



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Estudio del papel de la ferroptosis en la resistencia al
tratamiento quimioterapéutico en Cáncer de Ovario**

**Estudo do papel da ferroptose na resistencia ao tratamento
con quimioterapia no Cancro de Ovario**

**Role of ferroptosis in resistance to chemotherapy treatment
in Ovarian Cancer**

Ismael López Calvo

Curso: 2022 - 2023. Convocatoria: Junio

Director: Ángel José Vizoso Vázquez

Director: Juan Antonio Fafián Labora



Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Estudio del papel de la ferroptosis en la resistencia al tratamiento
quimioterapéutico en Cáncer de Ovario**

**Estudo do papel da ferroptose na resistencia ao tratamento con
quimioterapia no Cancro de Ovario**

**Role of ferroptosis in resistance to chemotherapy treatment in
Ovarian Cancer**

Ismael López Calvo

A Coruña, Junio 2023

Dr. Juan Antonio Fafián Labora y Dr. Ángel José Vizoso Vázquez en calidad de tutor/es de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador

Contenido

1	Resumen	1
1.1	Abstract.....	1
2	Introducción	2
2.1	Ferroptosis.....	3
2.1.1	Regulación de la Ferroptosis	4
2.1.2	Modulación de la Ferroptosis	6
3	Objetivos	7
4	Parte experimental.....	8
4.1	Cultivo Celular.....	8
4.2	Inducción de Ferroptosis <i>in vitro</i>	8
4.2.1	Tinción de Cristal Violeta.....	9
4.2.2	Medición de parámetros de Ferroptosis	10
4.3	Inducción de Ferroptosis en <i>Knockdowns</i>	12
4.3.1	Aislamiento y cuantificación de proteína procedente de células en las que se ha realizado silenciamiento	13
4.3.2	Western Blot.....	13
4.3.3	Inducción de Ferroptosis en <i>Knockdowns</i> para GPX4.....	14
4.4	Estadística	14
5	Resultados.....	15
5.1	Inducción de ferroptosis en un modelo <i>in vitro</i>	15
5.2	Medición de parámetros de Ferroptosis.....	16
5.3	Generación de células resistentes con el silenciamiento de <i>GPX4</i> y <i>FSP1</i> en la Ferroptosis.....	17

5.3.1	Evaluación de la resistencia de las células de ovario epitelial con el silenciamiento de GPX4 tras la inducción de ferroptosis empleando dos líneas celulares de cáncer de ovario epitelial	18
6	Discusión.....	20
7	Conclusiones.....	22
7.1	Conclusions	22
8	Bibliografía.....	23

ABREVIATURAS

(v/v): Volumen/volumen

°C: Grados centígrados

ACD: del inglés *Accidental Cell Death*

AIFM2: del inglés *Apoptosis Inducing Factor Mitochondrial 2*

BCA: del inglés *Bicinchoninic Acid*

BSA: del inglés *Bovine Serum Albumin*

CA125: del inglés *Cancer Antigen 125*

CoQ10: Coenzima Q

DMEM: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DTT: del inglés *Dithiothreitol*

FBS: del inglés *Fetal Bovine Serum*

FIN56: del inglés *Ferroptosis Inducer 56*

FINO2: del inglés *Ferroptosis Inducer O2*

FSP1: del inglés *Ferroptosis Supressor Protein1*

GPX4: del inglés *Glutathion Peroxidase 4*

GSH: Glutación forma reducida

GSS: Glutationsintetasa

GSSG: Glutación forma oxidada

HRP: del inglés *Horseradish Peroxidase*

MDA: del inglés *Malondialdehyde*

ml: Mililitro

min: Minuto/s

NAD(P)H: del inglés *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

nm: Nanómetros

nM: Nanomolar

P/S: Penicilina/estreptomicina

PBS: del inglés *Phosphate Buffered Saline*

PBS-T: PBS suplementado con Tween 20

PFA: Paraformaldehído

PL-PUFA: del inglés *Phospholipid-Polyunsaturated Fatty Acids*

RCD: del inglés *Regulated Cell Death*

RISC: del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*

ROS: del inglés *Reactive Oxygen Species*

RSL3: del inglés *RAS-Selective Lethal 3*

SDS: del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*

shRNAs: del inglés *Short Hairpin RNA*

siRNA: del inglés *Small Interfering RNA*

SLC3A2: del inglés *Solute Carrier Family 3 Member 2*

SLC7A11: del inglés *Solute Carrier Family 7 Member 11*

SQS: del inglés *Squalene Synthase*

TBA: del inglés *2-Thiobarbituric Acid*

V: Voltios

µg: Microgramos

µl: Microlitros

µM: Micromolar

1 RESUMEN

La baja tasa de supervivencia y las pocas alternativas de terapia para el cáncer de ovario epitelial hacen necesaria la búsqueda de nuevas opciones. La ferroptosis, un tipo de muerte celular regulada no apoptótica surge como una prometedora alternativa de tratamiento para este tipo de cáncer por las características que presenta: sobreexpresión de genes relacionados en la regulación de la homeostasis del hierro y proliferación celular, o un metabolismo anormal de hierro. Aunque la ferroptosis es un proceso descrito recientemente, el cual sigue estudiándose, en este trabajo mostramos cómo afecta a la proliferación celular la inducción de ferroptosis, así como su caracterización mediante la evaluación de diferentes parámetros. Así como también buscamos generar células resistentes a la ferroptosis, mediante *knockdowns* de *GPX4* (del inglés *Glutathion Peroxidase 4*) y *FSP1* (del inglés *Ferroptosis Suppressor Protein 1*). Lo que se observa es que la inducción de ferroptosis mediante erastina y RSL3 (del inglés *RAS-Selective Lethal 3*) disminuye la proliferación de células de cáncer de ovario epitelial, así como la importancia de *GPX4* en su regulación, gracias a la generación de células de cáncer de ovario epitelial *knockdown* de *GPX4*. Estos resultados muestran cómo su inducción parece un prometedor tratamiento frente al cáncer de ovario epitelial, siendo capaz de disminuir la proliferación de sus células tumorales. Las perspectivas son continuar esclareciendo cómo funciona la ferroptosis y cómo otros nuevos tratamientos relacionados pueden dar mejores resultados, probando inductores o actuando sobre otros ejes de regulación.

Palabras clave: Ferroptosis, cáncer de ovario, GPX4, regulación, silenciamiento, knockdown

1.1 ABSTRACT

The low survival rate and the few therapy alternatives for epithelial ovarian cancer make it necessary to search for new options. Ferroptosis, a type of non-apoptotic regulated cell death, emerges as a promising alternative treatment for this type of cancer due to its characteristics: overexpression of genes related to the regulation of iron homeostasis and cell proliferation, or abnormal iron metabolism. Although ferroptosis is a recently described process, which is still being studied, in this work we show how the induction of ferroptosis affects cell proliferation, as well as its characterisation through the evaluation of different parameters. We also sought to generate cells resistant to ferroptosis with knockdowns of *GPX4* (*Glutathion Peroxidase 4*) and *FSP1* (*Ferroptosis Suppressor Protein 1*). What is observed is that the induction of ferroptosis by erastin and RSL3 (*RAS-Selective Lethal3*) decreases the proliferation of epithelial ovarian cancer cells, as well as the importance of *GPX4* in its regulation, thanks to the generation of epithelial ovarian cancer cells knockdown of *GPX4*. These results show how its induction appears to be a promising treatment for epithelial ovarian cancer, being able to reduce the proliferation of its tumour cells. The prospects are to continue to clarify how ferroptosis works and how other new related treatments can give better results, by testing inducers or acting on other regulatory axes.

Keywords: Ferroptosis, ovarian cancer, GPX4, regulation, silencing, knockdown

2 INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el cáncer de ovario es uno de los más relevantes a nivel de diagnósticos, llegando a ser el quinto que más muertes causa en el caso de mujeres, y el primero en los que a aparato reproductor femenino se refiere¹. Si hablamos de cifras, en 2020 se estiman 313.959 nuevos casos diagnosticados y 207.252 muertes según la Asociación Española Contra el Cáncer².

Uno de los problemas que presenta el cáncer de ovario es su diagnóstico tardío, haciendo que la tasa de supervivencia a 5 años vista sea únicamente del 30-40%, ya que, por ejemplo, algunos de sus biomarcadores más utilizados, como CA125 (del inglés, *Cancer Antigen 125*), que presenta una sensibilidad baja a las técnicas de detección en estadios tempranos³. Si a esto le sumamos los pocos síntomas que se presentan en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad junto con la resistencia frente a la quimioterapia, los pacientes se encuentran con un mal pronóstico⁴.

Sin embargo, no existe un único tipo cáncer de ovario, ya que podemos hablar de tres clases de este:

- Carcinoma epitelial: se trata del más común, en torno al 97% de los casos, recubriendo la superficie externa del ovario, siendo común que se extienda a los órganos de la pelvis y el abdomen⁵.
- Tumores de células germinativas: representan un 2% de los cánceres de ovario, el cuál comienza en los óvulos⁵.
- Tumores de células estromales: el menos común de los tres, en torno al 1%, se forma en los tejidos que sostienen los ovarios⁵.

El hecho de que el diagnóstico normalmente se realice en etapas tardías de la enfermedad, hace que en muchos casos la tasa de supervivencia sea muy baja, sin embargo, sí que puede pasar a ser un problema crónico con etapas sin síntomas seguidas de recidivas⁶. En cuanto al tratamiento normalmente se utilizan tres estrategias; cirugía, quimioterapia y terapia dirigida⁷.

El procedimiento estándar que se lleva a cabo cuando se diagnostica cáncer de ovario consiste en una cirugía citoreductora seguida de tratamiento quimioterapéutico basado en compuestos de platino, como el cis-platino o carboplatino⁶. La quimioterapia consiste en 6 ciclos de regímenes de platino y taxanos (fármacos que impiden la proliferación celular al detener la mitosis⁸) intravenosos, aunque en los casos que están en estadios muy tempranos, puede omitirse, recurriendo únicamente a la cirugía citoreductora⁶. En este sentido, uno de los retos en la clínica son aquellos casos de cáncer que presentan resistencia a la quimioterapia, es decir, no se aprecia remisión alguna tras el tratamiento, o aquellos que tras la terapia vuelven a resurgir. Este tipo de tumores centran mucha atención porque estos tratamientos tienen una gran relevancia, al ser de los más comúnmente utilizados a la hora de enfrentarse al cáncer.

