,5%

- 10 mg de gelatina en 2 ml de agua destilada. Disolver en un baño a 40 °C.

APS 10%

- 100 mg de persulfato amónico en 1 ml de agua destilada.

Tampón separador

- Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

Tampón concentrador

- Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.

Tampón de electroforesis (*Running Buffer*) (10x)

Para 1 l:

- Tris 30 g
- Glicina 144 g
- SDS 10 g

El pH queda equilibrado a 8,3

Tampón de carga (4x)

- Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 12,5% (v/v).
- Glicerol 40% (v/v).
- SDS 8% (p/v).
- Azul de bromofenol 0,005% (p/v).

Tampón de lavado I

- Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4.
- Tritón X-100 2% (p/v).

Tampón de lavado II

- Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4.

Tampón sustrato

- Tris-HCl 0.05 M, pH 7,4.
- Tritón X-100 al 1%.
- CaCl₂ 5 mM.
- Na₃N 0,02%.

Solución de Coomassie

- Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) en una solución de agua-metanol-acético (5:5:2).

Solución decolorante (*destaining*)

- Solución de agua-metanol-acético (6:3:1).

Equipamiento

- Equipo de electroforesis.

Procedimiento

Obtención de medios acondicionados y extractos

1. Sembrar las células en placas de 6 pocillos con medio completo en un volumen de 1,5 ml y esperar a que alcancen la semiconfluencia. Cada condición se ensayará por duplicado.
2. Aspirar el medio, lavar las monocapas celulares dos veces con PBS y rellenar cada pocillo con 1,5 ml de medio sin suero suplido con 0,1% (p/v) de BSA y 200 KIU/ml de aprotinina, añadiendo además los tratamientos necesarios del compuesto a ensayar.
3. Incubar 24 h.

4. Trabajando con las placas sobre hielo, recoger los medios acondicionados en tubos y conservarlos a 4 °C.
5. Utilizar uno de los duplicados de cada pocillo para hacer un recuento celular.
6. Lavar el resto de pocillos dos veces con PBS frío y obtener los lisados celulares añadiendo 500 µL de tampón de lisis/pocillo y raspando posteriormente. Conservar a 4 °C.
7. Centrifugar los medios acondicionados y los extractos celulares obtenidos a 1000 g y 4 °C durante 10 minutos y almacenar a -20 °C para ser usados posteriormente en los ensayos zimográficos.

Preparación de los geles

1. Preparar el gel separador mezclando todos los reactivos (añadiendo justo al final el TEMED y el APS).

Cantidad para dos geles pequeños (preparar en un recipiente sobre hielo):

| Gel separador (10%) | | 10 ml |
|----------------------------|-------|--------------|
| Agua | 2,925 | ml |
| Acrilamida/bis 40% | 2,475 | ml |
| Buffer separador | 2,500 | ml |
| SDS 10% | 100 | µl |
| Gelatina 0,5% | 2 | ml |
| APS 10% | 50 | µl |
| TEMED | 5 | µl |

2. Preparar los cristales con los separadores en el *casting frame* y comprobar que están estancos haciendo una prueba con agua destilada.
3. Cargar el gel separador entre los cristales del *casting* hasta el nivel apropiado y aislarlo del oxígeno del aire poniendo por encima agua destilada o isopropanol. Dejar polimerizar durante 30 min.
4. Preparar el gel concentrador de la misma forma.
5. Cantidades para dos geles de pequeño tamaño (preparar en un recipiente sobre hielo):

| Gel concentrador (5%) | | 5 ml |
|------------------------------|-------|-------------|
| Agua | 3,062 | ml |
| Acrilamida/bis 40% | 0,638 | ml |
| Buffer concentrador | 1,250 | ml |
| SDS 10% | 50 | µl |
| APS 10% | 50 | µl |
| TEMED | 10 | µl |

6. Tirar el agua (o isopropanol) de la parte superior del gel separador y añadir gel concentrador hasta el borde, colocar el peine y dejar polimerizar durante otros 30 min.
7. Retirar el peine y colocar los geles en la cubeta de electroforesis.
8. Añadir el Tampón de electroforesis (*Running Buffer*).

Preparación y dispensación de las muestras

1. Normalizar las muestras al número de células del que procedían añadiendo la cantidad de medio de cultivo necesario.
2. Mezclar 21 μL de cada muestra normalizada con 7 μL de tampón de carga 4x.
3. Cargar 25 μL de muestra así preparada en cada calle.

Electroforesis

Correr los geles a una intensidad de 30 mA (60 mA para dos geles) y 4 °C durante aproximadamente 1 h, hasta que se vea salir el frente por el borde inferior.

Tratamiento de los geles

1. Extraer los geles y colocarlos en placas de Petri de tamaño adecuado.
2. Lavar los geles con tampón de lavado I durante 10 min. en agitación, a temperatura ambiente, dos veces. (Para eliminar el SDS y sustituirlo por Tritón X-100, que permite que las metaloproteinasas recuperen su actividad)
3. Lavar con tampón de lavado II, de igual forma, dos veces.
4. Añadir tampón sustrato e incubar durante 16 h a 37 °C (en estas condiciones la actividad gelatinasa de las MMP-2 y MMP-9 degrada la gelatina presente en el gel).

Tinción de los geles

1. Retirar el tampón sustrato, lavar suavemente con agua destilada y teñir cubriendo con solución de Coomassie R-250.
2. Retirar el Coomassie y lavar con la solución decolorante (*destaining*) hasta que se observe que las bandas tienen suficiente contraste.

Cuantificación e interpretación de los resultados

Los geles quedan teñidos de azul salvo en las zonas correspondientes a las actividades MMP-2 y MMP-9, que no se tiñen debido a la degradación de la gelatina. La intensidad de las bandas será proporcional a la actividad proteolítica de las metaloproteasas presentes en cada muestra.

Los resultados obtenidos se pueden fotografiar, digitalizar y cuantificar mediante un programa informático de análisis de imagen, p.e. *Scion Image*.

GELATINOGRAMA DE ACTIVIDAD *IN SITU*

Mediante zimografías de gelatina también es posible comprobar si un determinado compuesto es capaz de inhibir directamente la actividad de las gelatinasas. Para ello se realiza un gelatinograma con medio acondicionado de células sin tratar y se incuban posteriormente los geles en presencia del compuesto a ensayar.

Materiales

Los mismos que en el protocolo de zimografías de gelatina.

Procedimiento

- Realizar una zimografía de gelatina con muestras de medio acondicionado por células que sean productoras de ambas gelatinasas (p.e., HT-1080).
- Una vez finalizada la electroforesis y realizados los lavados, recortar las calles cuidadosamente una a una.
- Incubar cada calle por separado con una concentración diferente de compuesto a ensayar (salvo la calle que se usa como control) diluido en tampón sustrato, durante 12 h a 37 °C.
- Teñir los geles siguiendo el mismo protocolo que en el gelatinograma normal.

