



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## **Grao en Bioloxía**

### **Memoria do Traballo de Fin de Grao**

**Innovación en modelos *in vitro*: Resistencia a la ferroptosis en células de cáncer de ovario epitelial.**

**Innovación en modelos *in vitro*: Resistencia á ferroptosis en células de cáncer de ovario epitelial.**

**Innovation in *in vitro* models: Resistance to ferroptosis in epithelial ovarian cancer cells.**

**Paula Martínez Cid**

**Curso: 2023 - 2024. Convocatoria: Junio**

*Ángel José Vizoso Vázquez  
Juan Antonio Fafián Labora*





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

# Grao en Bioloxía

## Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Innovación en modelos *in vitro*: Resistencia a la ferroptosis en células de cáncer de ovario epitelial.**

**Innovación en modelos *in vitro*: Resistencia á ferroptosis en células de cáncer de ovario epitelial.**

**Innovation in *in vitro* models: Resistance to ferroptosis in epithelial ovarian cancer cells.**

Paula Martínez Cid  
A Coruña, Junio 2024

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.



## ÍNDICE

1	RESUMEN	
1.1	RESUMO	
1.2	ABSTRACT	
2	INTRODUCCIÓN.....	1
2.1	Cáncer de ovario epitelial.....	1
2.2	Ferroptosis.....	2
2.3	Regulación de la ferroptosis.....	2
2.3.1	Sistema Xc <sup>-</sup> /GSH/GPX4.....	2
2.3.2	Sistema FSP1/NADPH/Ubiquitinol.....	4
2.4	Moduladores de ferroptosis.....	5
3	OBJETIVOS.....	5
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
4.1	Cultivo celular.....	6
4.2	Inducción de ferroptosis.....	6
4.3	Medida de parámetros ferroptóticos.....	8
4.3.1	Cuantificación de proteína mediante BCA.....	8
4.3.2	Evaluación de los niveles de MDA.....	8
4.3.3	Medida de glutatión reducido.....	9
4.3.4	Medida de ROS.....	10
4.3.5	Medida del ión ferroso (Fe <sup>2+</sup> ).....	11
4.3.6	Estadística.....	11
4.4	Generación de mutantes knockouts de FSP1 y GPX4 en células SKOV3.....	11
4.5	Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.....	12
4.6	Transfección en células HEK293T y generación de partículas lentivirales.....	12
4.7	Aislamiento de clones por dilución (Single-cell cloning).....	13
4.8	Extracción y cuantificación de los niveles de proteínas totales.....	13
4.9	Western Blot.....	14
4.10	Extracción de ADN Genómico.....	15
5	RESULTADOS.....	17
5.1	Evaluación de la inducción de ferroptosis en dos líneas celulares de cáncer de ovario epitelial. (A2780 Y SKOV3).....	17
5.2	Evaluación de los posibles candidatos knockouts de GPX4 y FSP1 para línea celular de cáncer de ovario epitelial SKOV3.....	19
6	CONCLUSIONES.....	22
6.1	CONCLUSIÓN.....	22
6.2	CONCLUSIONS.....	22
7	BIBLIOGRAFÍA.....	23

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Compuestos utilizados para hacer el gel separador de acrilamida al 12 % (v/v).....	14
Tabla 2: Compuestos utilizados para hacer el gel concentrador de acrilamida al 4% (v/v).....	14
Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación. ....	16
Tabla 4: Aislamiento de los clones por dilución (Single-cell cloning). ....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del sistema Xc <sup>-</sup> /GSH/GPX4.....	3
Figura 2: Esquema del sistema FSP1/NADPH/Ubiquitinol.....	4
Figura 3: Esquema de inducción de ferroptosis.....	7
Figura 4: Esquema del mecanismo molecular empleado para medir MDA.....	9
Figura 5: Esquema del mecanismo molecular empleado para medir el glutatión.....	9
Figura 6: Esquema del mecanismo molecular empleado para medir ROS.....	11
Figura 7: Niveles de los parámetros ferroptóticos para A2780.....	17
Figura 8: Niveles de los parámetros ferroptóticos para SKOV3.....	18
Figura 9: Mapa de calor de la variación en los niveles de los parámetros ferroptóticos para A2780 y SKOV3 al aplicar los inductores ferroptóticos erastina y RSL3.....	19
: Evaluación de los posibles candidatos knockouts de FSP1 en cáncer de ovario epitelial.....	20
Figura 11: Evaluación de los posibles candidatos knockouts de GPX4 en cáncer de ovario epitelial.....	21
Figura 12: Representación de los niveles de proteína de los posibles candidatos knockouts de GPX4 (azul) y FSP1 (violeta) con respecto al wild type (Wt).....	21



## **ABREVIATURAS.**

(v/v): Volumen/volumen.

(p/v): Peso/volumen.

µg: Microgramo.

µl: Microlitro.

µm: Micrómetro.

µM: Micromolar.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNp: Ácido desoxirribonucleico plasmídico.

AIFM2: en inglés *Factor Mitochondria-Associated*.

APS: del inglés *Adenosine Phosphosulfate*.

ARNasas: Ribonucleasas.

BCA: del inglés *Bicinchoninic Acid*.

BH4: Tetrahidrobiopterina.

BSA: del inglés *Bovine Serum Albumin*.

CoQ10: Ubiquinona.

CoQ10H<sub>2</sub>: Ubiquinol.

DCF: de inglés *2',7'-Dichlorofluorescein*.

DCFH: del inglés *2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate*.

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

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DP113: Difenilnyodonio-113.

DPBS: del inglés *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*.

DPI1: Difenilnyodonio-1.

DPI112: Difenilnyodonio-112.

DTNB: del inglés *5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoic Acid)*.

FBS: *Fetal Bovine Serum*.

Fe<sup>2+</sup>:IÓN ferroso.

FSP1: del inglés *Ferroptosis Supressor Protein1*.

GADPH: del inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*.

GCH1: GTP-ciclohidrolasa-1.

GPX4: glutatión peroxidasa 4

GSH: Glutatión en forma reducida

GSSG: Glutatión en forma oxidada.

H<sub>2</sub>DCFDA: del inglés *Dichlorodihydrofluorescein-diacetate*.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno.

HRP: del inglés *Horseradish Peroxidase*.

IKE: del inglés *Imidazole ketone erastin*.

KDa: Kilodalton.

KOH: Hidróxido de potasio.

M: Molar.

MCR: Muerte Celular Regulada.

MDA: del inglés *Malondialdehyde*.

ml: Mililitro.

mm: Milímetro.  
mM: Milimolar.  
NADPH: del inglés *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*.  
nm: Nanómetro.  
°C: Grados centígrados.  
P/S: Penicilina/estreptomicina.  
PBS-T: del inglés *Phosphate Buffered Saline* suplementado con *Tween*.  
PEI: del inglés *Poly(ethyleneimine)*.  
PUFA-PL: del inglés *Phospholipid-Polyunsaturated Fatty Acids*.  
ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*.  
RSL3: del inglés *RAS-Selective Lethal*.  
SCL3A2: en inglés *Solute Carrier Family 3 Member 2*.  
SDS: del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*.  
sgARNs: del inglés *Single-guided RNA*.  
SLCA11: en inglés *Solute Carrier Family 7 Member 11*.  
SSA: del inglés *5-Sulfosalicylic acid solution*.  
TBA: del inglés *Thiobarbituric Acid*.  
TEMED: Tetrametiletilendiamina.  
TP53: del inglés *Tumor Protein p53*  
V: Voltio.  
Wt: del inglés *Wild type*.  
Xg: Fuerza centrífuga relativa.

## 1 RESUMEN

El cáncer de ovario epitelial se caracteriza por presentar una mortalidad elevada y un difícil diagnóstico en los estadios iniciales de su desarrollo. Es por eso por lo que surgen nuevos tipos de terapias para paliar la enfermedad, entre ellas la ferroptosis. Esta consiste en un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por la acumulación de radicales libres de hierro en las células, lo que conduce a la pérdida de integridad de la membrana celular y finalmente a la muerte celular. En este trabajo demostramos cómo se alteran diferentes parámetros celulares, incluyendo niveles de ROS (del inglés *Reactive Oxygen Species*), MDA (del inglés *Malondialdehyde*),  $Fe^{2+}$  (Ión ferroso) y GSH (forma reducida del glutatión) al ser tratadas las células de las líneas celulares de cáncer de ovario epitelial A2780 y SKOV3 con los inductores ferroptóticos erastina y RSL3 (del inglés *RAS Selective Lethal 3*). Además, también se pretende generar líneas celulares resistentes a la ferroptosis mediante la generación de mutantes *knockouts* de GPX4 (del inglés *Glutathion Peroxidase 4*) y FSP1 (del inglés *Ferroptosis Suppressor Protein1*) para SKOV3. Finalmente observamos que los inductores ferroptóticos logran inducir la ferroptosis en la línea celular SKOV3, pero no en A2780. Además, se consigue un posible candidato a *knockout* de GPX4. Las perspectivas a futuro serán continuar con la investigación de la ferroptosis para que pueda acabar convirtiéndose en un tratamiento eficaz y poder paliar así el impacto del cáncer de ovario epitelial en la sociedad.