Por lo que la búsqueda de nuevas terapias frente al cáncer de ovario ha centrado muchos esfuerzos en el ámbito de la investigación oncológica en los últimos años.

Así, recientemente, la ferroptosis aparece como una opción prometedora para el tratamiento de este tipo de tumores, ya que los diferentes estudios muestran como la regulación de la ferroptosis afecta a la sensibilidad de los tumores a la quimioterapia, tratándose de un tipo de muerte celular regulada, que se caracteriza principalmente por un metabolismo anormal de hierro y los productos de peroxidación de lípidos⁹. Estas características de la ferroptosis la convierten en una buena candidata para el tratamiento de cáncer de ovario epitelial, ya que se trata de células con niveles de hierro intracelular elevados, con alta expresión de genes relacionados con su proliferación celular e implicados en la regulación de homeostasis de hierro¹⁰.

2.1 FERROPTOSIS

En esta búsqueda de nuevos tratamiento, en 2012, Dixon *et al.* describieron un nuevo proceso de muerte celular regulada, RCD (del inglés, *Regulated Cell Death*), el cual se conoce como ferroptosis, siguiendo un proceso no apoptótico, ya que la membrana celular pierde su integridad y no participan las caspasas¹¹. Las RCD se diferencian de las ACD (del inglés *Accidental Cell Death*), porque están determinadas genéticamente y poseen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis del organismo¹⁰. Dentro de las RCD encontramos apoptosis, necroptosis, piroptosis, y ferroptosis. En el caso de la apoptosis, piroptosis, necroptosis se puede hablar de suicidio celular, ya que existe la expresión y/o modificación postraduccional de proteínas específicas para promover la muerte celular¹². La apoptosis se caracteriza por la intervención de caspasas y formación de cuerpos apoptóticos, mientras que en la piroptosis, aunque también participen caspasas (caspasa 1 y caspasa-4/5/11) destaca por la respuesta inflamatoria que tiene lugar¹⁰. La necroptosis se caracteriza por la participación de citocinas¹⁰.

Además, también cabe destacar la autofagia, un tipo de muerte celular programada no apoptótica que se caracteriza por la vacuolización de material intracelular para su transporte y degradación en los lisosomas.

Por otro lado, la ferroptosis es un tipo de RCD que se basa en la acumulación de peróxidos lipídicos, provenientes de la peroxidación de PL-PUFAs (del inglés *phospholipid-polyunsaturated fatty acids*) inducida por el ion ferroso (Fe(II))¹². En cuanto a sus características bioquímicas, las células que entran en ferroptosis muestran un desbalance en sus niveles de oxidación-reducción; un aumento en la presencia intracelular de ROS (del inglés *Reactive Oxygen Species*), y un descenso en los niveles de NAD(P)H (del inglés *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)¹¹.

Además, dentro de las muertes celulares no apoptóticas, la ferroptosis se diferencia de otras por que tiene lugar por la actividad metabólica de la célula, como es la producción de hidroperóxidos lipídicos, y si se inhibe este proceso, se evita la muerte celular¹².

La presencia en las células de cáncer de ovario epitelial de niveles elevados de ion ferroso (Fe(II)), hacen que la modulación de la ruta de regulación de la ferroptosis sea un tratamiento esperanzador contra este tipo de tumores.

2.1.1 Regulación de la Ferroptosis

Al tratarse de una RCD, causada por peroxidación lipídica y una consiguiente ruptura de la membrana celular¹², la regulación de la ferroptosis necesita una gran precisión para evitar que se desencadene fuera del contexto adecuado y se den muertes celulares innecesarias. Así, se han descrito varias rutas implicadas en este proceso, pero en este trabajo nos centraremos en las dos mejor estudiadas; el eje Cist(e)ína/GSH/GPX4 y el eje FSP1-CoQ10-NAD(P)H.

2.1.1.1 Eje Cist(e)ína/GSH/GPX4

En esta ruta de regulación de la ferroptosis una de las proteínas claves es el glutatión, que, en su forma reducida, GSH, se trata de un tripéptido que contiene un grupo tiol (γ -L- glutamil-L- cisteinilglicina). El GSH resulta de elevada importancia en cuanto a la defensa frente a compuestos oxidantes, debido a sus propiedades oxidorreductoras¹². Para su biosíntesis es necesaria la presencia de cisteína disponible.

Para tener cisteína disponible para la síntesis de GSH, es necesaria la acción del sistema Xc⁻, una proteína transmembrana dependiente de cloruro responsable del antiporte de glutamato y cistina¹³, como se muestra en la **Figura 1**, tratándose de un heterodímero unido por puentes disulfuro, teniendo como subunidades SLC7A11 (del inglés *Solute Carrier Family 7 Member 11*) y SLC3A2 (del inglés *Solute Carrier Family 3 Member 2*)¹⁴. Aunque también existen otras rutas para obtener cisteína, como la de la transulfuración, en la que a partir de homocisteína se obtiene cisteína, en un proceso mediado regulado por la vitamina B6^{12,15}. Esta cistina se reduce dando lugar a cisteína, la cual por acción de la glutamato-cisteína ligasa, da lugar a γ - glutamylcisteina. Así, para dar lugar finalmente a GSH se necesita de la acción de la glutathione sintetasa, GSS, y presencia de glicina¹⁶.

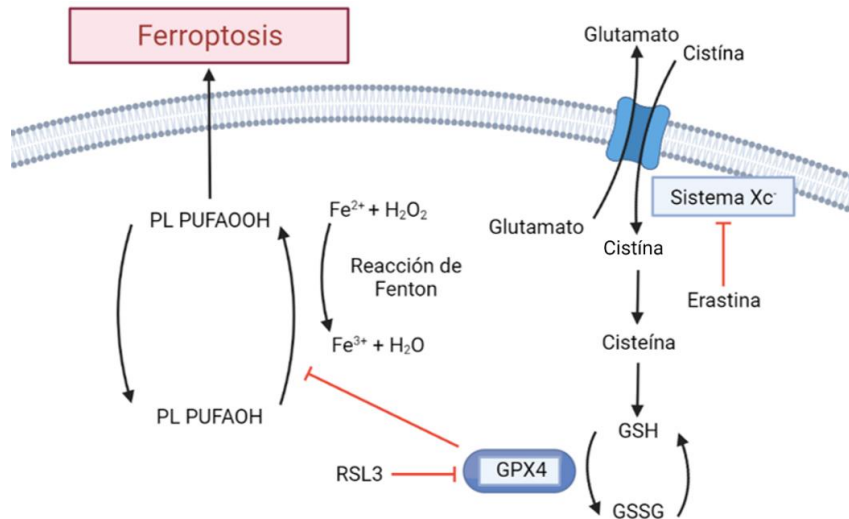


Figura 1. Resumen esquemático del eje Cist(e)ina/GSH/GPX4. Este mecanismo de regulación se basa en la entrada de una fuente de cisteína en la célula, a través del sistema Xc⁻, para poder así sintetizar el glutatión en su forma reducida, GSH, el cual reducirá la glutatión peroxidasa GPX4, que inhibe la peroxidación lipídica, impidiendo la ferroptosis. GSH: Forma reducida del glutatión, GSSG: Forma oxidada del glutatión, GPX4: Glutathion Peroxidase 4, RSL3: RAS-Selective Lethal 3, PL-PUFA: phospholipid-polyunsaturated fatty acids. Basado en *Ferroptosis in Ovarian Cancer: A Novel Therapeutic Strategy* de Li, L. et al. 2021.

Una vez se obtiene GSH, este es capaz de ceder equivalentes reductores a la glutatión peroxidasa GPX4, para que, esta sea capaz de reaccionar posteriormente con los PL-PUFA evitando que pasen a sus formas peroxidadas, a las que se puede dar lugar por la acción de ROS y Fe(II), que al interactuar con la membrana plasmática comprometan su integridad, provocando la ferroptosis¹⁷.

En cuanto a la regulación de esta ruta, existen dos puntos principales: el sistema Xc⁻ y GPX4, de forma que su modulación con erastina y RSL3 (del inglés *RAS-Selective Lethal 3*), los cuales inhiben el sistema Xc⁻ y GPX4 respectivamente, puede desencadenar la ferroptosis, al no poder inhibirse la formación de peróxidos de PL-PUFAs.

2.1.1.2 Eje FSP1-CoQ10-NAD(P)H

En esta ruta de regulación (**Figura 2**), la proteína FSP1, la cual también se nombra como AIFM2 (del inglés *Apoptosis Inducing Factor Mitochondrial 2*), se puede encontrar asociada a la membrana externa de las mitocondrias o en su forma citosólica¹⁸. Una vez sufre el proceso de miristoilación, que consiste en la adición de un grupo miristoíl, derivado del ácido mirístico, al extremo N-terminal¹⁹, se mueve a la membrana plasmática.

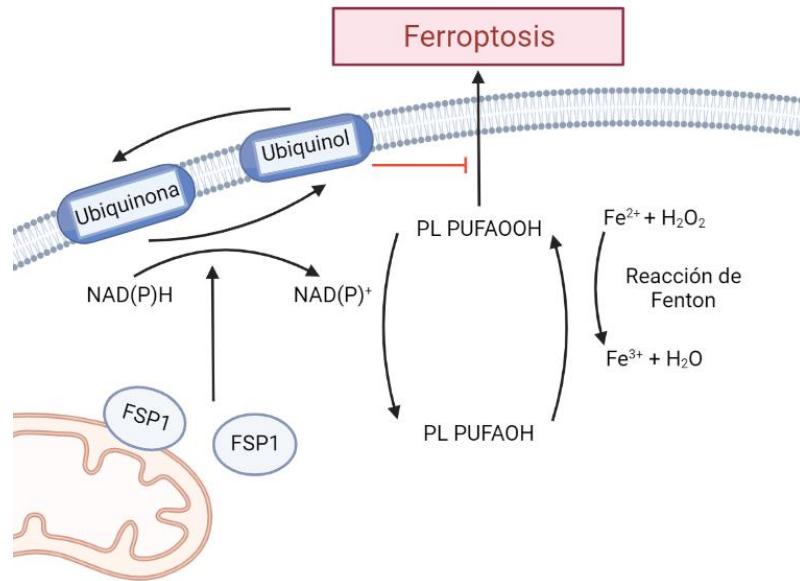


Figura 2. Resumen esquemático del eje FSP1-COQ₁₀-NAD(P)H. Para evitar que se llegue a dar la ferroptosis, este mecanismo de regulación se basa en la acción de la proteína FSP1, la cual se puede encontrar en el citosol o asociada a la membrana externa de las mitocondrias. Así, cuando FSP1 sufre el proceso de miristoilación este migra a la membrana plasmática¹⁸. FSP1: Ferroptosis Suppressor Protein1, NAD(P)H: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, PL-PUFA: phospholipid-polyunsaturated fatty acids. Basado en *Ferroptosis in Ovarian Cancer: A Novel Therapeutic Strategy* de Li, L. et al. 2021.

