

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Ferroptosis: nueva aproximación terapéutica para el cáncer de ovario epitelial

Ferroptose: nova aproximación terapéutica para o cancro de ovario epitelial

Ferroptosis: new therapeutic approach for epithelial ovarian cancer

Carmen Fátima Alarcón Veleiro

Julio, 2022

Director(es) Académico(s): María C. Arufe Gonda

Codirector (se procede): Juan A. Fabián Labora

Universidade da Coruña

Facultade de Ciencias

INIBIC

Ferroptosis: nueva aproximación terapéutica para el cáncer de ovario epitelial

Ferroptose: nova aproximación terapéutica para o cancro de ovario epitelial

Ferroptosis: new therapeutic approach for epithelial ovarian cancer

Carmen Fátima Alarcón Veleiro

A Coruña, Julio 2022

Dra. María del Carmen Arufe Gonda y Dr. Juan Antonio Fafián Labora en calidad de tutor/es de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

ARUFE GONDA
MARIA DEL
CARMEN -
36116727B

Firmado digitalmente
por ARUFE GONDA
MARIA DEL CARMEN -
36116727B
Fecha: 2022.07.15
17:21:55 +02'00'

Dra. María del Carmen Arufe Gonda

FAFIAN
LABORA JUAN
ANTONIO -
47387789S

Digitally signed by
FAFIAN LABORA JUAN
ANTONIO - 47387789S
Date: 2022.07.15
17:27:05 +02'00'

Dr. Juan Antonio Fafián Labora

Carmen
Fátima
Alarcón
Veleiro

Firmado
digitalmente por
Carmen Fátima
Alarcón Veleiro
Fecha: 2022.07.15
17:32:38 +02'00'

Carmen Fátima Alarcón Veleiro

Índice

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. Introducción.....	9
1.1 Cáncer de ovario epitelial.....	9
1.2 Ferroptosis.....	10
1.2.1 Relevancia del hierro en el organismo.....	10
1.2.2 Relevancia de los ácidos grasos.....	11
1.3 Moduladores farmacológicos de la ferroptosis.....	14
1.3.1 Principales mecanismos de regulación.....	15
Eje Cist(e)ína/GSH/GPX4.....	15
Sistema NAD(P)H/FSP1/CoQ ₁₀	18
1.4 Ferroptosis y cáncer.....	19
2. Objetivos.....	21
3. Material y métodos.....	21
3.1 Cultivo celular de OVCA.....	21
3.2 Modulación de ferroptosis en cultivos <i>in vitro</i>	22
3.3 Ferroptosis paracrina.....	23
3.4 Tinción de cristal violeta.....	23
3.5 Extracción de proteínas.....	24
3.6 Cuantificación de proteínas.....	24
3.7 Tinción de nitrato de plata.....	24
3.8 Estadística.....	25
3.9 Revisión bibliográfica.....	26
4. Resultados.....	26
4.1 Evaluación de la proliferación en OVCA en presencia de inductores de ferroptosis: <i>erastina y RSL3</i>	26
4.2 Evaluación de la proliferación en OVCA en presencia de inhibidores de ferroptosis: <i>DFO y ferrostatina-1</i>	28
4.3 Evaluación de la capacidad de transmisión paracrina: <i>erastina, RSL3 y DFO</i>	29
4.4 Evaluación de la integridad de las proteínas extraídas de OVCA tratadas con los moduladores de ferroptosis: <i>erastina, RSL3 y DFO</i>	32
5. Discusión.....	32
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía.....	36

ABREVIATURAS

ACSL3: del inglés, *Acyl-CoA synthetase long chain family member 3*.

ACSL4: del inglés, *Acyl-CoA synthetase long chain family member 4*.

AIF: del inglés, *apoptosis inducing factor*.

APS: del inglés, *ammonium persulfate*.

ATP: del inglés, *adenosine triphosphate*.

BCA: del inglés, *bicinchoninic acid*.

CoA: del inglés, *coenzyme A*.

COE: cáncer de ovario epitelial.

CoQ10: del inglés, *coenzyme Q10*.

DFO: del inglés, *deferoxamine*.

DMEM: del inglés, *dulbecco's modified eagle's médium*.

DMSO: del inglés, *dimethyl sulfoxide*.

DMT1: del inglés, *divalent metal transporter 1*.

DNA: del inglés, *deoxyribonucleic acid*.

DPP4: del inglés, *dipeptidil peptidase-4*.

FBS: del inglés, *fetal bovine serum*.

FINs: del inglés, *ferroptosis inducers*.

FSP1: del inglés, *ferroptosis supressor protein 1*.

GPX4: del inglés, *glutathione peroxidase 4*.

GS: glutatión oxidado.

GSSG: glutatión reducido.

H2Bub1: histona H2B en la lisina 120.

LPCAT: del inglés, *lysophosphatidylcholine acyltransferase*.

m/v: masa/volumen.

mL: mililitro.

mRNA: del inglés, *messenger RNA*.

mTOR: del inglés, *mammalian target of rapamycin*.

MUFAS: del inglés, *monounsaturated fatty acids*.

NaCl: cloruro de sodio.

NADH: del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen*.

NDH-2: del inglés, *NADH:quinone oxidoreductase type II*.

Nedd4: del inglés, *neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4*.

°C: grados centígrados.

OVCA: del inglés, *ovarian cancer*.

P/S: penicilina/estreptomicina.

PARP: del inglés, *poly-ADP ribose polymerase*.

PUFAS: del inglés, *polyunsaturated fatty acids*.

RAS: del inglés, *rat sarcoma virus*.

RIPA: del inglés, *radioimmunoprecipitation*.

RNA: del inglés, *ribonucleic acid*.

ROS: del inglés, *reactive oxygen species*.

RPM: revoluciones por minuto.

RSL: del inglés, *RAS-selective lethal*.

RTA: del inglés, *radical-trapping antioxidants*.

SCD1: del inglés, *stearoyl-CoA desaturase 1*.

SDS: del inglés, *sodium dodecyl sulfate*.

SLC7A11: del inglés, *solute carrier family 7 member 11*.

U.A.: unidades arbitrarias.

USP7: del inglés, *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7*.

v/v: volumen/volumen.

VDAC: del inglés, *voltage dependent anionic channel*.

ZEB1: del inglés, *zinc finger E-box-binding homeobox1*.

µg: microgramos.

RESUMEN

El cáncer de ovario epitelial es el más letal de los cánceres ginecológicos debido a la sintomatología inespecífica en las fases tempranas de la enfermedad. Con las opciones terapéuticas actuales, los resultados que se obtienen no son satisfactorios, siendo necesario estudiar otras alternativas.

Las células de cáncer de ovario presentan un metabolismo del hierro alterado de manera que se produce una acumulación de hierro a nivel intracelular, volviéndolas susceptibles a sufrir ferroptosis. La ferroptosis es un tipo de muerte celular regulada no apoptótica desencadenada por la peroxidación de lípidos dependiente de hierro. Es por ello por lo que el uso de moduladores de ferroptosis (erastina, RSL3, DFO y ferrostatina-1), podrían convertirse en una herramienta alternativa en el tratamiento de este tipo de cáncer.

En este trabajo se han tratado células de cáncer de ovario (OVCA) con diferentes compuestos que modulan la ferroptosis con el fin de analizar el efecto que tienen en la capacidad de proliferación. Asimismo, se trataron OVCA receptoras con el medio condicionado obtenido de OVCA donadoras tratadas con los diferentes moduladores de ferroptosis, para evaluar si las células ferroptóticas son capaces de propagar el proceso de forma paracrina.

De los dos inductores empleados, RSL3 fue capaz de disminuir la proliferación de las OVCA, mientras que la erastina no alteró la capacidad proliferativa de las células. Al contrario de lo esperado, el inhibidor DFO afectó a la proliferación de las células, concretamente la disminuyó. Por el contrario, la ferrostatina-1 no parece alterar la proliferación de las células. Asimismo, el medio condicionado de OVCA tratadas con RSL3 fue capaz de disminuir la proliferación en OVCA.

La ferroptosis se ha convertido en una herramienta prometedora para el tratamiento del cáncer y, concretamente para el manejo en cáncer de ovario epitelial mediante el uso de moduladores farmacológicos del proceso.

Palabras clave: cáncer de ovario epitelial, ferroptosis, hierro, erastina, RSL3, DFO y ferrostatina-1.

RESUMO

O cancro de ovario epitelial, que representa preto do 90% dos tumores de ovario primarios, é o máis letal dos cancros xinecolóxicos debido aos síntomas inespecíficos nas fases iniciais da enfermidade. Coas opcións terapéuticas actuáis, os resultados obtidos non son satisfactorios, sendo necesario estudar outras alternativas.

As células cancerosas de ovario presentan alterado o metabolismo do ferro de forma que se produce a acumulación intracelular de ferro. A ferroptose é un tipo de morte celular regulada non apoptótica desencadeada pola peroxidación lipídica dependente do ferro. É por isto que o uso de moduladores de ferroptose (erastina, RSL3, DFO y ferrostatina-1), poderían converterse nunha alternativa no tratamento deste tipo de cancro.

Neste traballo, as células cancerixenas de ovario (OVCA) foron tratadas con diferentes compostos que modulan a ferroptose para analizar o efecto que teñen na capacidade de proliferación. Así mesmo, as OVCA receptoras foron tratados co medio condicionado obtido das OVCA doadoras tratadas cos diferentes moduladores de ferroptose, para valorar se as células ferroptóticas son capaces de propagar o proceso de forma paracrina.

Dos dous indutores empregados, RSL3 foi capaz de diminuír a proliferación das OVCA, mentres que a erastina non alterou a capacidade proliferativa das células. Contrariamente ao esperado, o inhibidor DFO afecta a proliferación das células, concretamente diminuíndola. Pola contra, a ferrostatina-1 non parece alterar a proliferación das células. Asimesmo, o medio condicionado de OVCA tratadas con RSL3 diminuíu a proliferación en OVCA.

A ferroptose convertiuse nunha ferramenta prometedora para o tratamento do cancro e, concretamente para o manexo do cancro de ovario epitelial mediante o uso de moduladores farmacolóxicos do proceso.

Palabras chave: cancro de ovario epitelial, ferroptose, ferro, erastina, RSL3, DFO e ferrostatina-1.

ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer, which accounts for about 90% of primary ovarian tumours, is the most lethal of gynaecological cancers due to the non-specific symptoms in the initial stages of the disease. With the current therapeutic options, the results obtained are not satisfactory and it is necessary to study other alternatives.

Ovarian cancer cells have altered iron metabolism so that iron accumulates intracellularly, making them susceptible to ferroptosis. Ferroptosis is a type of non-apoptotic regulated cell death triggered by iron-dependent lipid peroxidation. Therefore, the use of ferroptosis modulators (erastin, RSL3, DFO and ferrostatin-1) could become an alternative tool in the treatment of this type of cancer.

In this study, ovarian cancer cells (OVCA) were treated with different compounds that modulate ferroptosis to analyse their effect on proliferation capacity. In addition, recipient OVCA were treated with the conditioned medium obtained from donor OVCA treated with the different ferroptosis modulators to assess whether the ferroptotic cells can propagate the process in a paracrine manner.

Of the two inducers used, RSL3 was able to decrease the proliferation of OVCA, while erastin did not alter the proliferative capacity of the cells. Contrary to expectations, the inhibitor DFO affected cell proliferation, specifically by decreasing it. In contrast, ferrostatin-1 did not seem to alter cell proliferation. Likewise, the conditioned medium of RSL3-treated OVCA was able to decrease proliferation in OVCA.

Ferroptosis has become a promising tool for the treatment of cancer and specifically for the management of epithelial ovarian cancer using pharmacological modulators of the process.

Key word: epithelial ovarian cancer, ferroptosis, iron, erastin, RSL3, DFO and ferrostatin-1.

1. Introducción

1.1 Cáncer de ovario epitelial

El cáncer de ovario epitelial (COE) se origina a partir de una capa de células que tapizan la superficie de los ovarios y trompas de Falopio y, representa aproximadamente el 90% de los tumores primarios de ovario. El COE es uno de los cánceres ginecológicos más letales, con una tasa de supervivencia de 5 años tras el diagnóstico de tan solo el 46%. Esto se debe a varios factores. El diagnóstico es complejo debido a que en las primeras fases del desarrollo de la enfermedad los síntomas son inespecíficos, provocando que en muchas ocasiones se diagnostique erróneamente. Todo ello hace que, en el momento en que se diagnostica correctamente la enfermedad se encuentre en estados avanzados, el pronóstico sea malo y la tasa de supervivencia baja (Lin & Chi, 2020).