**Palabras clave:** Ferroptosis, cáncer de ovario, GPX4, FSP1, Knockout.

### 1.1 RESUMO

O cancro de ovario epitelial caracterízase por presentar unha mortalidade elevada e un difícil diagnóstico nos estadios iniciais do seu desenvolvemento. É por eso polo que surxen novos tipos de terapias para paliar a enfermidade, entre elas a ferroptosis. Esta consiste nun tipo de morte celular programada que se caracteriza por a acumulación de radicais libres de ferro nas células, o que conduce á perda de integridade da membrana celular e finalmente á morte celular. Neste traballo demostramos cómo se alteran diferentes parámetros celulares, incluíndo niveles de ROS (do inglés *Reactive Oxygen Species*), MDA (do inglés *Malondialdehyde*),  $Fe^{2+}$  (Ión ferroso) e GSH (forma reducida do glutatión) ao ser tratadas as células das liñas celulares de cancro de ovario epitelial A2780 e SKOV3 con os inductores ferroptóticos erastina e RSL3 (do inglés *RAS Selective Lethal 3*). Ademais, tamén se pretende xerar liñas celulares resistentes á ferroptosis mediante a xeración de mutantes *knockouts* de GPX4 (do inglés *Glutathion Peroxidase 4*) e FSP1 (do inglés *Ferroptosis Suppressor Protein1*) para SKOV3. Finalmente observamos que os inductores ferroptóticos logran inducir a ferroptosis na liña celular SKOV3, pero non en A2780. Ademais, conséguese un posible candidato a *knockout* de GPX4. As perspectivas a futuro serán continuar con a investigación da ferroptosis para que poida acabar convertíndose nun tratamento eficaz e poder

paliar así o impacto do cáncer de ovario epitelial na sociedade.

**Palabras clave:** Ferroptosis, cáncer de ovario, GPX4, FSP1, Knockout.

## 1.2 ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer is characterized by high mortality and difficult diagnosis in the initial stages of its development. That is why new types of therapies are emerging to alleviate the disease, including ferroptosis. This consists of a type of programmed cell death that is characterized by the accumulation of iron free radicals in cells, which leads to the loss of cell membrane integrity and finally cell death. In this work we demonstrate how different cellular parameters ROS (Reactive Oxygen Species), MDA (Malondialdehyde),  $Fe^{2+}$  (Ferrous ion) and GSH (reduced form of glutathione) when cells from the epithelial ovarian cancer cell lines A2780 and SKOV3 were treated with the ferroptotic inducers erastin and RSL3 (RAS Selective Lethal 3). In addition, we also intend to generate for cell lines resistant to ferroptosis by generating knockout mutants of GPX4 (Glutathion Peroxidase 4) and FSP1 (Ferroptosis Suppressor Protein1) for SKOV3. Finally, we observed that ferroptotic inducers were able to induce ferroptosis in the SKOV3 cell line but not in A2780. Furthermore, a possible GPX4 knockout candidate is obtained. The future perspectives will be to continue researching ferroptosis so that it can end up becoming an effective treatment to alleviate the impact of epithelial ovarian cancer in the society.

Keywords: Ferroptosis, ovarian cancer, GPX4, FSP1, Knockout.

## 2 INTRODUCCIÓN.

### 2.1 Cáncer de ovario epitelial.

No solo se trata del quinto cáncer con mayor mortalidad en España, sino que nos enfrentamos a una realidad en la que se estima que el número de nuevos casos diagnosticados en España sea de 3716 para el año 2024 (Sociedad Española de Oncología Médica., 2024)

El cáncer consiste en la rápida creación de células anormales que crecen más allá de sus límites habituales y que luego pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y extenderse a otros órganos; este último proceso se conoce como metástasis. Las metástasis generalizadas son la principal causa de muerte por cáncer (*Cancer*, 2022).

En concreto, el cáncer de ovario tiene su origen en las gónadas reproductoras femeninas (ovarios) y se puede diferenciar en tres tipos principales:

**Carcinomas epiteliales de ovario:** Son el tipo más común de cáncer de ovario. Entre el 85 % y el 90 % de estos cánceres ocurren en las células que recubren la superficie externa del ovario. En casi el 70 % de las mujeres con este tipo de cáncer de ovario el diagnóstico se hace en las fases avanzadas. (*Los tres tipos de cáncer de ovario, explicados*, 2021)

Este a su vez se clasifica en 5 subtipos histológicos diferentes (seroso de alto grado, seroso de bajo grado, endometriode, claro celular y mucinoso). Sin embargo, los avances en la comprensión molecular de los diferentes subtipos histológicos nos lleva a agruparlos en un sistema dualista (Schatten, 2021).

Por un lado, está el cáncer epitelial de ovario tipo I, caracterizado por presentar lesiones precursoras definidas, no presentan la mutación *TP53* (del inglés *Tumor Protein p53*) de manera frecuente, generalmente son indolentes, y son de crecimiento lento. Por otro lado, tenemos el cáncer de ovario epitelial tipo II, que son clínicamente más agresivos, con lesiones precursoras desconocidas, y casi de manera ubicua poseen el mutante *TP53* (Schatten, 2021).

**Tumores de células germinativas:** Representan menos del 2 % de todos los cánceres de ovario y el 90 % de las pacientes con tumores de células germinativas sobreviven unos cinco años después del diagnóstico. Su desarrollo comienza en los óvulos (*Los tres tipos de cáncer de ovario, explicados*, 2021).

**Tumores de células estromales:** Representan alrededor del 1 % de todos los cánceres de ovario y se suele detectar en las etapas tempranas de su desarrollo. Se forma en los tejidos que sostienen los ovarios (*Los tres tipos de cáncer de ovario, explicados*, 2021).

Una vez que es diagnosticado se procede con el tratamiento, que normalmente consiste en una cirugía citorreductora seguida de quimioterapia. Esta última consiste en la administración intravenosa de carboplatino y paclitaxel cada 3 semanas (Lheureux *et al.*, 2019). Los medicamentos a base de platino funcionan mediante la unión cruzada del ADN, bloqueando la división celular y resultando en la muerte celular apoptótica. Los taxanos previenen la división

celular estabilizando los microtúbulos en el citoesqueleto e induciendo la apoptosis (Schatten, 2021).

El peligro se agrava debido a las dificultades en el diagnóstico precoz del cáncer de ovario. Esto a su vez se debe a que sus síntomas suelen ser abdominopélvicos (digestivos, urinarios), vagos e inespecíficos (Marzo-Castillejo *et al.*, 2023). Además, el cáncer de ovario epitelial ha desarrollado resistencia a las terapias existentes, aumentando así las dificultades de supervivencia de los pacientes (Schatten, 2021).

## **2.2 Ferroptosis.**

Actualmente, un número cada vez mayor de estudios ha demostrado que la ferroptosis puede inhibir la progresión de las células cancerosas de ovario, y si la combinamos con quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia puede mejorar el efecto inhibitor de tumores. Además, mejora el impacto anticancerígeno del cisplatino (utilizado tradicionalmente en el tratamiento del cáncer de ovario). Por lo que se convierte en un posible tratamiento eficaz para el cáncer de ovario (Zhao *et al.*, 2022).

La ferroptosis consiste en un tipo de muerte celular regulada (MCR), ubicado entre la necrosis celular y la apoptosis, que fue nombrada por primera vez en 2012 (Tan *et al.*, 2022). A pesar de ser un tipo de MCR, los inhibidores que son eficaces para los otros tipos de muerte celular programada son ineficaces para la ferroptosis y se caracteriza por presentar mitocondrias encogidas con crestas mitocondriales disminuidas (Lei *et al.*, 2021).

También podemos considerar a la ferroptosis como un subproducto del metabolismo celular: el oxígeno y el hierro son impulsores esenciales del metabolismo, lo que conduce a la producción de ROS (del inglés *reactive oxygen species*) como un subproducto inevitable; si una clase específica de ROS, los hidroperóxidos de fosfolípidos, no pueden neutralizarse eficientemente y por lo tanto se acumulan para perturbar la integridad de la membrana plasmática, las células sucumbirán a la muerte ferroptótica (Liang *et al.*, 2022)

## **2.3 Regulación de la ferroptosis.**

### **2.3.1 Sistema Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4.**

Se ha demostrado tanto a nivel bioquímico como a nivel genético que la síntesis de GSH (glutatión), el sistema Xc<sup>-</sup> y el glutatión peroxidasa 4 (GPX4) pueden proteger a las células de la muerte provocada por diversas condiciones de estrés oxidativo, particularmente aquellas que causan la privación de tiol, incluida la inhibición del sistema Xc<sup>-</sup> (Jiang *et al.*, 2021).

GPX4 es una selenoproteína que cataliza la reducción enzimática de hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol a sus respectivos alcoholes en células de mamíferos. Su acción se debe a dos electrones proporcionados por GSH y por otros tioles de bajo peso molecular (Jiang *et al.*, 2021).

Así, como se aprecia en la **Figura 1** se trata de un antiportador dependiente de

cloruro e independiente de sodio que consta de una actividad catalítica llamada SLCA11 (en inglés *Solute Carrier Family 7 Member 11*) y una subunidad reguladora llamada SCL3A2 (en inglés *Solute Carrier Family 3 Member 2*) conectados por enlaces disulfuro. El sistema Xc<sup>-</sup> está impulsado por un gradiente de concentraciones de cistina extracelular y glutamato intracelular, de forma que se produce un transporte en proporción 1:1. Una vez absorbida la cistina esta se reduce a cisteína que se usa para la biosíntesis de GSH. Por otro lado, GSH reducirá GPX4 liberando así GSSG. Con la GPX4 activa se reducen continuamente los hidroperóxidos de fosfolípidos (Li *et al.*, 2022). Cuando se inhibe GPX4, los hidroperóxidos de fosfolípidos pueden persistir por más tiempo, iniciando la reacción en cadena de Fenton la cuál es producida por la acción de los iones ferrosos (Fe<sup>2+</sup>) y el agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (L. Li *et al.*, 2021). Esto a su vez aumentará la cantidad de hidroperóxidos de fosfolípidos, que pueden reaccionar con iones ferrosos y férricos generando radicales libres que reaccionarán con los PUFA-PL (procedente del inglés *Phospholipid-Polyunsaturated Fatty Acids*) para propagar aún más los fosfolípidos peroxidados. Así, cuando el nivel celular de estos excede un cierto umbral, las células entran en ferroptosis al disminuir la integridad de su membrana (Li *et al.*, 2022).