Al estar FSP1 unida a la membrana plasmática, es capaz de reducir la ubiquinonona, también conocida como coenzima Q (CoQ₁₀), a ubiquinol, utilizando NAD(P)H, proveniente de la ruta de las pentosas fosfato¹¹. El papel del ubiquinol es reducir la oxidación lipídica mediante el atrapamiento de radicales, inhibiendo así que se llegue a una situación de ferroptosis¹⁸.

Además, esta ruta es un mecanismo que se compensa con la anterior en caso de que la expresión de GPX4 se vea afectada, de forma que aunque se inhiba una ruta para evitar la ferroptosis, siguen existiendo alternativas para que no llegue a desencadenarse^{19,20}.

2.1.2 Modulación de la Ferroptosis

Las características que presentan las células de cáncer de ovario epitelial, así como el conocimiento de sus rutas de regulación, hacen de la modulación de la ferroptosis una buena alternativa que abordar en este trabajo para el posible tratamiento de cáncer de ovario epitelial. En el caso de la inducción de ferroptosis existen 4 clases de fármacos²¹:

- Clase I: Se trata de inhibidores del Sistema Xc⁻, lo cual impide la entrada de cisteína en la célula, que es necesaria para la síntesis de glutatión, que actúa como antioxidante¹². Uno de los compuestos más utilizados de esta clase es la erastina²¹.

- Clase II: Estos inductores se unen covalentemente a GPX4 inhibiendo su actividad, un ejemplo es RSL3²¹.
- Clase III: Provocan el agotamiento de la proteína GPX4 además de CoQ₁₀, a través de la ruta SQS-mevalonato (del inglés *Squalene Synthase*), por ejemplo, FIN56 (del inglés *Ferroptosis Inducer 56*)²¹.
- Clase IV: Inducen la peroxidación lipídica a través de oxidación del hierro, además de provocar indirectamente la inactivación de GPX4, un ejemplo sería FINO₂ (del inglés *Ferroptosis Inducer O₂*)²¹.

Por lo que en este trabajo se buscará estudiar la ferroptosis como una terapia alternativa para el tratamiento de cáncer de ovario epitelial, actuando sobre sus ejes de regulación. En este caso utilizaremos los inductores de ferroptosis, erastina y RSL3, al ser de los más utilizados.

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la ferroptosis como posible terapia alternativa frente al cáncer de ovario, para lo que se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la proliferación celular tras la inducción de ferroptosis en células de cáncer de ovario epitelial, en las líneas celulares A2780 y SKOV3.
- Evaluar los niveles de hierro, ROS (del inglés *Reactive Oxygen Species*) y MDA (del inglés *Malondialdehyde*), tras la inducción de ferroptosis en células de cáncer de ovario epitelial.
- Generar líneas celulares resistentes a la ferroptosis con el silenciamiento de los genes *GPX4* y *FSP1* en la regulación de la ferroptosis, generando *knockdowns* de los mismos.
- Evaluar el efecto del silenciamiento para el gen *GPX4* en la proliferación celular tras la inducción de ferroptosis en *knockdowns* para el gen *GPX4* en células de cáncer de ovario epitelial.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 CULTIVO CELULAR

Para el cultivo celular de las diferentes líneas de cáncer de ovario epitelial se utilizó como medio de cultivo DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Lonza, España), al cual se le añadió FBS (del inglés *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, España) a una concentración 10 % (v/v) para conseguir un correcto crecimiento celular, así como también se añadieron antibióticos P/S (penicilina/estreptomicina) (ThermoFisher Gibco, Estados Unidos) al 1 % (v/v), para evitar posibles contaminaciones bacterianas. El cultivo celular se llevó a cabo utilizando placas de cultivo de 100 mm² de superficie (Corning, España).

La manipulación de los cultivos celulares se realizó en cabina de flujo laminar vertical y bioseguridad (Telstar AV-30/70, España), mientras que, para el mantenimiento y crecimiento de los cultivos, estos se mantuvieron en incubadores (Sanyo CO₂ Incubator, España) en condiciones de 37°C de temperatura, humedad del 95 % y una presión de CO₂ del 5 % (v/v).

Para este trabajo se utilizaron las líneas celulares de cáncer de ovario epitelial A2780 y SKOV3, procediendo A2780 de carcinoma²² y SKOV3 de adenocarcinoma²³ (ATCC, Reino Unido). Estas líneas celulares presentan una morfología epitelial y se disponen en monocapa sobre la placa, y en el caso de A2780 también son viables en suspensión. Cuando se llegó a una confluencia aproximada del 80-90 %, se recogieron las células para llevar a cabo los diferentes experimentos. Para ello, se lavaron los cultivos para posteriormente añadirles tripsina 1X (ThermoFisher, España) y se incubaron 5 minutos a 37 °C para que las células se despegasen de la placa. Después, se añadió medio de cultivo para inactivar la tripsina y se centrifugaron a 1.500 rpm, 5 minutos. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet con las células, que se resuspendieron utilizando medio de cultivo. Posteriormente se utilizó una cámara Neubauer (ThermoFisher, España) para realizar un recuento en microscopio (Nikon eclipse TS100, España) y poder utilizar la concentración de células deseadas para la realización de los experimentos.

Para asegurar que se trabajó con cultivos libres de *mycoplasma*, siendo esta una de las contaminaciones más frecuentes en laboratorios con cultivos celulares, se llevó a cabo un test de *mycoplasma* basado en el descrito en *Basic Cell Culture Protocols*²⁴.

4.2 INDUCCIÓN DE FERROPTOSIS *IN VITRO*

Para la inducción de ferroptosis en las líneas celulares se trabajó tanto con erastina, como con RSL3, buscando inducir ferroptosis al actuar sobre el sistema Xc⁻ y sobre GPX4, como se vio en los apartados 2.1.1.1 y 2.1.2. Para ello se utilizaron placas de cultivo celular de 6 pocillos (9,6 cm²) en los que se sembraron 50.000 células/pocillo. Tras la siembra, se dejó pasar un día para que las células se adhiriesen a los pocillos y luego se retiró el medio original y se les añadió

a los pocillos 2 ml de medio con la concentración correspondiente de los inductores de ferroptosis.

En este caso se trabajó con erastina y RSL3 a concentraciones de 1 μ M, decidiendo utilizar esta concentración basándonos en estudios previos del grupo²⁵. De forma que, se realizaron experimentos con ambas líneas celulares, en los que se añadían los inductores el día 0 (24 horas después del sembrado), se cambió el medio y se renovó el inductor de ferroptosis el día 3 y se recogió el experimento el día 6, como se muestra en la **Figura 3**.

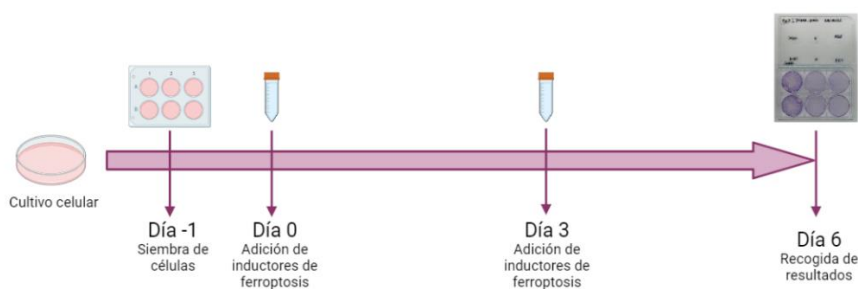


Figura 3. Esquema de la realización de los experimentos de proliferación celular tras la inducción de ferroptosis in vitro. El día -1 se sembraron las células a una concentración de 50.000 células/pocillo, después, se le añadieron los inductores de ferroptosis, erastina y RSL3, los días 0 y 3, para finalmente, el día 6 poder recoger los resultados.

Finalmente, se procede a la evaluación de los resultados obtenidos, mediante las técnicas descritas a lo largo de la memoria.

4.2.1 Tinción de Cristal Violeta

Para la tinción de cristal violeta, se retiró el medio de los pocillos de la placa de cultivo, se lavaron dos veces con PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*), las células fueron fijadas, para así mantener las células lo más inalteradas posibles respecto a cuando estaban vivas, con paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v) (Sigma-Aldrich, España) durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente, se retiró el PFA y se lavaron de nuevo dos veces con PBS. Luego se añadió el colorante cristal violeta, a una concentración del 0,5 % (v/v) (Sigma-Aldrich, España). Se incubaron durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró y se dejaron secar los pocillos de las placas en los que se ven las células teñidas, para posteriormente escanear las placas.

Una vez los pocillos estuvieron secos, se procedió a disolver el cristal violeta empleando ácido acético al 30 % (v/v) (Merk, Alemania). De nuevo se llevó la placa a agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se midió la absorbancia de los pocillos a la longitud de onda de 590 nm empleando un espectrofotómetro NanoQuant (Tecan Infinite M200, Estados Unidos).

4.2.2 Medición de parámetros de Ferroptosis

Para poder continuar caracterizando la inducción de ferroptosis en células de cáncer de ovario, se midieron los niveles de hierro (Fe(II) y hierro total (Fe(Tot))), ya que aumentan al establecerse la ferroptosis, ROS, porque se forma por estrés oxidativo, y MDA, que se trata de un producto de la peroxidación lipídica.