Los tratamientos disponibles son varios siendo, la cirugía una buena opción en aquellos casos en los que los tumores están perfectamente localizados. En otras situaciones, la cirugía se puede combinar con tratamientos farmacológicos tales como agentes quimioterapéuticos consiguiendo, en la mayor parte de los casos y al principio, alcanzar estados de remisión (Lheureux *et al.*, 2019). No obstante, en muchos casos las pacientes acaban recayendo, ya que desarrollan resistencia a los tratamientos eficaces para los tumores primarios. Llegados a este punto, las opciones terapéuticas cambian pudiendo emplear inhibidores de angiogénesis, inhibidores de PARP (del inglés, *poly-ADP ribose polymerase*) o inmunoterapias (Lheureux *et al.*, 2019; Lin & Chi, 2020). Sin embargo, los resultados que se obtienen con estos fármacos siguen siendo insatisfactorios, obteniendo buenos resultados en tan solo un 10-25% de las pacientes. Es por esto por lo que es importante mejorar las técnicas de detección precoz así como buscar nuevas alternativas para el tratamiento de células de COE resistentes para mejorar el pronóstico y la calidad de vida de las pacientes (Lin & Chi, 2020).

En los últimos años se ha estado estudiando nuevas vías para el tratamiento de este tipo de cáncer, entre estas alternativas se encuentra el uso de moduladores de muerte celular (Wang *et al.*, 2022). La muerte y la proliferación celular están equilibradas durante la vida de los organismos multicelulares. En ellos, la mayoría de las muertes celulares ocurren como consecuencia de un proceso fisiológico normal, que juega un papel clave en el desarrollo embrionario y en tejidos adultos. El descubrimiento reciente de un tipo de muerte celular regulada no-apoptótica, denominada ferroptosis se ha convertido en una

herramienta prometedora para el tratamiento del cáncer y, concretamente para el manejo en COE mediante el uso de moduladores farmacológicos del proceso (Li *et al.*, 2021).

1.2 Ferroptosis

En 2012, Dixon y colaboradores, estudiaron el mecanismo mediante el cual la erastina y RSL3, compuestos que denominaron RSL (del inglés, *RAS-selective lethal*) por su capacidad para acabar de manera específica con células tumorales con mutación en la proteína RAS (del inglés, *rat sarcoma virus*). El fenotipo observado en células tratadas con ese tipo de fármacos (incremento en los niveles intracelulares de ROS (del inglés, *reactive oxygen species*) es diferente al que muestran células apoptóticas (liberación del citocromo C, activación de las caspasas o fragmentación de la cromatina). Estos autores propusieron el término ferroptosis para describir este nuevo fenotipo observado al tratar las células cancerígenas con RSL3 y erastina (Dixon *et al.*, 2012).

La ferroptosis puede definirse como un tipo de muerte celular no-apoptótica regulada desencadenada por un incremento en los niveles intracelulares del hierro y de ROS, que provocan una peroxidación de lípidos a nivel intracelular que acaba culminando con la muerte de la célula (Zheng & Conrad, 2020).

Se ha asociado a múltiples condiciones fisiopatológicas tales como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas o fibrosis pulmonar, entre otros. Por lo tanto, el potencial terapéutico del uso de moduladores de este tipo de muerte celular es enorme (Jiang *et al.*, 2021; Zheng & Conrad, 2020).

1.2.1 Relevancia del hierro en el organismo

El hierro es enormemente importante para el correcto funcionamiento del organismo. Dentro de las células, normalmente se encuentra asociado a complejos, como el hemo (grupo prostético de muchas proteínas), agrupaciones o *cluster* Fe-S (cofactor de múltiples enzimas), y unido a la ferritina (proteína de almacenamiento del hierro). Una pequeña cantidad se encuentra libre conformando la reserva de hierro lábil. Suele presentarse en los estados de oxidación, Fe^{2+} o Fe^{3+} , permitiéndole actuar como un agente catalítico redox, aceptando o donando electrones (Iwai, 2019). Esta propiedad hace que sea un elemento potencialmente tóxico pudiendo reaccionar con las ROS y provocar la peroxidación de diferentes moléculas, entre ellas los lípidos (Bogdan *et al.*, 2016). Por

ello que, en células de mamífero y bajo condiciones fisiológicas normales, la homeostasis del hierro está finamente regulada (Iwai, 2019).

La principal vía de obtención de hierro es a través de la dieta, empleando dos transportadores distintos que se encuentran en las células epiteliales del duodeno. El DMT1 (del inglés, *divalent metal transporter 1*) permite el paso del hierro al citoplasma mientras que la ferroportina introduce el hierro a la circulación. Una vez en circulación, la transferrina actúa como proteína de unión al hierro permitiendo el transporte a lo largo del organismo (Tang, 2019). La internalización del hierro es un proceso de endocitosis mediada por el receptor de la transferrina (glicoproteína dimérica) cuyos dominios extracelulares tienen una elevada afinidad a la transferrina unida al hierro (Tang, 2019). Por tanto, la capacidad de la transferrina de inducir ferroptosis solo está presente cuando está unida a hierro. El tratamiento con RNA (del inglés, *ribonucleic acid*) de interferencia para disminuir los niveles de RNA del receptor de la transferrina es capaz de inhibir de forma significativa el desarrollo de este tipo de muerte celular (Gao *et al.*, 2015). La alteración del contenido celular de hierro puede modificar la sensibilidad de la célula a sufrir un fenómeno de ferroptosis. Así, el incremento de la disponibilidad de hierro intracelular por la degradación de la ferritina, proteína implicada en el almacenamiento de hierro intracelular, también llamada ferritinofagia, tras el tratamiento de células cancerígenas y fibroblastos con inductores de ferroptosis, son capaces de promover la ferroptosis (Gao *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2016).

La exportación del hierro está mediada por la proteína ferroportina 1 localizada en la membrana plasmática acoplada con una ferroxidasa como la ceruloplasmina. La reducción de la expresión de la ferroportina lleva a un incremento en la sensibilidad a la ferroptosis (Geng *et al.*, 2021). El tratamiento de células cancerígenas con inductores de ferroptosis puede volverlas resistentes, mediante el incremento de la expresión de la proteína prominina 2, una pentaspanina. Esta proteína promueve la formación de cuerpos multivesiculares y exosomas cargados con ferritina, eliminando el hierro de la célula pudiendo evadir la ferroptosis (Brown *et al.*, 2019).

1.2.2 Relevancia de los ácidos grasos

Otro punto importante en el desarrollo de la ferroptosis son los ácidos grasos, que son una clase de moléculas hidrofóbicas, ubicuas, indispensables para la vida y con una gran diversidad estructural (Tang, 2019). Las células de mamíferos obtienen los PUFAs

(del inglés, *polyunsaturated fatty acids*) mediante la conversión de ácidos grasos esenciales obtenidos por la dieta por medio de la acción de enzimas desaturasas y elongasas (Zheng & Conrad, 2020). En el contexto de la ferroptosis, la peroxidación de lípidos tiene lugar principalmente en PUFAs esterificados pero no en los libres. La presencia de los enlaces carbono-hidrógeno en los grupos metileno que flanquean a los dobles enlaces en los PUFA hace que este tipo de ácidos grasos sean especialmente susceptibles a experimentar reacciones de peroxidación. Por tanto, el incremento del número de dobles enlaces carbono-carbono en los PUFA trae consigo un aumento en la tasa y susceptibilidad del ácido graso de experimentar reacciones de peroxidación (PUFA-OOH) (Tang, 2019). La estructura y geometría de la membrana se ve afectada por la peroxidación de los lípidos (reacción que puede estar o no catalizada por enzimas como se explica más adelante), interrumpiendo la estructura y dinámica de la membrana plasmática con efectos negativos para supervivencia celular (Tang, 2019).

En la *vía enzimática*, las enzimas implicadas en la generación de los peróxidos de lípidos catalizan la formación de un complejo grupo de peróxidos lipídicos bioactivos que regulan la señalización celular (Tang, 2019). La *vía no enzimática* tiene lugar a través de la reacción de Fenton que describe un grupo de reacciones en las que el hierro libre es capaz de catalizar la generación de ROS a partir de peróxido de hidrógeno (**figura 1**) (Tang, 2019). Un estudio del 2018 parece indicar que, si bien es la auto oxidación el desencadenante principal de este proceso para que éste tenga lugar es necesario que se alcance un umbral de peróxidos de lípido. Además, es importante destacar que, para alcanzar ese umbral, la vía enzimática también es importante (Shah *et al.*, 2018).

Diferentes estudios ponen de manifiesto la importancia de enzimas como ACSL4 (del inglés, *acyl-CoA synthetase long chain family member 4*) en el desarrollo de la ferroptosis. ACSL4 es responsable de la esterificación (**figura 1**) de ácidos grasos, preferentemente PUFAs de cadena larga, a la CoA (del inglés, *coenzyme A*) de manera dependiente de ATP (del inglés, *adenosine triphosphate*). Seguidamente, estos productos pueden ser reesterificados en fosfolípidos por varias enzimas tipo LPCAT (del inglés, *lysophosphatidylcholine acyltransferase*), incrementando su concentración en las membranas lipídicas. La pérdida o inhibición genética de las enzimas comentadas anteriormente provoca un cambio en la composición lipídica de las membranas (Doll *et al.*, 2017).

En 2019, Magtanong y colaboradores, descubrieron que el desplazamiento de los PUFAs de la membrana plasmática por medio de MUFAs (del inglés, *monounsaturated fatty acids*) es otra forma que tienen las células de evitar la peroxidación de lípidos. Este proceso está regulado por medio del enzima ACSL3 (*acyl-CoA synthetase long chain family member 3*) que cataliza la esterificación del MUFA con la CoA (Magtanong *et al.*, 2019). Los MUFAs no contienen los dobles enlaces por lo que no son susceptibles a sufrir el proceso de peroxidación (Lei *et al.*, 2021). Estos estudios apoyan la idea de que fosfolípidos que contienen PUFAs son un prerequisite para la ejecución de la ferroptosis.

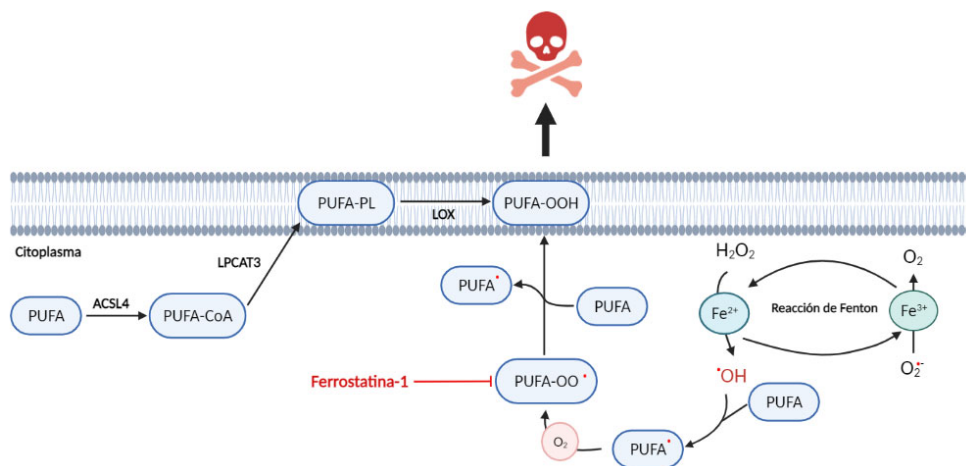


Figura 1. Esquema de peroxidación de ácidos grasos. Para que los ácidos grasos libres, en este caso PUFAs, sean esterificados con los fosfolípidos de membrana, primeramente deben de ser activados por medio de la unión de la coenzima A (CoA), proceso catalizado por el enzima ACSL4. A continuación, la esterificación la lleva a cabo el enzima LPCAT3. Las enzimas de la familia LOX (lipooxigenasas) son las encargadas de catalizar la dioxigenación de los PUFA esterificados (PUFA-OOH) generando los peróxidos de lípidos. La ferrostatina-1 es un inhibidor de las lipooxigenasas, de forma que evitan la generación de peróxidos de lípidos por la vía enzimática. Por otro lado, el hierro libre es altamente reactivo con el H₂O₂. Esta reacción se conoce con el nombre de reacción de Fenton y consta de un conjunto de ciclos en los que los iones ferrosos (Fe²⁺) se oxida a iones férricos (Fe³⁺) generando radicales hidroxilos (OH·). El Fe³⁺ se reduce a Fe²⁺ por medio de la reacción con radicales superóxido (O₂^{·-}). Los radicales libres generados, tales como OH·, son capaces de sacar un hidrógeno de los PUFA generando un radical PUFA·. A su vez, éste reacciona con el oxígeno molecular (O₂), dando lugar a radicales PUFA peroxil (PUFA-OO·), que retira un hidrógeno de otro PUFA generando los peróxidos de lípidos (PUFA-OOH) y otro radical PUFA·.