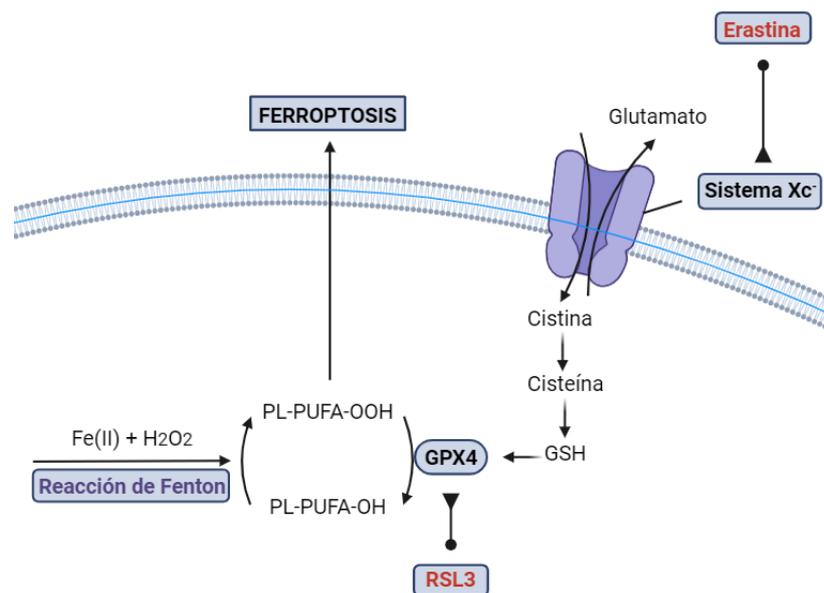


Figura 1

Figura 2

**Figura 1: Esquema del sistema Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4.** Con la ayuda de GSH, GPX4 reduce los niveles de ROS e inhibe la próxima ferroptosis, que es inhibida por RSL3. A su vez el Sistema Xc<sup>-</sup>, (antiportador cistina/glutamato) también funciona para sintetiza GSH durante este proceso, pudiendo ser bloqueado con erastina o sulfasalazina (Li *et al.*, 2021). GSH: Forma reducida del glutati6n, GSSG: Forma oxidada del glutati6n, GPX4: Glutathion Peroxidase 4, PL-PUFAs: Phospholipid-Polyunsaturated Fatty Acids, RSL3: RAS-Selective Lethal 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: per6xido de hidr6geno, Fe(II): I6n ferroso.

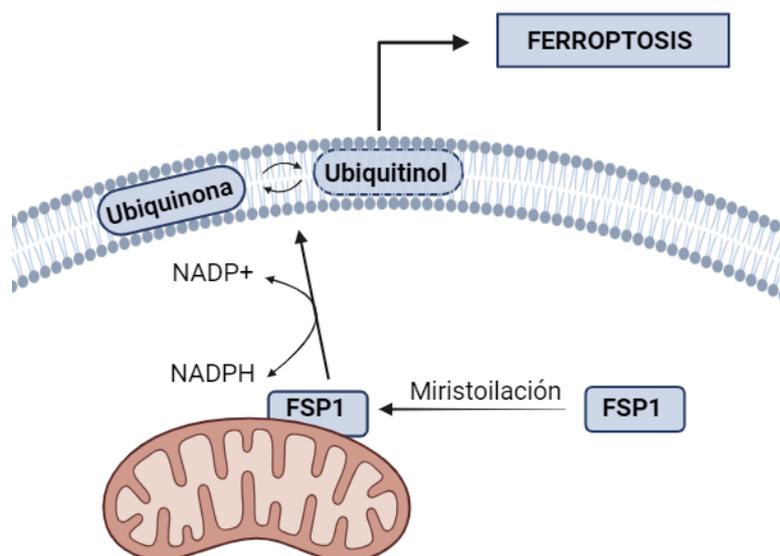
Por tanto, GPX4 es un regulador crítico para la muerte celular ferroptótica en el cáncer. El desequilibrio metabólico resultante de la inactivación de GPX4 conduce a la ferroptosis dentro de las células cancerosas. Apuntar directamente a GPX4 puede ser más efectivo para inducir la ferroptosis en las células cancerosas (Li *et al.*, 2021).

### 2.3.2 Sistema FSP1/NADPH/Ubiquinol.

Se trata de un sistema independiente de la actividad de GPX4 y del nivel de glutatión. Sin embargo, le confiere a la célula protección frente a la ferroptosis provocada por la eliminación de GPX4. Se basa en la acción de la proteína supresora de ferroptosis (FSP1) (del inglés *Ferroptosis Suppressor Protein1*) también llamada AIFM2 (procedente del inglés *Factor Mitochondria-Associated*) (Doll *et al.*, 2019).

Para facilitar la asociación de FSP1 a la bicapa lipídica se produce la previa miristoilación de la proteína en su extremo amino terminal. La enzima que cataliza el proceso se denomina pan-N-miristoil transferasa (Doll *et al.*, 2019).

Como se aprecia en la **Figura 2**, una vez que tenemos las FSP1 miristoilada y localizada en la membrana plasmática se reduce la CoQ<sub>10</sub> (ubiquinona) a CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> (ubiquinol) utilizando NADPH (procedente del inglés *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*). El ubiquinol es un antioxidante lipofílico que captura los radicales libres para prevenir la peroxidación lipídica y genera  $\alpha$ -tocoferol para capturar los radicales libres e inhibir así la ferroptosis (Li *et al.*, 2023).



**Figura 2: Esquema del sistema FSP1/NADPH/Ubiquinol.** El FSP1 miristoilado cataliza la reducción de ubiquinona a ubiquinol, consumiendo NADPH y mitigando la ferroptosis (L. Li *et al.*, 2021). *Ferroptosis Suppressor Protein1*, NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*.

En nuestro estudio nos centraremos en los ejes FSP1/NADPH/Ubiquitinol y Sistema Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4.

No obstante, es importante mencionar que existen otras rutas paralelas a estas últimas destinadas a inhibir la ferroptosis, como es el caso de la vía GCH1 (GTP-ciclohidrolasa-1)/BH4 (tetrahidrobiopterina). La GCH1 es una enzima limitante de la capacidad de síntesis de la BH4 (derivada de GTP) que tiene excepcional capacidad para eliminar la peroxidación lipídica (Li *et al.*, 2021).

#### **2.4 Moduladores de ferroptosis.**

Existen moléculas que interaccionan con las rutas de inhibición de la ferroptosis para inducirla y estas se dividen en varias clases diferentes. Sin embargo, nosotros nos centraremos en las principalmente en el estudio de la erastina y el RSL3.

Los moduladores de ferroptosis de la clase 1 incluyen erastina, artemisinina y derivados que son capaces de inhibir el sistema Xc<sup>-</sup>, impidiendo el transporte de cistina al interior celular e impidiendo la síntesis de GSH (Shintoku *et al.*, 2017).

Por otro lado, los inductores de la clase 2 incluyen el compuesto letal 3 selectivo de Ras, inhibiendo directamente la actividad de GPX4. Son el RSL3 y el difenilnyodonio (DPI1, DPI112, DP113...) (Shintoku *et al.*, 2017).

### **3 OBJETIVOS.**

El objetivo principal de este estudio es analizar el papel de la ferroptosis como un tratamiento potencial para combatir el cáncer de ovario. Para lograrlo se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de diferentes parámetros ferroptóticos tras la inducción de ferroptosis en las células de cáncer de ovario epitelial de la línea celular SKOV3 y A2780. Medimos los niveles de ROS (del inglés *Reactive Oxygen Species*), MDA (del inglés *Malondialdehyde*), y glutatión en su forma reducida (GSH).
2. Obtención de líneas celulares resistentes a la ferroptosis mediante el silenciamiento génico de *GPX4* y *FSP1*. Para ello se crean *knockouts* de estos genes.

## **4 MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **4.1 Cultivo celular.**

Nuestra finalidad es asegurar el crecimiento y mantenimiento en buenas condiciones de todas las células que poseemos. Para ello, cultivamos las células en placas Petri de 100x15mm (Corning, Estados Unidos) con 10 ml aproximadamente de medio de cultivo DMEM (procedente del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Lonza, España) suplementado con FBS (procedente del inglés *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich, España) al 10% (v/v) y antibióticos P/S (penicilina y estreptomina) (ThermoFisher Gibco, Estados Unidos) al 1% (v/v) para combatir las posibles infecciones bacterianas. Además, cada 2 o 3 días realizamos un cambio de medio de cultivo.

Una vez que tenemos una confluencia del 80% de células dispuestas en una monocapa y adheridas a la superficie de la placa, podemos proceder al levantamiento de las células para recoger las células con las que experimentaremos posteriormente.

Para ello primero lavamos la placa que queremos levantar con DPBS (procedente del inglés *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Corning, España), luego añadimos tripsina al 0,25% (p/v) (Lonza, España) e incubamos 5 minutos a 37 °C. La tripsina es una proteína que hace que las células no sean capaces de adherirse a las paredes de la placa, de forma que hace que queden en suspensión (Manira *et al.*, 2014). Una vez finalizada la incubación, añadimos a la placa el doble de medio de cultivo que el volumen de tripsina que hemos añadido antes (de esta forma inactivaremos la acción de la tripsina) y centrifugamos a 2100  $xg$  durante 5 minutos. Cuando finaliza la centrifugación descartamos el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado celular, el cual resuspendemos en el medio de cultivo nuevo.

A continuación, realizamos un recuento al microscopio (Nikon eclipse TS100, España) en cámara de Neubauer (Sigma-Aldrich, España), ajustando el volumen para obtener una concentración exacta de 50.000 células por pocillo.

Es importante resaltar que todo este proceso de cultivo celular es realizado en una cámara de flujo laminar vertical y bioseguridad tipo II (Telstar AV-30/70, España), y que cuando se termina con el proceso de manipulación las placas son almacenadas en una cámara incubadora (Sanyo CO<sub>2</sub> Incubator, España) a 37°C, 95% (v/v) de humedad y 5% (v/v) de presión del CO<sub>2</sub>.