Para llevar a cabo estas medidas se repitió el experimento que se muestra en la **Figura 3**, pero el día 6 en lugar de realizar la tinción con cristal violeta, se recogió el sobrenadante de los pocillos en tubos de 1,5 ml (Eppendorf, España) y se centrifugaron a 1500 rpm, durante 5 minutos para recoger las células que ya están muertas, al haber sufrido ferroptosis. Los pocillos se lavaron con suero salino y luego se les añadieron 100 µl de tampón Tris-HCl (40 mM, pH=7,4) (Thermo Fisher, Estados Unidos), realizando un raspado en la superficie de los pocillos de la placa de cultivo, de forma que se recogen las células en el mismo tubo de 1,5 ml en el que se recogieron las células muertas anteriormente.

4.2.2.1 Cuantificación de proteína

Para poder evaluar los resultados de los diferentes parámetros de ferroptosis es necesario conocer la concentración de proteínas de las muestras recogidas, para utilizar siempre la misma cantidad, en nuestro caso 2 µg para la medición de MDA, o en su defecto obtener resultados en función de la concentración de proteína de la muestra, para la medición de niveles de Fe y ROS.

Para ello se utilizó un *kit* comercial de BCA (del inglés *Bicinchoninic Acid*) (ThermoFisher, España), en el que, para calcular la concentración de proteínas de nuestras muestras, se preparó previamente una recta de calibrado utilizando BSA (del inglés *Bovine Serum Albumin*) con disoluciones de entre 0 y 2.500 µg/ml. Posteriormente, se mezclaron tanto las muestras como el calibrado, con la mezcla de reactivos A y B, en una proporción 1:50, y se midió la absorbancia a 480 nm en un espectrofotómetro NanoQuant (Tecan Infinite M200, Estados Unidos).

4.2.2.2 Medición de niveles de ROS

Para la medición de ROS en las muestras, se utilizó el *kit* comercial *ROS Detection Assay Kit* (Canvax, España), el cual se basa en la reacción mostrada en la **Figura 4**, para lo que se tomaron 5 µl de cada muestra por duplicado, que se añadieron a los pocillos de una placa de

96 pocillos (Corning, España). Después se les añadió el sustrato fluorescente, en este caso H₂DCFDA (del inglés *Dichlorodihydrofluorescein-diacetate*), hasta llegar a una concentración de 50 µM de H₂DCFDA. Después, se incubaron las muestras 30 min a 37°C en oscuridad, y posteriormente se midió la fluorescencia obtenida utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 530 nm, respectivamente, utilizando un fluorímetro comercial BioTek Synergy HTX (Thermo Fisher, Estados Unidos).

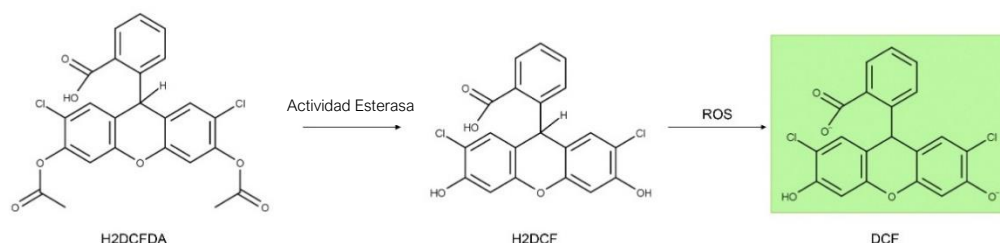


Figura 4. Esquema de las reacciones para obtener el complejo fluorescente DCF²⁶. En este ensayo de medición de niveles ROS lo que se mide es la fluorescencia de DCF (del inglés *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein*). Para ello se parte de H₂DCFDA, que pierde sus grupos acetato por la actividad esterasa de las proteínas de la muestra, pasando a H₂DCF, el cual se oxida debido a la presencia de ROS a DCF. Adaptado de *A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization* (<https://en.bioprotocol.org/en/bpdetail?id=3877&type=0>).

4.2.2.3 Medición de niveles de MDA

Este ensayo se basa en la formación de un compuesto coloreado por la reacción entre MDA y TBA (del inglés *2-Thiobarbituric Acid*), como se representa en la **Figura 5**.

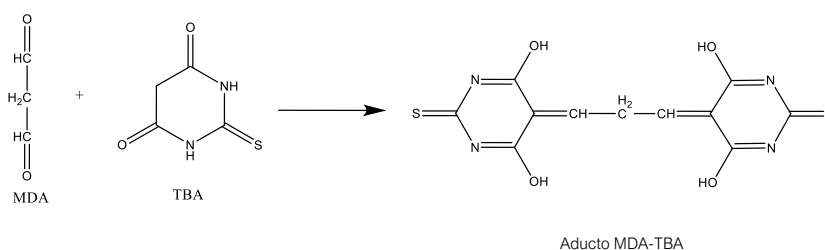


Figura 5. Esquema de la reacción entre MDA y TBA para dar lugar a un compuesto coloreado. La reacción de MDA y TBA forma un aducto, es decir un compuesto formado por la unión directa de ambos reactivos, el cual es coloreado y permite medir los niveles de MDA presente en las muestras²⁷. Basado en *TBARS Assay Kit. Canvax Reagents SL*. (<https://www.canvaxbiotech.com/cell-based-assays/other-assays-compounds/tbars-assay-kit/>).

A la hora de medir MDA se utilizó un *kit* comercial *TBARS Assay Kit* (Canvax, España), en el que se preparó una recta de calibrado con concentraciones entre 0 y 50 µM de MDA. Por otro lado, se tomaron 2 µg de proteínas de cada muestra y se les añadieron 10 µl de H₂O y SDS (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) en tubos de 1,5 ml. Después se añadieron 400 µl de reactivo de color, el cual se preparó pesando 106 µg de TBA y se diluyó en 10 ml de diluyente

A y 10 ml de diluyente B. Después se incubó la reacción 30 min a 50°C. Se añadieron 100 µl de muestra en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 530 nm empleando un espectrofotómetro BioTek Synergy HTX (Thermo Fisher, Estados Unidos).

4.2.2.4 Medición de niveles de Fe

En este caso se usó el *kit* comercial *Iron Assay Kit* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) que se utilizó para medir hierro total y en su estado de oxidación Fe(II), de manera que lo primero que se preparó en una placa de 96 pocillos fueron disoluciones de 100 µl de una recta de calibrado de Fe(II) con valores entre 0 y 100 µM, al que se añadieron 5 µl de agente reductor de hierro para asegurarnos de que está en su estado de oxidación Fe(II). Después, de cada muestra se tomaron 10 µl que se llevaron a 100 utilizando el tampón de ensayo de la casa comercial (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Para medir el Fe(II) presente en la muestra, y también el Fe total (para el que se añadieron 5 µl del agente reductor) se incubaron 30 min a 25°C. Después se añadió la de sonda de hierro, que es la que contiene el compuesto con el que reacciona el hierro para dar lugar a un compuesto coloreado, y se incubaron de nuevo a 25°C durante 60 min, protegiendo la placa de la luz solar. Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 593 nm empleando un espectrofotómetro BioTek Synergy HTX (Thermo Fisher, Estados Unidos).

4.3 INDUCCIÓN DE FERROPTOSIS EN *KNOCKDOWNS*

El silenciamiento se basa en introducir el siRNA (del inglés *Small Interfering RNA*) dentro de las células mediante lipofectamina, que forma un liposoma que introduce el siRNA en la célula. Este se asociará al complejo proteico RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*), de manera que mediará el reconocimiento del mRNA diana mediante apareamiento de las bases nitrogenadas y lo degradará, acabando con el silenciamiento del gen (*knockdown*)²⁸.

Para el continuar con el estudio de la regulación de ruta de ferroptosis se trabaja con *knockdowns* para los genes *GPX4* y *FSP1*, utilizando para ello siRNA específicos de dichos genes. La eficacia del silenciamiento se evalúa mediante Western Blot (WB).

Para el silenciamiento es necesaria la adición de siRNA 50 nM (concentración final en el pocillo) sintético (siRNA ID: s39571 (*FSP1*) y s6110(*GPX4*)) (Ambion®, Life Technologies, España) en el medio con las células (200.000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos). Para ello, previamente se tomó el volumen necesario de siRNA para tratar las células a la concentración de 50 nM y se diluyó en OptiMem (ThermoFisher, Estados Unidos). Por otro lado, se preparó una disolución de Lipofectamina 2000 tomando 5 µl por pocillo (ThermoFisher, Estados Unidos) diluida en OptiMem hasta llegar a un ratio 1:1 en volumen con la disolución con siRNA. Después, se mezcló la disolución de siRNA con la de Lipofectamina 2000, y se incubaron durante 20 min a 37°C. Finalmente se añadió la disolución final sobre el medio con las células (1,25 ml) para que la concentración final de siRNA sea de 50 nM en 1,5 ml de medio.

Para evaluar el grado de silenciamiento de ambos genes, se tomó como base el esquema de la **Figura 3**. En este sentido, se realizó la transfección el día 0 y se recogieron muestras los días 3 y 6 después de la transfección. Se recogieron los pellets de células utilizando tripsina y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.3.1 Aislamiento y cuantificación de proteína procedente de células en las que se ha realizado silenciamiento

Se extrajeron las proteínas de cada muestra añadiendo tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), NaCl 10 mM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), MgCl₂ 1,5 mM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), DTT 1,5 mM (del inglés *Dithiothreitol*) (ThermoFisher, Estados Unidos), NP-40 0,05 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)) con inhibidor de proteasas al 1X (ThermoFisher, Estados Unidos), resuspendiendo el pellet y manteniendo las muestras durante 20 min a 4°C. Posteriormente se llevan a centrifugar a 13.000 rpm, 10 min a 4°C y se recoge el sobrenadante. Después de cada muestra se preparan 10 µl de una dilución 1:10 y en una placa de 96 pocillos se añadieron 4 µl de cada muestra. En paralelo se preparó una recta de calibrado con BSA entre 0 y 1 µg/µl. A cada pocillo se le añaden 200 µl de reactivo Bradford al 1X (Bio-Rad, Estados Unidos) y se midió su absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro BioTek Synergy HTX (Thermo Fisher, Estados Unidos).

4.3.2 Western Blot

Se prepararon 20 µg de proteínas totales de cada muestra en 25 µl de volumen total con tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), NaCl 10 mM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), MgCl₂ 1,5 mM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), DTT 1,5 mM (ThermoFisher, Estados Unidos), NP-40 0,05 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)) y tampón de carga Laemmli 1X (partiendo de Laemmli 5X (Tris-HCl 312,5 mM pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), SDS 10 % (Fisher Scientific, Estados Unidos), glicerol 50% (NZYTech, Portugal), beta-mercaptoetanol 10% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), y 0,025 % azul de bromofenol (Bio-Rad, Estados Unidos), DTT 500 mM (ThermoFisher, Estados Unidos)) como diluyentes. Se les dio un choque térmico de 95°C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas y que las muestras ya estuvieran listas para cargarse en geles de poliacrilamida.