Recientemente se describió que las células ferroptóticas no son solamente células que están muriendo, sino que también puede tener acción paracrina induciendo ferroptosis en células vecinas. En células embrionarias de ratón, se observó la propagación del proceso de peroxidación lipídica de forma paracrina (Nishizawa *et al.*, 2021).

1.3 Moduladores farmacológicos de la ferroptosis

La inhibición o inducción de la ferroptosis es una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades marcadas por una proliferación incontrolada de células, como el cáncer.

Se han descubierto cuatro vías para la inducción de la ferroptosis, de manera que los FINs (del inglés, *ferroptosis inducers*) se pueden clasificar en cuatro grupos distintos:

- Clase I. Se sabe que la supresión de los sistemas antioxidantes de las células cancerígenas hace que sean mucho más susceptibles al daño oxidativo y a la muerte celular. Este tipo de inductores actúa mediante la inhibición directa del antiportador cistina/glutamato de la membrana celular, reduciendo los niveles de cisteína intracelular y, afectando a la síntesis de glutatión. El glutatión forma parte de uno de los sistemas antioxidantes más importantes a nivel celular. Dentro de este grupo, uno de los más estudiados es la erastina (Hassannia *et al.*, 2019).
- Clase II. Tiene como objetivo principal la inactivación de GPX4 (del inglés, *glutathione peroxidase 4*), afectando a uno de los principales sistemas celulares para evitar la acumulación de peróxidos de lípidos intracelular. Dentro de este grupo de inductores, uno de los más estudiados es el RSL3 (Hassannia *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2014).
- Clase III. Este tipo de moduladores agotan GPX4, la CoQ₁₀ (del inglés, *coenzyme Q10*) y, con ello, atacan dos de los principales sistemas antioxidantes que tienen las células (Hassannia *et al.*, 2019).
- Clase IV. Se ha demostrado que las células cancerígenas tienen unos requerimientos de hierro superiores a células no cancerígenas, a menudo se habla “adicción al hierro”. Esto hace que las células cancerígenas sean más susceptibles a la inducción de la ferroptosis incrementando el *pool* de hierro libre intracelular proporcionando una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer. Estos inductores incrementan los niveles de hierro libre intracelular (Hassannia *et al.*, 2019).

Por otro lado, la inhibición exógena de la ferroptosis se puede conseguir por tres vías diferentes:

- Eliminación del hierro mediante el uso de quelantes de hierro tales como el DFO (del inglés, *deferoxamine*) o con el uso de inhibidores de autofagia (Zheng & Conrad, 2020).
- Disminución de fosfolípidos con PUFAs mediante el uso de inhibidores de ACSL4 o con MUFAs (Zheng & Conrad, 2020).
- Uso de RTAs (del inglés, *radical-trapping antioxidants*) tales como la ferrostatina-1 (Soula *et al.*, 2020; Zheng & Conrad, 2020).

1.3.1 Principales mecanismos de regulación

Es esencial que las células posean mecanismos para poder regular la ferroptosis finamente e, impedir que se desencadene en momentos no adecuados. A continuación, se muestran algunos de los sistemas celulares para el control de la ferroptosis.

Eje Cist(e)ína/GSH/GPX4

El glutatión (GS) es un tripéptido que contiene una cisteína en el centro catalítico y desempeña un papel fundamental en la protección frente este tipo de muerte celular. La forma reducida de GS, GSH, es capaz de actuar como cofactor de múltiples enzimas entre las que se encuentran las glutatión peroxidasa (GPXs) que son una familia de enzimas estructuralmente relacionadas que reducen el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros peróxidos orgánicos a agua y alcohol, respectivamente, empleando GSH como donante de electrones (Jiang *et al.*, 2021).

La cisteína es necesaria para sintetizar GSH y, puede obtenerse de dos formas: por medio de la dieta por medio de la ruta de transulfuración reversa o bien a través de un antiportador de cistina/glutamato localizado en la membrana celular (**figura 2**) (Jiang *et al.*, 2021). En el primer caso, la cisteína es sintetizada a partir de la metionina por medio de varias reacciones químicas (Wang *et al.*, 2019). En el segundo caso, la célula utiliza un antiportador de cistina/glutamato (ratio 1:1) localizado en la membrana celular que también recibe el nombre de sistema x_c⁻. Este transportador es un heterodímero compuesto por una subunidad de cadena ligera denominada xCT, que es la parte sustrato específica y está codificada por el gen *SLC7A11* (del inglés, *solute carrier family 7 member 11*). Debido a las condiciones oxidantes del medio extracelular, la cisteína extracelular es inestable y rápidamente se oxida a cistina que es la forma dimérica. Así, la cistina es transportada a las células por medio del antiportador y, en el interior celular

se convierte rápidamente a cisteína debido a las altas condiciones reductoras (Tang, 2019; Zhao *et al.*, 2020). La inhibición del antiportador mediante el uso de fármacos tales como la erastina o la falta de cisteína puede hacer que las células se vuelvan sensibles a la ferroptosis (Liu *et al.*, 2020). Sin embargo, en células de ovario se ha descrito que un tratamiento prolongado con el fármaco genera resistencia a la ferroptosis ya que son capaces de superar la ausencia de cisteína por medio de la activación de la ruta de transulfuración reversa (Liu *et al.*, 2020).

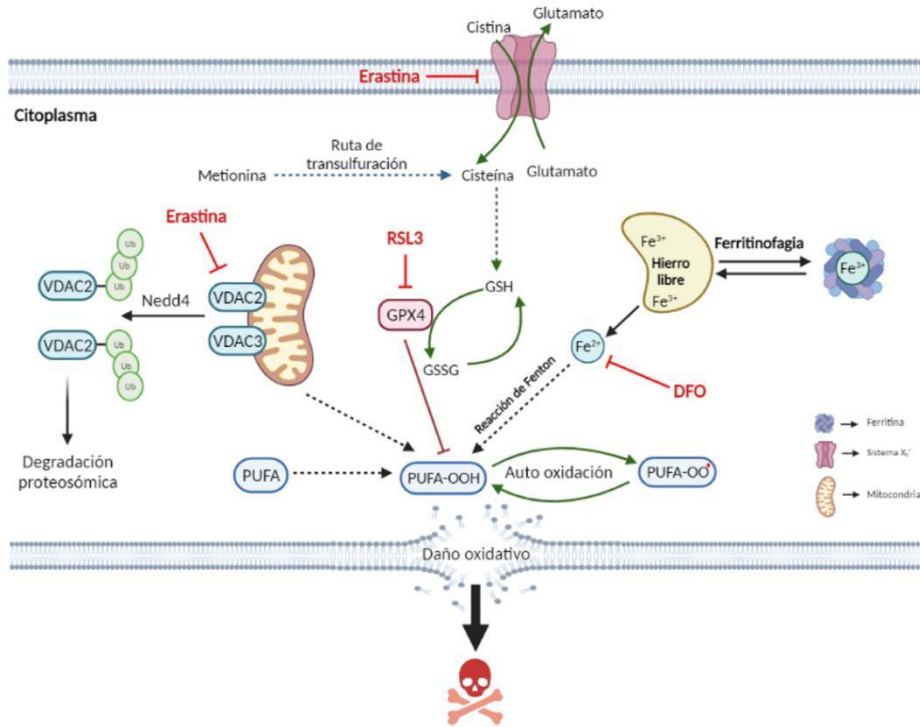


Figura 2. Sistema de regulación de la ferroptosis en las células, eje cist(e)ina/GSH/GPX4. El antiportador de cist(e)ina/glutamato sirve para introducir la cisteína en la célula. Las células son capaces de sintetizar cisteína a través de la ruta de transulfuración a partir de la metionina obtenida de la dieta. La cisteína es necesaria para la generación del GSH que es utilizado por GPX4 como donante de electrones para la reducción de los peróxidos de lípidos. El tratamiento con erastina bloquea al antiportador cisteína/glutamato, mientras que RSL3 inhibe la enzima GPX4, todo ello permite la acumulación de peróxidos de hidrógeno. Asimismo, los canales aniónicos dependientes de voltaje 2 y 3 (VDAC 2 y 3) localizados en la mitocondria controlan el flujo de metabolito y sustratos necesarios para la respiración mitocondrial. El tratamiento con erastina permite mantener esos canales abiertos, aumentando la tasa de respiración mitocondrial contribuyendo a la generación de ROS y, por tanto a la peroxidación de lípidos. Finalmente, el Fe^{3+} es almacenado en la ferritina, la degradación de la misma, ferritinofagia, sirve para liberar el Fe^{3+} que se reduce a Fe^{2+} . Por medio de la reacción de Fenton, el Fe^{2+} contribuye a la generación de peróxidos de lípidos. Todos estos procesos llevan al desarrollo de la ferroptosis. El tratamiento con el DFO sirve para quelar el Fe^{2+} y, evitar la generación de los peróxidos de lípidos.

Por otro lado, los VDAC (del inglés, *voltage dependent anionic channel*) localizados en la membrana mitocondrial externa son importantes en conferir a las células sensibilidad para el desarrollo de la ferroptosis (**figura 2**). Existen tres isoformas de estos canales y juntos conforman la mayor parte de las proteínas de la membrana mitocondrial

externa. Controlan el flujo de metabolitos y sustratos necesarios para la respiración y pueden alternar entre un estado abierto o cerrado. El tratamiento de células cancerígenas con fármacos como la erastina es capaz de mantener abiertos estos canales provocando un incremento en el metabolismo mitocondrial con el consecuente aumento en la producción de ROS y una disminución en la glucólisis (Yang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020).

El tratamiento de células cancerígenas con erastina es capaz de inducir resistencia a la ferroptosis por otra vía distinta a la descrita anteriormente. La erastina es capaz de estimular la expresión de Nedd4 (del inglés, *neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4*), una ubiquitin ligasa que lleva a la degradación de VDAC2/3. De esta forma, se incrementa la resistencia de células cancerígenas al tratamiento con erastina (Yang *et al.*, 2020). Todas aquellas condiciones que alteren los niveles o la actividad de GPX4 tendrán un impacto inmediato en la supervivencia celular ya que GPX4 cataliza la reducción de los peróxidos de lípido. De esta forma la inhibición de GPX4 mediante fármacos como RSL3 o mediante técnicas genéticas confiere sensibilidad a ferroptosis en distintas líneas celulares (Zou *et al.*, 2019).

El modelo convencional de regulación de GPX4 contemplaba únicamente al antiportador de cisteína/glutamato como único regulador de la actividad de GPX4. Sin embargo, se observó que la depleción de GSH induce una muerte celular por ferroptosis mucho más suave que la ausencia de cisteína o inhibidores de ferroptosis que actúa sobre el antiportador como la erastina (Harris *et al.*, 2019). Un estudio reciente realizado por Zhang *et al.*, muestra que la cisteína no solo es capaz de promover la síntesis de GSH sino también la síntesis proteica de GPX4 a través de la ruta de señalización Rag-mTORC1-4EBP. Análisis proteómicos revelaron que, tras la disminución de los niveles de cisteína, los niveles proteicos de GPX4 disminuyen, los cuales no se podían atribuir a una disminución en los niveles de mRNA (del inglés, *messenger RNA*), incremento de la actividad del proteasoma o autofagia, sino a la reducción de la síntesis proteica de GPX4. Asimismo, demostraron que la delección de *SLC7A11*, el tratamiento con erastina o la ausencia de cisteína promueve la ferroptosis tras el tratamiento con inductores de ferroptosis como la RSL3, debido a cambios en los niveles proteicos de GPX4. Esto se debe a que la falta de cisteína reduce la localización de mTOR (del inglés, *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) en los lisosomas, prerequisite necesario para su activación inducida por la presencia de aminoácidos. Estos datos sugieren que

mTORC1 (del inglés, *mammalian target of rapamycin complex 1*) es capaz de inducir resistencia a ferroptosis al menos en parte al incremento de la síntesis de GPX4 (Zhang *et al.*, 2021).

Por otra lado, se ha descrito que mTOR y GPX4 pueden regularse recíprocamente. El tratamiento con RSL3 (inhibidor de GPX4) o el *knockdown* de GPX4 es capaz de disminuir el nivel de fosforilación de mTOR, sugiriendo la existencia de un posible *feedback* positivo entre GPX4 y mTOR. (Liu *et al.*, 2020).

Sistema NAD(P)H/FSP1/CoQ₁₀

A pesar de que el eje mencionado anteriormente es considerado el principal mecanismo que reprime el desarrollo de ferroptosis en mamíferos, estudios de *genome-wide* recientes han descubierto otros sistemas protectores de ferroptosis independientes a GPX4 (Jiang *et al.*, 2021).

Aunque el potencial antiferroptótico de FSP1 (del inglés, *ferroptosis suppressor protein 1*) se ha descubierto recientemente (Doll *et al.*, 2019; Koppula *et al.*, 2022), en 2001 se describió la existencia de una proteína desconocida con actividad NADH (del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen*) oxidasa que junto con GPX4 evitaba la “apoptosis” en células de linfoma de *Burkitt* inducidas por el cultivo de las mismas a bajas densidades (Briemeier *et al.*, 2001).

