

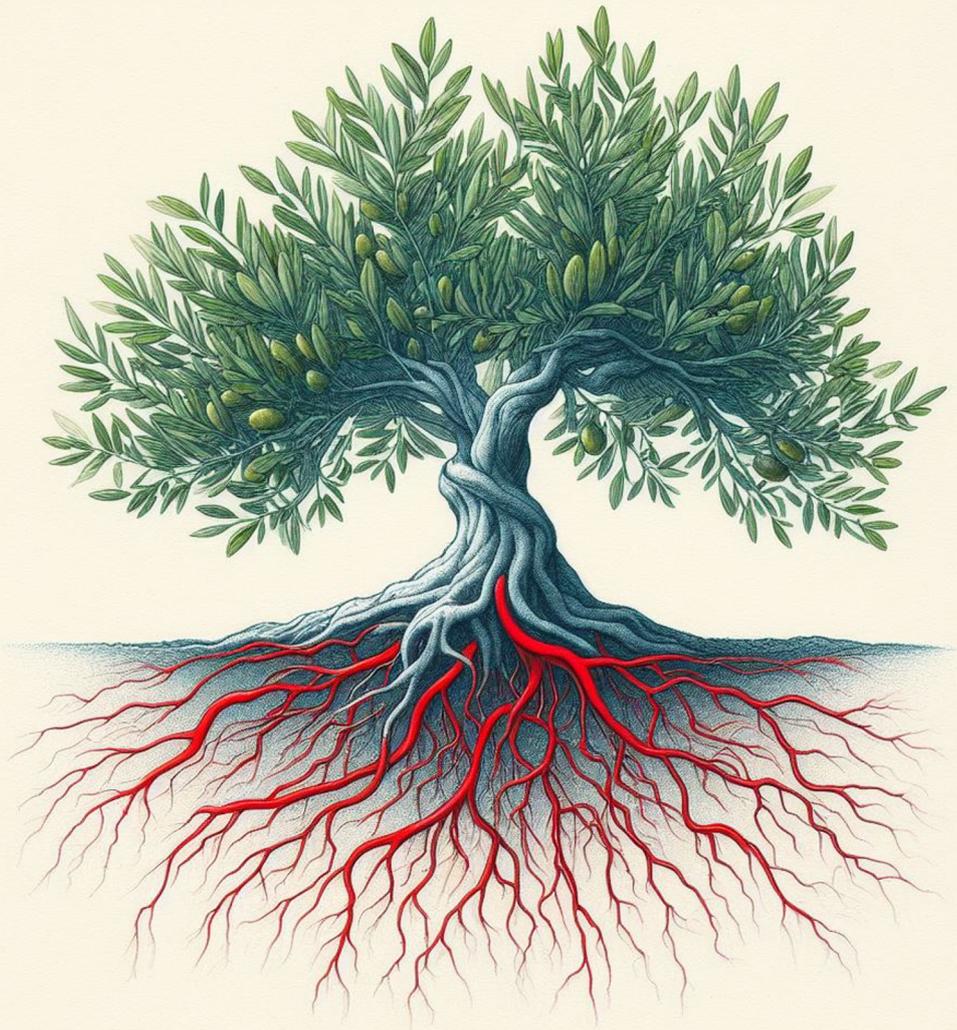


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Modulation of Angiogenesis, Inflammation, and Cell Death by
Molecules from Olive Oil and Other Natural Sources



Ana Dácil Marrero Capitán

Directores:

Dr. Miguel Ángel Medina Torres

Dra. Beatriz Martínez Poveda

Málaga, 2024



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

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

DISSERTATION

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Modulation of Angiogenesis, Inflammation, and Cell Death by Molecules from Olive Oil and Other Natural Sources

*Modulación de la Angiogénesis, la Inflamación y la Muerte
Celular por Moléculas Provenientes del Aceite de Oliva y Otras
Fuentes Naturales*

Ana Dácil Marrero Capitán

Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada

Directores:

Dr. Miguel Ángel Medina Torres

Dra. Beatriz Martínez Poveda

Málaga, 2024



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña ANA DÁCIL MARRERO CAPITÁN

Estudiante del programa de doctorado EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: MODULATION OF ANGIOGENESIS, INFLAMMATION, AND CELL DEATH BY MOLECULES FROM OLIVE OIL AND OTHER NATURAL SOURCES

Realizada bajo la tutorización de ANA MARÍA RODRÍGUEZ QUESADA y dirección de MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES Y BEATRIZ MARTÍNEZ POVEDA (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 2 de abril de 2024

Fdo.: ANA DÁCIL MARRERO CAPITÁN Doctorando/a	Fdo.: ANA MARÍA RODRÍGUEZ QUESADA Tutor/a
Fdo.: MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES BEATRIZ MARTÍNEZ POVEDA	





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Director/es de tesis



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es



Por el presente documento, los DIRECTORES de la tesis, D. MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES, catedrático del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, y DÑA. BEATRIZ MARTÍNEZ POVEDA, investigadora y profesora titular del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, así como la TUTORA de la tesis, DÑA. ANA MARÍA RODRÍGUEZ QUESADA catedrática del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN

Que DÑA. ANA DÁCIL MARRERO CAPITÁN, graduada en Bioquímica por la Universidad de Málaga y la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección y tutorización conjunta el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “Modulation of Angiogenesis, Inflammation, and Cell Death by Molecules from Olive Oil and Other Natural Sources” en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga.