Para la electroforesis se preparó primero el gel separador al 12% (v/v) de acrilamida (NZYTech, Portugal), y después el gel concentrador al 4% (v/v) de acrilamida. Posteriormente se llevó el gel a la cubeta de electroforesis (Bio-Rad, Estados Unidos) que se rellenó con tampón de electroforesis (Tris-Base 0,02 M (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), glicina 0,2 M (NZYTech, Portugal) y SDS 3 mM (Fisher Scientific, Estados Unidos)). Después se cargan las muestras en los pocillos del gel, además de un marcador de pesos moleculares (NZY Colour Protein Marker II, NZYTech, Portugal) y 25 µl de cada muestra preparada por pocillo. Se llevó a cabo la electroforesis a 100 V hasta que las muestras salieron del gel concentrador y después a 180 V hasta que llegaron al frente de electroforesis.

Posteriormente se inició la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, LifeSciences, Estados Unidos). Esto se realizó mediante una transferencia húmeda en la que se colocan, el gel, papel de filtro (Filter-Lab, España), almohadillas (Bio-Rad, Estados Unidos), y la membrana de nitrocelulosa siguiendo la siguiente secuencia: almohadilla, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, almohadilla. El gel debe estar colocado hacia el cátodo y la membrana hacia el ánodo. El *sándwich* se introdujo en la cubeta de transferencia llena de tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), glicina 192 mM (NZYTech, Portugal), 20% (v/v) metanol (Scharlab, España) y se aplicó un amperaje constante de 300 mA, durante una hora.

Finalmente, se bloqueó la membrana con leche sin grasa (Nestlé Sveltesse, España) al 10% (m/v) en PBS-T (PBS suplementado con Tween 20 al 0,1%) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), se incubó con los anticuerpos primarios toda la noche (conejo anti-FSP1 (Cat. No.: 20886-1-AP, Proteintech, Estados Unidos) a la dilución 1:1000 y conejo anti-GPX4 (Cat. No.: MA5-32B27, Invitrogen, Estados Unidos) a la dilución 1:500 en PBS-T con leche al 5%), se lavó 3 veces durante 10 min en PBS-T y se incubaron una hora con el anticuerpo normalizador, utilizado como control de carga (ratón anti-vinculina (Cat. No.: 66305-I-Ig, Proteintech, Estados Unidos) (1:100) para la membrana donde se detecta FSP1 y ratón anti-GAPDH (Cat. No.: 60004-I-Ig, Proteintech, Estados Unidos) (1:5.000) para la membrana donde se detecta GPX4).

Después, se realizaron de nuevo 3 lavados, posteriormente se incubaron durante 1 h con proteína G, conjugada con HRP (del inglés *Horseradish Peroxidase*) (Millipore, Estados Unidos) (1:5.000) y de nuevo se realizaron tres lavados con PBS-T. El revelado se llevó a cabo con un *kit* de quimioluminiscencia (Thermo Fisher, Estados Unidos) en el fotodocumentador de geles Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad, Estados Unidos).

4.3.3 Inducción de Ferroptosis en *Knockdowns* para GPX4

Para evaluar el papel de GPX4 en la ferroptosis, en las líneas celulares de cáncer de ovario A2780 y SKOV3, se llevó a cabo la inducción de ferroptosis empleando el esquema representado en la **Figura 3**, añadiendo el siRNA (50 nM) de GPX4 incubado previamente con Lipofectamina 2000 como se describió anteriormente en el apartado 4.3.

4.4 ESTADÍSTICA

Para comprobar si los experimentos realizados son estadísticamente significativos, se realizaron 3 réplicas biológicas y a su vez en cada una, 2 réplicas técnicas por condición. Los datos se analizaron mediante la prueba t-student no pareado con el software estadístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., USA). Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (SD), y los p-valor como: * si $p < 0,05$ y ** si $p < 0,01$.

5 RESULTADOS

5.1 INDUCCIÓN DE FERROPTOSIS EN UN MODELO *IN VITRO*

Para los experimentos de inducción de ferroptosis *in vitro* se obtuvieron los resultados reflejados en la **Figura 6**, en la que se pueden observar tanto imágenes representativas de las tinciones de cristal violeta (**Figura 6A** y **Figura 6B**), así como en los histogramas que representan los resultados obtenidos tras medir la absorbancia de cristal violeta disuelto en ácido acético (**Figura 6C** y **Figura 6D**). El cristal violeta tiñe las células y la cantidad de colorante es relativo al número de las mismas, de forma que al medir la absorbancia obtendremos una estimación del número de células presente en cada pocillo.

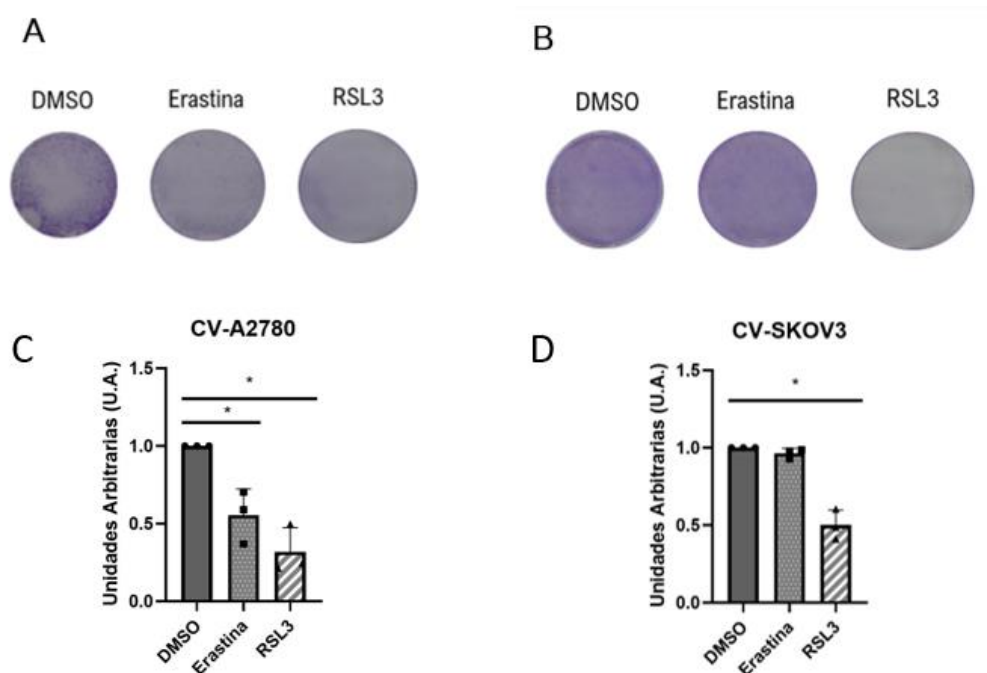


Figura 6. Inducción de ferroptosis *in vitro* en las líneas celulares de cáncer de ovario epitelial. A) Imágenes representativas de los resultados de proliferación celular en A2780 tratadas con los inductores de ferroptosis (erastina y RSL3). B) Imágenes representativas de los resultados de proliferación celular en SKOV3 tratadas con los inductores de ferroptosis (Erastina y RSL3). C) Histograma de la cuantificación de cristal violeta relativo al número de células de la línea A2780 tras el tratamiento con los inductores de ferroptosis (erastina y RSL3), comparados con un tratamiento control de DMSO. D) Histograma de la cuantificación de cristal violeta relativo al número de células de la línea SKOV3 tras el tratamiento con los inductores de ferroptosis (erastina y RSL3), comparados con un tratamiento control de DMSO. Para la comparación entre los resultados obtenidos (medias y desviaciones estándar) se utilizó la prueba t-student (* si $p < 0,05$ y ** si $p < 0,01$). Se realizaron tres réplicas biológicas y a su vez, dos réplicas técnicas por condición. CV=Cristal Violeta, U.A.= Unidades Arbitrarias.

Como se puede observar (**Figura 6C**) en el caso de la línea A2780 la proliferación celular es estadísticamente significativa menor con ambos inductores de ferroptosis, tanto para el caso

de la erastina como para el del RSL3, en comparación al DMSO. También, parece observarse un mayor efecto sobre la proliferación celular por parte de RSL3, que por parte de la erastina (Figura 6C).

Por otro lado, en el caso de las células de la línea SKOV3, se observa que el inductor de ferroptosis RSL3 reduce de manera estadísticamente significativa la proliferación celular tras el tratamiento durante 6 días en comparación al DMSO. Además, no se observan diferencias significativas en la proliferación celular cuando las células son tratadas con erastina (Figura 6D).

5.2 MEDICIÓN DE PARÁMETROS DE FERROPTOSIS

Como se ha descrito a lo largo de la memoria, los parámetros por los que evaluamos la ferroptosis son: niveles de ROS, MDA y Fe (Fe(II) y Fe total (Fe(Tot))). En el caso de ROS y MDA, nos dan información acerca del estrés oxidativo que sufren las células tras los diferentes tratamientos con los inductores de ferroptosis²⁹. Por otro lado, los niveles de Fe(II) y Fe(Tot) nos dan información sobre qué células tienen un mayor contenido en hierro, y por lo tanto son más susceptibles de sufrir ferroptosis¹⁰.