FSP1 pertenece a la familia de NDH-2 (del inglés, *NADH:quinone oxidoreductase type II*). Debido a la homología estructural que tiene con la proteína AIF (del inglés, *apoptosis inducing-factor*), en un primer momento se propuso que FSP1 pudiera tener una función proapoptótica (Zheng & Conrad, 2020). Como miembro de la familia NDH-2, emplea NADH para reducir la CoQ₁₀ y se localiza mayoritariamente en gotas lipídicas y en la membrana plasmática actuando como un sistema para eliminar los peróxidos lipídicos (**figura 3**) (Bersuker *et al.*, 2019; Doll *et al.*, 2019). En el extremo N-terminal contiene un motivo de miristoilación que facilita la translocación a la membrana donde es capaz de neutralizar las ROS, previene la peroxidación de lípidos y, consecuentemente, el desarrollo de ferroptosis (Doll *et al.*, 2019). Desempeña la función con ayuda de la CoQ₁₀ también conocida como ubiquinona. FSP1 cataliza la reducción de la ubiquinona

a ubiquinol que actúa como RTA. De esta forma es capaz de impedir que tenga lugar la ferroptosis, indicando que FSP1 actúa en paralelo a la ruta comentada anteriormente.

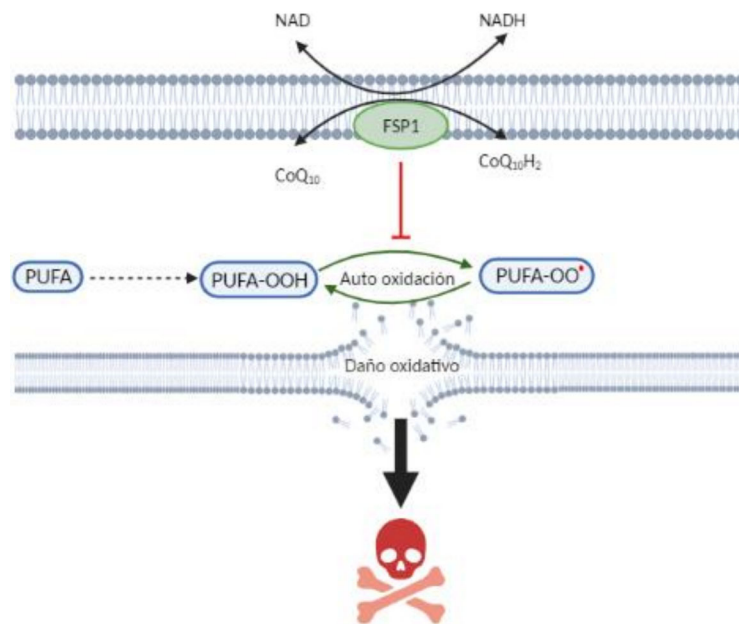


Figura 3. Sistema de regulación de la ferroptosis en células, sistema NADH/FSP1/CoQ₁₀. La proteína FSP1 (del inglés, *ferroptosis suppressor protein 1*) se localiza en la membrana plasmática a través de un anclaje miristoilo y cataliza la reducción de la ubiquinona (CoQ₁₀) a ubiquinol (CoQ₁₀H₂), consumiendo NADH. El ubiquinol sirve para atrapar los radicales libres que provocan peroxidación lipídica. De esta manera, la célula se protege frente al desarrollo de ferroptosis.

1.4 Ferroptosis y cáncer

Desde los descubrimientos de esta modalidad de muerte celular, se ha ligado al cáncer ya que su descubrimiento ha sido el fruto de la búsqueda de compuestos para su tratamiento (Dixon *et al.*, 2012). Diferentes estudios han revelado la relación múltiples genes relacionados con el desarrollo del cáncer y de distintas rutas de señalización implicadas en el control de la ferroptosis. En principio, parecería lógico pensar que las células cancerígenas tengan una mayor tendencia a experimentarla debido a una mayor actividad metabólica y, por ende, una mayor cantidad de ROS (Zheng & Conrad, 2020). Además, se ha descrito que presentan alterado el metabolismo del hierro, concretamente muestran una mayor cantidad del receptor de la transferrina implicado en la importación del hierro (Basuli *et al.*, 2017).

Se ha observado que muchos supresores tumorales sensibilizan a las células a desarrollar un proceso de ferroptosis, pudiendo concebir la supresión tumoral como una función fisiológica innata de este tipo de muerte celular. Entre todos los supresores tumorales, se encuentra p53 que es uno de las más estudiadas. Por una parte, se vio que

p53 es capaz de sensibilizar las células a experimentar ferroptosis mediante la represión transcripcional de *SLC7A11*, apoyando la idea de que a través de p53, la ferroptosis contribuye con el papel supresor tumoral del mismo (Jiang *et al.*, 2015). Recientemente se ha descubierto un tipo de marca epigenética asociada con la monoubiquitinación de la histona H2B en la lisina 120 (H2Bub1), una marca epigenética asociada a la activación transcripcional se ha relacionado con la regulación de *SLC7A11* y la ferroptosis. Concretamente, incrementa la expresión de *SLC7A11* disminuye la sensibilidad a la ferroptosis. p53 actúa como un regulador negativo de H2Bub1 mediante la interacción y la promoción de la translocación nuclear de USP7 (del inglés, *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7*), una desubiquitinasa que elimina la marca epigenética de la región reguladora del *SLC7A11*, disminuyendo la expresión del mismo (Wang *et al.*, 2019).

Sin embargo, existen otros estudios en los que se observa que p53 actúa previniendo el desarrollo de la ferroptosis. La pérdida de p53 evita la acumulación nuclear de DPP4 (del inglés, *dipeptidil peptidase-4*) en el núcleo facilitando la peroxidación de lípidos de membrana dependiente de DPP4 lo que acaba provocando ferroptosis (Xie *et al.*, 2017). Por otra lado, a través de p21, p53 es capaz de evitar el desarrollo de ferroptosis en ausencia de cisteína, sugiriendo que actúa como un mecanismo para evitar la proliferación de las células cancerígenas (Tarangelo *et al.*, 2018). Así, p53 es capaz de regular un gran grupo de genes implicados en distintos procesos biológicos y, su actividad puede ser dependiente del contexto.

La activación de la ferroptosis es una de las aproximaciones prometedoras para el tratamiento de células cancerígenas resistentes a los tratamientos actuales. Por ejemplo, las células cancerígenas mesenquimales que típicamente se caracterizan por una alta expresión de ZEB1 (del inglés, *zinc finger E-box-binding homeobox1*), son altamente sensibles a la ferroptosis inducida por la inhibición de GPX4. Se ha propuesto que ZEB1 es un factor lipogénico y regula el metabolismo lipídico, estableciendo la relación entre la expresión de este en esas células mesenquimales y la vulnerabilidad a sufrir peroxidación lipídica (Viswanathan *et al.*, 2017). Asimismo, la supervivencia de células resistentes a los fármacos empleados depende en gran medida de GPX4 para sobrevivir, haciendo que sea una diana importante para el tratamiento. Se ha observado que GPX4 es necesario para la recaída en un modelo de xenoinjerto de melanoma (Hangauer *et al.*, 2017). Por tanto, la capacidad de una determinada célula cancerígena a ser resistente o sensible al desarrollo de la ferroptosis va a depender de su *background* genético.

El uso de moduladores de ferroptosis parecen ser una estrategia prometedora para el tratamiento del COE. Las células de COE muestran algunas características que hacen que puedan ser tratadas con ese tipo de fármacos. Se describió que presentan bajos niveles de ferroportina y altos niveles de transferrina, de manera que se produce una acumulación de hierro a nivel intracelular. El incremento de hierro intracelular promueve la invasión y metástasis de OVCA mediante la inducción de metaloproteasas de matriz y la interleuquina 6 (Basuli *et al.*, 2017). Células de cáncer de ovario que tienen sobreexpresado SCD1 (del inglés, *stearoyl-CoA desaturase 1*) muestran resistencia al desarrollo de la ferroptosis, imitando el efecto del tratamiento con MUFA. La inhibición de SCD1 desencadena ferroptosis porque elimina CoQ₁₀, proteína empleada por FSP1 para proteger frente al desarrollo de la ferroptosis (Tsfay *et al.*, 2019). Por todo lo comentado, resulta prometedor el estudio y descripción de la ferroptosis no solo como mecanismo biológico *per se*, sino que puede ayudar a esclarecer las dianas moleculares terapéuticas para el tratamiento contra el cáncer de ovario epitelial y el microambiente.

2. Objetivos

Por todo lo descrito anteriormente en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto del uso de inductores de ferroptosis (erastina y RSL3), a diferentes concentraciones y tiempos, en la capacidad proliferativa de células OVCA.
- Determinar el efecto del uso de inhibidores de ferroptosis (DFO y ferrostatina-1), a diferentes concentraciones y tiempos, en la capacidad proliferativa de células OVCA.
- Evaluar la capacidad paracrina de células OVCA tratadas con moduladores de ferroptosis (erastina, RSL3 y DFO) para afectar a la proliferación celular de células OVCA.

3. Material y métodos

3.1 Cultivo celular de OVCA

La actividad realizada con los cultivos celulares de la línea de OVCA (HTBB-77TM, ATCC, España), durante su crecimiento y expansión, se llevó a cabo en condiciones de esterilidad empleando una cabina de flujo laminar (Telstar AV-30/70, España). Las células, de la línea celular OVCA, se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm² de

superficie (p100) (Corning, España), en medio de cultivo DMEM (del inglés, *dulbecco's modified eagle's medium*) (Lonza, España) suplementado con 10% (v/v) de FBS (del inglés *fetal bovine serum*) (Sigma, Aldrich) y 1% (v/v) penicilina/estreptomicina (P/S). Esta línea celular crece en monocapa, para realizar los experimentos se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 80-90% para, posteriormente, levantarlas empleando 5 mL de tripsina 1X (ThermoFisher, España) durante 5-6 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a la centrifugación a 1500 revoluciones por minuto (rpm) (1250 xg) durante 5 minutos. A continuación, las células se resuspendieron en un volumen conocido para, posteriormente realizar diferentes experimentos.

Para poder sembrarlas a una densidad conocida es necesario hacer un recuento de las mismas. El recuento se llevó a cabo empleando el microscopio (Nikon eclipse TS100, España). se calculó el volumen necesario para poder sembrarlas a la densidad deseada para cada experimento. Finalmente, se añadió el medio de cultivo para el crecimiento adecuado de las células tras sembrarlas.

Para el cultivo celular se utilizaron incubadores (Sanyo CO₂ Incubator, España) con niveles definidos de presión de CO₂ al 5% (v/v) a 37°C de temperatura.

3.2 Modulación de ferroptosis en cultivos *in vitro*

Para evaluar los efectos de los diferentes moduladores de ferroptosis (erastina, RSL3, DFO y ferrostatina-1) sobre las OVCA, se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos (Corning, España) y se decidió tratarlas durante 3 y 6 días (**figura 4**) a concentraciones de 250 nM, 500 nM y 1 μ M basándonos en estudios previos (Hassannia et al., 2019; Yang et al., 2014). Transcurridos los días establecidos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) (Sigma-Aldrich, España) y se tiñeron empleando el cristal violeta al 0.5% (v/v) (Sigma-Aldrich, España). En cada uno de los experimentos se hicieron 3 réplicas técnicas. Una vez que se sembraron las células, se dejan adherirse a la superficie de la placa de cultivo y reposar durante aproximadamente 24 horas, tras lo cual se añadió el tratamiento pertinente. Asimismo, en todos los casos se añadieron tres réplicas técnicas de cada condición y un control que lleva DMSO (del inglés, *dimethyl sulfoxide*) (ThermoFisher, España) en la misma relación v/v que la concentración más alta del tratamiento empleado en cada caso.

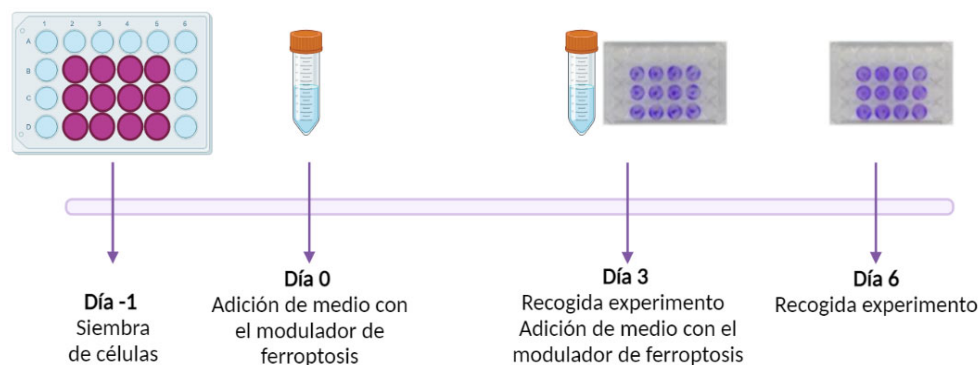


Figura 4. Resumen de los tratamientos con los moduladores de ferroptosis: erastina, RSL3, DFO y ferrostatina-1.