Que los artículos que avalarán esta Tesis Doctoral no han sido empleados previamente como respaldo para otras Tesis.

Para que conste, a efecto de lo establecido en el Real Decreto Regulador de los estudios de Tercer Ciclo-Doctorado RD99/2011, modificado por los Reales Decretos 534/2013, 43/2015 Y 195/2016, AUTORIZAMOS la presentación de dicha Tesis Doctoral en la Universidad de Málaga.

Fdo., los directores,

Miguel Ángel Medina Torres

Beatriz Martínez Poveda

Fdo., la tutora,

Ana María Rodríguez Quesada



Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

PID2019-105010RB-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) PY20_00257, UMA18-FEDERJA-220, Fondos del grupo BIO 267 (Junta de Andalucía y FEDER) y el “Plan Propio de Investigación y Transferencia” de la Universidad de Málaga. Además, el trabajo está respaldado por el CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) y el CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), iniciativas del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España.

Ana Dácil Marrero Capitán realizó una estancia durante 3 meses en el grupo de investigación de la Dr. Sharon Tooze, en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Autofagia del Instituto Francis Crick de Londres, Reino Unido. Gracias a la metodología disponible en el grupo receptor, se pudo comenzar la caracterización del efecto de (-)-oleaceína y (-)-oleocantal sobre la autofagia en células tumorales de mama, tema en el que se sigue trabajando actualmente. Para esta estancia se dispuso de una beca de movilidad del Instituto Biomédico de Málaga IBIMA-Plataforma BIONAND.

List of abbreviations	3
Resumen (summary)	9
1. Introduction	23
1.1. Angiogenesis.....	25
1.1.1. Structure and formation of blood vessels.....	25
1.1.2. The angiogenic process.....	26
1.1.3. Regulators of angiogenesis.....	27
1.1.4. Steps of the angiogenic process.....	29
1.1.5. Main signaling pathways regulating angiogenesis.....	34
1.1.6. Angiogenesis in pathological conditions.....	39
1.2. Cancer.....	40
1.2.1. The hallmarks of cancer.....	40
1.2.2. Tumor angiogenesis.....	48
1.3. Inflammation.....	53
1.3.1. General process of inflammation.....	53
1.3.2. NF- κ B as a central regulator of inflammation.....	54
1.3.3. Atherosclerosis, inflammation, and endothelial dysfunction.....	57
1.4. Regulated cell death.....	59
1.4.1. Apoptosis.....	60
1.4.2. Regulated non-apoptotic cell death mechanisms (regulated necrosis).....	62
1.4.2.1. Necroptosis.....	62
1.4.2.2. Review 1 “Pyroptosis modulators: new insights of gasdermins in health and disease”	65
1.4.2.3. Ferroptosis.....	84
1.4.2.4. Autophagy.....	86
1.5. Natural products as a source of bioactive compounds.....	91
1.5.1. Review 2 “Antiangiogenic phytochemicals constituent of diet as promising candidates for chemoprevention of cancer”	91
1.5.2. Mediterranean diet and extra virgin olive oil.....	113
1.5.2.1. Mediterranean diet: more than a dietary choice.....	113
1.5.2.2. Bioactivities of phenolic compounds in extra virgin olive oil.....	115
2. Hypothesis and objectives/Hipótesis y objetivos	127
3. Material & methods	135
4. Results	145
4.1. Investigation of natural extracts and compounds.....	148
4.1.1. Article 1: “A proteomic study of the bioactivity of <i>Annona muricata</i> leaf extracts in HT-1080 fibrosarcoma cells”	149
4.1.2. Article in progress 1: “Antiangiogenic potential of an olive oil extract: insights from a proteomic study”	167
4.1.3. Article 2: “Anti-angiogenic effects of oleacein and oleocanthal: new bioactivities of compounds from extra virgin olive oil”	199