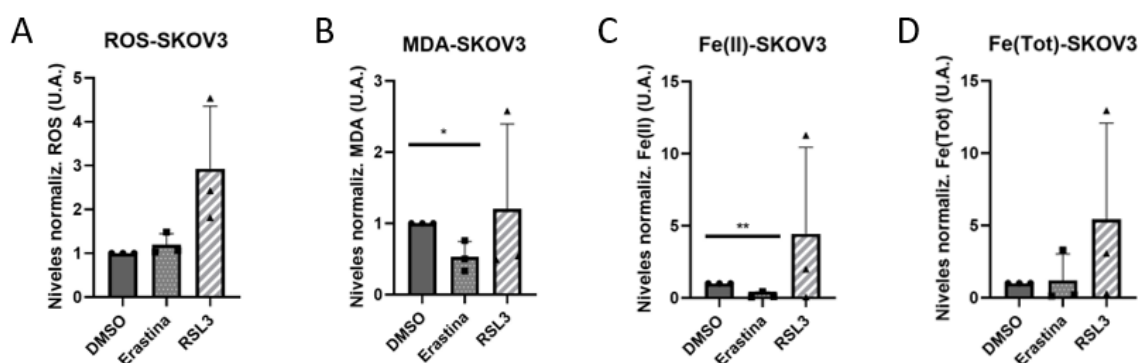


Figura 7. Niveles de los diferentes parámetros que caracterizan la ferroptosis. Histogramas de A) los niveles de ROS en SKOV3, normalizados frente a los valores del tratamiento con DMSO. B) los niveles de MDA en SKOV3, normalizados frente a los valores del tratamiento con DMSO. C) los niveles de Fe(II) en SKOV3, normalizados frente a los valores del tratamiento con DMSO. D) los niveles de Fe(Tot) en SKOV3, normalizados frente a los valores del tratamiento con DMSO. Para la comparación entre los resultados obtenidos (medias y desviaciones estándar) se utilizó la prueba t-student (si $p < 0,05$ y ** si $p < 0,01$). Se realizaron tres réplicas biológicas y a su vez, dos réplicas técnicas por condición. Las unidades son unidades arbitrarias (U.A.).*

En estos experimentos con SKOV3 vemos un incremento en cuanto al nivel de ROS tras el tratamiento con RSL3, mientras que en caso de la erastina los niveles de ROS son similares (Figura 7A). Por otro lado, para los niveles de MDA, dentro de los resultados existe una importante variabilidad dentro del tratamiento con RSL3, que se traduce en unos valores de desviación elevados, cómo se ve en la Figura 7B. Sin embargo, llama la atención que los niveles de MDA sean estadísticamente inferiores en el caso del tratamiento con erastina.

En todos los casos parece observarse una tendencia en la que el nivel de estrés oxidativo es mayor en aquellas células que han sido tratadas con RSL3, lo que se ve tanto para ROS (Figura 7A), como para MDA (Figura 7B).

Por otro lado, al hablar de hierro, se observa que aquellas células que sufren el proceso de ferroptosis tienen los niveles de hierro alterados, mostrando niveles de este más elevados³⁰. Esto parece que se observa tanto para los niveles de Fe(II) (Figura 7C) como Fe(Tot) (Figura 7D), para el tratamiento con RSL3, de forma que existe una tendencia en la que en las células ferroptóticas, muestran niveles de hierro incrementados.

En el caso del tratamiento de erastina, se observa una disminución estadísticamente significativa de los niveles de MDA (Figura 7B) y Fe(II) (Figura 7C), mientras que, parece que los niveles de ROS (Figura 7A) y Fe total (Figura 7D) tienden a aumentar ligeramente.

5.3 GENERACIÓN DE CÉLULAS RESISTENTES CON EL SILENCIAMIENTO DE *GPX4* Y *FSP1* EN LA FERROPTOSIS

Para generar células resistentes a la ferroptosis se procedió a realizar experimentos de silenciamiento con *knockdowns*. Para ello, lo primero es evaluar si el silenciamiento se está produciendo de una manera efectiva. Los resultados obtenidos tras tratar las células a una concentración de 50 nM para el siRNA se muestran en la Figura 8.

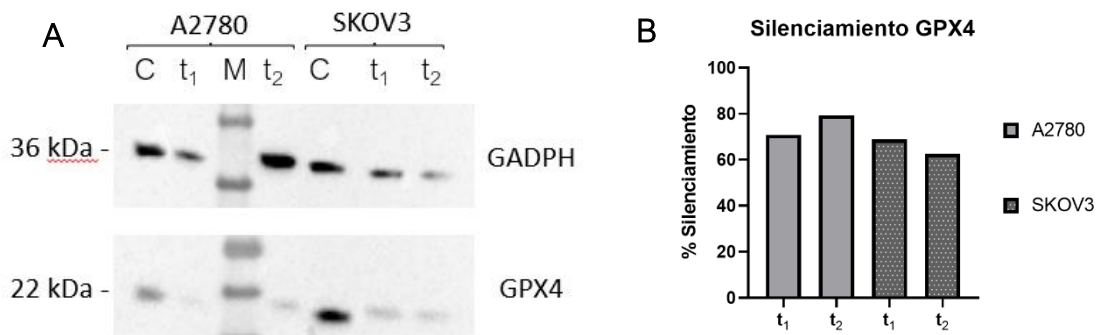


Figura 8. Evaluación del silenciamiento de GPX4 en cáncer de ovario epitelial. A) Imagen representativa del WB en el que se muestran las bandas correspondientes a GAPDH y GPX4 en las muestras C (control), las muestras tratadas con el siRNA durante 3 días (t₁), a 6 días (t₂) y M que se corresponde con el marcador de pesos moleculares. B) Porcentaje de silenciamiento obtenido para GPX4 a los tiempos t₁ y t₂ en las líneas celulares A2780 y SKOV3. Se realizó una réplica.

Como se puede observar en la Figura 8, se obtuvo el silenciamiento de GPX4 en ambas líneas celulares después de 3 y 6 días de la transfección. Una vez comprobada la eficiencia del proceso de silenciamiento se procedió a evaluar la resistencia de las células a la ferroptosis.

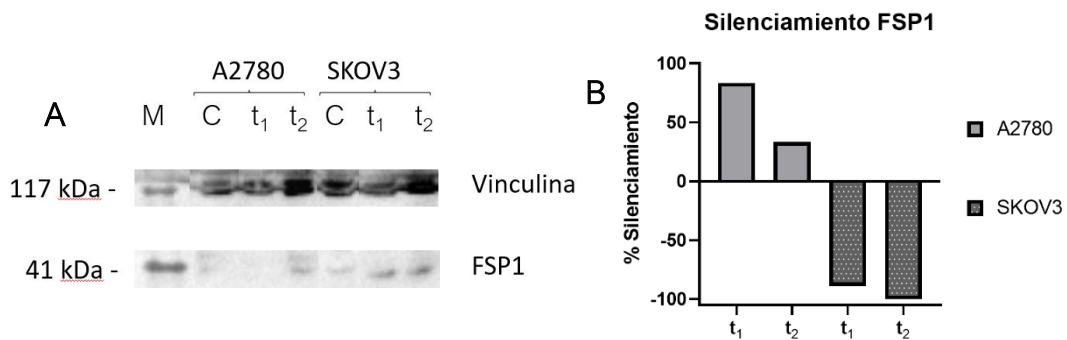


Figura 9. Evaluación del silenciamiento de FSP1 en cáncer de ovario epitelial. A) WB en el que se muestran las bandas correspondientes a C el control, las muestras tratadas durante 3 días (t_1), a 6 días (t_2) y M que se corresponde con el marcador de pesos moleculares. B) Porcentaje de silenciamiento obtenido para GPX4 a los tiempos t_1 y t_2 en las líneas celulares A2780 y SKOV3. Se realizó una réplica.

En el caso de *FSP1* los resultados obtenidos varían (**Figura 9**), en primer lugar, se observa un menor grado de silenciamiento en la línea celular A2780 a lo largo del tiempo, así como que no se logró silenciar *FSP1* en el caso de la línea celular SKOV3 (**Figura 9B**). Debido a que no se logró un silenciamiento eficaz en *FSP1*, se decidió centrarse en *GPX4*.

5.3.1 Evaluación de la resistencia de las células de ovario epitelial con el silenciamiento de *GPX4* tras la inducción de ferroptosis empleando dos líneas celulares de cáncer de ovario epitelial

Tras la generación de líneas celulares resistentes a la ferroptosis, se trataron con inductores de la misma para comprobar cómo el silenciamiento de *GPX4* provocó cambios en la proliferación celular tras los tratamientos.

Lo que se observó es cómo la proliferación celular disminuyó al silenciar *GPX4* en los tratamientos con DMSO y erastina con respecto a las células sin el silenciamiento en ambas líneas celulares. Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación en las células sin el silenciamiento y con el silenciamiento cuando fueron tratadas con erastina en el caso de A2780, algo que sí se observó en SKOV3 (**Figura 10B** y **Figura 10D**).

Mientras que para el tratamiento con RSL3, es dependiente de la línea celular tratada (**Figura 10**). En el caso de A2780 parece que la proliferación celular tiende a aumentar ligeramente en las células en las que se ha silenciado *GPX4* respecto a aquellas en las que no se hizo el silenciamiento, mientras que para SKOV3, parece que disminuye ligeramente (**Figura 10D**).