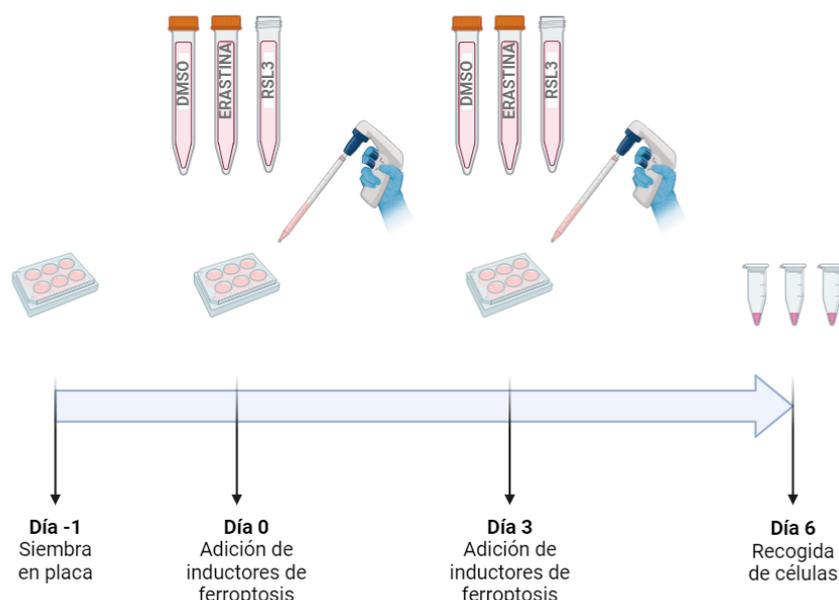
Es importante realizar una prueba de contaminación de micoplasma para asegurarnos de que estamos trabajando con células sin ninguna contaminación.

### **4.2 Inducción de ferroptosis.**

Inducimos ferroptosis en dos líneas celulares de cáncer de ovario epitelial de SKOV3 y A2780 tratadas con erastina y RSL3 (ambos procedentes de MedChemExpress, Reino Unido) como inductores. Además, utilizaremos DMSO (Dimetil sulfóxido) (MedChemExpress, Reino Unido) como control.

Inicialmente sembramos 50.000 células en cada uno de los seis pocillos de la placa (Corning, Alemania) y dejamos que las células se adhieran a la superficie de la placa. A continuación, prepararemos medios de cultivo con DMSO, erastina y RSL3, todos ellos a una concentración de 1  $\mu$ M.

Como se aprecia en la **Figura 3**, 24 horas después del sembrado (día 0) añadimos el medio de cultivo con los inductores ferroptóticos y el DMSO en cada uno de los 6 pocillos (Corning, Alemania) (dos pocillos con DMSO, dos con Erastina y 2 con RSL3). A los 3 días retiramos el medio que había y volvemos a añadir de nuevo la misma concentración de inductores ferroptóticos en el medio de cultivo. Finalmente, recogemos las células tras la inducción de ferroptosis para los próximos experimentos.



**Figura 3: Esquema de inducción de ferroptosis:** Sembramos en una placa de cultivo de 6 pocillos, 50.000 células por pocillo y dejamos que se adhieran durante 24 horas. Añadimos los inductores de ferroptosis (RSL3 y Erastina) y como control DMSO tras 24 horas de sembrar las células y a los 3 días del comienzo del tratamiento. Finalmente, recogemos las células para la evaluación de los parámetros de ferroptosis el día 6.

Para la recolecta de las muestras retiramos el medio de los pocillos y lo centrifugamos a 2100  $xg$  durante 5 minutos. A continuación, lavamos los pocillos con DPBS (procedente del inglés *Dulbecco's Phosphate Buffered Solution*), añadimos 100 $\mu$ l de buffer TrisHCl (40mM y pH 7,4) (ThermoFisher, Estados Unidos) y rascamos el fondo del pocillo con la punta de una pipeta para asegurarnos la recogida de todas las células del fondo. Finalmente recolectamos el sobrenadante con las células y lo congelamos a  $-20^{\circ}C$  para posteriormente medir los parámetros de ferroptosis (GSH, ROS, MDA y  $Fe^{2+}$ ).

### **4.3 Medida de parámetros ferroptóticos.**

#### **4.3.1 Cuantificación de proteína mediante BCA.**

Para poder medir los parámetros de MDA, ROS, glutatión reducido (GSH) y  $Fe^{2+}$  es necesario conocer la cantidad de proteína que hay en nuestras muestras. Por lo que para cuantificarla utilizamos un kit comercial de BCA (procedente del inglés *Bicinchoninic Acid*) llamado Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Madrid).

Previamente se prepara una curva de calibrado mediante concentraciones crecientes de BSA (procedente del inglés *Bovine Serum Albumin*) de 0 a 2  $\mu$ M. Una vez tenemos nuestra curva preparada añadimos 5  $\mu$ l de cada concentración de nuestra curva en una placa de 96 pocillos (Avantor, Estados Unidos). Además, también añadimos 5  $\mu$ l de cada una de nuestras muestras (hacemos dos réplicas técnicas por concentración y muestra). Después, añadimos 100  $\mu$ l de reactivo comercial a cada uno de los pocillos y dejamos incubar a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido ese tiempo, procedemos a medir la absorbancia en un Synergy HTX (Agilent, Estados Unidos) a 480 nm.

#### **4.3.2 Evaluación de los niveles de MDA.**

Para medir MDA empleamos el kit comercial TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) Assay Kit Colorimetric/Fluorometric (Canvax, Valladolid). Inicialmente preparamos una curva de calibrado con concentraciones de 0 a 50  $\mu$ M de MDA. A continuación, en una placa de 96 pocillos (Corning, España) añadimos 5  $\mu$ l de cada muestra a la placa y de las concentraciones de los estándares (hacemos dos réplicas técnicas por muestra y concentración de los estándares de la curva) y añadimos a cada pocillo 145  $\mu$ l de SDS (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*). Finalmente, dejamos incubar durante 30 minutos a 50°C y posteriormente medimos la absorbancia en el espectrofotómetro Synergy HTX (Agilent, Estados Unidos) a 520 nm.

Apreciamos en la **Figura 4** cómo este ensayo se basa en la reacción del MDA con el TBA (procedente del inglés *Thiobarbituric Acid*) para formar un cromógeno rosa, que puede detectarse en un espectrofotómetro Synergy HTX (Agilent, Estados Unidos) a 520 nm («TBARS Assay Kit», s. f.).



comercial. A continuación, realizamos la curva de calibrado de GSH realizando diluciones seriadas en SSA de la solución estándar previamente preparada de GSH al 0,5%. De esta forma obtenemos una curva con concentraciones crecientes de 0,78 a 25  $\mu\text{M}$ .

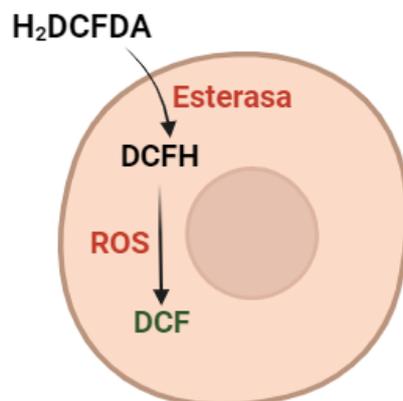
Añadimos a la placa de 96 pocillos (Corning, España) 5  $\mu\text{l}$  de las soluciones necesarias para realizar la curva de calibrado de GSH y añadimos otros 5  $\mu\text{l}$  de cada una de nuestras muestras (hacemos dos réplicas técnicas para las de muestras y los puntos de la curva de calibrado para GSH). Una vez que tenemos esto preparado añadimos 60  $\mu\text{l}$  de solución tampón a cada pocillo e incubamos durante una hora a 37°C. Una vez finalizada la incubación añadimos 60  $\mu\text{l}$  de la solución sustrato, otros 60  $\mu\text{l}$  de la solución enzima e incubamos 10 minutos a 37°C y a oscuras en una incubadora (Labbox, Barcelona). Por último, medimos la absorbancia en el espectrofotómetro Synergy HTX (Agilent, Estados Unidos) a 405 nm.

#### **4.3.4 Medida de ROS.**

Para la medición de los niveles de ROS empleamos el kit comercial llamado ROS *Detection Assay Kit* (DCFDA/H<sub>2</sub>DCFDA) (Canvax, Valladolid).

Lo primero que se hizo fue poner 2,5  $\mu\text{l}$  de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pocillos (Corning, España). Después, le añadimos a cada muestra tampón TrisHCl al 1X y el fluoróforo H<sub>2</sub>DCFDA (procedente del inglés *Dichlorodihydrofluorescein-diacetate*) a concentración 50  $\mu\text{M}$ . A continuación, incubamos 30 minutos a 37 °C y a oscuras, y cuando finalice la incubación medimos la absorbancia en el espectrofotómetro Synergy HTX (Agilent, Estados Unidos) a 530 nm.

Como se aprecia en la **Figura 6** el compuesto H<sub>2</sub>DCFDA entra en las células por difusión y las enzimas esterasas intracelulares escinden los grupos acetilo del compuesto para formar DCFH (procedente del inglés *2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate*), la cual es oxidada por ROS y lo convierte DCF (procedente de inglés *2',7'-dichlorofluorescein*), un compuesto que emite una longitud de onda de 530 nm (Kim & Xue, 2020).



**Figura 6: Esquema del mecanismo molecular empleado para medir ROS.** *H<sub>2</sub>DCFDA* (procedente del inglés *Dichlorodihydrofluorescein-diacetate*), *DCFH* (procedente del inglés *2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate*), *DCF* (procedente del inglés *2',7'-dichlorofluorescein*), y *ROS* (procedente del inglés *Reactive Oxygen Species*).