Cuantificación e interpretación de los resultados

Igual que en la zimografía de gelatina.

GELATINOGRAMA REVERSO

La realización de zimogramas reversos de gelatina permite el análisis de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs). Para ello se realiza un SDS-PAGE copolimerizado con gelatina que además contiene medio acondicionado rico en metaloproteasas.

Materiales

Reactivos

Preparar los siguientes reactivos tal como se indica en el protocolo para zimografías de gelatina:

- Tampón de lisis.
- SDS 10%.
- APS 10% .
- Tampón concentrador.
- *Running Buffer* (10x).
- Tampón de carga (4x).
- Tampón de lavado I.
- Tampón de lavado II.
- Tampón sustrato.
- Solución de Coomassie.
- Solución *destaining*.

Preparar además:

Tampón separador

- Tris-HCl 2 M, pH 8,8.

Gelatina 1%

- 20 mg de gelatina en 2 ml de agua destilada. Disolver en un baño a 40 °C.

Medio acondicionado por BAEC tratado con SDS

- Añadir 0,6 ml de SDS 10% a 3 ml de medio acondicionado por BAEC e incubar 1 h a temperatura ambiente.

Equipamiento

- Equipo de electroforesis.

Procedimiento

Obtención de medios acondicionados y extractos

Además de obtener los medios acondicionados y los extractos de las células a ensayar (tal como se indica en el protocolo para zimografías de gelatina) es necesario obtener aparte medio acondicionado rico en proteasas (p.e., procedente de células BAE).

Preparación de los geles

1. Preparar el gel separador mezclando todos los reactivos (añadiendo justo al final el TEMED y el APS).

Cantidad para 2 geles pequeños (preparar en un recipiente sobre hielo):

| Gel separador (12%) | 10 ml |
|-----------------------|-------------|
| Agua | 1,450 ml |
| Acrilamida/bis 40% | 3,000 ml |
| Tris/HCl 2 M pH 8,8 | 0,940 ml |
| SDS 10% | 100 μ l |
| Medio de BAEC tratado | 3,600 ml |
| Gelatina 1% | 1,000 ml |
| APS 10% | 50 μ l |
| TEMED | 5 μ l |

2. Una vez preparado y polimerizado el gel separador, realizar una electroforesis previa a 15 mA y 4 °C hasta que el frente de rojo fenol del medio acondicionado alcance unas $\frac{3}{4}$ partes del gel (1-2 cm antes del final).
3. Retirar el tampón de electroforesis y los restos que puedan quedar de él cuidadosamente con papel de filtro.
4. Añadir el gel concentrador al 5% (preparado como se indica en el protocolo de zimografías de gelatina).
5. **Continuar con el proceso de forma idéntica al realizado para las zimografías de gelatina** (preparación de las muestras, electroforesis, tratamiento y tinción de los geles).

Cuantificación e interpretación de los resultados

Mediante esta técnica se pueden observar los TIMPs como bandas teñidas de azul, correspondientes a la gelatina no degradada, sobre un fondo claro que sí ha sido degradado. La intensidad de las bandas será proporcional a la capacidad inhibidora de los TIMPs presentes en cada muestra.

Los resultados obtenidos se pueden fotografiar, digitalizar y cuantificar mediante un programa informático de análisis de imagen, p.e., *Scion Image*.

ZIMOGRAFÍA DE PLASMINÓGENO

El uPA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa) es una serín-proteasa que tiene la capacidad de procesar el plasminógeno y generar plasmina. La plasmina es otra potente serín-proteasa, similar a la tripsina, que activa los precursores de las MMPs, iniciando así la cascada de degradación proteolítica. Además, la plasmina tiene capacidad para digerir diversos sustratos entre los que se encuentra la caseína de la leche, característica que es aprovechada para la detección de uPA y sus inhibidores (PAI) mediante zimografía de plasminógeno.

Materiales

Reactivos

Preparar los siguientes reactivos tal como se indica en el protocolo para zimografías de gelatina:

- Tampón de lisis.
- SDS 10%.
- APS 10%.
- Tampón separador.
- Tampón concentrador.
- *Running Buffer* (10x).
- Tampón de carga (4x).
- Tampón de lavado I.
- Tampón de lavado II.

Para la elaboración del “gel sustrato” necesitaremos:

- PBS.
- Leche en polvo desnatada.
- Agar.
- Plasminógeno 44 U/ml.
- Azida sódica al 0,2%.

Equipamiento

- Equipo de electroforesis.
- Cristal soporte para el gel sustrato, similar a los usados para la electroforesis.
- Cámara húmeda.
- Baño a 45 °C.
- *Termoblock* a 45 °C.

Procedimiento

Obtención de medios acondicionados y extractos

La obtención de los medios acondicionados y los extractos de las células a ensayar se realiza tal como se indica en el protocolo para zimografías de gelatina.

Preparación de los geles separador y concentrador

- Preparar el gel separador mezclando todos los reactivos (añadiendo justo al final el TEMED y el APS). A diferencia de los gelatinogramas, a este gel no se le añade gelatina.

Cantidad para dos geles pequeños (preparar en un recipiente sobre hielo):

| Gel separador (10%) | 10 ml | |
|----------------------------|--------------|----|
| Agua | 4,925 | ml |
| Acrilamida/bis 40% | 2,475 | ml |
| Buffer separador | 2,500 | ml |
| SDS 10% | 100 | µl |
| APS 10% | 50 | µl |
| TEMED | 5 | µl |

- Preparar el gel concentrador de la misma forma que en los zimogramas de gelatina.

Cantidades para dos geles de pequeño tamaño (preparar en un recipiente sobre hielo):

| Gel concentrador (5%) | 5 ml | |
|------------------------------|-------------|----|
| Agua | 3,062 | ml |
| Acrilamida/bis 40% | 0,638 | ml |
| Buffer concentrador | 1,250 | ml |
| SDS 10% | 50 | µl |
| APS 10% | 50 | µl |
| TEMED | 10 | µl |

Preparación, carga de las muestras y electroforesis

Se sigue el mismo protocolo que para los zimogramas de gelatina.