INDEX

4.1.4. Article in progress 2: "The extra virgin olive oil phenolic compounds (-)-oleacein and (-)-oleocanthal inhibit tumor cell autophagy"	211
4.2. Study of synthetic derivatives of natural compounds.....	225
4.2.1. Article 3: "A comparative study of the antiangiogenic activity of hydroxytyrosyl alkyl ethers"	227
4.2.2. Article 4: "Inhibition of endothelial inflammatory response by HT-C6, a hydroxytyrosol alkyl ether derivative"	241
4.2.3. Article in progress 3: "Nanosystem encapsulation and prodrug synthesis as approaches to improve the performance of two hydroxytyrosol alkyl ethers"	259
5. Discussion.....	271
6. Limitations of the studies and future perspectives.....	275
7. Conclusions/Conclusiones.....	279
8. Bibliography.....	287
9. Annexes	317

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de los efectos moduladores de compuestos del aceite de oliva y de otras fuentes de origen natural sobre la angiogénesis, la inflamación y la muerte celular. Estos procesos celulares, cuando se desregulan, juegan un importante papel en el desarrollo de enfermedades prevalentes como el cáncer o la aterosclerosis. Se han publicado dos revisiones bibliográficas en el marco del contexto teórico del trabajo presentado en esta Tesis:

Artículo de revisión 1: Allali-Boumara, I., Marrero, A.D., Quesada, A.R., Martínez-Poveda, B., Medina, M.Á., 2023. **Pyroptosis modulators: new insights of gasdermins in health and disease**. *Antioxidants* 12, 1551. <https://doi.org/10.3390/antiox12081551>.

Este artículo de revisión aborda la piroptosis, un tipo de muerte celular inflamatoria, focalizándose en papel crucial de las proteínas de la familia gasdermina en este proceso. Durante la piroptosis, las gasderminas experimentan cambios estructurales, formando poros en la membrana celular y liberando contenido proinflamatorio al exterior de la célula. El análisis revisa el conocimiento actual sobre las gasderminas humanas, sus estructuras moleculares y su impacto en la salud y la enfermedad, especialmente en el contexto del cáncer. Además, se examina la acción moduladora de la piroptosis y las gasderminas por parte de compuestos naturales y sintéticos, revelando oportunidades relevantes para el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras.

Artículo de revisión 2: Marrero, A.D., Quesada, A.R., Martínez-Poveda, B., Medina, M.Á., 2022. **Antiangiogenic phytochemicals constituent of diet as promising candidates for chemoprevention of cancer**. *Antioxidants* 11, 302. <https://doi.org/10.3390/antiox11020302>.

El artículo aborda la necesidad de nuevos enfoques para complementar la intervención clínica en tumores, dado el alto índice de cáncer asociado a hábitos alimenticios occidentales. Se destaca el papel de los fitoquímicos, como quercetina y ácido ursólico, en la quimiopreención del cáncer, poniendo el foco en sus propiedades moduladoras de la angiogénesis. El análisis se centra en compuestos presentes en plantas, como compuestos fenólicos, terpenoides y antraquinonas, evaluando sus efectos antitumorales en estudios *in vitro* e *in vivo*, así como revisando datos clínicos disponibles. A pesar de las limitaciones en los ensayos clínicos, los datos pre-clínicos subrayan la prometedora eficacia de estos fitoquímicos en la prevención y tratamiento del cáncer, enfatizando la necesidad de una comprensión más profunda de sus mecanismos de acción y mejoras en el diseño de los ensayos clínicos.

Los contenidos no recogidos en las revisiones mencionadas anteriormente y que son de relevancia en el contexto de esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

1. Angiogénesis

La formación de vasos sanguíneos puede producirse por diversos mecanismos; uno de ellos es la vasculogénesis, esencial durante el desarrollo embrionario y por el que los vasos se forman *de novo* a partir de precursores endoteliales llamados angioblastos. Posteriormente, ocurre la angiogénesis, que implica la ramificación a partir de vasos previamente formados.

En el ser humano adulto, las células endoteliales se encuentran habitualmente en estado quiescente y son poco proliferativas. Sin embargo, estas pueden iniciar rápidamente el proceso de angiogénesis en determinadas condiciones, como la hipoxia o la falta de nutrientes, donde se busca restaurar el flujo sanguíneo para mantener el crecimiento y función de los tejidos. Estos nuevos vasos pueden originarse mediante la formación de un nuevo brote (angiogénesis por brote) o la división de vasos preexistentes (angiogénesis por intususcepción). Esta tesis se enfoca en la regulación de la angiogénesis por brote.

La angiogénesis está regulada por complejas vías de señalización que equilibran señales pro y anti-angiogénicas, lo que se conoce como el “interruptor angiogénico”. Dentro de las moléculas que actúan como activadores e inhibidores de la angiogénesis se incluyen factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular (VEGF) o el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), que son inductores, o los interferones (INF), que actúan como inhibidores.