#### 4.3.5 Medida del ión ferroso (Fe<sup>2+</sup>).

Para cuantificar los niveles de ión ferroso se utilizó el kit comercial *Iron Colorimetric Assay Kit* (E-BC-K139-S) (Elabscience, Estados Unidos).

Primero preparamos una curva de calibrado a concentraciones crecientes de ión ferroso (de 0 a 60 M). Después, pasamos 20 µl de cada una de nuestras muestras y de las concentraciones de calibrado a un tubo de 1,5 ml (Eppendorf, Alemania) y se le añaden 5,45 µl de agente reductor de hierro, tanto a las muestras como a la curva de calibrado. Seguidamente, incubamos todo a 100°C durante 5 minutos, dejamos enfriar 10 minutos, depositamos 10 µl de cada muestra (hacemos dos réplicas técnicas por muestra) a cada uno de los 96 pocillos de la placa y medimos la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro Synergy HTX (Agilent, Estados Unidos).

#### 4.3.6 Estadística.

Inicialmente normalizamos los datos obtenidos, después hacemos una prueba F para comprobar si las varianzas entre muestras son iguales o diferentes y por último hacemos una prueba de *t-student* pareado comparando DMSO con Erastina y DMSO con RSL3 fijándonos en el p-valor de una sola cola. Expresamos los resultados como media ± desviación estándar, y los p-valor como \* para un p-valor < 0,05 y \*\* para un p-valor < 0,01. Cabe destacar que para realizar el análisis estadístico empleamos el software estadístico de Microsoft Excel.

#### 4.4 Generación de mutantes knockouts de *FSP1* y *GPX4* en células SKOV3.

Por un lado, tenemos líneas celulares de SKOV3 (American Type Culture Collection HTB 77) y A2780 (Sigma-Aldrich, España, 93112519) que han sido

modificadas con modificación genética viral empleando un ADN plasmídico (ADNp) denominado vector vacío, como control de la técnica, y por otro lado ADNp que contiene sgARNs de *GPX4* y *FSP1* para la generación de *Knockouts* de *GPX4* y *FSP1*, respectivamente.

#### **4.5 Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.**

Para extraer el ADNp utilizamos un kit comercial de extracción llamado *PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit* (ThermoFisher, Estados Unidos) y seguimos las instrucciones del fabricante.

Inicialmente decantamos las células para conseguir un precipitado celular centrifugando a 4000 *xg* durante siete minutos. A su vez, equilibramos la columna con 10 mL de tampón de equilibrio. Una vez obtenido el precipitado celular se resuspende en 4 mL del tampón de resuspensión. Después, añadimos 4 mL de tampón de lisis, mezclando por inversión e incubamos 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, añadimos 4 mL del tampón de neutralización.

Continuamos centrifugando a 13.000 *xg* durante 10 minutos. Después, añadimos el sobrenadante a las columnas con una pipeta Pasteur y esperamos a que el líquido baje por la columna. A continuación, procederemos a realizar dos lavados de 10 minutos con el tampón de lavado. Una vez realizados los lavados, añadimos 5 mL del tampón de elución. Seguidamente, precipitamos el ADNp al añadirle 3,5 mL de isopropanol y centrifugamos a 13.000 *xg* durante 30 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante. Después, resuspendemos el precipitado celular en etanol al 70% (v/v) y centrifugamos a 13.000 *xg* y a 4°C durante 5 minutos, descartando el sobrenadante. Es importante secar el ADNp al vacío durante 10 minutos y lo resuspendemos en 100 µL de tampón de elución.

#### **4.6 Transfección en células HEK293T y generación de partículas lentivirales.**

Para la obtención de partículas lentivirales se utiliza la línea celular HEK293T cultivada en medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% PenStrep, y las cuales son transfectadas con un cocktail de tres construcciones plasmídicas que incluyen 0,8 µg de pMD2.G (Addgene # 12259 ;<http://n2t.net/addgene:12259> ;RRID:Addgene\_12259), 1,6 µg de psPAX2 (Addgene # 12260 ;<http://n2t.net/addgene:12260> ;RRID:Addgene\_12260) y 5 µg del plásmido lentiCRISPR v2 (Addgene # 52961 ;<http://n2t.net/addgene:52961> ;RRID:Addgene\_52961) en 500 µl de Opti-MEM (Gibco, Estados Unidos). Por otro lado, preparamos en un tubo de 1,5 ml 60 µg de PEI (del inglés *Poly(ethyleneimine)*) en 500 µl de Opti-MEM por cada placa. A continuación, incubamos 5 minutos a 37°C, los mezclamos y volvemos a incubar durante 25 minutos a 37°C. Por último, añadimos un 1mL de mezcla en cada placa y recogemos el medio con las partículas lentivirales en suspensión a las 48 y 72 horas. Es importante tener en cuenta que el medio de cultivo no debe contener

antibióticos en este caso.

Posteriormente infectamos la línea celular SKOV3 con dichas partículas lentivirales, para lo que comenzamos filtrando el medio con un filtro de 0,45 µm (Scharlab, España). A continuación, se suplementa dicho medio con polibreno (Sigma-Aldrich, España) en una proporción 1:1000 e infectamos las células un total de tres veces cada 8 horas, incluyendo lavados con DPBS entre las distintas dosis lentivirales. Tras la última infección, se añade medio DMEM nuevo (suplementado con 10% FBS y 1% PenStrep) para a las 48 horas añadir medio suplementado con el antibiótico de selección (puromicina 3 µg/ml) durante 2 semanas para la selección.

#### **4.7 Aislamiento de clones por dilución (Single-cell cloning).**

Tras dos semanas de selección en medio de cultivo suplementado con puromicina recogemos las células y determinamos el número de células por mL. A continuación, diluimos para conseguir que haya 10 células/mL para después sembrar 100 µL en cada pocillo de placas de 96 pocillos y las dejamos crecer. A las 24 horas hacemos una verificación de los pocillos que contengan solamente una célula en la superficie, descartando aquellos que no tengan ninguna célula o que tengan más de una célula. Finalmente, permitimos el crecimiento de los pocillos seleccionados, siempre comprobando que efectivamente tenemos una sola colonia empleando un microscopio óptico (Nikon eclipse TS100, España).

#### **4.8 Extracción y cuantificación de los niveles de proteínas totales.**

La comprobación de mutantes se realizará por Western-Blot para detectar los niveles de proteína en cada clon. Para ello, es necesario en primer lugar realizar la extracción y cuantificación de proteína.

En primer lugar, extraemos las proteínas de cada muestra añadiendo 60 µL de tampón de lisis RIPA (procedente del inglés *Radio-Immunoprecipitation Assay*) (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1,0% (v/v) NP-40, 0,1% (p/v) SDS (dodecilsulfato sódico), 0,5% (p/v) DOC (desoxicolato de sodio) y 2,0 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), suplementado con inhibidor de proteasas (ThermoFisher, Estados Unidos) al 1X, resuspendemos el precipitado celular y mantenemos las muestras a 4°C durante 20 minutos en agitación con noria. A continuación, centrifugamos a 18.200 xg durante 10 minutos y 4°C y recogemos el sobrenadante. Después, preparamos 10 µl de una dilución 1/10 y añadimos 4 µL de cada una de estas muestras a una placa de 96 pocillos (Corning, España). Finalmente, añadimos 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Estados Unidos) al 1X y medimos su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Synergy HTX (Agilent, Estados Unidos).

Paralelamente, en la misma placa de 96 pocillos también añadimos concentraciones crecientes de BSA (procedente del inglés *Bovine Serum Albumin*) entre 0 y 1 µg/µL para preparar la recta de calibrado.

#### 4.9 Western Blot.

Preparamos 20 µg de proteínas totales de cada muestra en 25 µl de volumen total de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8 (Sigma-Aldrich, España) y tampón de carga Laemmli al 1X (Tris-HCl 312,5 mM pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y les sometimos un tratamiento térmico de 95 °C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Para la electroforesis preparamos el gel separador al 12 % (v/v) de acrilamida como indica la **Tabla 1**.

**Tabla 1: Compuestos utilizados para hacer el gel separador de acrilamida al 12 % (v/v).** APS (procedente del inglés Ammonium Persulfate) y TEMED (Tetrametiletilendiamina).

Compuesto	Volumen	Concentración inicial
H <sub>2</sub> O mili-Q	2472 µl	
Tris-HCl (pH 8,8)	3000 µl	10mM
Acrilamida	2400 µl	40% (v/v)
SDS	40 µl	20% (p/v)
APS	80 µl	10% (p/v)
TEMED	8 µl	116,21 g/mol

A continuación, añadimos isopropanol para aislar la acrilamida del oxígeno y que así polimerice bien el gel.

Una vez polimerizado preparamos el gel concentrador al 4% (v/v) de acrilamida como se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Compuestos utilizados para hacer el gel concentrador de acrilamida al 4% (v/v).**

Compuesto	Volumen	Concentración inicial
H <sub>2</sub> O mili-Q	1272 µl	
Tris-HCl (pH 6,8)	938 µl	312,5 mM
Acrilamida	250 µl	40% (v/v)
SDS	12,5 µl	20% (p/v)
APS	25 µl	10% (p/v)
TEMED	2,5 µl	116,21 g/mol

Cuando ya tenemos preparado el gel concentrador lo llevamos a la cubeta de electroforesis (Bio-Rad, Estados Unidos) y rellenamos con tampón de electroforesis (Tris-Base 0,02 M (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), glicina 0,2 M (NZYTech, Portugal). Después, cargamos 6 µL del marcador de pesos moleculares (NZY Colour Protein Marker II, NZYTech, Portugal) y 25 µL de cada una de las muestras en los pocillos del gel. Llevamos a cabo la electroforesis 100 V hasta que las muestras salen del gel concentrador y después a 180 V durante la separación de proteínas por pesos moleculares.