Tratamiento de los geles

- Extraer los geles y colocarlos en placas de Petri de tamaño adecuado.
- Lavar los geles con tampón de lavado I durante 10 min. en agitación, a temperatura ambiente, dos veces.
- Lavar con tampón de lavado II, de igual forma, dos veces.
- El gel se extenderá sobre un “gel sustrato” que se habrá preparado previamente como sigue:

Preparación del gel sustrato

1. Preparar un baño termostatzado a 45 °C.
2. Colocar el cristal (sobre el que se verterá más tarde el gel sustrato) sobre un *termoblock* a 45 °C en el interior de una cabina de bioseguridad.
3. Resuspender 0,16 gr de leche en polvo en 1 ml de PBS y dejar atemperando en el baño a 45 °C.
4. Añadir 37,5 mg de agar a 3,75 ml de PBS en el interior de un tubo de 15 ml e introducirlo en el interior de un vaso de precipitado con agua (sin tapar el tubo). Meter en el microondas y fundir perfectamente, sin que queden grumos (dando pulsos cortos y resuspendiendo con una pipeta). Una vez fundido, dejar atemperar a 45 °C en el baño.
5. Verter 750 µL del tubo de la leche en el de agar y dejar atemperando en el baño.
6. Añadir 40 µL de plasminógeno (44 U/ml) y 9 µL de azida al 0,2%.
7. Agitar en un *vortex* rápidamente y verter todo sobre el cristal, extendiendo con una punta de pipeta y evitando las burbujas.
8. Retirar el cristal con el gel sustrato del *termoblock* y esperar que solidifique.
9. Extender el gel a analizar sobre el gel sustrato e introducir en una cámara húmeda.
10. Incubar durante 12 h a 4 °C (para que se produzca la transferencia de las proteínas del gel hacia el gel sustrato).
11. Incubar a 37 °C de 3 a 6 h, hasta observar la aparición de las bandas de degradación de la caseína inducidas por el uPA. Tomar fotografías de las bandas de degradación sobre fondo negro.
12. Reincubar a 37 °C durante 24 h, hasta observar las bandas de caseína no degradada producidas por la presencia de PAI. Tomar fotografías de las bandas sobre fondo negro.

Cuantificación e interpretación de los resultados

La actividad uPA cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina, la cual ejerce su acción proteolítica sobre la caseína de la leche. Tras 3-6 h, las zonas de digestión de la caseína inducidas por uPA se observan como bandas incoloras rodeadas de blanco (o negras rodeadas de blanco cuando se observan sobre un fondo negro). El tamaño de las bandas se corresponde con la actividad uPA presente en las muestras.

Tras 24 h de incubación, las zonas no digeridas debido a la presencia de inhibidores (PAI) se observan como bandas blancas. El tamaño de las bandas será proporcional a la actividad inhibidora de los PAI presentes en cada muestra.

Los resultados obtenidos se pueden fotografiar, digitalizar y cuantificar mediante un programa informático de análisis de imagen, p.e., *Scion Image*.

ENSAYO DE “HERIDA” (*WOUND-HEALING*)

El ensayo de herida es un ensayo sencillo pero de gran valor informativo. Permite evaluar la actividad migratoria de las células mediante la realización de una franja (“herida”) a lo largo de una monocapa de células en cultivo, cuantificando el número de células que colonizan la línea raspada en un periodo de tiempo determinado.

Materiales

Los rutinarios para el cultivo de células en placas de 6 pocillos.

Equipamiento

- Incubador de CO₂.
- Microscopio invertido de contraste de fases con sistema de captura de imagen.
- Cabina de bioseguridad.

Procedimiento

1. Cultivar las células en placas de 6 pocillos y esperar a que alcancen la confluencia.
2. Realizar dos líneas en cada pocillo raspando con la punta de una pipeta sobre la monocapa celular siguiendo dos diámetros perpendiculares, consiguiendo de esta forma dos líneas en cruz de 1 mm de ancho libres de células en cada pocillo.
3. Lavar las células con PBS y añadir 1,5 ml de medio completo en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones del compuesto a ensayar.
4. Fotografiar las áreas sobre las que se han realizado las heridas a tiempos cero, 4 h, 8 h y 24 h de incubación.

Cuantificación e interpretación de los resultados

La superficie libre de células se cuantifica mediante análisis de imagen tanto en los pocillos control como en los tratados y se normaliza con respecto a sus respectivos valores a tiempo cero.

Para el análisis de imagen se puede utilizar el programa *Image J*.

Notas

Cuando se van a valorar tiempos largos (más de 8 h) es necesario descartar que el efecto observado es debido a la proliferación celular y no a la migración, para ello se pueden dejar las células incubando sin suero desde el día anterior al ensayo, al igual que durante el tiempo de realización del mismo. Otra forma es inhibir la proliferación añadiendo al cultivo mitomicina C (0,02 mg/ml).

ENSAYO DE MIGRACIÓN EN CÁMARA DE BOYDEN

Este ensayo permite el seguimiento en tiempo real del proceso de migración celular. Las células son marcadas previamente con fluorescencia y depositadas en el compartimento superior de un pocillo separado por una membrana porosa opaca del compartimento inferior, hacia el cual migran las células atraídas por un quimioatrayente. La migración de las células a través de la membrana puede ser monitorizada a lo largo del tiempo mediante un fluorímetro.

Materiales y reactivos

- Cultivo celular al 80%-90% de confluencia.
- Insertos con membrana porosa de 8 μm de tamaño de poro, opacos a la fluorescencia adaptables a placas de 24 pocillos.
- Placa de 24 pocillos.
- Tubos.
- Microplaca de 96 pocillos.
- PBS.
- Calceína-AM, 1 mM.
- Medio de cultivo apropiado para el tipo celular, sin FBS y con 0,1% de BSA.

Equipamiento

- Incubador de CO₂.
- Cabina de bioseguridad biológica.
- Fluorímetro.

Procedimiento

Siempre se trabajará con la luz de la cabina de cultivos apagada para evitar la degradación de la calceína.

Marcaje de las células con calceína

1. Partir de un cultivo al 80%-90% de confluencia con las células a ensayar.
2. Retirar el medio, lavar suavemente con PBS y añadir 10 ml de medio nuevo.
3. Añadir 50 μL de calceína-AM (1 mM) y distribuirla homogéneamente por toda la placa agitando suavemente.
4. Incubar durante 2 h a 37 °C (la calceína-AM, de carga neutra, atraviesa rápida y fácilmente las membranas celulares por difusión y es procesada en el citosol por esterasas inespecíficas generando calceína libre, con carga y de lenta expulsión. Así, quedan las células marcadas permanentemente con fluorescencia).

5. Tras la incubación, lavar la monocapa celular dos veces con PBS de forma suave, tratar con tripsina y resuspender en 5 ml de medio de cultivo sin suero, suplido con 0,1% de BSA.
6. Hacer un recuento para determinar la densidad celular y preparar una suspensión madre a 100.000 células/ml en 10 ml de medio, sin FBS con 0,1% de BSA.

Tratamiento de las células con el compuesto

7. Tomar las alícuotas que sean necesarias de la suspensión celular en tubos aparte y aplicar los diferentes tratamientos experimentales, incubando 15 min. a temperatura ambiente. Mantener las células control en las mismas condiciones que las experimentales.

Preparación de la placa

8. En la placa de 24 pocillos, preparar los pocillos experimentales y los controles poniendo 600 μ L de medio suplido al 20% con FBS sobre el fondo (como quimioatrayente); salvo en los pocillos que se utilizan como control negativo, en los cuales se pone el medio sin FBS.
9. Colocar los insertos sobre los pocillos así preparados con la ayuda de unas pinzas y depositar en cada uno 500 μ L de suspensión (100.000 células/ml) de células tratadas o sin tratar (control).(De esta forma se establece una comunicación entre la suspensión celular del inserto y el pocillo con el quimioatrayente a través de la membrana porosa).
10. Incubar las células a 37 °C, 5% CO₂ y monitorizar la cinética de la migración tomando medidas fluorimétricas a intervalos de 30 minutos durante 5 h.