Una vez activa, la angiogénesis implica una serie de pasos: activación de células endoteliales, degradación de la matriz extracelular (MEC), especialización celular en células de la punta (*tip*) o del tallo (*stalk*), elongación del brote y estabilización vascular. El proceso culmina en la formación de un sistema vascular funcional. Durante la activación de las células endoteliales, estas abandonan su estado quiescente para pasar a un estado angiogénico. Determinadas moléculas pro-angiogénicas, como el VEGF, inducen cambios fenotípicos en las células endoteliales que activan su capacidad de proliferación y migración, y dan lugar al aumento de la permeabilidad del vaso. A continuación, ocurre la degradación de la MEC. En esta fase, las células endoteliales activadas secretan metaloproteinasas (MMP) y otras proteasas para degradar la MEC, permitiendo la invasión celular hacia tejidos circundantes. Luego, tiene lugar la especialización en células de la punta y del tallo. En la angiogénesis por brote, las células de la punta migran guiadas por señales pro-angiogénicas, mientras que las células del tallo proliferan para alargar el brote. Una vez ocurre la especificación celular, la proliferación y migración de las células endoteliales permite que el brote se siga elongando. En este punto, los factores de crecimiento como el VEGF activan vías de señalización como la de ERK/MAPK, que inducen procesos como la migración celular. Por último, se da

la estabilización del vaso. La formación de una monocapa celular y la integración de células de soporte, como los pericitos o las células musculares lisas, en la pared del vaso, contribuyen a la estabilización del mismo.

A su vez, estos pasos están dirigidos por una serie de moléculas de señalización, que activan la expresión de genes que estimulan diversos procesos en las células endoteliales. Las vías moleculares que regulan la angiogénesis se pueden categorizar en aquellas que involucran factores de crecimiento y sus receptores, como VEGF, FGF, factor de crecimiento derivado de pericitos (PDGF) o factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factores de transcripción, como el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) o el factor nuclear-kappa B (NF-κB), y moléculas de maduración, morfogénesis y guía, como las angiopoyetinas y su receptor TIE-2, NOTCH y sus ligandos delta y jagged, o efrinas y sus receptores.

La angiogénesis desregulada juega un papel crucial en diversas condiciones médicas, como el cáncer, algunas enfermedades inflamatorias crónicas, como la aterosclerosis, y trastornos oculares. Comprender su implicación en estos contextos es esencial para desarrollar intervenciones terapéuticas dirigidas.

2. Cáncer

El cáncer es un conjunto complejo de enfermedades caracterizado por el crecimiento y la diseminación no controlados de células anormales en el organismo. A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de muerte, habiendo provocado cerca de 10 millones de fallecimientos en 2020. Los cánceres predominantes incluyen los de mama, pulmón, colorrectal, próstata, estómago, hígado y cuello uterino.

A nivel molecular, el desarrollo del cáncer implica una secuencia de alteraciones sucesivas en genes que afectan las funciones celulares. Determinados factores, como la exposición prolongada a productos químicos ambientales y a la radiación, o las infecciones por patógenos concretos, contribuyen a la aparición de estas alteraciones. A pesar de la diversidad en los mecanismos que favorecen el desarrollo del cáncer, los investigadores Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg identificaron una serie de características comunes o *hallmarks* en las células cancerosas, lo que facilitó el abordaje molecular del cáncer en la investigación biomédica.

Las diez características principales del cáncer incluyen señalización proliferativa sostenida, evasión de supresores tumorales, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, activación de invasión y metástasis, desregulación de la energética celular, evasión de la destrucción inmunitaria, inestabilidad genómica y mutación, y promoción tumoral por inflamación. Además, se han propuesto hallazgos emergentes y características habilitadoras: plasticidad fenotípica, entrada en senescencia, reprogramación epigenética no mutacional y microbiomas polimórficos. Estos *hallmarks* ofrecen una comprensión integral de los procesos clave en la

transformación celular y en la propagación del cáncer, proporcionando una base para la identificación y el diseño de herramientas terapéuticas específicas y efectivas.

De entre los *hallmarks* del cáncer, en esta tesis ponemos el foco en la angiogénesis tumoral. Los tumores requieren un suministro continuo de nutrientes y oxígeno, y durante la progresión tumoral, se activa y mantiene un "interruptor angiogénico" que permite el crecimiento constante de nuevos vasos, beneficiando la supervivencia del tumor. Determinados factores, como el VEGF, y diversos eventos, como la hipoxia y la aparición de señales oncogénicas, desempeñan un papel crucial en esta activación.

El papel de las células derivadas de la médula ósea, como los macrófagos y las células progenitoras vasculares, es también vital en el desarrollo de la angiogénesis patológica. En el caso de las células inmunitarias, estas pueden infiltrarse en las zonas de lesión y liberar una serie de factores que promuevan la angiogénesis. Por otro lado, las células progenitoras vasculares pueden sufrir diferenciación e incorporarse en nuevos vasos como células endoteliales o pericitos. Además, cabe destacar que en el cáncer pueden darse mecanismos alternativos de formación vascular, como la cooptación vascular, la imitación vascular (*vascular mimicry*) y la trans-diferenciación de células tumorales. En cualquier caso, la neovascularización en tumores exhibe anormalidades, lo que afecta a la eficacia de los tratamientos anti-angiogénicos.