3.3 Ferroptosis paracrina

Las células se trataron con los moduladores de ferroptosis (erastina, RSL3 y DFO), durante 3 y 6 días siguiendo, tal y como se explica en el apartado 3.2 (**figura 5**). Transcurrido ese tiempo, se recogió el medio que fue centrifugado a 1500 rpm (1250 xg) durante 5 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante, que se corresponde con el medio condicionado se guardó en un eppendorf nuevo y se almacenó a -80°C . Las células OVCA receptoras se sembraron. En este caso a día 0 y a día 3 se añadió el medio previamente centrifugado para eliminar los restos celulares. Finalmente, se suplementó con 10% (v/v) de FBS (Sigma-Aldrich, España). Trascurridos los días establecidos, las células se fijan y se tiñen mediante la tinción cristal violeta.

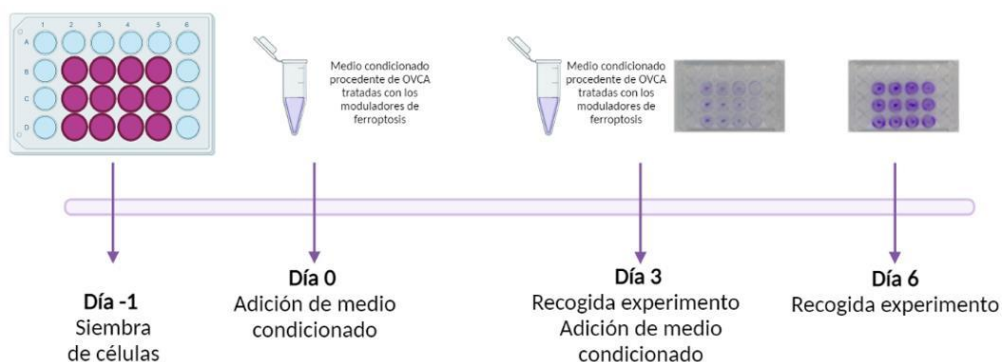


Figura 5. Resumen de los tratamientos con el medio condicionado obtenido de células OVCA tratadas con los moduladores de ferroptosis: erastina, RSL3 y DFO.

3.4 Tinción de cristal violeta

La tinción cristal violeta se emplea para evaluar la formación de colonias y proliferación celular en diferentes tipos celulares, en este caso se hizo en células OVCA. Para ello, se preparó una disolución de cristal violeta a 0,5% (v/v) (Sigma-Aldrich, España) en agua destilada. Las OVCA se lavaron con agua destilada dos veces. A

continuación, se fijaron usando paraformaldehído al 4% (v/v) (Sigma-Aldrich, España) durante 5 minutos en agitación. Después, se lavaron con agua destilada para eliminar los restos del reactivo de fijación. Seguidamente, las células se tiñeron con la disolución de cristal violeta y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se les retiró el colorante y se dejaron secar.

Finalmente, para su cuantificación se disolvió el cristal violeta con ácido acético al 30% (v/v) (Merk, Alemania) en agua destilada durante 30 minutos en rotación a temperatura ambiente. Por último, se leyó la placa en el espectrofotómetro NanoQuant (Tecan infinite M200, Estados Unidos) de absorbancia a una longitud de onda de 590 nm.

3.5 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se hizo según un protocolo estandarizado con tampón de lisis RIPA (del inglés, *radioimmunoprecipitation*) compuesto por NaCl (150 mM), Tritón 1% (v/v), desoxiclorato de sodio 0,5 % (v/v), SDS 0,1 % (v/v) y 50 mM Tris-Base con pH=8 (todo de Thermo Fisher, EE.UU) al que se le añadió un inhibidor de proteasas (Thermo Fisher, EE.UU) a una concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se añadió 100 μl de tampón de lisis por 10.000 células, se re-suspendió la mezcla y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Por último, se cogió el sobrenadante donde se encuentran contenidas las proteínas y se guardó a -80 °C hasta su uso.

3.6 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron mediante un kit comercial BCA (del inglés, *bicinchoninic acid*) (ThermoFisher, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para calcular la concentración de proteínas se realizó antes una recta de calibrado a partir de 9 diluciones de albúmina de suero bovino con concentraciones que van desde 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se mezclaron luego los reactivos proporcionados en el kit de ensayo (A y B) en una proporción 1:50. Las muestras de la recta de calibrado y las muestras a analizar se cargaron en una placa de 96 pocillos (Corning, Madrid) y se leyeron los resultados en un lector de placas Nanoquant (Tecan Trading, Suiza) a 480 nm.

3.7 Tinción de nitrato de plata

Previo a la inmunodetección y para comprobar la integridad de las proteínas se realizó una tinción con nitrato de plata. Para ello, se preparó un gel de acrilamida al 15%

(v/v) con Tris pH 8,8 a 1,5 M para el gel separador y Tris pH 6,8 a 1 M para el gel concentrador. En ambos casos, se empleó SDS (del inglés, *sodium dodecyl sulfate*) y APS (del inglés, *ammonium persulfate*) al 10% (p/v). Se cargaron 2 µg de la muestra con tampón de carga 1X (ThermoFisher, EE.UU). El gel se corrió en una cubeta de electroforesis (Bio-rad) a 80-120V.

A continuación, se prepararon los reactivos necesarios para revelar el gel (algunos de ellos en campana de flujo (Sanyo CO₂ Incubator, España). En primer lugar, el gel se sumergió en la *solución fijadora* (etanol (40% (v/v), ácido acético glacial (10% (v/v), agua destilada (50% (v/v)) (todos los reactivos de ThermoFisher, EE.UU)) durante 20 minutos. Se hicieron lavados durante 10 minutos con agua destilada; y 1 minuto en la *solución sensibilizadora* (tiosulfato sódico (0,02% (m/v)). Se volvieron a hacer varios lavados con agua destilada; y se impregnó en el reactivo de plata (nitrato de plata (0,2% (m/v)) y formalina (0,075% (v/v) (todos los reactivos de ThermoFisher, EE.UU)) durante 40 min, seguido de un lavado de entre 5-10 segundos con agua destilada. Posteriormente, el gel se introdujo en la *solución reveladora* (carbonato sódico 3% (m/v) hasta que se observaron las bandas correspondientes a las proteínas en el gel hasta un máximo de 15 minutos.

Por último, se sumergió en una *solución de stop* (30 minutos) (3% (m/v) tris-base en 10% (v/v) ácido acético) (todos los reactivos de ThermoFisher, EE.UU) para que no se tiñera más el gel. Tras el revelado, se procedió a escanear el gel. La densidad de las bandas de las proteínas se cuantificó con el programa informático “*Image.J*” para normalizar la concentración de las proteínas obtenidas con el método BCA y así obtener la concentración real debido a la complejidad de las muestras proteica. Una vez comprobada la integridad de las proteínas se podrían utilizar para llevar a cabo estudios proteómicos.

3.8 Estadística

Los datos obtenidos se normalizan frente al control y en función de los días de exposición al modulador de ferroptosis empleado. Para comprobar si los resultados obtenidos en los experimentos realizado son estadísticamente significativos, se hicieron 3 réplicas técnicas y, en algunos casos, 3 biológicas. Los resultados se analizaron mediante una *T de Student* no pareada empleando el software estadístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, EE.UU). Todos los resultados se expresaron como la media

± la desviación estándar y las probabilidades se representaron como: **($p < 0,01$) y ***($p < 0,001$).

3.9 Revisión bibliográfica

Para la obtención de la bibliografía utilizada en este trabajo se usaron las plataformas digitales de libre acceso, Google Académico (<https://scholar.google.es/>) y PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

4. Resultados

4.1 Evaluación de la proliferación en OVCA en presencia de inductores de ferroptosis: erastina y RSL3

Tanto la erastina (Hassannia *et al.*, 2019) como el RSL3 son capaces de inducir ferroptosis mediante mecanismos distintos (Bersuker *et al.*, 2019; Doll *et al.*, 2019). Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar los efectos que producen estos compuestos en las OVCA, así como, determinar la concentración idónea para poder utilizarlos en futuros experimentos.

Tras llevar a cabo los cultivos a diferentes tiempos y concentraciones con los inductores de ferroptosis siguiendo lo indicado en **figura 4**, se obtuvieron para la proliferación celular empleando el cristal violeta los siguientes resultados que se encuentran en las **figuras 6 y 7**. El tratamiento con erastina (**figuras 6A y 6B**), tanto a 3 como a 6 días y, a las concentraciones empleadas no se observa diferencias en la capacidad proliferativa de las células tratadas con respecto al control. A partir de lo observado tras realizar la tinción con cristal violeta de células OVCA tratadas con RSL3 (**figuras 6C y 6D**), se aprecia una disminución en la capacidad proliferativa, tanto a 3 como a 6 días a medida que aumenta la concentración del inductor de ferroptosis. Con el fin de cuantificar estas observaciones, los resultados de absorbancia relativos al número de células normalizados con respecto a la condición DMSO obtenidos se sometieron al análisis estadístico *t de student* para determinar la existencia de una disminución de la proliferación estadísticamente significativa. En las gráficas de la **figuras 7A y 7B** no se observa, ni a 3 ni a 6 días, diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de proliferación de las células OVCA tratadas con erastina respecto al control. Por el contrario, el análisis estadístico realizado con los datos obtenidos tras el tratamiento con

RSL3 (figuras 7C y 7D), muestran diferencias estadísticamente significativas tanto a 3 como a 6 días a medida que incrementa la concentración del inductor.

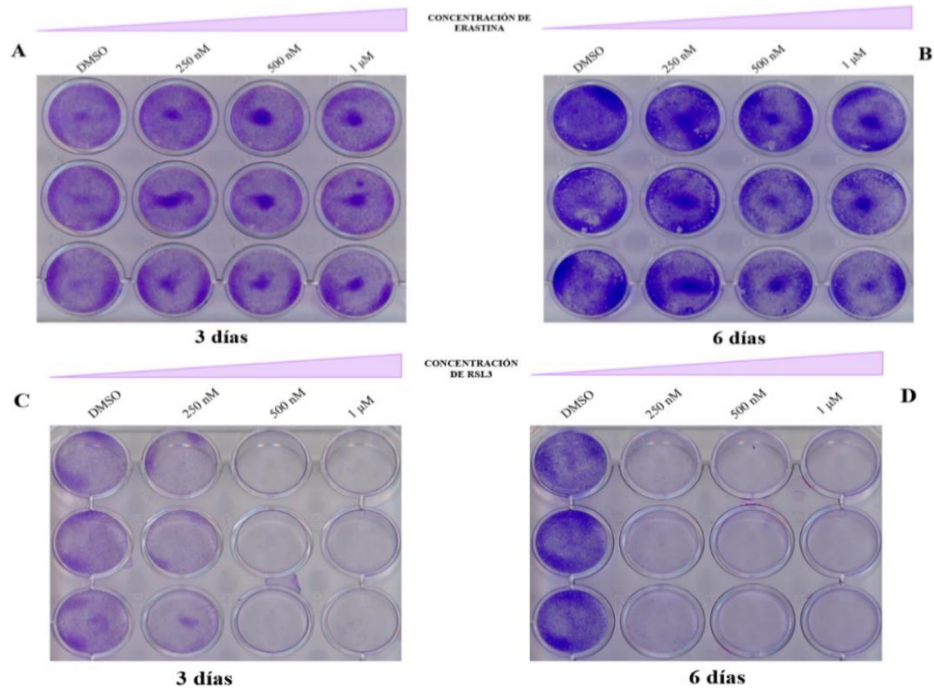


Figura 6. Imágenes representativas de los experimentos obtenidas tras la fijación y tinción con cristal violeta de las OVCA a diferentes días y concentraciones de los inductores. **A.** Tratamiento con erastina a 3 días. **B.** Tratamiento con erastina a 6 días. **C.** Tratamiento con RSL3 a 3 días. **D.** Tratamiento con RSL3 a 6 días. n=3 réplicas biológicas