Recta de calibrado

Preparar la recta de calibrado tras realizar la primera lectura de la placa (tiempo cero).

11. Partir de la suspensión inicial de 100.000 células/ml.
12. Rotular 12 tubos, con números del 1 al 12 y preparar de la forma indicada más abajo, añadiendo primero el medio de cultivo (sin FBS, 0,1% de BSA) y después la cantidad indicada de suspensión celular.

13.

| Tubo nº | Células/pocillo | Medio de cultivo (µL) | Suspensión celular (µL) |
|---------|-----------------|-----------------------|------------------------------|
| 12 | 8000 | 240 | 960 de la suspensión inicial |
| 11 | 6000 | 240 | 360 de la suspensión inicial |
| 10 | 4000 | 400 | 400 del tubo 12 |
| 9 | 2000 | 375 | 125 del tubo 12 |
| 8 | 1000 | 450 | 150 del tubo 10 |
| 7 | 800 | 450 | 50 del tubo 12 |
| 6 | 600 | 450 | 50 del tubo 11 |
| 5 | 400 | 450 | 50 del tubo 10 |
| 4 | 200 | 450 | 50 del tubo 9 |
| 3 | 100 | 900 | 100 del tubo 8 |
| 2 | 50 | 250 | 250 del tubo 3 |
| 1 | 0 | 500 | 0 - |

14. Dispensar 100 µL de cada tubo en una microplaca de 96 pocillos, por cuadruplicado, y medir la fluorescencia en las mismas condiciones que el ensayo de migración.

15. Construir la recta patrón con los datos de fluorescencia.

Cuantificación e interpretación de los resultados

El cálculo del número de células con capacidad migratoria se realiza interpolando los valores de fluorescencia obtenidos en cada lectura en la recta patrón construida al efecto.

Notas

En esta tesis, La fluorescencia fue detectada usando un fluorímetro para microplacas FL600FA, BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, USA en el modo de lectura “por abajo”, usando el par excitación/emisión de 485/530 nm y una ganancia de 75%.

ENSAYO DE INVASIÓN EN CÁMARA DE BOYDEN MODIFICADA

Este ensayo permite el seguimiento en tiempo real de la movilidad de las células a través de una capa de Matrigel. El procedimiento a seguir es básicamente igual que en el ensayo de migración en cámara de Boyden, aunque con algunas modificaciones metodológicas. Las células, marcadas previamente con fluorescencia, son depositadas en el compartimento superior de un pocillo separado por una membrana porosa del compartimento inferior, la cual se ha recubierto previamente con una capa de Matrigel. Las células migran a través del Matrigel atraídas por un quimioatrayente y pueden ser monitorizadas a lo largo del tiempo mediante un fluorímetro.

Materiales y reactivos

Además de los utilizados en el ensayo de migración en cámara de Boyden necesitaremos:

- Un volumen suficiente de solución de Matrigel diluido a 0,5 mg/ml en agua estéril fría.

Equipamiento

- El mismo utilizado en el ensayo de migración en cámara de Boyden.

Procedimiento

El procedimiento a seguir es el mismo que en el caso de la migración, aunque con las siguientes variantes:

1. los insertos han de ser previamente recubiertos con Matrigel.
2. La suspensión celular que se deposita sobre ellos será de 400.000 células/ml (200.000 células/inserto).

Recubrimiento de los insertos con Matrigel

1. Preparar el volumen necesario de una solución de Matrigel a 0,5 mg/ml diluyendo el stock con agua fría estéril.
2. Colocar los insertos en la placa de 24 pocillos y recubrir cada uno con 50 μ l de la solución de Matrigel, asegurándonos de que cubra toda la superficie.
3. Dejar la placa abierta secándose en la cabina de bioseguridad durante unas 8 h. (La placa se puede guardar una vez seca a 4 °C, sellada con parafilm para su uso posterior).

Cuantificación e interpretación de los resultados

El cálculo del número de células con capacidad invasiva se realiza interpolando los valores de fluorescencia obtenidos en cada lectura en la recta patrón construida al efecto.

ENSAYO DE TUBULOGÉNESIS SOBRE MATRIGEL

El proceso de morfogénesis de las células endoteliales para dar lugar a capilares se puede modelizar *in vitro* mediante la inducción de la formación de estructuras similares a tubos vasculares sobre una matriz tridimensional. La morfogénesis de las células endoteliales se induce mediante la utilización de Matrigel (MAT), un extracto solubilizado y reconstituido de lámina basal obtenido a partir del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón, un tumor rico en proteínas de la lámina basal y de la matriz extracelular. Entre sus componentes están la laminina, el colágeno tipo IV, proteoglucanos de heparán sulfato, TGF- β , FGF-2 y activador tisular del plasminógeno, así como otros factores de crecimiento que aparecen constitutivamente en el tumor EHS.

Materiales

- Microplaca de 96 pocillos.
- Bandeja con hielo.

Reactivos

- MAT.
- Medio DMEM bajo en glucosa (1 g/l).
- Penicilina / estreptomycin, 5.000 U/ml / 5.000 U/ml.
- Anfotericina B, 250 μ g/ml.
- L-glutamina, 200 mM.
- Suero fetal de ternera (FBS).
- Suramina o, alternativamente, estaurosporina.

Preparación de material y reactivos

Preparación del MAT:

- El MAT se presenta comercialmente a 10,5 mg/ml aproximadamente. Una vez que se recibe se deja descongelando durante unas 12 h a 4 °C, se hacen fracciones alícuotas y se congelan a -20 °C.

Medio de cultivo para HUVEC / BAEC:

Para 500 ml de DMEM (1 g/l de glucosa) añadir:

- 5 ml Penicilina/estreptomycin.
- 2,5 ml Anfotericina B.
- 5 ml L-glutamina.
- 25 ml FBS (sólo para las HUVEC).

Equipamiento

- Incubador de CO₂.
- Microscopio invertido de contraste de fases.
- Cabina de bioseguridad.