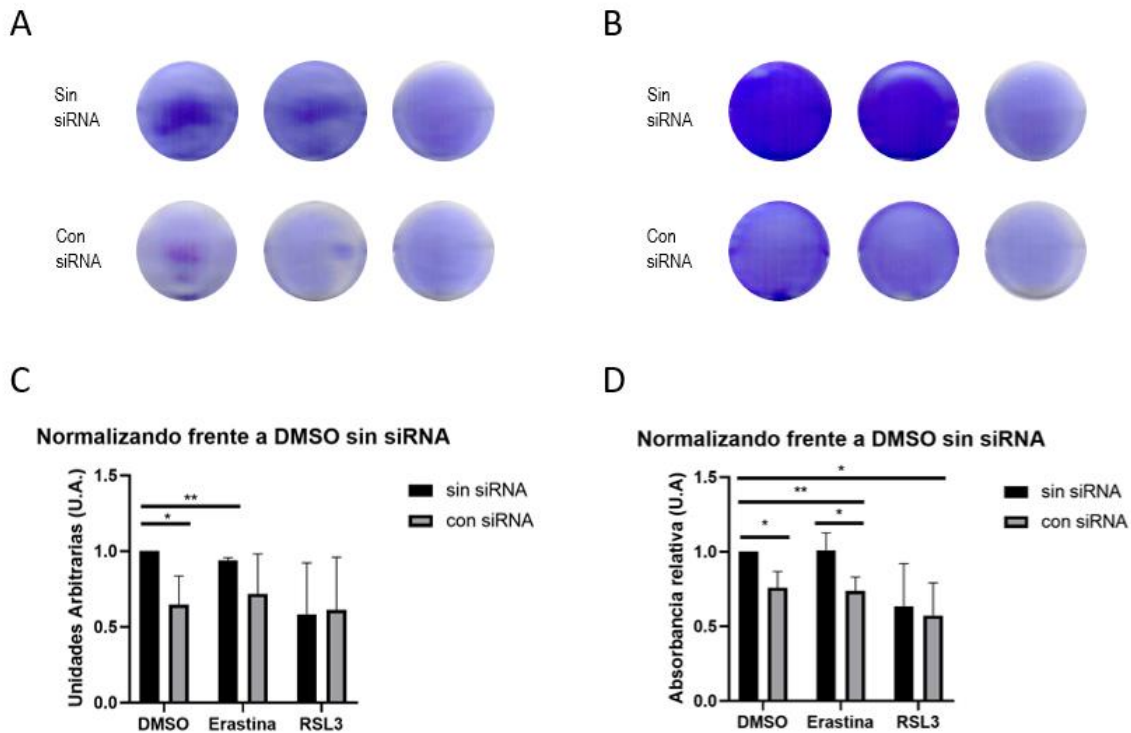


Figura 10. Papel de GPX4 en la inducción de ferroptosis in vitro en las líneas celulares A2780 y SKOV3. A) Imágenes representativas de los resultados de proliferación celular en A2780 tratadas con los inductores de ferroptosis (Erastina y RSL3), y con siRNA. B) Imágenes representativas de los resultados de proliferación celular en SKOV3 tratadas con los inductores de ferroptosis (Erastina y RSL3) y siRNA. C) Histograma de la cuantificación de cristal violeta relativo al número de células del knockdown de la línea A2780 tras el tratamiento con los inductores de ferroptosis erastina y RSL3, así como con un tratamiento control de DMSO. Los valores están normalizados frente al tratamiento con DMSO sin siRNA. (U.A.= Unidades Arbitrarias). D) Histograma de la cuantificación de cristal violeta relativo al número de células del knockdown de la línea SKOV3 tras el tratamiento con los inductores de ferroptosis erastina y RSL3, así como con un tratamiento control de DMSO. Los valores están normalizados frente al tratamiento con DMSO sin siRNA. (U.A.= Unidades Arbitrarias). Para la comparación entre los resultados obtenidos (medias y desviaciones estándar) se utilizó la prueba t-student (* si $p < 0,05$ y ** si $p < 0,01$). Se realizaron tres réplicas biológicas.

Por otro lado, se midieron de nuevo parámetros de ferroptosis utilizados en el apartado 5.2 en la línea SKOV3 para comprobar si se está produciendo ferroptosis, obteniendo los resultados que se observan en la **Figura 11**. En lo que se refiere a los niveles de ROS, lo que se observa es como en la línea celular de cáncer de ovario epitelial (SKOV3) tienden a incrementarse cuando las células sin silenciamiento son tratadas con RSL3 en comparación con el DMSO (**Figura 11A**). En cuanto a las resistentes con silenciamiento de GPX4 se observó que los niveles de ROS son generalmente inferiores. Viendo como en el caso del DMSO y la erastina, los niveles de ROS tras el silenciamiento son estadísticamente significativos inferiores a los niveles sin silenciamiento de GPX4.

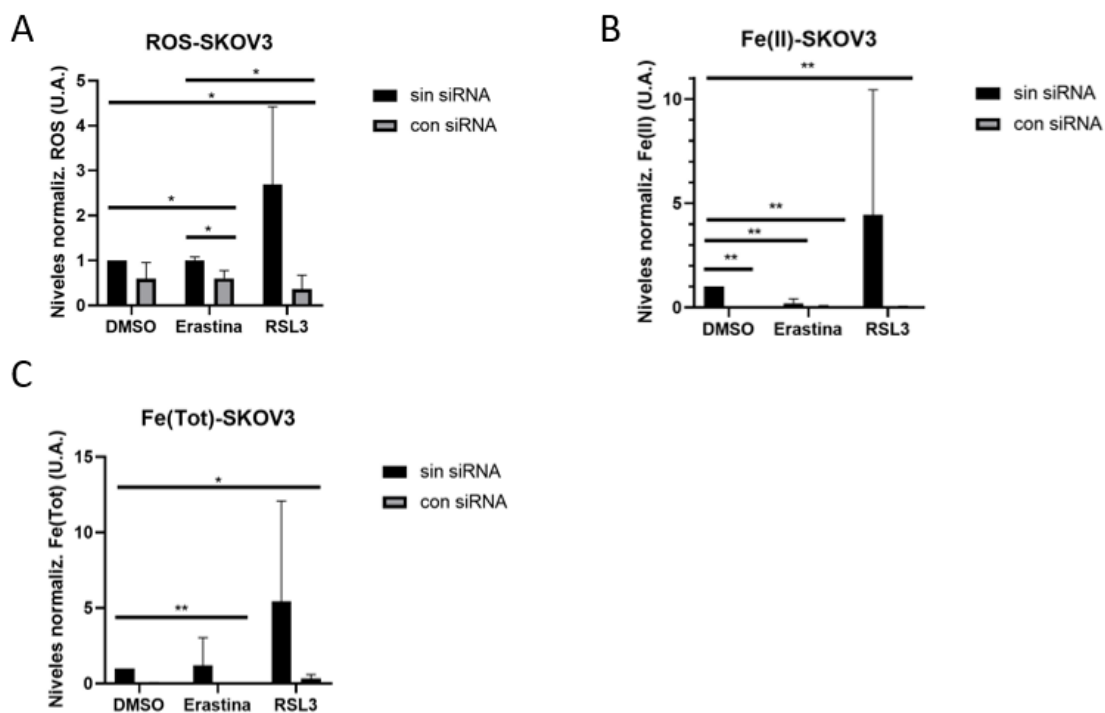


Figura 11. Niveles de los diferentes parámetros que caracterizan la ferroptosis. Histogramas de A) los niveles de ROS en SKOV3 tras el silenciamiento de GPX4, normalizados frente a los valores del tratamiento con DMSO. B) los niveles de Fe(II) en SKOV3 tras el silenciamiento de GPX4, normalizados frente a los valores del tratamiento con DMSO. C) los niveles de Fe(total) en SKOV3 tras el silenciamiento de GPX4, normalizados frente a los valores del tratamiento con DMSO. Para la comparación entre los resultados obtenidos (medias y desviaciones estándar) se utilizó la prueba t-student (* si $p < 0,05$ y ** si $p < 0,01$). Se realizaron tres réplicas biológicas y a su vez, dos réplicas técnicas por condición. Las unidades son unidades arbitrarias (U.A.).

Por último, los niveles de hierro se muestran generalmente más elevados tras los tratamientos con inductores de ferroptosis si los comparamos con los de DMSO, en las células no tratadas con siRNA, siendo más altos en el caso de RSL3, tanto para Fe(II) (**Figura 11B**) como Fe total (**Figura 11C**). La única excepción a esto es el tratamiento de erastina sin el silenciamiento de GPX4, que muestra unos niveles de Fe(II) inferiores. Además, también se aprecia como los niveles de hierro, tanto para Fe(II), como para Fe(Tot), son inferiores en los casos de aquellas células en las que se ha silenciado GPX4.

6 DISCUSIÓN

Dentro del contexto del cáncer de ovario, que es el quinto que más muertes de mujeres causa, y el primero si hablamos de aparato reproductor, la ferroptosis aparece como una nueva alternativa a las terapias convencionales, como se expuso anteriormente en la introducción de este trabajo.

Tras la evaluación llevada a cabo a lo largo de este trabajo, se ha observado cómo la inducción de ferroptosis, mediante diferentes compuestos, como la erastina o RSL3, provocan una disminución en la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de ovario epitelial, A2780 y SKOV3 concordando con los resultados publicados en 2023 por Alarcón-Veleiro *et al.* Aunque cabe mencionar que en el caso de SKOV3, la erastina no provocó un descenso estadísticamente significativo en la proliferación celular. Esto se puede relacionar con la concentración utilizada (1 μM), ya que, en otros estudios, como por ejemplo el de Yang *et al.* en 2014, se observó como dependiendo de la línea celular, la inhibición del crecimiento podía darse a concentraciones de 10 μM , por lo que aunque parece existir una leve tendencia a la disminución de la viabilidad celular a esta concentración de erastina, para comprobar si realmente el bajo rendimiento de la erastina en estas líneas celulares se debe a la concentración utilizada en este trabajo, se podrían realizar nuevos experimentos donde se probasen concentraciones más elevadas y diferentes tiempos de tratamiento.

En el proceso de evaluación de la ferroptosis, nos encontramos un aumento en los niveles de ROS en las células que han sido tratadas con RSL3, de forma que sí existe un estrés oxidativo al tratar con RSL3 las células de la línea de SKOV3. Por otro lado, tanto en el caso de los niveles de MDA, como de Fe(II) y Fe(Tot), parece existir una tendencia en la que se observa cómo sus niveles son mayores al inducir ferroptosis, al igual que lo descrito por Nie, Z. *et al.* en 2022. Además, cabe destacar que las diferencias observadas en el tratamiento con erastina no debemos relacionarlas con el proceso de ferroptosis, ya que en SKOV3 no se apreció una disminución de la proliferación celular con este tratamiento, así como la disminución en los niveles de MDA y Fe(II). Por otra parte, para hacer más robusto el estudio presentado en este trabajo se recomendaría completar los resultados realizando los experimentos en la línea celular A2780.

A la hora de obtener células resistentes a la ferroptosis se consiguió el *knockdown* de *GPX4*, viendo como los niveles de expresión de *GPX4* disminuyeron, tanto a los 3 como a los 6 días, permitiendo continuar el mismo esquema que en los experimentos realizados previamente en células sin tratar con siRNA. Sin embargo, para *FSP1*, se observó que no se logró un silenciamiento completo, siendo en la línea A2780 la que presentó una mayor respuesta al proceso de silenciamiento, por ello proponemos cambiar la estrategia de modificación genética empleando shRNAs (del inglés *Short Hairpin RNA*) usando partículas lentivirales.