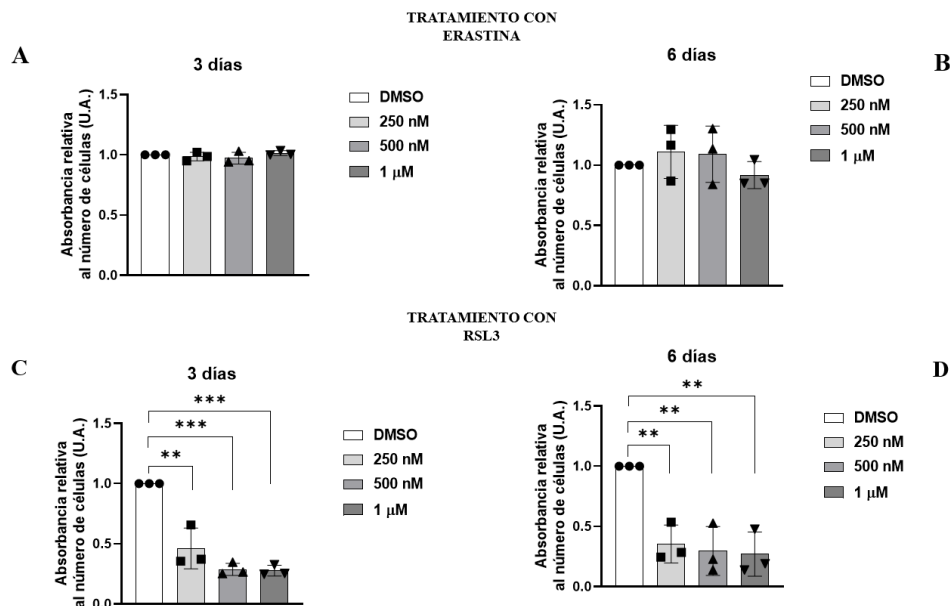


Figura 7. Histogramas de la cuantificación del cristal violeta procedente de OVCA tratadas a diferentes tiempos y concentraciones. Se representan los valores de la media y la desviación estándar obtenidos con los valores normalizados de los 3 experimentos independientes realizados con los dos tratamientos. **A.** Tratamiento con erastina a 3 días. **B.** Tratamiento con erastina a 6 días. **C.** Tratamiento con RSL3 a 3 días. **D.** Tratamiento con RSL3 a 6 días. La prueba estadística empleada fue la t de Student.

4.2 Evaluación de la proliferación en OVCA en presencia de inhibidores de ferroptosis: DFO y ferrostatina-1

El DFO es un quelante de hierro que actúa uniéndose al hierro libre y, por tanto, impidiendo que éste pueda actuar. (Zheng & Conrad, 2020). La ferrostatina-1 también es un inhibidor de la ferroptosis, inactivando a las lipoxigenasas (Zheng & Conrad, 2020).

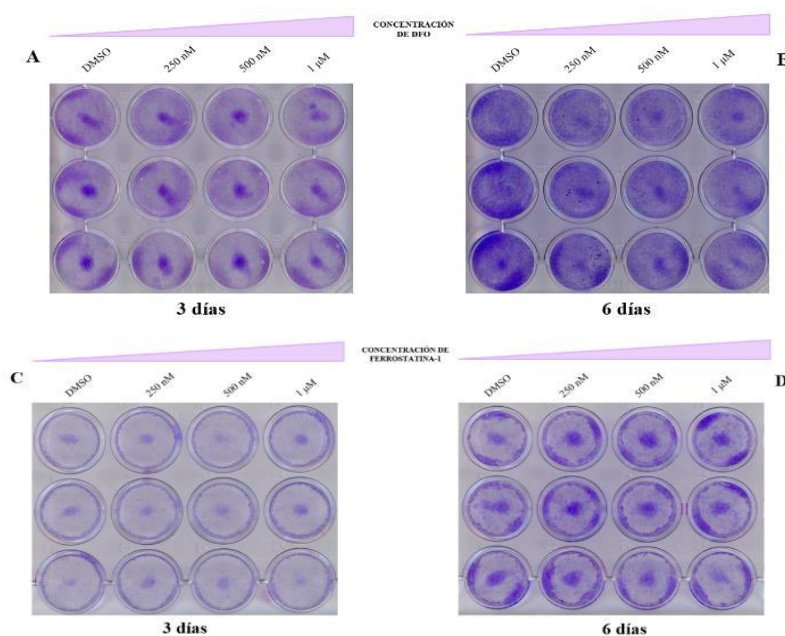


Figura 8. Imágenes representativas de los experimentos obtenidas tras la fijación y tinción con cristal violeta de las OVCA a diferentes días y tratamientos. **A.** Tratamiento con DFO a 3 días. **B.** Tratamiento con DFO a 6 días. **C.** Tratamiento con ferrostatina-1 a 3 días. **D.** Tratamiento con ferrostatina-1 a 6 días.

Tras llevar a cabo los cultivos a las concentraciones y tiempos con los inhibidores de ferroptosis siguiendo lo indicado en la sección 3.2 de material y métodos (**figura 4**), se obtuvieron para el cristal violeta los siguientes resultados que se pueden observar en las figuras que se encuentran a continuación (**figuras 8 y 9**). El tratamiento con DFO (**figuras 8A y 8B**), tanto a 3 como a 6 días y, a las concentraciones empleadas no se observa diferencias en la capacidad proliferativa de las células tratadas con respecto al control. Con el fin de cuantificar estas observaciones, los resultados de absorbancia relativos al número de células normalizados con respecto a la condición DMSO obtenidos se sometieron al análisis estadístico *t de student* para determinar la existencia de una disminución de la proliferación estadísticamente significativa. En las gráficas de la **figuras 9A y 9B** se observan, tanto a 3 como a 6 días, diferencias estadísticamente significativas a concentraciones de 500 nM y 1 μ M de DFO en la capacidad de proliferación con respecto al control. El tratamiento de OVCA con ferrostatina-1 no muestra diferencias en cuanto a la capacidad de proliferación (**figuras 8C y 8D**). No fue

posible realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos tras el tratamiento con ferrostatina-1 (**figuras 9C y 9D**) debido a la falta de réplicas.

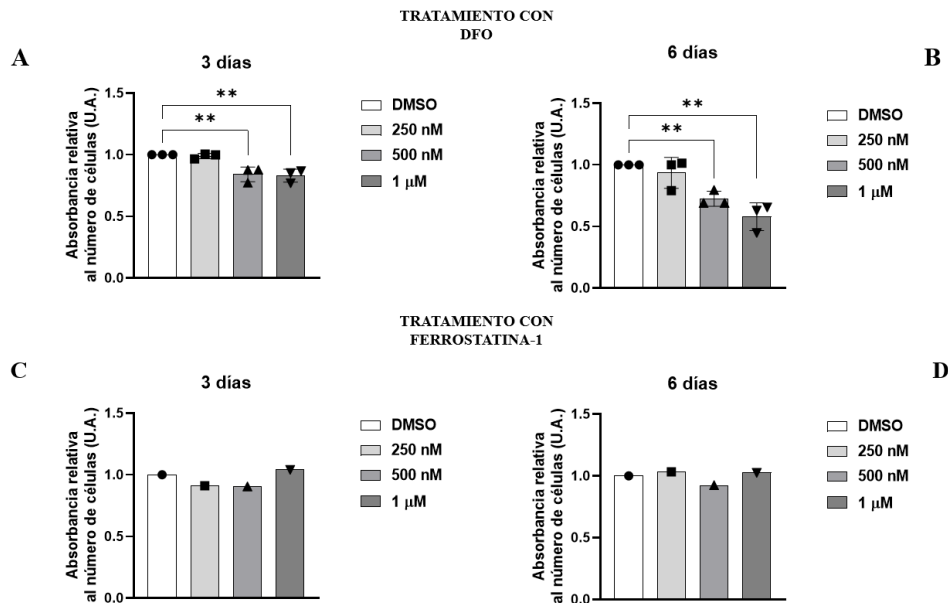


Figura 9. Histogramas de la cuantificación del cristal violeta procedente de OVCA tratadas a diferentes tiempos y concentraciones. Se representan los valores de la media y la desviación estándar obtenidos con los valores normalizados de los 3 experimentos independientes realizados con el DFO. Se representa los valores de la media obtenidos con la ferrostatina-1, n=1 réplicas biológicas. **A.** Tratamiento con DFO a 3 días. **B.** Tratamiento con DFO a 6 días. **C.** Tratamiento con ferrostatina-1 a 3 días. **D.** Tratamiento con ferrostatina-1 a 6 días. La prueba estadística fue la t de Student.

4.3 Evaluación de la capacidad de transmisión paracrina: erastina, RSL3 y DFO

Con el fin de evaluar la capacidad del medio condicionado de las OVCA tras ser tratadas con los moduladores de ferroptosis (siguiendo lo que se indica en la sección 3.3 de material y métodos (**figura 5**)) puedan ser transmisores de señal, se establecieron tres modelos de ferroptosis: 1) ferroptosis inducida por erastina, 2) ferroptosis inducida por RSL3, 3) inhibición de ferroptosis por DFO. Después del tratamiento se retiró el medio de cultivo y se centrifugó con el fin de eliminar cualquier resto celular que pudiese quedar. Seguidamente, el medio condicionado se empleó para OVCA receptoras con el fin de evaluar si, las OVCA donantes son capaces de actuar como transmisores de señal a través del medio condicionado.

Tras llevar a cabo los cultivos a las diferentes concentraciones y tiempos con el medio condicionado procedente de células OVCA donadoras tratadas con los inductores de ferroptosis (erastina y RSL3) (**figura 5**), se obtuvieron para la evaluación de proliferación mediante el cristal violeta los siguientes resultados que se pueden observar

en las figuras que se encuentran a continuación (**figuras 10 y 11**). Para cuantificar lo observado, los resultados de absorbancia relativos al número de células normalizados con respecto a la condición DMSO obtenidos se sometieron al análisis estadístico *t de student* para determinar la existencia de una disminución de la proliferación estadísticamente significativa. Las células receptoras tratadas con el medio condicionado de células donantes tratadas con erastina (**figuras 10A y 10B**), tanto a 3 como a 6 días y, a las concentraciones empleadas no se observa diferencias en la capacidad proliferativa de las células tratadas con respecto al control. Asimismo, debido a la falta de réplicas no fue posible realizar un análisis estadístico (**figuras 11A y 11B**). A pesar de que estadísticamente, los resultados obtenidos para las células OVCA receptoras tratadas con medio condicionado de células donantes tratadas con RSL3 no muestran diferencias estadísticamente significativas (**figuras 11C y 11D**), sí que se observa una tendencia a la disminución de la capacidad de proliferación, tanto a 3 como a 6 días, a medida que incrementa la concentración del inductor RSL3.

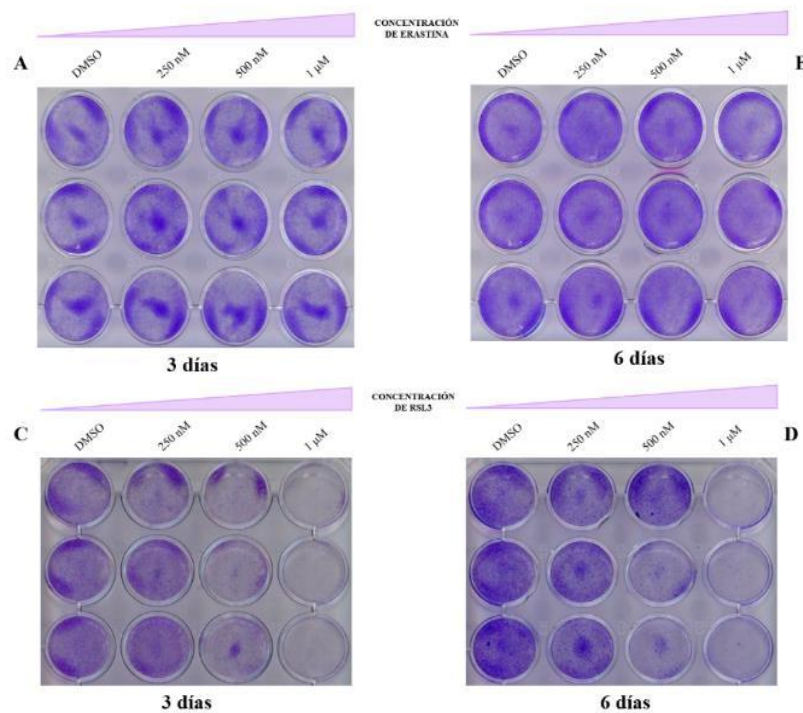


Figura 10. Imágenes representativas de los experimentos obtenidas tras la fijación y tinción con cristal violeta de las OVCA a diferentes días y tratamientos. **A.** Tratamiento con medio condicionado de OVCA receptoras tratadas con erastina a 3 días. **B.** Tratamiento con medio condicionado de OVCA receptoras tratadas con erastina a 6 días. **C.** Tratamiento con medio condicionado de OVCA receptoras tratadas con RSL3 a