Procedimiento

- Descongelar las alícuotas de MAT durante aproximadamente 1 h a 4 °C (en un vaso con hielo semifundido en el interior de una nevera).
- Enfriar en un congelador el material estéril que va a estar en contacto con el MAT (puntas de pipeta, microplaca, etc.) antes de su uso.
- En una cabina de bioseguridad, distribuir 50 µl de MAT en los pocillos necesarios de una microplaca de 96, mantenida en frío sobre hielo en una bandeja. Tener en cuenta que cada condición se ha de ensayar por triplicado.
- Dejar la placa sobre el hielo durante 10 min. para que desaparezcan las posibles burbujas formadas durante el pipeteo. Opcionalmente, la placa así preparada se puede dejar a 37 °C para continuar con el ensayo al día siguiente.
- Dejar polimerizar durante 30 min. a 37 °C.
- Para HUVEC: preparar una suspensión celular de 125.000 cél./ml en el medio DMEM suplementado (5% FBS). Para BAEC: preparar una suspensión celular de 250.000 cél./ml en el medio DMEM suplementado (sin FBS).
- Poner 200 µl de suspensión en cada pocillo.
- En los pocillos experimentales añadir 5 µl del compuesto para que quede a la concentración que se desea ensayar (para ajustar la concentración no se consideran los 50 µl de MAT).
- Los pocillos usados como control negativo se pueden suplementar con suramina 50 µM o, alternativamente, con estaurosporina 2 µM. Añadiendo 5 µl a la concentración requerida.
- Los pocillos usados como control positivo se suplementarán con 5 µl del vehículo usado para diluir los compuestos.
- Incubar a 37 °C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda durante aproximadamente 6 horas.

Cuantificación e interpretación de los resultados

Tras las 6 h de incubación, se observa la morfología celular a 40x y 100x, se evalúan las formaciones tubulares y se toman fotografías.

ENSAYOS SOBRE MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE EMBRIONES DE POLLO

La membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de las aves aparece durante el desarrollo embrionario como consecuencia de la fusión del alantoides con el corion y experimenta un pronto y rápido desarrollo que se ve acompañado por la formación mediante angiogénesis de una extensa red de vasos sanguíneos. La CAM de pollo (*Gallus gallus*) es de muy fácil acceso a través de la cáscara del huevo y su potencial para probar los efectos antiangiogénicos de compuestos experimentales resulta de gran utilidad.

Materiales

- Huevos fertilizados.
- Alcohol 70%.
- Jeringas de 5 ml y agujas de 0,8x25 mm, 21G.
- Pinzas de punta fina y tijeras de disección.
- Cinta adhesiva.

Reactivos

- Metilcelulosa.

Preparación de los reactivos

Preparación de los discos de metilcelulosa

1. Mezclar el compuesto que se va a ensayar con una solución de metilcelulosa al 1% en agua a las dosis requeridas. Los controles negativos se prepararán con volúmenes equivalentes del disolvente empleado para disolver el compuesto (habitualmente DMSO).
2. Depositar gotas de 10 μ L de la mezcla sobre una superficie estéril de teflón en el interior de una cabina de flujo laminar y dejar secar, para conseguir de esta forma discos de pequeño tamaño.

Equipamiento

- Incubadora para huevos con bandeja basculante.
- Cabina de bioseguridad.
- Lupa binocular dotada de sistema de adquisición de imágenes.

Procedimiento

1. Incubar los huevos fertilizados en posición horizontal a 38 °C en atmósfera húmeda durante 3 días en agitación suave.
2. Limpiar la superficie de la cáscara con alcohol al 70%.
3. Pinchar los huevos con una jeringa por su vértice más estrecho, perforando con cuidado para no pinchar la yema, y extraer de 2 a 2,5 ml de albúmina. De

esta forma se consigue la creación de una falsa cámara de aire en el lateral del huevo.

4. Con unas tijeras abrir una pequeña ventana a través de la cáscara lateral del huevo para localizar la zona de crecimiento de la CAM.
5. Tras comprobar que el huevo está fecundado, sellar las ventanas con cinta adhesiva para evitar la desecación y prolongar la incubación en posición horizontal y sin agitación durante 5 días más.
6. Colocar los discos de metilcelulosa cuidadosamente sobre la CAM con unas pinzas de punta fina.
7. Sellar de nuevo los huevos con cinta adhesiva e incubar durante 2 días más.
8. Examinar la CAM con una lupa binocular y realizar la toma de imágenes.

Valoración de los resultados

El ensayo es puntuado como positivo cuando 2 observadores independientes informan de una reducción clara del número de vasos en el área tratada, de una desorganización de los mismos o de la aparición de “rebotes” ocasionados por la anastomosis de vasos próximos, siempre que no aparezcan asociadas reacciones inflamatorias que puedan falsear los resultados.

ENSAYOS DE APOPTOSIS ENDOTELIAL SOBRE MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE EMBRIONES DE CODORNIZ

Habitualmente los ensayos en membrana corioalantoidea (CAM) de ave para probar efectos antiangiogénicos de compuestos experimentales se han realizado sobre embriones de pollo, sin embargo, una modificación utilizando embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) ha hecho posible poner de manifiesto si determinados compuestos inducen apoptosis específica sobre células endoteliales. Esto se ha conseguido combinando tres herramientas: 1) la utilización del anticuerpo monoclonal QH1 (Quail endothelial and hematopoietic cell-specific marker), un marcador de superficie específico de células endoteliales y de precursores hematopoyéticos de codorniz; 2) la técnica TUNEL (Terminal UDP-nick end labeling) para el marcaje de células apoptóticas; y 3) la tinción de núcleos con yoduro de propidio.

Materiales

- Huevos fertilizados de codorniz.
- Alcohol 70%.
- Jeringas hipodérmicas.
- Pinzas de punta fina y tijeras de disección.
- Cinta adhesiva.
- Portaobjetos polilisinados.

Reactivos

- Metilcelulosa.
- PBS.
- Paraformaldehido 4% en PBS.
- Etanol al 50%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%.
- Butanol.
- Parafina.
- Xilol.
- Proteinasa K (10 µg/ml en Tris/HCl 10 mM, pH 8).
- In Situ Cell Death Detection Kit, Roche
- Suero de oveja.
- BSA.
- Triton X-100.
- Anticuerpo monoclonal anti-QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank).
- Anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (Cy5-conjugated donkey anti-mouse IgG, Molecular Probes).
- Yoduro de propidio.

- RNAsa
- Glicerina.

Preparación de los reactivos

Preparación de los discos de metilcelulosa

3. Mezclar el compuesto que se va a ensayar con una solución de metilcelulosa al 1% en agua a las dosis requeridas. Los controles negativos se prepararán con volúmenes equivalentes del disolvente empleado para disolver el compuesto (habitualmente DMSO).
4. Depositar gotas de 8 µL de la mezcla sobre una superficie estéril de teflón en el interior de una cabina de flujo laminar y dejar secar, para conseguir de esta forma discos de pequeño tamaño.

Mezcla de reacción TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche)

1. Mezclar 50 µL de solución enzimática con 450 µL de solución de marcado.
2. Diluir la mezcla de reacción a $\frac{1}{4}$ con el tampón de dilución.

Solución de bloqueo SBT

Preparar una solución de PBS con:

- 16% Suero de oveja.
- 1% BSA.
- 0,5 % Tritón X-100.

Solución de yoduro de propidio

Yoduro de propidio a 5 µg/ml en PBS suplementando con:

- RNAsa 20 µg/ml.
- BSA 0,5%.

