



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Desarrollo de un nuevo inhibidor de la enzima Acil-CoA sintetasa 4 para su aplicación potencial en el tratamiento de cáncer de mama, ovario y próstata

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Jesica Giselle Prada

Directora de tesis:

Dra. Paula Mariana Maloberti

Directora adjunta:

Dra. Ana Fernanda Castillo

Consejera de estudios:

Dra. Adalí Pecci

Instituto de Investigaciones Biomédicas, INBIOMED (UBA-CONICET)
Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

Buenos Aires, 2024

Desarrollo de un nuevo inhibidor de la enzima Acil-CoA sintetasa 4 para su aplicación potencial en el tratamiento de cáncer de mama, ovario y próstata.

RESUMEN

La enzima acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) es una enzima clave en el metabolismo lipídico que ejerce su función a través de la regulación de los niveles del ácido araquidónico intracelulares. Dado su papel en el metabolismo de este ácido graso, recientemente se la ha vinculado a un nuevo tipo de muerte celular denominado ferroptosis. Además, la desregulación de los niveles de ácido araquidónico está vinculada con enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, trastornos neurodegenerativos y cáncer, por lo que esta enzima se ha convertido en un blanco terapéutico clave. Numerosos trabajos han demostrado el rol de ACSL4 en la agresividad tumoral en cáncer de mama y próstata. Por esta razón, el interés en la búsqueda de inhibidores de la enzima con potencial uso terapéutico se ha incrementado.

En este trabajo de tesis doctoral se presenta el desarrollo de un nuevo inhibidor específico de ACSL4, y el estudio de su efecto en modelos tumorales agresivos de cáncer de mama, de ovario y de próstata.

Luego de realizar el cribado de las moléculas potenciales inhibidoras de ACSL4 mediante *docking* virtual, se seleccionó una de ellas, se optimizó químicamente y se obtuvo el compuesto PRGL493. Este compuesto demostró ser un eficaz inhibidor de la enzima en ensayos tanto *in vitro* como en líneas celulares, mostrando una mayor potencia en comparación con la rosiglitazona, otro inhibidor. En modelos de cáncer de mama triple negativo y cáncer de próstata resistente a la castración, PRGL493 redujo de manera significativa parámetros de agresividad como la proliferación y migración celular. La inhibición de ACSL4 por PRGL493 restauró la expresión de los receptores de estrógenos α y de andrógenos en células de cáncer de mama triple negativo y cáncer de próstata resistente a la castración, respectivamente. Además, se observó una disminución en los niveles de transportadores asociados al eflujo y resistencia a quimioterapéuticos en las células tumorales tratadas con este compuesto inhibidor. El compuesto también inhibió la expresión de varios componentes de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, entre ellos pGSK3 $\alpha\beta$, pS6 y pAKT.

Se realizaron ensayos en las líneas celulares de próstata y mama utilizando concentraciones subefectivas de fármacos quimioterapéuticos utilizados en la clínica, junto con una concentración subefectiva del compuesto PRGL493. Se observó una inhibición significativa y sinérgica en la proliferación celular al combinar estos compuestos, indicando una sensibilización a los tratamientos por el uso de PRGL493. Además, la combinación del inhibidor con 4-hidroxitamoxifeno sensibilizó a las células de cáncer de mama triple negativo al tratamiento hormonal.

Previamente se demostró el papel de la enzima ACSL4 en la esteroidogénesis en la regulación del transporte de colesterol, paso limitante de este proceso, a través de la proteína StAR. En este trabajo de tesis se demuestra que PRGL493 inhibe la esteroidogénesis mediante experimentos tanto en líneas celulares como *in vivo*. Además, este inhibidor disminuyó significativamente la síntesis de StAR y de esteroides en células de cáncer de próstata. En modelos de xenoinjerto de células de cáncer de mama triple negativo y de cáncer de próstata resistente a la castración tratados con PRGL493, se observó una disminución en el volumen tumoral de los ratones. Los tumores mostraron un aumento en la expresión de receptores de estrógenos α y andrógenos, respectivamente, así como una disminución en los niveles de Ki67, un marcador de proliferación celular, indicando una disminución en la agresividad tumoral y sugiriendo una posible respuesta a los tratamientos hormonales.

Se analizó el papel de ACSL4 en el cáncer de ovario epitelial (COE). Se observó una expresión de ACSL4 significativamente incrementada en muestras de ovario de pacientes con COE en comparación con el tejido normal. Asimismo, se detectó una mayor expresión de ACSL4 en líneas celulares de COE en comparación con la línea de ovario control.