En los *knockdowns* para *GPX4* se observó cómo en aquellos tratamientos que no provocaron ferroptosis, DMSO y erastina, la proliferación celular disminuía, confirmando que *GPX4* se trata de una proteína que juega un papel muy importante para el desarrollo normal de las células, como vieron por ejemplo Yang *et al.* en 2014. Por otro lado, en los tratamientos con RSL3, se observó cómo el silenciamiento de *GPX4* mantenía similares los niveles proliferación celular respecto a las células no tratadas con siRNA, así como también respecto a las tratadas con siRNA y DMSO, dando a entender que se daba menos muerte celular debida a la ferroptosis, lo que se puede deber a que se inhiba la ferroptosis mediante otras rutas de regulación, como puede ser el eje FSP1-CoQ10-NAD(P)H, como proponen Ma, T. *et al.* En 2022.

A la hora de medir los diferentes parámetros que caracterizan la ferroptosis en los *knockdowns* generados para *GPX4*, lo que se observó fue como existía un menor nivel de estrés oxidativo al inducirse la ferroptosis, lo que se reflejaba en los niveles de ROS tras el tratamiento con RSL3. De la misma forma, tras tratar las células con inductores de ferroptosis, pero sin siRNA, se vio como los niveles de Fe (tanto Fe(II), como Fe(Tot)) eran más elevados, mientras que estos eran más bajos en aquellas células en las que silenció *GPX4*, lo que muestra como no se da lugar a la ferroptosis, lo que encaja con lo que proponíamos anteriormente de que las líneas celulares generadas con el *knockdown* de *GPX4* poseen otros mecanismos para evitar la ferroptosis, como propusieron Bersuker, K. *et al.* en 2019.

7 CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se llega con este trabajo se tratarán en función de los objetivos propuestos:

- La inducción de ferroptosis en las líneas celulares A2780 y SKOV3, con erastina y RSL3, produce una disminución en la proliferación celular.
- Los niveles de hierro, ROS y MDA, tras la inducción de ferroptosis en células de cáncer de ovario epitelial, en las líneas celulares A2780 y SKOV3, se ven aumentados, indicando cómo tras la inducción, se produce estrés oxidativo en las células.
- Se generaron líneas resistentes a la ferroptosis por el silenciamiento de *GPX4* en las líneas celulares A2780 y SKOV3, pero no se logró el silenciamiento de *FSP1* en las mismas líneas celulares.
- El silenciamiento de *GPX4*, seguido de la inducción de ferroptosis nos permitió confirmar la importancia de *GPX4* en el crecimiento celular, así como en la regulación de la ferroptosis.

7.1 CONCLUSIONS

The conclusions reached in this work will be discussed according to the proposed objectives:

- Induction of ferroptosis in A2780 and SKOV3 cell lines, with erastin and RSL3, produces a decrease in cell proliferation.
- The levels of iron, ROS and MDA, after induction of ferroptosis in epithelial ovarian cancer cells, are increased, indicating that after induction, oxidative stress is produced in the cells.
- Ferroptosis-resistant lines were generated by *GPX4* silencing in the A2780 and SKOV3 cell lines, but *FSP1* silencing was not achieved in the same cell lines.
- Silencing of *GPX4* followed by induction of ferroptosis allowed us to confirm the importance of *GPX4* in cell growth as well as in the regulation of ferroptosis.

8 BIBLIOGRAFÍA

- (1) ¿Qué indican las estadísticas clave sobre el cáncer de ovario? <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/acerca/estadisticas-clave.html> (accedido 2023-02-01, 18:21).
- (2) ¿Qué es el cáncer de ovario? <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-ovario> (accedido 2023-02-01, 18:24).
- (3) Enroth, S.; Berggrund, M.; Lycke, M.; Broberg, J.; Lundberg, M.; Assarsson, E.; Olovsson, M.; Ståhlberg, K.; Sundfeldt, K.; Gyllensten, U. High Throughput Proteomics Identifies a High-Accuracy 11 Plasma Protein Biomarker Signature for Ovarian Cancer. *Commun Biol* 2019, 2 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0464-9>.
- (4) Jumaa <https://orcid.org>, M. G.; Department of Microbiology, College of Medicine, University of Maysan, Maysan, Iraq; Abdul-Kareem Ramadhan <https://orcid.org>, M.; Department of Pathology, College of Medicine, University of Maysan, Maysan, Iraq. Cancer Testis Antigen XAGE-1 Is a Promising Marker for the Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *JMedLife* 2021, 14 (5), 710–715. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0304>.
- (5) *Los tres tipos de cáncer de ovario, explicados*. NIH MedlinePlus Magazine. <https://magazine.medlineplus.gov/es/article/3-types-of-ovarian-cancer-explained> (accedido 2023-02-01, 19:18).
- (6) Cortez, A. J.; Tudrej, P.; Kujawa, K. A.; Lisowska, K. M. Advances in Ovarian Cancer Therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018, 81 (1), 17–38. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8>.
- (7) Matulonis, U. A.; Sood, A. K.; Fallowfield, L.; Howitt, B. E.; Sehouli, J.; Karlan, B. Y. Ovarian Cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2016, 2, 16061. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>.
- (8) *Definición de taxano - Diccionario de cáncer del NCI - NCI*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/taxano> (accedido 2023-06-16, 11:00).
- (9) Nie, Z.; Chen, M.; Gao, Y.; Huang, D.; Cao, H.; Peng, Y.; Guo, N.; Wang, F.; Zhang, S. Ferroptosis and Tumor Drug Resistance: Current Status and Major Challenges. *Front. Pharmacol.* 2022, 13, 879317. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.879317>.
- (10) Zhang, C.; Liu, N. Ferroptosis, Necroptosis, and Pyroptosis in the Occurrence and Development of Ovarian Cancer. *Front Immunol* 2022, 13, 920059. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.920059>.
- (11) Wang, D.; Tang, L.; Zhang, Y.; Ge, G.; Jiang, X.; Mo, Y.; Wu, P.; Deng, X.; Li, L.; Zuo, S.; Yan, Q.; Zhang, S.; Wang, F.; Shi, L.; Li, X.; Xiang, B.; Zhou, M.; Liao, Q.; Guo, C.; Zeng, Z.; Xiong, W.; Gong, Z. Regulatory Pathways and Drugs Associated with Ferroptosis in Tumors. *Cell Death Dis* 2022, 13 (6), 544. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04927-1>.

- (12) Dixon, S. J. Ferroptosis: Bug or Feature? *Immunological Reviews* 2017, 277 (1), 150–157. <https://doi.org/10.1111/imr.12533>.
- (13) Li, F.-J.; Long, H.-Z.; Zhou, Z.-W.; Luo, H.-Y.; Xu, S.-G.; Gao, L.-C. System Xc⁻/GSH/GPX4 Axis: An Important Antioxidant System for the Ferroptosis in Drug-Resistant Solid Tumor Therapy. *Front Pharmacol* 2022, 13, 910292. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.910292>.
- (14) 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. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* 2012, 149 (5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>.
- (15) Suárez García, I.; Gómez Cerezo, J. F.; Ríos Blanco, J. J.; Barbado Hernández, F. J.; Vázquez Rodríguez, J. J. La Homocisteína: ¿El Factor de Riesgo Cardiovascular Del Próximo Milenio? *Anales de Medicina Interna* 2001, 18 (4), 53–59.
- (16) Fu, A.; van Rooyen, L.; Evans, L.; Armstrong, N.; Avizonis, D.; Kin, T.; Bird, G. H.; Reddy, A.; Chouchani, E. T.; Liesa-Roig, M.; Walensky, L. D.; James Shapiro, A. M.; Danial, N. N. Glucose Metabolism and Pyruvate Carboxylase Enhance Glutathione Synthesis and Restrict Oxidative Stress in Pancreatic Islets. *Cell Rep* 2021, 37 (8), 110037. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110037>.
- (17) 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. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* 2014, 156 (1), 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>.
- (18) Li, L.; Qiu, C.; Hou, M.; Wang, X.; Huang, C.; Zou, J.; Liu, T.; Qu, J. Ferroptosis in Ovarian Cancer: A Novel Therapeutic Strategy. *Front Oncol* 2021, 11, 665945. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.665945>.
- (19) Bersuker, K.; Hendricks, J.; 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. The CoQ Oxidoreductase FSP1 Acts in Parallel to GPX4 to Inhibit Ferroptosis. *Nature* 2019, 575 (7784), 688–692. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1705-2>.
- (20) Ma, T.; Du, J.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Wang, B.; Zhang, T. GPX4-Independent Ferroptosis—a New Strategy in Disease's Therapy. *Cell Death Discov.* 2022, 8 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01212-0>.
- (21) Feng, H.; Stockwell, B. R. Unsolved Mysteries: How Does Lipid Peroxidation Cause Ferroptosis? *PLoS Biol* 2018, 16 (5), e2006203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006203>.
- (22) ECACC cell line profiles. <https://www.culturecollections.org.uk/collections/ecacc-cell-line-profiles.aspx> (accedido 2023-02-15, 12:17).

- (23) *SK-OV-3 [SKOV-3; SKOV3] - HTB-77 | ATCC*. <https://www.atcc.org/products/htb-77> (accedido 2023-06-18, 11:25).
- (24) *Basic Cell Culture Protocols*; Helgason, C. D., Miller, C. L., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 946. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8>.
- (25) Alarcón-Veleiro, C.; Mato-Basalo, R.; Lucio-Gallego, S.; Vidal-Pampín, A.; Quindós-Varela, M.; Al-Qatarnah, T.; Berrecoso, G.; Vizoso-Vázquez, Á.; Arufe, M. C.; Fafián-Labora, J. Study of Ferroptosis Transmission by Small Extracellular Vesicles in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12 (1), 183. <https://doi.org/10.3390/antiox12010183>.
- (26) *A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization*. <https://en.bio-protocol.org/en/bpdetail?id=3877&type=0> (accedido 2023-05-10, 11:09).
- (27) *TBARS Assay Kit*. Canvax Reagents SL. <https://www.canvaxbiotech.com/cell-based-assays/other-assays-compounds/tbars-assay-kit/> (accedido 2023-06-06, 8:48).
- (28) Wittrup, A.; Lieberman, J. Knocking down Disease: A Progress Report on SiRNA Therapeutics. *Nat Rev Genet* 2015, 16 (9), 543–552. <https://doi.org/10.1038/nrg3978>.
- (29) Carvajal Carvajal, C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica* 2019, 36 (1), 91–100.
- (30) Tang, D.; Chen, X.; Kang, R.; Kroemer, G. Ferroptosis: Molecular Mechanisms and Health Implications. *Cell Res* 2021, 31 (2), 107–125. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00441-1>.