

Caracterización de las bioactividades de compuestos naturales en células endoteliales y tumORAles.

Characterization of bioactivities of natural compounds in endothelial and tumor cells.

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología Celular y Molecular

Universidad de Málaga

Autor: María del Carmen Banqueri Pegalajar

Área de conocimiento y Departamento: Área de Bioquímica y Biología Molecular,
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Fecha de presentación: Julio 2024

Líneas de investigación: Vasculogénesis, angiogénesis y hematopoyesis y
Mecanismos moleculares de acción de fármacos

N.º de páginas de la memoria: 80

N.º de páginas de los anexos: 12

D. Miguel Ángel Medina Torres, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, Tutor del trabajo titulado: «Caracterización de las bioactividades de compuestos naturales en células endoteliales y tumorales»

INFORMA:

Que Dña. María del Carmen Banqueri Pegalajar ha realizado en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, bajo su supervisión, el trabajo recogido en la presente memoria de Trabajo Fin de Máster. Así como la adecuación de los contenidos y resultados del trabajo a las líneas de investigación: Vasculogénesis, angiogénesis y hematopoyesis y Mecanismos moleculares de acción de fármacos

Y para que así conste, firmo el presente informe en Málaga, a 20 de junio de 2024

MEDINA
TORRES
MIGUEL ANGEL
- 25048233Z



Firmado digitalmente
por MEDINA TORRES
MIGUEL ANGEL -
25048233Z
Fecha: 2024.06.20
22:25:48 +02'00'

El Tutor: Miguel Ángel Medina Torres



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Facultad de Ciencias
Decanato

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DEL TFM

D./Dña. María del Carmen Banqueri Pegalajar
con DNI (NIE o pasaporte) 76068629Q

DECLARA que es autor/a del presente Trabajo de Fin de Máster, titulado:
Caracterización de las bioactividades de compuestos naturales en células endoteliales y tumorales.

Que ha cumplido con las obligaciones legales sobre propiedad intelectual e industrial y que además, es un trabajo original, no habiéndose utilizado fuentes bibliográficas sin ser citadas debidamente. De no cumplir con este compromiso, el abajo firmante es consciente de que, de acuerdo con la Normativa de Evaluación y de Calificación de los estudiantes de la Universidad de Málaga de 14 de marzo de 2018, esto conllevará automáticamente la calificación numérica de cero, independientemente del resto de las calificaciones que hubiera obtenido. Esta consecuencia debe entenderse sin perjuicio de las responsabilidades disciplinarias en las que se pudieran incurrir.

En Málaga, a 20 de Junio de 20 24

BANQUERI
PEGALAJAR
MARIA DEL
CARMEN -
Fdo. 76068629Q

Firmado digitalmente
por BANQUERI
PEGALAJAR MARIA
DEL CARMEN -
76068629Q
Fecha: 2024.06.20
19:08:27 +02'00'

VISTO BUENO DEL TUTOR/COTUTOR

D./Dña. Miguel Ángel Medina Torres en calidad de Tutor/a
con la Categoría Profesional de Catedrático, en la Institución Universidad de Málaga,
y D./Dña. Manuel Bernal Muñoz en calidad de Cotutor/a
con la Categoría Profesional de Investigador, en la Institución Universidad de Málaga,

INFORMAN que el presente Trabajo Fin de Máster ha sido realizado bajo nuestra supervisión y cumple con el Reglamento relativo a la propiedad intelectual e industrial.