Equipamiento

- Incubadora para huevos con bandeja basculante.
- Cabina de flujo laminar.
- Lupa binocular.
- Microtomo.
- Estufa 37 °C.
- Microscopio confocal.

Procedimiento

Procesamiento de los huevos.

1. Incubar los huevos de codorniz fertilizados en posición horizontal a 38 °C en atmósfera húmeda durante 2 días en agitación suave.
2. Limpiar la superficie de la cáscara con alcohol al 70%.
3. Pinchar los huevos con una jeringa hipodérmica por su vértice más estrecho, perforando con cuidado para no pinchar la yema, y extraer 0,5 ml de albúmina. De esta forma se consigue la creación de una falsa cámara de aire en el lateral del huevo.

4. Con una tijera abrir una pequeña ventana a través de la cáscara lateral del huevo para localizar la zona de crecimiento de la CAM.
5. Tras comprobar que el huevo está fecundado, sellar las ventanas con cinta adhesiva para evitar la desecación y prolongar la incubación en posición horizontal y sin agitación durante 5 días más.
6. Colocar los discos de metilcelulosa cuidadosamente sobre la CAM con unas pinzas de punta fina.
7. Sellar de nuevo los huevos con cinta adhesiva e incubar durante 24 h.

Disección de las CAM

Tras la reincubación retirar cuidadosamente los discos de metilcelulosa y diseccionar las áreas de CAM sobre las que se había depositado el disco.

Fijación y deshidratación

1. Lavar las CAM con PBS y fijarlas con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 5 h a 4 °C.
2. Lavar en PBS (3 x 5 min.).
3. Deshidratar en una serie de alcoholes crecientes: en etapas de 15 minutos al 50%, 70%, 80%, 90%, 96%; y finalmente al 100% (2 veces x 5 min.), pasándolas a butanol (2 veces x 5 min.).

Inclusión en parafina

1. Lavar las CAM metiéndolas en un vasito con parafina a 60 °C durante 30 minutos, 3 veces, desechando la parafina usada.
2. Incluir las en bloques con parafina y dejarlos solidificar.

Realización de los cortes histológicos

1. Retallar y hacer cortes histológicos de 10 µm de grosor con el microtomo.
2. Montar los cortes en portas polilisinados y dejarlos en estufa a 37 °C durante toda la noche.

Inmunomarcado de las células apoptóticas mediante ensayo TUNEL

3. Desparafinar los cortes con xilol (3 x 10 min.).
4. Rehidratar en una serie de alcoholes decrecientes en etapas de 5 min.: 100% (2 veces), 96% (2 ves), 70%, 50% y en agua pura.
5. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con la solución de proteinasa K.
6. Lavar con PBS (3 x 5 min.).

7. Preparar la mezcla de reacción TUNEL
8. Añadir la mezcla de reacción e incubar 10 minutos a 25 °C en cámara húmeda (modificación de las instrucciones suministradas en el kit). Al control negativo se le añadirán únicamente 50 µL de solución de marcado.

Inmunomarcado de las células endoteliales

1. Lavar los cortes con PBS (3 veces x 5 min.)
2. Incubar los cortes con SBT durante 30 minutos en cámara húmeda para bloquear los sitios de unión no específicos.
3. Tirar el exceso de solución de bloqueo e incubar las preparaciones durante 24 h a 4 °C en cámara húmeda con el anti-QH1 diluido 1:100 en SBT.
4. Lavar las preparaciones con PBS (2 veces x 5 min.).
5. Incubar durante una hora con el anticuerpo secundario conjugado con Cy5 diluido a 1:100 en SBT.

Tinción de los núcleos con Yoduro de propidio

1. Lavar las preparaciones con PBS.
2. Incubar durante 30 segundos en la solución de yoduro de propidio.
3. Lavar las preparaciones con PBS y montarlas con una solución de glicerina-PBS (1:1).

Obtención y montaje de las imágenes

1. La observación y captura de las imágenes se realiza en un microscopio confocal.
2. Se obtienen dos imágenes de cada muestra:
 - a) Una imagen con dos colores: rojo (núcleos teñidos con yoduro de propidio) y verde (marcaje TUNEL)
 - b) Otra imagen con un sólo color: verde (marcaje del anticuerpo QH1), el cual es necesario recodificar a azul mediante tratamiento de imagen con un programa informático (Photoshop o similar).
3. Finalmente, se mezclan las dos imágenes mediante el mismo programa.

Interpretación de los resultados

Las células apoptóticas aparecerán con los núcleos marcados en verde-amarillo, mientras el resto de núcleos aparecerán marcados en rojo. La superficie de las células endoteliales, las células hematopoyéticas y sus precursores aparecerán marcados en azul por el anticuerpo QH1.

ENSAYO *IN VIVO* DE PEZ CEBRA FLUORESCENTE

El pez cebra (*Danio rerio*) puede ser utilizado fácilmente como modelo de angiogénesis *in vivo*. Además, la disponibilidad de líneas transgénicas de pez cebra con vasos sanguíneos fluorescentes ha permitido un análisis rápido y preciso de los vasos gracias a la expresión de una proteína verde fluorescente (GFP). La línea transgénica de peces cebra utilizada (TG(fli1:EGFP)^{y1}) porta 15-kb de un promotor del factor de transcripción “friend leukemia virus integration-1” (fli-1), que codifica para la expresión de la GFP en el endotelio.

Materiales

- Huevos fecundados.
- Placas de Petri.
- Pipetas Pasteur.
- Microplaca de 96 pocillos.
- Portaobjetos excavado.

Reactivos

- Lejía diluida al 0.5% en agua del sistema.
- Tricaína 0.02%.

Equipamiento

- Estufa con puerta acristalada.
- Pinzas finas.
- Microscopio de epifluorescencia.

Procedimiento

Día 1- Recogida de la puesta y desinfección de los huevos

5. Tras el apareamiento, recoger los huevos y transferirlos a una placa de Petri.
6. Retirar los excrementos y huevos no fecundados con una pipeta Pasteur.
7. Retirar el agua en el que se encuentran los embriones y añadir lejía diluida al 0,5% en agua del sistema. Tratar durante 90 segundos.
8. Retirar la lejía y lavar con agua del sistema durante 3 minutos, 3 veces.
9. Añadir agua del sistema hasta cubrir por completo los embriones.
10. Incubar a 28,5 °C durante 24 h en una estufa con puerta de cristal.

Día 2- Retirada del corion y tratamiento de las larvas

1. Retirar el corion de los embriones manualmente con la ayuda de un par de pinzas finas, permitiendo la liberación de las larvas.
2. Preparar una microplaca de 96 pocillos con 100 µl de agua del sistema por pocillo, en presencia de la concentración deseada del compuesto a ensayar.
3. Transferir las larvas a los pocillos, poniendo una larva por pocillo.
4. Incubar a 28,5 °C durante 24 h en una estufa con puerta de cristal.