A pesar de los avances, la aparición de resistencia tumoral a tratamientos anti-angiogénicos en modelos preclínicos y en la práctica clínica pone de manifiesto la complejidad de este proceso. Recientemente, el enfoque de la terapia moduladora de la angiogénesis ha cambiado su foco de buscar la inhibición de la angiogénesis a la normalización vascular, mejorando la eficacia de los tratamientos convencionales y ofreciendo resultados más efectivos y duraderos en la lucha contra el cáncer.

3. Inflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico a diversos estímulos, desde patógenos invasores hasta señales endógenas como lesiones celulares. La activación aguda de la inflamación busca eliminar daños y promover la reparación tisular, pero puede desembocar en una respuesta crónica si no se resuelve adecuadamente, contribuyendo a la aparición y/o la progresión de diversas condiciones patológicas.

Cuando se activa la inflamación, se da una cascada de eventos microcirculatorios cruciales, como el aumento del flujo sanguíneo, la infiltración de glóbulos blancos en el tejido, la actividad fagocítica y la liberación de mediadores inflamatorios. Diversas vías de señalización intracelular y transcripción nuclear, como NF- κ B y la proteína activadora-1 (AP-1), regulan estos procesos. Así, citoquinas como las interleuquinas (IL) IL-1 β e IL-6, o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), promueven la inflamación, mientras que

IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) la inhiben. Sin embargo, desequilibrios en estos mecanismos pueden llevar a condiciones inflamatorias crónicas.

Cabe destacar que NF- κ B es el regulador central de la inflamación y la función inmunológica, activándose mediante las vías canónica y no canónica. La vía canónica se asocia comúnmente con la regulación de respuestas inmunes e inflamatorias, mientras que la no canónica influye en funciones inmunes específicas como el desarrollo de los órganos linfoides.

La inflamación tiene un papel central en el desarrollo de la aterosclerosis, principal causa global de enfermedad cardiovascular. Aunque históricamente se consideraba una enfermedad provocada por la acumulación de colesterol y triglicéridos en la pared vascular, ahora se entiende como una enfermedad inflamatoria crónica. La disfunción endotelial, precursora de cambios ateroscleróticos, es inducida por la acumulación de lipoproteínas modificadas y la secreción prolongada de citoquinas proinflamatorias por parte del endotelio.

En la aterosclerosis, la activación de NF- κ B regula la expresión de moléculas clave en la disfunción endotelial, como son las citoquinas atrayentes de células inmunitarias, como CCL2 o CCL5, y las moléculas de adhesión linfocitaria, como la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) o la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1).

En conclusión, la interacción entre inflamación y disfunción endotelial destaca la importancia de identificar nuevas estrategias terapéuticas en la aterosclerosis. Potencialmente, los medicamentos que mitiguen la disfunción endotelial y reduzcan marcadores proinflamatorios son prometedores para abordar la aterosclerosis y las patologías relacionadas.

4. Muerte celular

El equilibrio entre la división y la muerte celulares es fundamental para mantener la homeostasis en organismos multicelulares. Tradicionalmente, los mecanismos de muerte celular se categorizaban en dos tipos: apoptosis (regulada) y necrosis accidental (no regulada). Sin embargo, en las últimas dos décadas, se han descubierto vías adicionales de muerte celular reguladas no apoptóticas, denominadas “muerte celular no apoptótica regulada” o “necrosis regulada”. Estas vías incluyen la necroptosis, ferroptosis, piroptosis, NETosis y la muerte celular autofágica, entre otros, y se distinguen de la apoptosis por no ser mecanismos dependientes de las caspasas 3 y 7.

En esta tesis, ponemos el foco en la apoptosis, necroptosis, piroptosis, ferroptosis y autofagia, proporcionando evidencias sobre la posible modulación de estos mecanismos de muerte celular por moléculas o extractos de origen natural.

La apoptosis, una forma regulada de muerte celular, garantiza que el contenido celular no se libere, evitando cualquier fuga al entorno circundante. Este mecanismo es dependiente de caspasas, enzimas que, al activarse,

RESUMEN

desencadenan una cascada de eventos que lleva a la muerte celular. Existen dos vías principales de apoptosis: la extrínseca o activada por ligando, generalmente iniciada por células inmunológicas, y la intrínseca o mitocondrial, desencadenada por señales intracelulares como el daño al ADN. Estas vías convergen en la fase de ejecución, donde determinadas caspasas específicas se activan, degradando material nuclear y fragmentando la célula en cuerpos apoptóticos.