En Málaga, a 21 de junio de 20 24

MEDINA
TORRES
MIGUEL
ANGEL -
Fdo. 25048233Z

Firmado digitalmente por
MEDINA TORRES
MIGUEL ANGEL -
25048233Z
Fecha: 2024.06.21
09:08:57 +02'00'

BERNAL
MUÑOZ
MANUEL -
Fdo. 77806763V

Firmado digitalmente
por BERNAL MUÑOZ
MANUEL - 77806763V
Fecha: 2024.06.21
09:01:34 +02'00'



EFQM AENOR



Campus de Teatinos, s/n. 29071 Málaga
Tel.: 952 13 19 87 - E-mail: decanato.ciencias@uma.es

ÍNDICE

0. Resumen y Abstract	0
1. Introducción	1
1.1. Cáncer	1
1.1.1 Cáncer de mama triple negativo	4
1.2. Angiogénesis	5
1.2.1 Angiogénesis fisiológica y microvasculatura	5
1.2.2 Angiogénesis patológica y cáncer.....	6
1.3. Autofagia	7
1.4.1 Autofagia en células tumorales	8
1.4.2 Autofagia en células endoteliales.....	11
1.4. Estrés Oxidativo	13
1.5.1 Estrés oxidativo en células tumorales	14
1.5.2 Estrés oxidativo en células endoteliales.....	17
1.5. Compuestos naturales	19
1.5.1 Ramnetina	21
1.5.2 Punicalina	21
1.5.3 Verbascoside	22
2. Hipótesis y Objetivos	23
3. Materiales y Métodos	24
3.1. Cultivos celulares	24
3.2. Estudio de la proliferación celular	24
3.3. Estudio de la migración celular	25
3.4. Evaluación de la formación de tubos	25
3.5. Evaluación de la autofagia	26
3.6. Evaluación del estrés oxidativo	28
3.7. Características de las sondas fluorescentes	31
3.8. Análisis estadísticos	32
3.9. Búsqueda bibliográfica	32
4. Resultados	33
4.1. Estudio de la proliferación celular	33
4.2. Estudio de la migración celular	36
4.3. Evaluación de la formación de tubos	43

4.4. Detección de autofagia	49
4.5. Detección de estrés oxidativo	56
5. Discusión de resultados	65
5.1. Estudio de la proliferación celular	65
5.2. Estudio de la migración celular	67
5.3. Evaluación de la formación de tubos	69
5.4. Detección de autofagia	71
5.5. Detección de estrés oxidativo	73
6. Limitaciones y perspectivas	75
7. Conclusiones	76
8. Bibliografía	77
9. Anexos	81
10. Reconocimientos	93

Caracterización de las bioactividades de compuestos naturales en células endoteliales y tumorales.

RESUMEN

Existe un gran desafío en la búsqueda de nuevos fármacos anticancerígenos, especialmente para aquellos tipos de cáncer altamente agresivos como el cáncer de mama triple negativo. Por ello, se evaluaron las bioactividades de compuestos naturales: ramnetina, punicalina y Verbascoside, en células endoteliales y tumorales sobre algunos procesos relevantes en la dinámica del microambiente tumoral: angiogénesis, autofagia y estrés oxidativo.

Se plantea la hipótesis de que los compuestos naturales seleccionados podrían actuar como moduladores potenciales de procesos clave en la dinámica del microambiente tumoral, tales como la angiogénesis, la autofagia y el estrés oxidativo. Para probar esta hipótesis, se caracterizaron los efectos de los compuestos naturales seleccionados en células endoteliales y tumorales en relación con la Angiogénesis Tumoral y se evaluaron los efectos de los compuestos naturales seleccionados en la dinámica de Autofagia y Estrés Oxidativo en células endoteliales y tumorales mediante *High Content Analysis System* (HCS).

Se realizaron experimentos *in vitro* utilizando células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) y células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo MTT, la migración celular se analizó a través de ensayos de cicatrización de heridas y la angiogénesis mediante el ensayo de formación de tubos sobre Matrigel.

La autofagia fue evaluada mediante la detección del autofagosoma en condiciones basales e inducidas por privación de nutrientes. El estrés oxidativo se estudió mediante la detección de especies reactivas de oxígeno en condiciones basales e inducidas por peróxido de hidrógeno. La dinámica de estos dos últimos procesos se observó y analizó gracias al uso de sondas fluorescentes mediante *HCS*.