Día 3- Observación de los embriones al microscopio

1. Anestésiar las larvas añadiendo triclaína (0.02%)
2. Colocar en un portaobjetos excavado y examinar bajo un microscopio de epifluorescencia a una magnificación de 4x y 10x.

Interpretación de los resultados

Observar los efectos del tratamiento sobre los vasos sanguíneos intersegmentales de la región caudal tomando las imágenes pertinentes, bien fotografía de los vasos intersegmentales o vídeo (magnificación 20x) del flujo sanguíneo a través de ellos.

Referencias

- Lawson ND, Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 248:307–318.
- Rubinstein AL (2003). Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 6(2):218-23.

ENSAYO DE ANILLO AÓRTICO DE RATÓN

El ensayo de anillo aórtico de ratón es un modelo *ex vivo* muy útil que cierra la brecha existente entre los modelos de angiogénesis *in vivo* e *in vitro* existentes en la actualidad. En este sistema, los anillos de aorta de ratón se cultivan en geles de colágeno, donde desarrollan redes microvasculares formadas por canalizaciones de células endoteliales. Este modelo remeda de manera más exacta el entorno donde tiene lugar la angiogénesis que los modelos *in vitro* de células endoteliales aisladas y por otro lado permite un control más preciso y reproducible del entorno vascular que los modelos *in vivo*.

Materiales

- Ratón de 7 semanas aproximadas de edad.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Tubo de recogida de sangre con activador de la coagulación.
- Hielo.
- Placas de Petri de 100 mm (de las usadas para cultivos celulares).
- Placas de Petri de 60 mm (de las usadas para cultivos bacteriológicos).
- Plancha de corcho de unos 20 cm x 20 cm.
- Hojas de papel de aluminio estéril.
- Agujas.

Reactivos

- Isoflurano.
- Medio MEM (Minimum Essential Medium).
- Medio DMEM libre de suero, suplementado con 100 U/ml de penicilina-estreptomicina.
- Agarosa VII (Sigma).
- Colágeno 2 mg/ml (colagen R, Serva).
- Medio MEM 10x.
- NaHCO₃ (15.6 mg/ml).
- NaOH 1 M.
- Medio de cultivo MCDB 131 (Gibco) suplementado.

Para reconstituir 500 ml de medio MCDB 131 habrá que añadir:

- a. 5 ml de glutamina 200 mM.
- b. 10 ml de P/S 5000 U/ml.
- c. 5 ml de NaHCO₃ 92,4 mg/ml (Sigma).

Equipamiento

- Material de disección estéril: tijeras y pinzas de disección; tijeras de iridectomía y pinzas de microdisección; mango y hojas curvas de bisturí; espátula doblada en su extremo.
- Perforadores de tapones de 10 mm y 17 mm de diámetro.
- Vaso de precipitado con imán en su interior, estéril.
- Agitador magnético.
- Centrífuga.
- Incubador de CO₂.

Procedimiento

Preparación de los cultivos tridimensionales de anillos aórticos

1. Sacrificar un ratón de aproximadamente 7 semanas de edad mediante inhalación de isoflurano, diseccionar cuidadosamente la aorta torácica, transferirla rápidamente a una placa de cultivo con medio MEM libre de suero y mantenerla en frío sobre hielo (etapas B y C).
2. Retirar cuidadosamente el tejido fibroadiposo periaórtico y realizar secciones transversales de la aorta para conseguir explantes en forma de anillo de un milímetro de largo (etapa D).
3. Incorporar los explantes en un gel de colágeno intersticial de cola de rata tipo I a una concentración de 1,5 mg/ml (etapas E y F) polimerizado en el interior de pocillos cilíndricos construidos con agarosa (etapa A).
4. Los geles de colágeno polimerizado en los pocillos de agarosa se preparan por triplicado en placas de Petri de 60 mm de diámetro de las usadas habitualmente en bacteriología y se mantienen a 37 °C.
5. A cada placa de Petri se le añaden 6 ml de medio MCDB131 suplementado (etapa F).
6. Los explantes así preparados se mantienen en un Incubador a 37 °C, 5% CO₂ y ambiente húmedo durante una semana y se examinan al microscopio cada dos días.

Etapas:

A. Preparación de los pocillos de agarosa.

1. Solubilizar 1,5 g de agarosa VII en 100 ml de agua MilliQ y esterilizar en autoclave.
2. Repartir la agarosa en placas de Petri estériles de 100 mm vertiendo 30 ml por placa.
3. Una vez haya polimerizado la agarosa, con la ayuda de un perforador de tapones, formar anillos realizando cortes circulares de 17 mm de diámetro y,

posteriormente, cortes de 10 mm concéntricos a los anteriores. Quitar el centro de los anillos y desecharlo.

4. Con una espátula doblada en su extremo sujetar el borde del anillo, levantarlo y colocarlo boca abajo en una placa de Petri de 60 mm. Colocar 3 anillos de agarosa en cada placa.

B. Preparación del suero de ratón.

1. Sacrificar el ratón mediante inhalación con isoflurano y realizar una sección por la línea media del tórax.
2. Cortar la caja torácica, dar un corte en el corazón con unas tijeras y recoger la mayor cantidad de sangre posible con una pipeta Pasteur estéril.
3. Transferir la sangre a un tubo estéril con activador de la coagulación y dejar la muestra a temperatura ambiente durante 10-15 min.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min., y mantener la muestra en hielo hasta su uso.

C. Extracción de la aorta del ratón.

1. Apartar las vísceras hacia un lado para dejar libre el campo de disección, cortar la aorta a nivel de las arterias ilíacas e ir separando del tejido conectivo con unas pinzas a la vez que se va cortando con unas tijeras de forma paralela a la columna vertebral.
2. Cortar la aorta a nivel del cayado aórtico y transferirla a una placa con medio DMEM, libre de suero, suplementado con 100 U/ml de penicilina-estreptomicina mantenida sobre hielo.

D. Limpieza del tejido fibroadiposo periaórtico y obtención de los anillos.

1. Colocar la aorta sobre una plancha de corcho cubierta con papel de aluminio estéril y fijarla por los extremos con agujas estériles manteniéndola siempre empapada de medio para evitar que se seque.
2. Retirar con cuidado el tejido fibroadiposo periaórtico ayudándose con unas pinzas de microdisección y con unas tijeras de iridectomía estériles, con cuidado de no dañar la aorta.
3. Una vez limpia la aorta, colocarla sobre la cara interior de la tapadera de una placa de Petri estéril manteniéndola empapada del mismo medio.
4. Exanguinar la aorta presionando suavemente con las pinzas a todo lo largo.
5. Cortar anillos de 1 mm de largo con un bisturí de hoja curva (se consiguen unos 20 anillos por aorta). Mantenerlos siempre cubiertos de medio.
6. Transferir los anillos a una placa de Petri con medio libre de suero y lavarlos varias veces con medio MEM frío. Mantener sobre hielo hasta su uso. Se pueden mantener así hasta dos horas.