La necroptosis tiene un papel dual, adaptativo y patogénico, e involucra eventos inflamatorios importantes en patologías humanas como la aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas. Es controlada por proteínas como RIPK1 y RIPK3, y puede ser iniciada por varios receptores de muerte celular.

Por otro lado, la ferroptosis es una forma regulada de muerte celular dependiente del metabolismo, caracterizada por la acumulación de hierro y la peroxidación lipídica. Este mecanismo se ha asociado a la sensibilización de ciertos tipos de cáncer a la quimioterapia, y es actualmente una diana que suscita gran interés en la investigación clínica.

Finalmente, la autofagia es el proceso celular responsable de la degradación y reciclaje de componentes celulares dañados. Este mecanismo puede ocurrir como una adaptación a situaciones de estrés, pero también puede inducir un tipo genuino de muerte celular. La relación entre la muerte celular y la autofagia es compleja y depende del contexto. La muerte celular dependiente de autofagia es una forma regulada de muerte celular que cursa fundamentalmente a través de la activación de la maquinaria autofágica.

En resumen, el estudio de las diversas vías de muerte celular aporta nuevas dianas terapéuticas en enfermedades relacionadas, como el cáncer, y la modulación farmacológica de estos mecanismos genera nuevas e interesantes oportunidades de tratamiento.

5. Dieta mediterránea y aceite de oliva virgen extra

La dieta mediterránea, rica en alimentos saludables, destaca por su capacidad para reducir el riesgo de enfermedades crónicas, aumentar la esperanza de vida y mejorar el bienestar general. Aunque hay variaciones en esta dieta según los países, el uso de aceite de oliva virgen extra (AOVE) es una característica común.

Son numerosos los beneficios para la salud que se han asociado al seguimiento de la dieta mediterránea, especialmente la disminución de factores de riesgo cardiovascular y la protección frente a enfermedades cardíacas. Además, hay evidencias sobre sus beneficios frente a diabetes, obesidad, cáncer y decline cognitivo. A pesar de estos beneficios, la implementación y medición completas de la dieta mediterránea presentan desafíos, siendo actualmente un área muy activa en investigación.

El AOVE, derivado de las aceitunas mediante extracción mecánica, destaca por su producción específica y composición especial. Principalmente compuesto por triglicéridos, contiene ácidos grasos monoinsaturados,

especialmente ácido oleico, y algunos poliinsaturados. Sin embargo, se reconoce que gran parte de los beneficios del AOVE proviene de sus componentes minoritarios, los compuestos fenólicos, cuya concentración varía según factores agronómicos.

Los compuestos fenólicos, incluidos el tirosol y el hidroxitirosol, son antioxidantes primarios en el AOVE y juegan un papel crucial tanto en sus características sensoriales como en la salud humana. Además, destacan los secoiridoides, como la oleuropeína y el ligustroside, presentes en cantidades significativas. Estos compuestos han demostrado tener efectos beneficiosos para la salud, incluidos efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos.

El hidroxitirosol ha sido descrito como una molécula con fuertes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Se absorbe rápidamente y tiene efectos positivos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, reduciendo el estrés oxidativo y mejorando los perfiles lipídicos. Entre sus efectos antiinflamatorios destaca la regulación de diversas vías de señalización y la disminución la expresión de citoquinas proinflamatorias. Además, el hidroxitirosol ha sido asociado con efectos anticancerígenos, inhibiendo la proliferación y promoviendo la apoptosis en células cancerosas.

En la investigación actual se dedica un esfuerzo considerable a explorar formulaciones novedosas de hidroxitirosol con el objetivo de mejorar su estabilidad, solubilidad y otra serie de propiedades, con el fin de aumentar su biodisponibilidad y vida media plasmática. Así han surgido algunos derivados sintéticos del hidroxitirosol, como ésteres y éteres alquilos, con propiedades mejoradas e incluso novedosas respecto de su precursor.

Otros componentes fenólicos importantes del AOVE son los secoiridoides. En este grupo, el oleocantal y la oleaceína exhiben propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y anti-angiogénicas. Así, se ha demostrado que estos compuestos inhiben diversas vías de señalización, reduciendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis en células cancerosas, e impidiendo la actividad de ciertas enzimas y reduciendo la expresión de citoquinas inflamatorias.

Finalmente, es importante resaltar la acción moduladora de los compuestos fenólicos del AOVE sobre la autofagia. La evidencia científica sugiere que estos compuestos tienen un papel dual sobre la autofagia, con algunos estudios apuntando a una activación y otros, a una inhibición, dependiendo del contexto celular y las condiciones específicas. La investigación en este ámbito se presenta como una vía prometedora para comprender mejor los beneficios del AOVE en la salud, especialmente en enfermedades neurodegenerativas y en cáncer.