Una vez finalizada la electroforesis comenzamos con la transferencia de las

proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, LifeSciences, Estados Unidos). Para ello, hacemos una transferencia húmeda con un sistema tipo sándwich con el siguiente orden: almohadilla (Bio-Rad, Estados Unidos), papel de filtro (Filter-Lab, España), gel, membrana, papel de filtro y almohadilla, de tal forma que el gel quede colocado hacia el cátodo y la membrana hacia el ánodo. Lo introducimos todo en la cubeta de transferencia, la llenamos 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 aplicamos una diferencia de potencial de 300 mA de forma constante durante una hora.

Por último, realizamos el inmunoensayo, y para ello bloqueamos la membrana con leche sin grasa al 10% (p/v) (Nestlé Sveltesse, España) en PBS-T (procedente del inglés *Phosphate Buffered Saline* suplementado con Tween 20 al 0,1% (v/v)) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e incubamos la membrana con los anticuerpos primarios conejo anti-FSP1 (Cat. No.: 20886-1-AP, Invitrogen, Estados Unidos) y conejo anti-GPX4 (Cat. No.: MA532B27, Invitrogen, Estados Unidos) a la dilución 1:500 toda la noche en PBS-T con leche al 5% (p/v). Después, realizamos tres lavados de 10 minutos en PBS-T, incubamos una hora con el anticuerpo utilizado como control de carga (conejo anti-tubulina (Clone 11H10, 2125; Cell Signaling) (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, realizamos de nuevo otros tres lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno, incubamos durante una hora con proteína G conjugada con HRP (del inglés *Horseradish Peroxidase*) (Millipore, Estados Unidos) (1:5000). Finalmente, hacemos otros tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T y a continuación revelamos con el kit de quimioluminiscencia *Pierce™ Fast Western Blot Kit, ECL Substrate* (Thermo Fisher, Estados Unidos) en el fotodocumentador de geles Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad, Estados Unidos).

#### **4.10 Extracción de ADN Genómico.**

Para la extracción del ADN genómico, se empleó el kit de aislamiento NZY Tissue gDNA (NZYTech). Inicialmente, se recolectaron las células de las placas p100 que dieron mejor resultado en el Western Blot, conservando una pequeña porción en placas p6 para mantener el cultivo. La otra porción se centrifugó a 1.400 xg durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los pellets se lavaron con PBS y se centrifugaron nuevamente. Tras retirar el PBS, las células se resuspendieron en 200 µL de Buffer NT1. Se añadieron 25 µL de proteinasa K y 200 µL de Buffer NL (previamente agitado). Los tubos se agitaron en el vórtex y luego se incubaron durante 10 minutos a 56 °C en un termobloque.

Se añadieron 210 µL de etanol absoluto a cada muestra y se mezclaron nuevamente en el vórtex. La muestra se transfirió a una columna NZY Spin Tissue Column colocada sobre un tubo colector y se centrifugó a 15.400 xg

durante 1 minuto. Luego se lavó la columna primero con 500 µL de Buffer NW1 (centrifugación a 15.400 xg durante 1 minuto) y después con 600 µL de Buffer NW2, centrifugando nuevamente. Se eliminó el contenido del tubo colector entre cada centrifugación. Posteriormente, se realizó otra centrifugación a 15.400 xg durante 2 minutos. Finalmente, la columna se colocó en un tubo Eppendorf y se incubó con Buffer NE (de elución, previamente calentado en baño para mayor rendimiento) durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una última centrifugación a 15.400 xg durante 2 minutos, obteniendo así el ADN genómico, que se cuantificó.

#### PCR

Para la amplificación de las regiones genómicas que contenían las dianas GPX4 y FSP1, se utilizaron los cebadores AJVV587f + AJVV588r y AJVV561f + AJVV562r, respectivamente (Tabla x). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando la polimerasa NZYTaQ II DNA polymerase (NZYTech) y 100 ng de ADN genómico de cada candidato en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). El programa de PCR utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial del ADN para generar ADN monohebra y activación de la enzima (4 minutos, 95 °C). A continuación, se realizaron 35 ciclos de 3 etapas: desnaturalización (15 segundos, 95 °C), anillamiento (30 segundos, 55 °C) y extensión (1 minuto, 72 °C). Finalmente, se llevó a cabo un ciclo extra (5 minutos, 72 °C) para completar los amplicones incompletos.

**Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación.**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' &gt; 3'</b>	<b>Gen</b>
<b>AJVV587f</b>	GAAGTAAACTACTACTCAGCTCGTCGACCTGC	GPX4
<b>AJVV588r</b>	CCCTTGGGTTGGATCTTCATCCACTTCC	GPX4
<b>AJVV561f</b>	GGAATGGGCTGGAAGTGGGATACC	FSP1
<b>AJVV562r</b>	CCTGTCTCCACGGAGGCTCGGAG	FSP1

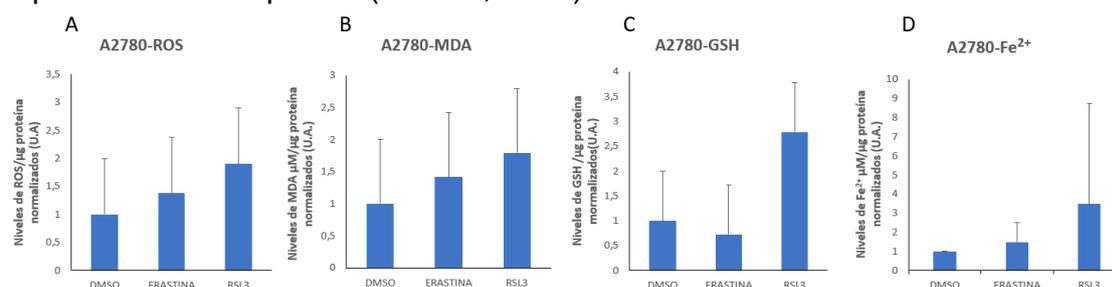
Una vez finalizada la reacción de PCR, los resultados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El volumen restante del producto amplificado se purificó utilizando el kit NZYGelpure (NZYTech) para eliminar los componentes de la reacción de PCR que pudieran interferir en la secuenciación. Se mezclaron 10 volúmenes de Buffer de Unión con cada muestra y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió la solución a una columna de sílica, se centrifugó y se siguieron los pasos descritos en el apartado 2.4 de “Material y métodos”.

Una vez purificado y cuantificado el producto de PCR, se envió a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) para confirmar la presencia de indels (inserciones y/o deleciones) en el locus de GPX4 y SFP1 de los diferentes candidatos.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

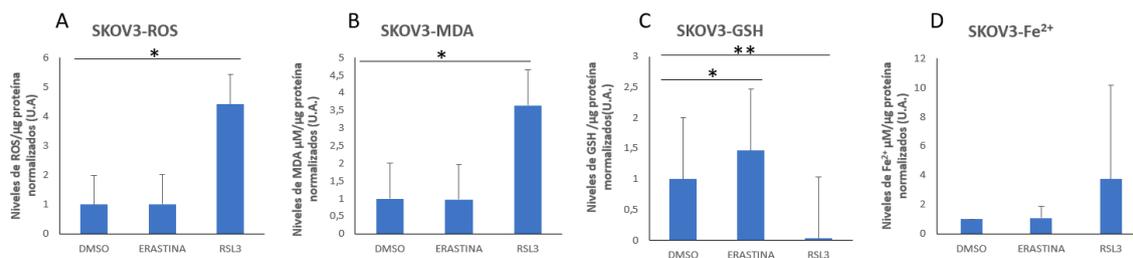
### 5.1 Evaluación de la inducción de ferroptosis en dos líneas celulares de cáncer de ovario epitelial. (A2780 Y SKOV3).

Los parámetros que analizamos son ROS, MDA, GSH y  $Fe^{2+}$ . Las células que han sufrido ferroptosis incrementan los niveles de  $Fe^{2+}$  y de MDA debido al aumentado de la peroxidación lipídica, así como una disminución de los niveles de GSH, ocasionando una acumulación de los productos procedentes de la peroxidación lipídica como MDA y 4HNE (Alarcón-Veleiro *et al.*, 2023). A su vez, altos niveles de ROS, también son indicativos de que se está produciendo el proceso de ferroptosis. (Li *et al.*, 2021).



**Figura 7: Niveles de los parámetros ferroptóticos para A2780.** Histogramas de la media y desviación estándar de A) Niveles de ROS, normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO. B) Niveles de MDA normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO. C) Niveles de GSH normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO y D) Niveles de  $Fe^{2+}$  normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO. Para comparar los resultados hicimos una prueba de *t*-student pareado (\* si *p*-valor<0,05 y \*\* si *p*-valor<0.01). Las unidades de medida son unidades arbitrarias (U.A.). Empleamos dos réplicas biológicas y en cada una de ellas dos réplicas técnicas.

Con respecto a la línea celular de cáncer de ovario A2780 se observa un incremento en los niveles de ROS al tratamiento con erastina y RSL3 con respecto a DMSO, siendo mayor los niveles de ROS al aplicar el RSL3 con respecto a Erastina (**Figura 7A**). En cuanto a los niveles de MDA vemos que ocurre exactamente lo mismo que con ROS (**Figura 7B**). Cuando evaluamos los niveles de  $Fe^{2+}$  observamos que ocurre lo mismo que con ROS y MDA, pero hay que tener en cuenta que la variabilidad entre las dos réplicas biológicas es muy elevada, y esto se ve reflejado en la gran desviación típica que se presenta. Por lo contrario, en el caso del GSH sí que apreciamos una tendencia a la disminución del GSH con el tratamiento con la erastina, en cambio con el tratamiento con RSL3 se observa un incremento. (**Figura 7C**).