Los resultados arrojaron que los tres compuestos ejercen una inhibición significativa en la proliferación y migración celular en ambas líneas celulares, tanto endoteliales como tumorales. Además, interrumpieron la formación de tubos, indicando potentes efectos antiangiogénicos. También se observó que los compuestos modulaban los procesos de autofagia y de estrés oxidativo tanto en condiciones basales como en condiciones inducidas por privación de nutrientes y peróxido de hidrógeno respectivamente.

En conclusión, ramnetina, punicalina y verbascoside muestran fuertes propiedades anticancerígenas y antiangiogénicas al dirigirse a las vías de angiogénesis, autofagia y estrés oxidativo. Estos hallazgos sugieren su potencial para la investigación como potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento de cánceres agresivos, lo que justifica una mayor investigación en contextos preclínicos y clínicos. La caracterización y validación *in vitro* en líneas celulares humanas brindó información crucial sobre los mecanismos subyacentes que constituyen una base sólida para posteriores estudios en modelos *in vivo*. Esta investigación destaca la relevancia de los productos naturales en el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas contra el cáncer, subrayando la importancia de continuar explorando su potencial terapéutico.

Palabras clave:

Angiogénesis, cáncer, antiangiogénicos, autofagia, estrés oxidativo, células tumorales, células endoteliales, sistema de cribado de alto contenido, ramnetina, punicalina, verbascoside, acteoside, kusaginina

Characterization of bioactivities of natural compounds in endothelial and tumor cells.

ABSTRACT

There exists a significant challenge in the search for novel drugs crucial to cancer progression, particularly in highly aggressive cancer types such as triple-negative breast cancer. Consequently, the bioactivities of the natural compounds rhamnetin, punicalin, and verbascoside were evaluated in endothelial and tumor cells, focusing on key processes relevant to the tumor microenvironment dynamics: angiogenesis, autophagy, and oxidative stress.

The hypothesis is proposed that the selected natural compounds could act as potential modulators of key processes in the dynamics of the tumor microenvironment, such as angiogenesis, autophagy, and oxidative stress. To test this hypothesis, the effects of the selected natural compounds on endothelial and tumor cells were characterized in relation to Tumor Angiogenesis, and their effects on the dynamics of Autophagy and Oxidative Stress were evaluated using a High Content Analysis System (HCS).

In vitro experiments were conducted using human endothelial cells (HMEC-1) and triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231). Cell proliferation was assessed through the MTT assay, cell migration was analyzed using wound healing assays, and angiogenesis was evaluated through the tube formation assay on Matrigel. Autophagy was assessed by detecting autophagosomes under basal conditions and nutrient deprivation-induced conditions. Oxidative stress was studied by detecting reactive oxygen species under basal conditions and hydrogen peroxide-induced conditions. The dynamics of these latter processes were observed and analyzed using fluorescent probes via HCS.

The results indicated that the three compounds significantly inhibited cell proliferation and migration in both endothelial and tumor cell lines. Additionally, they disrupted tube formation, indicating potent anti-angiogenic effects. The compounds also modulated autophagy and oxidative stress processes under basal conditions and conditions induced by nutrient deprivation and hydrogen peroxide, respectively.

In conclusion, rhamnetin, punicalin, and verbascoside exhibit strong anticancer and anti-angiogenic properties by targeting the pathways of angiogenesis, autophagy, and oxidative stress. These findings suggest their potential for further investigation as therapeutic agents in the treatment of aggressive cancers, warranting additional research in preclinical and clinical contexts. The in vitro characterization and validation in human cell lines provided crucial insights into the underlying mechanisms, forming a solid foundation for subsequent in vivo studies. This research underscores the relevance of natural products in developing new pharmacological strategies against cancer, highlighting the importance of continuing to explore their therapeutic potential.

Keywords:

Angiogenesis, cancer, antiangiogenic, autophagy, oxidative stress, cancer cells, endothelial cells, high-content analysis system, rhamnetin, punicalin, verbascoside, acteoside, kusaginin