En resumen, la dieta mediterránea, con énfasis en el AOVE, destaca por sus beneficios para la salud, lo que está respaldado por una amplia evidencia científica. Los componentes fenólicos, como el hidroxitirosol y sus derivados, el oleocantal y la oleaceína, desempeñan un papel crucial en estos beneficios,

RESUMEN

ofreciendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. La investigación continua en este campo puede proporcionar información valiosa para la promoción de hábitos alimentarios saludables y el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en estos compuestos naturales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parte de los resultados derivados de esta Tesis Doctoral se han publicado en cuatro artículos de investigación originales. Además, los resultados obtenidos que aún no han sido publicados se han estructurado en forma de tres manuscritos en preparación. En esta sección, los resultados se presentan en dos bloques principales: un primer bloque de resultados obtenidos del estudio de extractos y compuestos naturales, y un segundo bloque de resultados en derivados sintéticos de compuestos naturales. A continuación, se recapitulan los principales contenidos de los artículos y manuscritos incluidos en cada uno de los bloques.

Bloque 1. Extractos y compuestos naturales:

Artículo 1: Marrero, A.D., Quesada, A.R., Martínez-Poveda, B., Medina, M.Á., Cárdenas, C., 2023. **A proteomic study of the bioactivity of *Annona muricata* leaf extracts in HT-1080 fibrosarcoma cells.** International Journal of Molecular Sciences 24, 12021. <https://doi.org/10.3390/ijms241512021>.

Este artículo se centró en el estudio de la graviola (*Annona muricata*), una planta tropical con diversos usos etnobotánicos y aplicaciones farmacológicas. Utilizando un enfoque proteómico, se examinaron patrones en los niveles de proteínas, tanto en medios acondicionados como en extractos celulares, de células de fibrosarcoma HT-1080, previamente tratadas con extractos acuosos o en DMSO de las hojas de *Annona muricata*. Los resultados mostraron conjuntos completos de proteínas desreguladas después del tratamiento, y el análisis funcional demostró la aparición de alteraciones en el ciclo celular y en el metabolismo del hierro, lo que se validó experimentalmente *in vitro*. Además, se reveló que los extractos realizados en DMSO protegen tanto a las células tumorales como a las endoteliales frente a la ferroptosis. Este estudio proteómico proporciona información valiosa sobre las potenciales bioactividades de los extractos de *Annona muricata*, mostrando posibles aplicaciones en el tratamiento del cáncer y de enfermedades relacionadas con la disfunción endotelial.

Artículo en preparación 1: Marrero, A. D., Cárdenas, C., Castilla, L., Ortega-Vidal, J., Salido, S., R. Quesada, A., Altarejos, J., Martínez-Poveda, B. & Medina, M.Á. **Antiangiogenic potential of an olive oil extract: insights from a proteomic study.**

Este trabajo aborda el impacto de un extracto fenólico de AOVE obtenido de aceitunas de la variedad "Picual" de Jaén, España, en células endoteliales. Se realizó un análisis proteómico que apuntó hacia una modulación de procesos relacionados con la angiogénesis. En experimentos *in vitro*, el extracto de AOVE inhibió la migración, adhesión, invasión, degradación de la matriz extracelular y formación de tubos en células endoteliales, al mismo tiempo que indujo apoptosis. Estos resultados respaldan de manera sólida el potencial antiangiogénico del extracto, destacando su relevancia en la angiopreención y en la mitigación de patologías relacionadas con la angiogénesis, como el cáncer y enfermedades oftalmológicas dependientes de angiogénesis, como la degeneración macular y la retinopatía diabética.

Artículo 2. Marrero, A.D., Ortega-Vidal, J., Salido, S., Castilla, L., Vidal, I., Quesada, A.R., Altarejos, J., Martínez-Poveda, B., Medina, M.Á., 2023. **Anti-angiogenic effects of oleacein and oleocanthal: new bioactivities of compounds from extra virgin olive oil.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 165, 115234. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115234>

Este artículo se centra en el potencial modulador de la angiogénesis del (-)-oleocantal y la (-)-oleaceína, compuestos fenólicos presentes en el AOVE. Nuestros resultados en modelos *in vivo* apuntaron a un potencial inhibitorio de la angiogénesis por parte de estos compuestos. Esto se comprobó mediante ensayos *in vitro*, donde la (-)-oleaceína y el (-)-oleocantal inhibieron la proliferación, invasión y formación de túbulos en células endoteliales. Además, la (-)-oleaceína reprimió la migración e indujo apoptosis en estas células. Como conclusión, se sugiere que la (-)-oleaceína y el (-)-oleocantal son candidatos prometedores para la angiopreención y podrían ser estudiados como moduladores de la angiogénesis en intervenciones clínicas, así como constituir un reclamo funcional interesante para la industria alimentaria.