PRGL493 inhibió la proliferación y migración celular de modelos celulares de COE. Además, el inhibidor disminuyó el eflujo de drogas mediada por transportadores ABC, involucrados en el mecanismo de resistencia a quimioterapéuticos. La combinación del inhibidor junto a tratamientos utilizados en COE produjo un efecto sinérgico sobre la inhibición de la proliferación celular al utilizar las drogas en dosis subefectivas.

Este trabajo proporciona una prueba de concepto para la posible aplicación de PRGL493 en la práctica clínica. Además, estos hallazgos pueden ser clave para terapias

dirigidas al control del crecimiento tumoral y la resistencia a fármacos en tumores que expresan ACSL4 y dependen de la síntesis de esteroides. El uso de tratamientos combinados de inhibidores de ACSL4 con quimioterapéuticos o terapia hormonal podría mejorar la eficacia y disminuir los efectos colaterales producidos por estas drogas.

PALABRAS CLAVE: Acil-CoA sintetasa 4, ácido araquidónico, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario epitelial, nuevo inhibidor

Development of a Novel Acyl-CoA Synthetase 4 Inhibitor for Potential Application in the Treatment of Breast, Ovarian, and Prostate Cancer

ABSTRACT

The enzyme acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4) is a key player in lipid metabolism, functioning through the regulation of intracellular arachidonic acid levels. Given its role in arachidonic acid metabolism, it has recently been linked to a novel form of cell death known as ferroptosis. Moreover, dysregulation of arachidonic acid levels is associated with cardiovascular diseases, inflammatory disorders, neurodegenerative conditions, and cancer, making ACSL4 a crucial therapeutic target. Numerous studies have demonstrated ACSL4's involvement in tumor aggressiveness in breast and prostate cancers, thereby increasing interest in the search for ACSL4 inhibitors with therapeutic potential.

This doctoral thesis presents the development of a novel ACSL4-specific inhibitor and explores its effects in aggressive tumor models of breast, ovarian, and prostate cancers.

Following virtual screening of potential ACSL4 inhibitors, one compound was selected, chemically optimized, and named PRGL493. This compound proved to be an effective inhibitor of the enzyme in both in vitro and in cell lines assays, demonstrating greater potency compared to rosiglitazone, another inhibitor. In triple-negative breast cancer and castration-resistant prostate cancer models, PRGL493 significantly reduced parameters of aggressiveness such as cell proliferation and migration. Inhibition of ACSL4 by PRGL493 restored the expression of estrogen α and androgen receptors in triple-negative breast cancer and castration-resistant prostate cancer cells, respectively. Furthermore, a decrease in efflux transporter levels and resistance to chemotherapy was observed in tumor cells treated with this inhibitor. The compound also inhibited the expression of several components of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, including pGSK3 $\alpha\beta$, pS6, and pAKT.

Experiments were conducted using sub-effective concentrations of chemotherapy drugs in prostate and breast cell lines, combined with a sub-effective

concentration of PRGL493. A significant and synergistic inhibition of cell proliferation was observed upon combining these compounds, indicating sensitization to treatments through the use of PRGL493. Additionally, the combination of the inhibitor with 4-hydroxytamoxifen sensitized triple-negative breast cancer cells to hormonal treatment.

Previous studies have demonstrated the role of ACSL4 in steroidogenesis through the regulation of cholesterol transport, a limiting step in this process, via the StAR protein. This thesis work demonstrates that PRGL493 inhibits steroidogenesis in experiments both in cell lines and *in vivo*. Additionally, this inhibitor significantly reduced StAR and steroid synthesis in prostate cancer cells. In xenograft models of triple-negative breast cancer and castration-resistant prostate cancer treated with PRGL493, a decrease in tumor volume was observed. These tumors exhibited increased expression of estrogen α and androgen receptors, respectively, and decreased levels of Ki67, a marker of cell proliferation, indicating reduced tumor aggressiveness and suggesting a potential response to hormonal treatments.

The role of ACSL4 in epithelial ovarian cancer (EOC) was analyzed. ACSL4 expression was significantly increased in ovarian samples from EOC patients compared to normal tissue. Additionally, higher ACSL4 expression was detected in EOC cell lines compared to the control ovarian line.