**Figura 8: Niveles de los parámetros ferroptóticos para SKOV3.** Histogramas de la media y desviación estándar de A) Niveles de ROS, normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO. B) Niveles de MDA normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO. C) Niveles de GSH normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO y D) Niveles de Fe<sup>2+</sup> normalizados frente a los valores de las células tratadas con DMSO. Para comparar los resultados hicimos una prueba de t-student pareado (\* si p-valor<0,05 y \*\* si p-valor<0.01). Las unidades de medida son unidades arbitrarias (U.A.). Empleamos dos réplicas biológicas y en cada una se engloba una única réplica técnica.

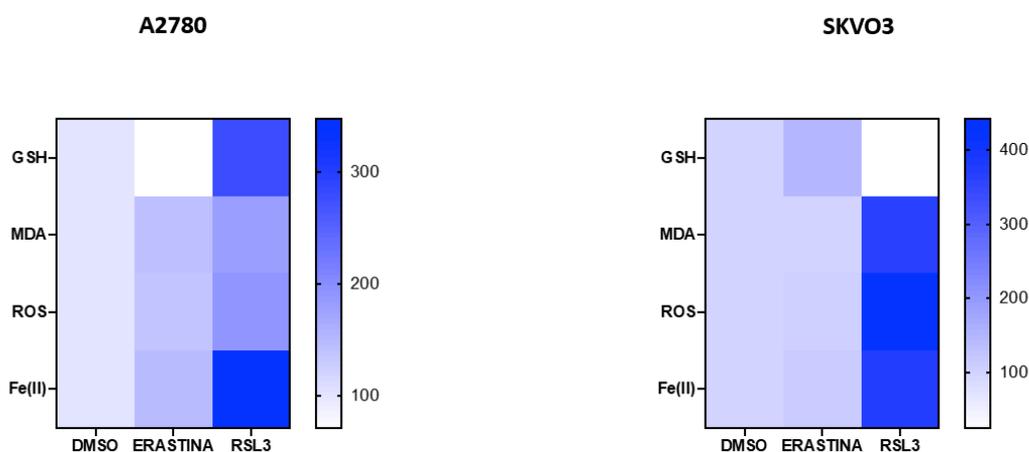
Centrándonos en SKOV3 observamos tanto para ROS (**Figura 8A**) como para MDA (**Figura 8B**) que, aunque la erastina no aumenta los niveles de estos dos parámetros al comparar las células tratadas con erastina con respecto a las tratadas con DMSO, con RSL3 sí se observa un gran incremento en los niveles y además esas diferencias son estadísticamente significativas. Con los niveles de Fe<sup>2+</sup> ocurre lo mismo que con los parámetros anteriores, pero aquí la variabilidad entre las dos réplicas biológicas es mucho mayor, y esto se ve reflejado en la gran desviación típica que presenta el RSL3 (**Figura 8D**). Se confirma que el tratamiento con erastina incrementa de forma estadísticamente significativa los niveles de GSH con respecto a las tratadas con DMSO, (**Figura 8C**). Sin embargo, hay una disminución estadísticamente significativa en los niveles de GSH con el tratamiento con RSL3 con respecto al DMSO.

Como se aprecia en la **Figura 9**, los niveles de los parámetros ferroptóticos están aumentados en general, al tratar las células de cáncer de ovario epitelial con RSL3 tanto para SKOV3 como para A2780. Esto puede deberse a que el RSL3 actúa inhibiendo directamente uno de los mecanismos antioxidantes principales de la célula, el sistema GPX4, mientras que la erastina actúa inhibiendo el sistema Xc-, que es el punto de inicio del mecanismo de ferroptosis (Rodríguez & Hernando, 2024). Con respecto al tratamiento con la erastina sí que podemos apreciar un ligero incremento en los parámetros ferroptóticos de MDA, ROS y Fe<sup>2+</sup>, así como una disminución de GSH en las células tratadas en comparación con el DMSO en la línea celular A2780. Sin embargo, en SKOV3 no se aprecian cambios en los parámetros de MDA, ROS y Fe<sup>2+</sup>, pero sí visualizamos un incremento de GSH con respecto a los de DMSO.

Para ambas líneas celulares los resultados coinciden con los publicados en el estudio de (Alarcón-Veleiro *et al.*, 2023), siendo así mayores los niveles de ROS, MDA y Fe<sup>2+</sup> para las células en las que ha sido inducida la ferroptosis con

RSL3 que las tratadas con DMSO, además de una disminución de los niveles de GSH, lo que nos lleva a pensar que probablemente sea debido a que este está pasando a su forma oxidada (GSSG). Estos datos nos revelan que evidentemente sí que se produce la ferroptosis.

Sin embargo, podemos comprobar que en general, por un lado, los niveles de ROS, MDA y  $Fe^{2+}$  tratados con erastina son prácticamente iguales que con DMSO y por otro lado, que los niveles de GSH tratados con erastina suben de forma estadísticamente significativa con respecto a los de DMSO (en el caso de SKOV3). Esto probablemente se deba a que la concentración de erastina que usamos (1 $\mu$ M) no era lo suficientemente alta ya que en el estudio de Park *et al* (Park & Chung, 2019) usan hasta un 10  $\mu$ M y se aprecia una reducción significativa de la viabilidad celular. También, probablemente consiguiésemos mejores resultados si hubiésemos usado alguna forma análoga de la erastina, como por ejemplo IKE (procedente del inglés *Imidazole ketone erastin*), la cual fue usada en el estudio de Zhang *et al* (Zhang *et al.*, 2019). Su funcionamiento se basa en la incorporación de un carbonilo que le confiere a la molécula la capacidad de interacción covalente reversible con proteínas, lo que resulta en una mejora de potencia de hasta 100 veces (Zhang *et al.*, 2019).



**Figura 9:** Mapa de calor de la variación en los niveles de los parámetros ferroptóticos para A2780 y SKOV3 al aplicar los inductores ferroptóticos erastina y RSL3 (del inglés *RAS Selective Lethal 3*).

## 5.2 Evaluación de los posibles candidatos *knockouts* de *GPX4* y *FSP1* para línea celular de cáncer de ovario epitelial SKOV3.

Con la finalidad de generar líneas celulares resistentes a la ferroptosis, utilizamos la tecnología Crispr/Cas para obtener mutantes *knockouts* de los genes *GPX4* y *FSP1*. Tras los pasos de transfección celular en la línea celular HEK293T para obtención de partículas virales, y la posterior modificación genómica de las líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3, se realizó un asilamiento de los posibles candidatos resistentes al antibiótico puromicina por

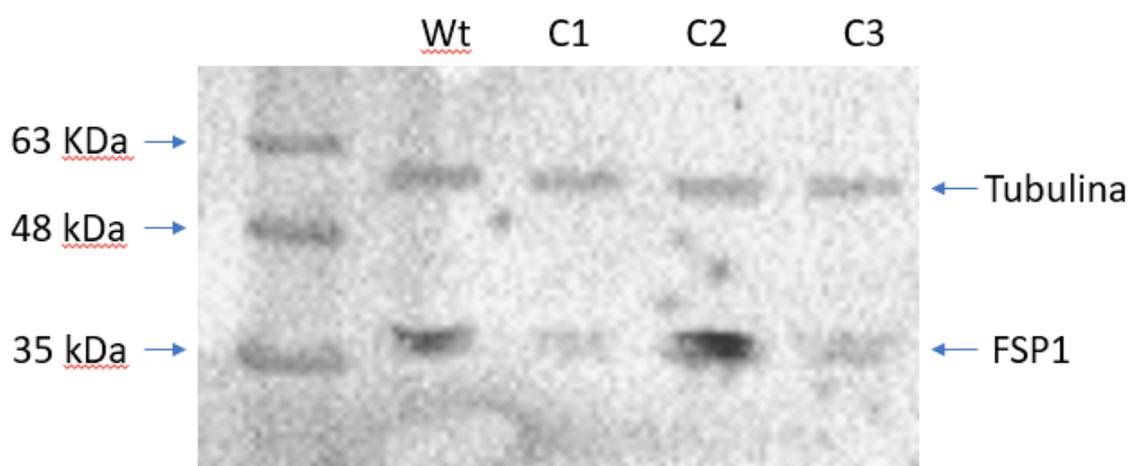
dilución (*Single-cell cloning*).

En la **Tabla 4** mostramos el número de los posibles candidatos con los que partimos y los que finalmente testeamos por *Western Blot*. Pusimos un total de 192 pocillos para *FSP1* y 96 pocillos para *GPX4*. Observamos al microscopio óptico (Nikon eclipse TS100, España) cada uno de los pocillos con la finalidad de buscar cuáles de ellos presentaban una única célula (clon). Durante tres semanas aproximadamente fuimos comprobando que tuviera lugar la expansión clonal de esa célula en cada uno de los pocillos y se formará una monocapa que ocupara el 80% de la superficie del pocillo, siendo ese momento cuando podemos levantar las células para comprobarlas por Western-Blot. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el número de pocillos finalmente comprobados disminuye y esto se debe a que, durante el proceso, muchas células fueron dejando de ser viables.

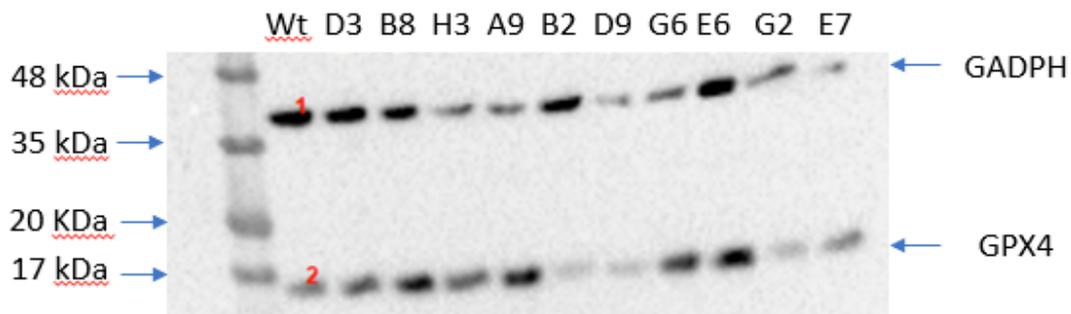
**Tabla 4: Aislamiento de los clones por dilución (*Single-cell cloning*).**

	Número de pocillos totales.	Número de pocillos con una sola célula.	Número de pocillos testeados por Wester-Blot.
<b>GPX4</b>	96	16	10
<b>FSP1</b>	192	8	4

En total se comprobaron 10 candidatos para *GPX4* y 3 para *FSP1*. En *FSP1* no se obtuvo ningún candidato como se puede apreciar en la **Figura 10**. En el caso de *GPX4* en general observamos cómo se produce una gran variabilidad en los niveles de proteína con respecto al *Wild-type* (**Figura 11**).