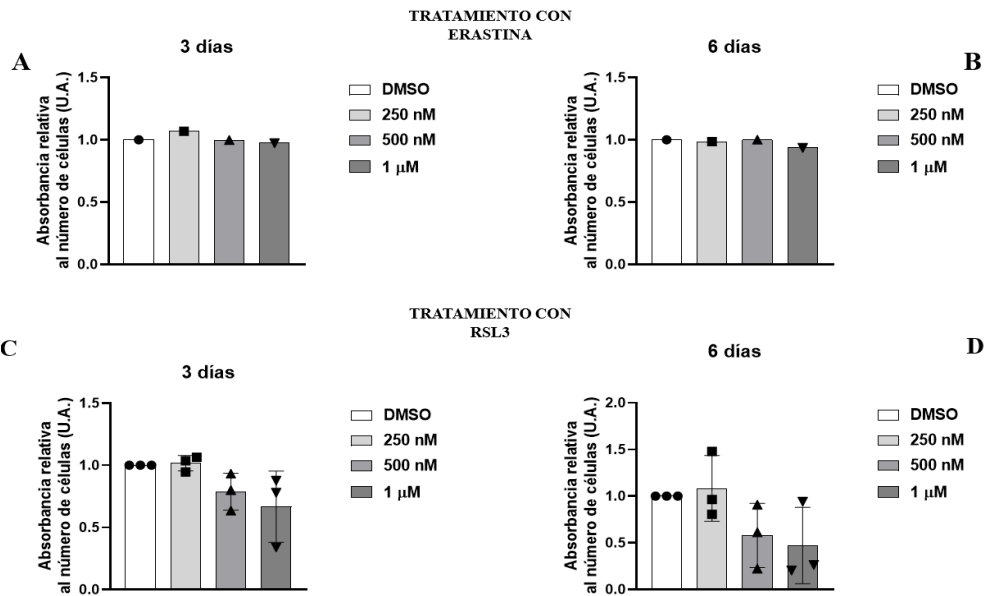


Figura 11. Histogramas de la cuantificación del cristal violeta procedente de OVCA tratadas a diferentes tiempos y concentraciones. Se representan los valores de la media y la desviación estándar obtenidos con los valores normalizados de los 3 experimentos independientes realizados con los dos tratamientos. **A.** Tratamiento con medio condicionado de OVCA receptoras tratadas con DFO a 3 días. **B.** Tratamiento con medio condicionado de OVCA receptoras tratadas con DFO a 6 días.

El tratamiento con el medio condicionado de células donantes tratadas con DFO (**figuras 12A y 12B**), tanto a 3 como a 6 días y, a las concentraciones empleadas no se observa diferencias en la capacidad proliferativa de las células tratadas con respecto al control. Los resultados de absorbancia relativos al número de células normalizados con respecto a la condición DMSO obtenidos se sometieron al análisis estadístico *t de Student* y, estos no muestran diferencias estadísticamente significativas (**figuras 13A y 13B**).

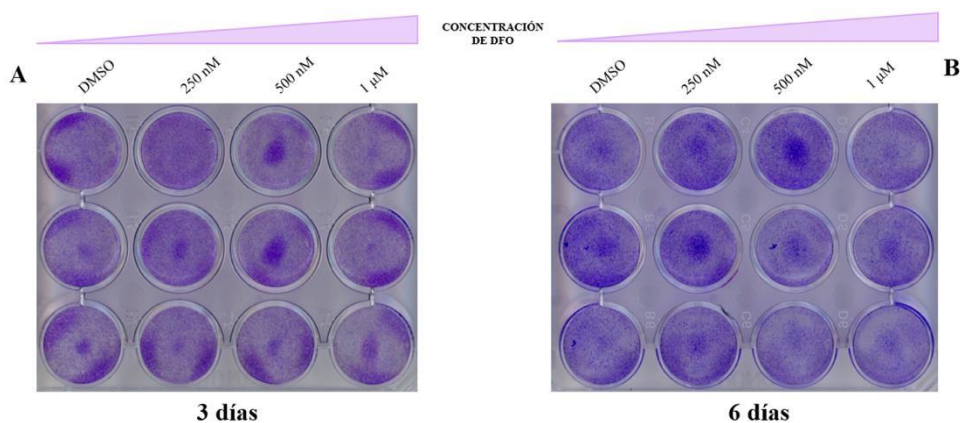


Figura 12. Imágenes representativas de los experimentos obtenidas tras la fijación y tinción con cristal violeta de las OVCA tratadas con DFO a diferentes días. A. 3 días. **B.** 6 días.

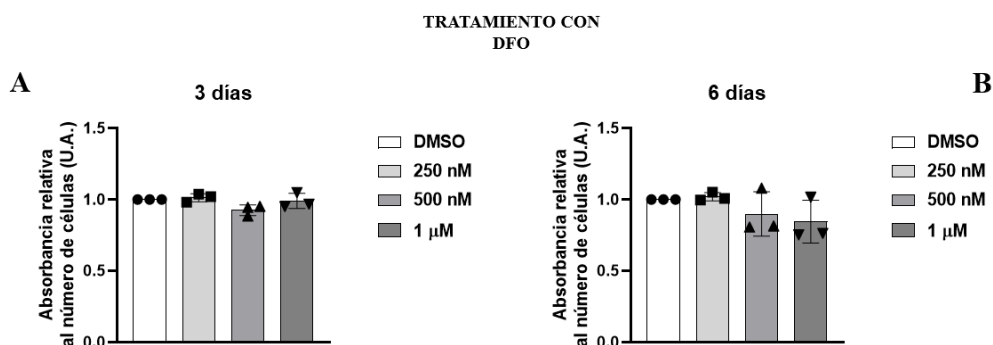


Figura 13. Histogramas de la cuantificación del cristal violeta procedente de OVCA's tratadas a diferentes tiempos y concentraciones. Se representan los valores de la media y la desviación estándar obtenidos con los valores normalizados de los 3 experimentos independientes realizados con los dos tratamientos. **A.** Tratamiento con medio condicionado de OVCA receptoras tratadas con DFO a 3 días. **B.** Tratamiento con medio condicionado de OVCA receptoras tratadas con DFO a 6 días.

4.4 Evaluación de la integridad de las proteínas extraídas de OVCA's tratadas con los moduladores de ferroptosis: erastina, RSL3 y DFO

Los resultados obtenidos con la tinción con nitrato de plata demostraron buena integridad de proteínas en los cultivos procedentes de OVCA's, tanto en los controles (tratadas con DMSO) como en las tratadas con los moduladores de ferroptosis (erastina, RSL3 y DFO) (**figura 14**).

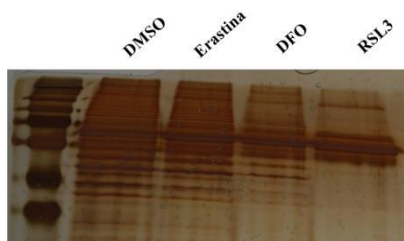


Figura 14. Integridad proteica. La columna de la izquierda se corresponde con el marcador de peso molecular de proteínas empleado. El resto (de izquierda a derecha) pertenecen a proteínas extraídas de OVCA tratadas con erastina, DFO y RSL3.

5. Discusión

A lo largo de este trabajo se ha mencionado que el COE es uno de los cánceres ginecológicos más letales. Debido a los síntomas inespecíficos de la enfermedad, el diagnóstico suele realizarse en fases avanzadas. De esta forma, los resultados alcanzados con las opciones terapéuticas actuales son insatisfactorios siendo el riesgo de resistencia a los mismos y de metástasis elevado. Todo ello hace que el pronóstico de estos pacientes sea, en la mayor parte de los casos, bastante pesimista (Li *et al.*, 2021; Lin & Chi, 2020).

En los últimos años se han estado investigando nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. El hierro es necesario para una gran

cantidad de procesos biológicos importantes tales como el transporte de oxígeno, la biosíntesis del DNA o la generación de ATP, entre otros (Hassannia *et al.*, 2019). Así, las células deben contener la suficiente cantidad de hierro. Sin embargo, también puede generar ROS, provocando estrés oxidativo y activando rutas de señalización cruciales para la supervivencia y muerte celular (Bogdan *et al.*, 2016). En diferentes tipos de cáncer, tales como mama, melanoma, glioblastoma, próstata..., se ha descrito alteración en el metabolismo del hierro (Basuli *et al.*, 2017), convirtiéndose en un punto importante para el tratamiento de estas enfermedades.

A pesar de ser el hierro un elemento esencial para el funcionamiento celular, también se ha relacionado con el desencadenamiento de la ferroptosis que es un tipo de muerte celular regulada, no apoptótica desencadenada por la acumulación de ROS que contribuyen al incremento de la concentración de peróxidos de lípido en la membrana celular dañándola. Las células COE muestran una serie de características que las convierte en posibles candidatas para el uso de moduladores de ferroptosis, tales como la erastina, RSL3, DFO y la ferrostatina-1, como tratamiento alternativo (Dixon *et al.*, 2012; Zheng & Conrad, 2020). Para ello, en este trabajo se trataron células OVCA con diferentes concentraciones de cada uno de los moduladores durante 3 y 6 días con el objetivo de evaluar los efectos de estos sobre la capacidad proliferativa.

La erastina es un inductor ferroptosis a través del sistema X_c^- , canales VDAC y p53 (Hassannia *et al.*, 2019). Por otro lado, el RSL3 es un inhibidor de GPX4, afectando a la capacidad de la célula de eliminar los peróxidos de lípido generados (Yang *et al.*, 2014).

El tratamiento de OVCA con los dos inductores de ferroptosis (erastina y RSL3) permitió obtener resultados diferentes (**figuras 6 y 7**). Si bien es cierto que se observa una cierta tendencia a la disminución de la proliferación con el incremento del tiempo de tratamiento y de la concentración de erastina empleada, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de proliferación de las OVCA tratadas con respecto al control (**figura 7**). Esto podría deberse a la activación de otros mecanismos celulares para suplir la falta de cisteína y, con ello la disminución de los niveles de GPX4. Por ejemplo, analizar la expresión del enzima cistationina β -sintasa, implicada en la obtención de cisteína por medio de la ruta de transulfuración, permitiría determinar la activación de la misma en este tipo de células tras el tratamiento con erastina (Liu *et al.*, 2020). Por otro lado, podrían estar activándose mecanismos alternativos, tales

como FSP1, que protejan a las células de las ROS y peróxidos de lípidos generados. Análisis proteómicos y genéticos del nivel de FSP1 podrían ayudar a comprobarlo (Bersuker *et al.*, 2019; Doll *et al.*, 2019). Asimismo, podría ser interesante repetir los experimentos para incrementar el tamaño muestral para obtener una estadística más robusta.

Contrariamente, RSL3 fue capaz de disminuir la proliferación celular a la concentración más baja empleada (**figuras 6C, 6D, 7C, 7D**), poniendo en relevancia su uso potencial para el tratamiento de este tipo de cáncer y la importancia de GPX4 en la supervivencia celular, coincidiendo con lo observado por Yang y colaboradores en fibroblastos derivados de la piel (Yang *et al.*, 2014).

El tratamiento de OVCA con los inhibidores de ferroptosis (DFO y ferrostatina-1) obtuvieron resultados diferentes. Con el DFO, las células OVCA mostraron una disminución estadísticamente significativas, tanto a 3 como a 6 días, a concentraciones de 500 nM y 1 μ M en la capacidad proliferativa (**figuras 8A, 8B, 9A, 9B**). Una de las características de las células de cáncer de ovario es la alteración en el metabolismo del hierro, en particular acumulan una gran cantidad de hierro a nivel intracelular debido al incremento del receptor de la transferrina y una disminución de la ferroportina (Basuli *et al.*, 2017). El hierro es necesario tanto para la proliferación como para la progresión del ciclo celular, la sobreexpresión de estos procesos la base de, al menos, parte de la dependencia de las células cancerosas del hierro (Basuli *et al.*, 2017). Así, los cambios en el metabolismo del hierro que se observa en el cáncer de ovario no son eventos accidentales, sino que ayudan a la transición a un estado de malignidad: contribuyen de forma importante al crecimiento y a la metástasis (Basuli *et al.*, 2017). Por tanto, esta disminución de la proliferación observadas a concentraciones altas podría deberse a la ausencia de suficiente hierro libre como para sustentar la actividad normal de las células cancerígenas. El tratamiento con ferrostatina-1 dio lugar a resultados totalmente diferentes ya que, a ninguno de los tiempos analizados ni concentraciones empleadas, se aprecian diferencias en la proliferación (**figuras 8C, 8D, 9C, 9D**). Si bien es cierto que el número de réplicas es muy bajo (n=1) y, que sería necesario repetir los experimentos, los resultados obtenidos podrían corroborar la actividad del compuesto como inhibidor que no afecta a la capacidad de proliferación como en otros estudios (Soula *et al.*, 2020)

Seguidamente, comprobamos la capacidad de las OVCA ferroptóticas para actuar como transmisores de señal pudiendo afectar a la viabilidad de células vecinas. El

tratamiento con medio condicionado procedente de células donadoras tratadas con erastina (**figuras 10A, 10B, 11A, 11B**) no fue capaz de afectar a la proliferación a diferencia de lo que se muestra estudios de otros grupos (Nishizawa *et al.*, 2021). Puesto que el tamaño muestral es de $n=1$, sería interesante repetir los experimentos incrementar el valor de n para evaluar y concluir que efecto tiene en la ferroptosis paracrina.