Artículo en preparación 2. Marrero, A.D., Posligua-Garcia, J.D., Bernal, M., Ortega-Vidal, J., Salido, S., Altarejos, J., Almacellas E., Tooze, S., Quesada, A.R., Martínez-Poveda, B., Medina, M.Á. **The extra virgin olive oil phenolic compounds (-)-oleacein and (-)-oleocanthal inhibit tumor cell autophagy.**

En este estudio se exploraron los efectos del (-)-oleocantal y la (-)-oleaceína en la autofagia de células tumorales. Los resultados revelaron una inhibición significativa de este proceso celular a dosis bajas de los compuestos. Estos hallazgos son relevantes en la investigación del cáncer, donde la regulación de la autofagia ha surgido como una nueva diana en las investigaciones dirigidas hacia esta enfermedad.

Bloque 2. Derivados sintéticos de compuestos naturales.

Artículo 2: Marrero, A. D., Castilla, L., Espartero, J. L., Madrona, A., R. Quesada, A., Medina, M.Á., Martínez-Poveda, B. (2020). **A comparative study of the antiangiogenic activity of hydroxytyrosyl alkyl ethers.** *Food Chemistry*, 333, 127476. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127476>.

En este estudio se investigó el potencial anti-angiogénico de seis derivados sintéticos éteres alquílicos del hidroxitirosol. Los resultados indicaron que los compuestos afectaron a la viabilidad de las células endoteliales *in vitro* a dosis en el rango micromolar, de forma directamente proporcional a la longitud de la cadena alifática. Además, determinados derivados inhibieron la migración celular y la formación de estructuras tubulares. El hidroxitirosil hexil éter (HT C6) mostró los efectos más notables, induciendo también la apoptosis en células endoteliales. Además, se confirmó la actividad anti-angiogénica del HT C6 *in vivo* mediante el ensayo en membrana corioalantoidea de huevo fecundado de pollo. Los compuestos de cadenas alifáticas más largas presentaron problemas de solubilidad. Por lo tanto, propusimos al derivado sintético del hidroxitirosol HT C6 como un nuevo compuesto anti-angiogénico y un candidato prometedor para el tratamiento de enfermedades dependientes de la angiogénesis.

Artículo 3: Marrero, A.D., Castilla, L., Bernal, M., Manrique, I., Posligua-García, J.D., Moya-Utrera, F., Porrás-Alcalá, C., Espartero, J.L., Sarabia, F., Quesada, A.R., Medina, M.Á., Martínez-Poveda, B., 2023. **Inhibition of endothelial inflammatory response by HT-C6, a hydroxytyrosol alkyl ether derivative.** *Antioxidants* 12, 1513. <https://doi.org/10.3390/antiox12081513>.

Dadas las conocidas propiedades antiinflamatorias del hidroxitirosol, en este trabajo nos enfocamos en los posibles efectos antiinflamatorios de su derivado sintético HT C6. Utilizando diversas técnicas, demostramos que el HT C6 reduce significativamente la expresión de moléculas de adhesión vascular inducida por TNF- α en células endoteliales, afectando a la capacidad quimiotáctica de estas células y a la adhesión de monocitos *in vitro*. Como mecanismo de acción, identificamos una inhibición de la vía de NF- κ B en células endoteliales. En conclusión, el compuesto HT C6 presenta interesantes efectos antiinflamatorios en células endoteliales *in vitro*, lo que lo convierte en un prometedor fármaco para el tratamiento de aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas con la inflamación y la disfunción endotelial.

Artículo en preparación 2: Marrero, A.D., Castilla, L., Moya-Utrera, F., Porrás-Alcalá, C., Espartero, J.L., Sarabia, F., Quesada, A.R., Medina, M.Á., Martínez-Poveda, B. **Nanosystem encapsulation and prodrug synthesis as approaches to improve the performance of two hydroxytyrosol alkyl ethers.**

Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de dos derivados éter alquílicos del hidroxitirosol que presentaron solubilidad reducida en un trabajo anterior, se diseñaron modificaciones químicas estratégicas dirigidas a optimizar el uso de estas moléculas en entornos acuosos. Para ello, planteamos dos enfoques diferentes: la nanoencapsulación de los derivados en un sistema de liberación controlada, y su derivatización en pro-fármacos. Los resultados iniciales respaldaron el funcionamiento adecuado de estos métodos, pero destacamos la necesidad de una evaluación biológica exhaustiva para comprender plenamente su impacto en la actividad biológica de los éteres alquílicos de hidroxitirosol. El estudio sienta las bases de nuevas estrategias que podrían generar versiones mejoradas de estos compuestos fenólicos bioactivos o mejorar su liberación y biodisponibilidad a través de sistemas innovadores.