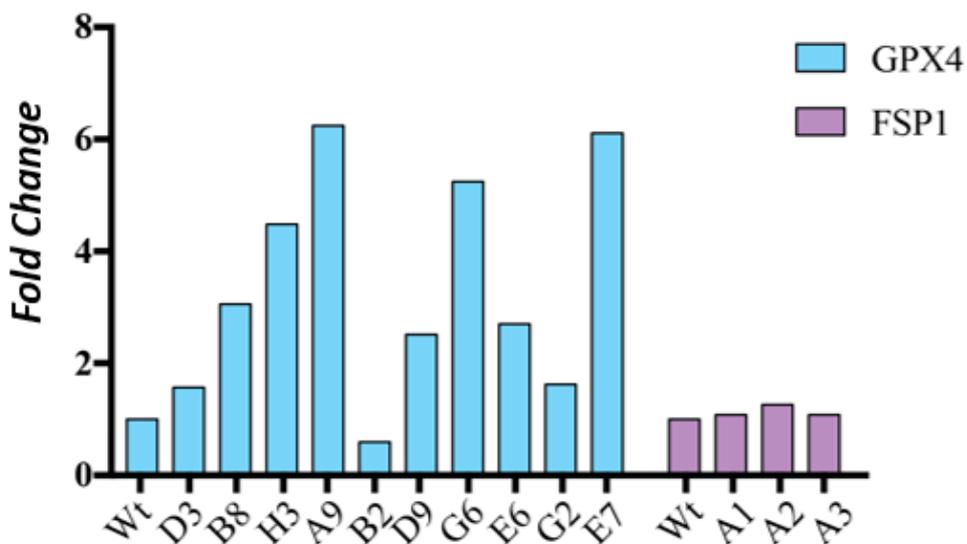


**Figura 10: Evaluación de los posibles candidatos knockouts de *FSP1* en cáncer de ovario epitelial.** Imagen del Western Blot en el que se muestra las bandas correspondientes a Tubulina y *FSP1* en las muestras de todos los posibles knockouts.



**Figura 11: Evaluación de los posibles candidatos knockouts de GPX4 en cáncer de ovario epitelial.** Imagen del Western Blot en el que se muestra las bandas correspondientes a GAPDH (procedente del inglés Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) y GPX4 en las muestras de todos los posibles knockouts.

Los resultados obtenidos acerca de los niveles de proteína de los distintos clones de GPX4 y FSP1 se observan en la **Figura 12**. En el caso de GPX4, observamos la presencia de un único posible candidato (B2) que presenta una menor cantidad de dicha proteína en comparación con el *Wild type* (Wt). En el caso de FSP1, no se observan cambios significativos de la proteína en los candidatos comprobados con respecto a la línea celular no mutada.



**Figura 12: Representación de los niveles de proteína de los posibles candidatos knockouts de GPX4 (azul) y FSP1 (violeta) con respecto al wild type (Wt).** Fold Change indica el número de veces que varían los niveles de proteína con respecto al Wild Type

Es por ello que, en base a lo anterior, se seleccionó solamente el candidato B2 de GPX4 para realizar un aislamiento de ADN genómico, y posterior caracterización de la zona mutada mediante secuenciación Sanger. En la actualidad se está a la espera de los resultados de dicha secuenciación.

## **6 CONCLUSIONES**

Las conclusiones a las que llegamos en función de los resultados obtenidos son las siguientes:

- La línea celular de cáncer de ovario epitelial SKOV3 es capaz de activar el mecanismo de la ferroptosis, al contrario de la línea celular A2780.
- Se obtiene un posible candidato a *knockout* de GPX4 en la línea celular de cáncer de ovario epitelial SKOV3.

### **6.1 CONCLUSIÓN**

As conclusións ás que chegamos en función dos resultados que obtivemos son as seguintes:

- A liña celular de cáncer de ovario epitelial SKOV3 é capaz de activar o mecanismo da ferroptosis ao contrario da liña celular A2780.
- Obtívose un posible candidato a *knockout* de GPX4 na liña celular de cáncer de ovario epitelial SKOV3.

### **6.2 CONCLUSIONS**

The conclusions we reached based on the results obtained are the following:

- The SKOV3 epithelial ovarian cancer cell line is capable of activating the ferroptosis mechanism, unlike the A2780 cell line..
- A possible GPX4 knockout candidate is obtained in the epithelial ovarian cancer cell line SKOV3.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- 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. (2023). Study of Ferroptosis Transmission by Small Extracellular Vesicles in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Antioxidants*, 12(1), 183. <https://doi.org/10.3390/antiox12010183>
- Cancer*. (2022, febrero 3). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., Da Silva, M. C., Ingold, I., Goya Grocin, A., 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>
- GSSG/GSH Quantification Kit G257 manual*. (2023, diciembre 14). DOJINDO. <https://www.dojindo.com/manual/G257/>
- 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>
- Kim, H., & Xue, X. (2020). Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 160, 10.3791/60682. <https://doi.org/10.3791/60682>
- Lei, G., Mao, C., Yan, Y., Zhuang, L., & Gan, B. (2021). Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies. *Protein & Cell*, 12(11), 836-857. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00841-y>
- 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, D., Zhang, M., & Chao, H. (2021). Significance of glutathione peroxidase 4 and intracellular iron level in ovarian cancer cells—"Utilization" of ferroptosis mechanism. *Inflammation Research*, 70(10-12), 1177-1189. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01495-6>
- Li, F.-J., Long, H.-Z., Zhou, Z.-W., Luo, H.-Y., Xu, S.-G., & Gao, L.-C. (2022). System Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4 axis: An important antioxidant system for the ferroptosis in drug-resistant solid tumor therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 910292. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.910292>
- 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, 665945. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.665945>
- Li, W., Liang, L., Liu, S., Yi, H., & Zhou, Y. (2023). FSP1: A key regulator of ferroptosis. *Trends in Molecular Medicine*, 29(9), 753-764. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2023.05.013>

- Liang, D., Minikes, A. M., & Jiang, X. (2022). Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling. *Molecular Cell*, 82(12), 2215-2227. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.022>
- Los tres tipos de cáncer de ovario, explicados. (2021, octubre 8). NIH MedlinePlus Magazine. <https://magazine.medlineplus.gov/es/article/3-types-of-ovarian-cancer-explained>
- Manira, M., Khairul Anuar, K., Seet, W. T., Ahmad Irfan, A. W., Ng, M. H., Chua, K. H., Mohd Heikal, Mohd. Y., Aminuddin, B. S., & Ruszymah, B. H. I. (2014). Comparison of the effects between animal-derived trypsin and recombinant trypsin on human skin cells proliferation, gene and protein expression. *Cell and Tissue Banking*, 15(1), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s10561-013-9368-y>
- Marzo-Castillejo, M., Vela-Vallespín, C., Mascort Roca, J., Guiriguet Capdevila, C., Codern-Bové, N., & Borrás, J. M. (2023). La visión de los profesionales sanitarios del proceso diagnóstico de las mujeres con cáncer de ovario en Catalunya: Estudio cualitativo. *Atención Primaria*, 55(6), 102619. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2023.102619>
- Park, E., & Chung, S. W. (2019). ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death & Disease*, 10(11), 822. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2064-5>
- Rodríguez, N. P., & Hernando, D. D. B. (2024). TÍTULO: INFLUENCIA DE LOS ÉTERES DE FOSFOLIPIDOS DE ETANOLAMINA EN LA MODULACIÓN DE LA FERROPTOSIS EN MACRÓFAGOS.
- Schatten, H. (2021). *Ovarian Cancer Stem Cells: Characterization and Role in Tumorigenesis*. (Vol. 1330).
- Shintoku, R., Takigawa, Y., Yamada, K., Kubota, C., Yoshimoto, Y., Takeuchi, T., Koshiishi, I., & Torii, S. (2017). Lipxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL. *Cancer science*, 108(11), 2187-2194. <https://doi.org/10.1111/cas.13380>
- Sociedad Española de Oncología Médica. (2024). *LAS\_CIFRAS\_2024.pdf*. [https://www.seom.org/images/LAS\\_CIFRAS\\_2024.pdf](https://www.seom.org/images/LAS_CIFRAS_2024.pdf)
- Tan, Z., Huang, H., Sun, W., Li, Y., & Jia, Y. (2022). Current progress of ferroptosis study in ovarian cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 966007. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.966007>
- TBARS Assay Kit. (s. f.). *Canvax Reagents SL*. Recuperado 16 de mayo de 2024, de <https://www.canvaxbiotech.com/ruo-grade-shop/cell-based-assays/other-assays-compounds/tbars-assay-kit/>
- Zhang, Y., Tan, H., Daniels, J. D., Zandkarimi, F., Liu, H., Brown, L. M., Uchida, K., O'Connor, O. A., & Stockwell, B. R. (2019). Imidazole ketone erastin induces ferroptosis and slows tumor growth in a mouse lymphoma model. *Cell chemical biology*, 26(5), 623-633.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.01.008>
- Zhao, H., Xu, Y., & Shang, H. (2022). Ferroptosis: A New Promising Target for

Ovarian Cancer Therapy. *International Journal of Medical Sciences*,  
19(13), 1847-1855. <https://doi.org/10.7150/ijms.76480>