Pese a lo descrito en la bibliografía (Nishizawa *et al.*, 2021), los resultados obtenidos con RSL3 no llegan a mostrar diferencias estadísticamente significativas, aunque haya una cierta tendencia a la disminución de la proliferación a los 6 días con una concentración de 500 nM (**figuras 10C, 10D, 11C, 11D**). No se puede descartar que, está ausencia de significación se deba a errores cometidos durante la manipulación. La desviación estándar observada en el análisis de la absorbancia del cristal violeta procedente de OVCA receptoras tratadas con el medio condicionado procedente de OVCA donadoras tratadas con RSL3 es grande. De esta manera, podría ser interesante repetir los experimentos incrementando el tamaño muestral.

Por otro lado, el tratamiento con el medio condicionado de células OVCA donadoras tratadas con DFO tampoco afectó a la capacidad de proliferación en células receptoras (**figuras 12 y 13**) corroborando la incapacidad de este compuesto para estimular fenómenos de ferroptosis.

El análisis de la integridad de los extractos proteicos mediante tinción de nitrato de plata permitió conocer la buena calidad de las proteína. Así, podrían usarse en un futuro para la realización de estudios proteómicos para el estudio del mecanismos molecular de ferroptosis en cáncer de ovario epitelial.

En definitiva, estos resultados presentan una función prometedora en la clínica para el tratamiento de COE como una nueva alternativa.

6. Conclusiones

El objetivo general de este trabajo se centró en la evaluación de los efectos de moduladores de ferroptosis (erastina, RSL3, DFO y ferrostatina-1) en la capacidad proliferativa de células OVCA, así como el potencial de éstas células tratadas en modificar su microambiente afectando en células receptoras.

Siguiendo el esquema de trabajo y tras haber realizado el análisis de los resultados y la discusión de los mismos, concluimos que:

1. La erastina no afecta a la proliferación de OVCA mientras que RSL3 disminuye la capacidad de proliferación.
2. El DFO disminuye la capacidad de proliferación de OVCA, mientras que la ferrostatina-1 no interviene con la capacidad proliferativa.
3. OVCAAs tratadas con RSL3 disminuyen la capacidad de proliferación de forma paracrina.

7. Bibliografía

- Basuli, D., Tesfay, L., Deng, Z., Paul, B., Yamamoto, Y., Ning, G., Xian, W., McKeon, F., Lynch, M., Crum, C. P., Hegde, P., Brewer, M., Wang, X., Miller, L. D., Dymment, N., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2017). Iron addiction: A novel therapeutic target in ovarian cancer. *Oncogene*, *36*(29), 4089–4099. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.11>
- Bersuker, K., Hendricks, J. M., Li, Z., Magtanong, L., Ford, B., Tang, P. H., Roberts, M. A., Tong, B., Maimone, T. J., Zoncu, R., Bassik, M. C., Nomura, D. K., Dixon, S. J., & Olzmann, J. A. (2019). The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, *575*(7784), 688–692. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2>
- Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(3), 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.11.012>
- Brielmeier, M., Béchet, J. M., Suppmann, S., Conrad, M., Laux, G., & Bornkamm, G. W. (2001). Cloning of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPx) as an anti-apoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells. *BioFactors*, *14*(1–4), 179–190. <https://doi.org/10.1002/biof.5520140123>
- Brown, C. W., Amante, J. J., Chhoy, P., Elaimy, A. L., Liu, H., Zhu, L. J., Baer, C. E., Dixon, S. J., & Mercurio, A. M. (2019). Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export. *Developmental Cell*, *51*(5), 575-586.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.007>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, *149*(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Grocin, A. G., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Mourão, A., Buday, K., Sato,

- M., Wanninger, J., Vignane, T., Mohana, V., Rehberg, M., Flatley, A., Schepers, A., ... Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, *575*(7784), 693–698. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0>
- Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Irmeler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., Prokisch, H., Trümbach, D., Mao, G., Qu, F., Bayir, H., Füllekrug, J., Scheel, C. H., Wurst, W., Schick, J. A., ... Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology*, *13*(1), 91–98. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>
- Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., & Jiang, X. (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, *26*(9), 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>
- Gao, M., Monian, P., Quadri, N., Ramasamy, R., & Jiang, X. (2015). Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Molecular Cell*, *59*(2), 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.011>
- Geng, N., Shi, B. J., Li, S. L., Zhong, Z. Y., Li, Y. C., Xua, W. L., Zhou, H., & Cai, J. H. (2021). Knockdown of ferroportin accelerates erastin-induced ferroptosis in neuroblastoma cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *22*(12), 3826–3836. https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15267
- Hangauer, M. J., Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Bole, D., Eaton, J. K., Matov, A., Galeas, J., Dhruv, H. D., Berens, M. E., Schreiber, S. L., McCormick, F., & McManus, M. T. (2017). Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature*, *551*(7679), 247–250. <https://doi.org/10.1038/nature24297>
- Harris, I. S., Endress, J. E., Coloff, J. L., Selfors, L. M., McBrayer, S. K., Rosenbluth, J. M., Takahashi, N., Dhakal, S., Koduri, V., Oser, M. G., Schauer, N. J., Doherty, L. M., Hong, A. L., Kang, Y. P., Younger, S. T., Doench, J. G., Hahn, W. C., Buhrlage, S. J., DeNicola, G. M., ... Brugge, J. S. (2019). Deubiquitinases Maintain Protein Homeostasis and Survival of Cancer Cells upon Glutathione Depletion. *Cell Metabolism*, *29*(5), 1166–1181.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.020>
- Hassannia, B., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. (2019). Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer. *Cancer Cell*, *35*(6), 830–849. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.002>
- Hou, W., Xie, Y., Song, X., Sun, X., Lotze, M. T., Zeh, H. J., Kang, R., & Tang, D. (2016). Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy*, *12*(8), 1425–1428. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1187366>

- Iwai, K. (2019). Regulation of cellular iron metabolism: Iron-dependent degradation of IRP by SCFFBXL5 ubiquitin ligase. *Free Radical Biology and Medicine*, *133*, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.011>
- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S. J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., & Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, *520*(7545), 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature14344>
- Jiang, X., Stockwell, B. R., & Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*(4), 266–282. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>
- Kang, R., Kroemer, G., & Tang, D. (2019). The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radical Biology and Medicine*, *133*(6), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.074>
- Koppula, P., Lei, G., Zhang, Y., Yan, Y., Mao, C., Kondiparthi, L., Shi, J., Liu, X., Horbath, A., Das, M., Li, W., Poyurovsky, M. V., Olszewski, K., & Gan, B. (2022). A targetable CoQ-FSP1 axis drives ferroptosis- and radiation-resistance in KEAP1 inactive lung cancers. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29905-1>
- Lei, G., Zhuang, L., & Gan, B. (2021). mTORC1 and ferroptosis: Regulatory mechanisms and therapeutic potential. *BioEssays*, *43*(8), 1–11. <https://doi.org/10.1002/bies.202100093>
- Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. *The Lancet*, *393*(10177), 1240–1253. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32552-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2)
- Li, L., Qiu, C., Hou, M., Wang, X., Huang, C., Zou, J., Liu, T., & Qu, J. (2021). Ferroptosis in Ovarian Cancer: A Novel Therapeutic Strategy. *Frontiers in Oncology*, *11*(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.665945>
- Lin, C. C., & Chi, J. T. (2020). Ferroptosis of epithelial ovarian cancer: genetic determinants and therapeutic potential. *Oncotarget*, *11*(39), 3562–3570. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27749>
- Liu, N., Lin, X., & Huang, C. (2020). Activation of the reverse transsulfuration pathway through NRF2/CBS confers erastin-induced ferroptosis resistance. *British Journal of Cancer*, *122*(2), 279–292. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0660-x>
- Magtanong, L., Ko, P. J., To, M., Cao, J. Y., Forcina, G. C., Tarangelo, A., Ward, C. C., Cho, K., Patti, G. J., Nomura, D. K., Olzmann, J. A., & Dixon, S. J. (2019). Exogenous

- Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. *Cell Chemical Biology*, 26(3), 420–432.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.11.016>
- Nishizawa, H., Matsumoto, M., Chen, G., Ishii, Y., Tada, K., Onodera, M., Kato, H., Muto, A., Tanaka, K., & Igarashi, K. (2021). Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells. *Cell Death and Disease*, 12(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03613-y>
- Shah, R., Shchepinov, M. S., & Pratt, D. A. (2018). Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. *ACS Central Science*, 4(3), 387–396. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00589>
- Soula, M., Weber, R. A., Zilka, O., Alwaseem, H., La, K., Yen, F., Molina, H., Garcia-Bermudez, J., Pratt, D. A., & Birsoy, K. (2020). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers. *Nature Chemical Biology*, 16(12), 1351–1360. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0613-y>
- Tang, D. (2019). Ferroptosis in health and disease. In *Ferroptosis in Health and Disease*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-26780-3>
- Tarangelo, A., Magtanong, L., Bieging-Rolett, K. T., Li, Y., Ye, J., Attardi, L. D., & Dixon, S. J. (2018). p53 Suppresses Metabolic Stress-Induced Ferroptosis in Cancer Cells. *Cell Reports*, 22(3), 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.077>
- Tesfay, L., Paul, B. T., Konstorum, A., Deng, Z., Cox, A. O., Lee, J., Furdui, C. M., Hegde, P., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2019). Stearoyl-CoA desaturase 1 protects ovarian cancer cells from ferroptotic cell death. *Cancer Research*, 79(20), 5355–5366. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0369>
- Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Dhruv, H. D., Gill, S., Eichhoff, O. M., Seashore-Ludlow, B., Kaffenberger, S. D., Eaton, J. K., Shimada, K., Aguirre, A. J., Viswanathan, S. R., Chattopadhyay, S., Tamayo, P., Yang, W. S., Rees, M. G., Chen, S., Boskovic, Z. V., Javaid, S., Huang, C., ... Schreiber, S. L. (2017). Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature*, 547(7664), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nature23007>
- Wang, X., Hua, P., He, C., & Chen, M. (2022). Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: Molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, xxx. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.03.020>
- Wang, Y., Yang, L., Zhang, X., Cui, W., Liu, Y., Sun, Q., He, Q., Zhao, S., Zhang, G., Wang, Y., & Chen, S. (2019). Epigenetic regulation of ferroptosis by H2B monoubiquitination and p53. *EMBO Reports*, 20(7), 1–16.

<https://doi.org/10.15252/embr.201847563>

- Xie, Y., Zhu, S., Song, X., Sun, X., Fan, Y., Liu, J., Zhong, M., Yuan, H., Zhang, L., Billiar, T. R., Lotze, M. T., Zeh, H. J., Kang, R., Kroemer, G., & Tang, D. (2017). The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. *Cell Reports*, *20*(7), 1692–1704. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.055>
- Yang, W. S., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, *156*(1–2), 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>
- Yang, Y., Luo, M., Zhang, K., Zhang, J., Gao, T., Connell, D. O., Yao, F., Mu, C., Cai, B., Shang, Y., & Chen, W. (2020). Nedd4 ubiquitylates VDAC2/3 to suppress erastin-induced ferroptosis in melanoma. *Nature Communications*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14324-x>
- Zhang, Y., Swanda, R. V., Nie, L., Liu, X., Wang, C., Lee, H., Lei, G., Mao, C., Koppula, P., Cheng, W., Zhang, J., Xiao, Z., Zhuang, L., Fang, B., Chen, J., Qian, S. B., & Gan, B. (2021). mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21841-w>
- Zhao, Y., Li, Y., Zhang, R., Wang, F., Wang, T., & Jiao, Y. (2020). The role of Erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy. *Oncotargets and Therapy*, *13*, 5429–5441. <https://doi.org/10.2147/OTT.S254995>
- Zheng, J., & Conrad, M. (2020). The Metabolic Underpinnings of Ferroptosis. *Cell Metabolism*, *32*(6), 920–937. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.011>
- Zou, Y., Palte, M. J., Deik, A. A., Li, H., Eaton, J. K., Wang, W., Tseng, Y. Y., Deasy, R., Kost-Alimova, M., Dančik, V., Leshchiner, E. S., Viswanathan, V. S., Signoretti, S., Choueiri, T. K., Boehm, J. S., Wagner, B. K., Doench, J. G., Clish, C. B., Clemons, P. A., & Schreiber, S. L. (2019). A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09277-9>