E. Preparación de colágeno de tipo I.

1. Dentro de una cabina de flujo, en condiciones de esterilidad, colocar sobre hielo un vaso de precipitado con un imán dentro (previamente esterilizados en autoclave) y este a su vez sobre un agitador magnético.
2. Para 25 anillos será necesario mezclar:
 - a. 7,5 ml de colágeno 2 mg/ml (colagen R, Serva).
 - b. 1 ml de MEM 10 x.
 - c. 1,5 ml de NaHCO₃ (15.6 mg/ml).
3. Una vez preparada la mezcla, poner en agitación lenta evitando las burbujas y añadir poco a poco, en gotas de 10 µl, la cantidad necesaria de NaOH 1 M hasta que el indicador del medio vire a rojo, quedando ajustado el pH a 7,4 (serán necesarios aproximadamente 0,1 ml de NaOH 1 M).

F. Incorporación de los anillos aórticos en el colágeno tipo I.

1. Cogér cada placa de Petri de 60 mm que contiene 3 pocillos de la agarosa (etapa A) y añadirle 200 µl de colágeno tipo I (etapa E) a cada pocillo.
2. Dejar polimerizar a 37 °C durante 15 min.
3. Colocar un explante en la parte superior del colágeno I de cada pocillo de agarosa de forma que queden centrados en medio del pocillo y colocados lateralmente.
4. Incubar a 37 °C durante 5-10 min.
5. Verter sobre el explante otros 200 µl del colágeno tipo I
6. Dejar polimerizar de nuevo durante 15 min. a 37 ° C.
7. Añadir a cada placa de Petri:
 - a. 5,85 ml de medio de cultivo MCDB 131 suplementado como se indica en la sección de reactivos.
 - b. 150 ul de suero de ratón (etapa B).
8. Incubar a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda durante 6 días y observar al microscopio.

Cuantificación e interpretación de los resultados

Para realizar el análisis de las imágenes todas las imágenes deben ser tomadas bajo las mismas condiciones de luz, contraste y magnificación.

En cada imagen se puede valorar el número de microvasos, la longitud máxima de los mismos y el número total de ramificaciones.

La respuesta angiogénica se puede cuantificar mediante el recuento microscópico visual a 100 aumentos del número de microvasos cada 24 h, siguiendo los siguientes criterios:

- Los microvasos se distinguen por su morfología única.
- La ramificación de un microvaso genera dos nuevos.
- Cada anastomosis formada se cuenta como dos microvasos.

ENSAYO CLONOGÉNICO EN AGAR BLANDO (*SOFT AGAR*)

La mayoría de las células requieren estar adheridas a un sustrato para llegar a dividirse. Esta proliferación dependiente de anclaje es un mecanismo de control de la división celular que muchas células transformadas han perdido.

Cuando las células se siembran en un medio de cultivo entre una densa capa de agar no tienen acceso a un sustrato sólido sobre el cual poder propagarse, de manera que sólo las células con capacidad de proliferación independiente de anclaje son capaces de crecer (por lo general las células transformadas). La capacidad para crecer en "agar blando" es una prueba de rutina que indica que las células con estas características son anclaje-independientes, lo cual se correlaciona fuertemente con la tumorigenicidad y la invasividad celular.

Materiales y reactivos

- Cultivo celular al 80%-90% de confluencia.
- Placa de 24 pocillos.
- Tubos.
- PBS.
- Medio de cultivo apropiado para el tipo celular, sin FBS y con 0,1% de BSA.

Equipamiento

- Incubador de CO₂.
- Cabina de bioseguridad biológica.

Procedimiento

El ensayo se realiza en placas de 6 pocillos, sembrando 5.000 células/pocillo, por triplicado. Cada pocillo contiene: en la parte inferior 1,5 ml de "agar base" y en la parte superior 1,5 ml de "agar superior" al que se han añadido las células y el compuesto a ensayar.

Preparar las placas de la siguiente forma (cantidades para 1 pocillo):

Agar base (0,5 %):

1. Tubo 1: pesar 7,5 mg de agarosa (con la máxima esterilidad) y añadir a 0.360 ml de medio de cultivo sin aditivos. Fundir en el microondas y mantenerlo en un baño a 37 °C.
2. Tubo 2: mezclar:
 - FBS: 0,150 ml
 - Gln: 0,015 ml
 - ATB: 0,030 ml
 - Fungizona: 0,015 ml
 - Medio: 0,930 ml
3. Atemperar el tubo 2 en un baño a 37 °C.

4. Mezclar ambos tubos y mantenerlos a 37 °C mientras se están dispensando en la placa para que el agar no se asiente de forma prematura (dentro de un recipiente, p.e., un vaso de precipitado con agua a temperatura ambiente).
5. Dispensar 1,5 ml de agar base/pocillo.
6. Añadir con rapidez la cantidad necesaria del compuesto a ensayar a los pocillos experimentales para que quede a la concentración deseada.
7. Dejar gelificar a temperatura ambiente.

Las placas así preparadas se pueden almacenar a 4 °C hasta 1 semana (si el compuesto experimental es estable).

Agar superior (0,35%)

1. Tubo 1: pesar 5,25 mg de agarosa (con la máxima esterilidad) y añadir a 0,260 ml de medio de cultivo sin aditivos. Fundir en el microondas y mantenerlo en un baño a 37 °C.
2. Preparar 1,030 ml de suspensión celular a 4.855 células/ml, en medio sin aditivos.
3. Tubo 2: mezclar:
 - FBS: 0,150 ml
 - Gln: 0,015 ml
 - ATB: 0,030 ml
 - Fungizona: 0,015 ml
 - Suspensión celular: 1,030 ml
 - Compuesto experimental: el volumen necesario para que quede a la concentración deseada.
4. Atemperar el tubo 2 en el baño a 37 °C.
5. Mezclar los tubos 1 y 2 y mantener a 37 °C mientras se están dispensando en la placa para que el agar no se asiente de forma prematura.
6. Dispensar 1,5 ml de agar superior/pocillo.
7. Dejar gelificar a temperatura ambiente.

Incubar las placas a 37 °C y 5% de CO₂ durante 12-14 días para permitir el crecimiento de las colonias.

Tinción

Tras la incubación, las placas se tiñen con cristal violeta 0,005% durante 1 h, añadiendo 0,5 ml/pocillo. Esto da mayor contraste cuando se utiliza un microscopio convencional. Con microscopio invertido de contraste de fases las colonias se pueden distinguir bien sin necesidad de teñir.

Cuantificación e interpretación de los resultados

Las colonias se cuentan en un microscopio a 40x. Sólo las colonias de diámetros mayores de 100 µm son contadas como positivas. Para el recuento se eligen 10 campos de 40x al azar. Los campos más representativos se fotografían.

En cada experimento se hacen tres réplicas de los pocillos y se calcula la media. Se realizan tres experimentos independientes.