In EOC cell models, PRGL493 inhibited cell proliferation and migration, and also reduced drug efflux mediated by ABC transporters involved in chemotherapy resistance. The combination of the inhibitor with drugs used in EOC treatment showed a synergistic effect in inhibiting cell proliferation when used at sub-effective doses. This work provides a proof of concept for the potential clinical application of PRGL493. Furthermore, these findings may be crucial for therapies aimed at controlling tumor growth and drug resistance in tumors expressing ACSL4 and dependent on steroid synthesis. The use of combination therapies involving ACSL4 inhibitors with chemotherapy drugs or hormonal therapy could enhance efficacy and reduce the side effects associated with these medications.

KEYWORDS: Acyl-CoA Synthetase 4, arachidonic acid, breast cancer, prostate cancer, epithelial ovary cancer, new inhibitor

AGRADECIMIENTOS

Esta es una tesis que tuvo muchas manos y muchos ojos, como alguien me dijo. Es el fruto de un gran trabajo colectivo. Fiel a mi estilo, no esperen que estos agradecimientos sean breves.

Quiero antes que nada agradecer a la educación pública por hacer posible mi formación en una casa de excelencia como es la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. A Exactas, por ser mi segunda casa por tantos años, y a todos sus docentes y personal por la formación y el trato brindados todos esos años. A la Facultad de Medicina que me abrió sus puertas a través de nuestro Instituto. A CONICET, que con la beca otorgada me permitió obtener esta invaluable formación.

A toda la gente del INBIOMED, por ser el lugar donde aprendí realmente a hacer y a vivir la ciencia de la mano de enormes científicos y científicas, que me compartieron los protocolos, y los secretos extraoficiales, de cada una de las técnicas. Gracias a todos por el aprendizaje, los debates, los congresos, las charlas de temas random en el almuerzo y las mil anécdotas que generamos cada día.

Uli, es un placer tenerte como compañero de trabajo, aprendí mucho de nuestros experimentos juntos, y disfruté de nuestras charlas de viajes y recomendaciones de series entre medición y medición.

Ceci, gracias por recibirme en la otra parte de tu mesada y por cada uno de los conocimientos que me transmitiste, también por la buena energía que siempre generás. Gracias Mechi por estar presente cuando te necesitaba y hacerme sentir tu apoyo, y por haberme ayudado estos años a resolver muchas situaciones del día a día (como aportes a los protocolos o llevarme agua a cultivo). Mechi y Ceci, perdón por haberlas vuelto locas hablando tanto, pero como sé que en el fondo lo van a extrañar voy a seguir haciéndolo.

Gracias Ale por haber aportado a que esta tesis quede mejor. A Mer, a Pablo y a Isa por los momentos compartidos estos años. A Fabiana por ayudarme a poner a punto técnicas con tanto entusiasmo.

A Cris Paz por ser una referente como profesional y como persona, y por el trato siempre tan amable y respetuoso. Al Dr. Podestá por su formación y apoyo desde el principio en mis primeros pasos en la ciencia, algo que valoro mucho y que fue sumamente formativo. Es un honor haber contado con ambos a través de la tesis.

A Cele y Maxi por ayudarme con cada uno de los trámites y papeles que tanto me cuesta gestionar, por hacerlo siempre con la mejor predisposición. Por las charlas y los mates. Es un placer trabajar con gente como ustedes.

A Sil, por tener desde el primer día una palabra amable para mí, por ser una persona confiable y de buen corazón. Por ser de esas personas que hace bien tener cerca y que son un mimo al alma. Cada una de tus palabras de aliento y cariño, algunas en momentos en que realmente las necesitaba, hicieron la diferencia.

A Mati, Katia, May, Lu y Nadín que me acompañaron en mis primeros pasos en el laboratorio y me recibieron de la mejor forma. A Luciana y Albertina por haberme acompañado cuando ingresé. A todas las personas que fueron pasando por el instituto, así como también a los que recientemente se sumaron, y ya son o fueron parte de las risas y charlas compartidas, como Pauli, Eve, Mati, Joaco. A Fabri, por las risas y la buena onda que me ayudaron a aliviar el estrés, así como por el apoyo logístico en la etapa final.

A Luciano, que en poco tiempo te convertiste en mi compañero de mates, en posible primo lejano y psicólogo. Gracias por las charlas que me ayudaron en momentos de colapso, por el empuje y por estar horas haciéndome el aguante cuando lo necesitaba, como con mi temita con las citas, bancándome hasta tarde con tanta paciencia.

A Meli. Siempre me apoyaste y me enseñaste con paciencia. Gracias por ser ese apoyo y guía en la ciencia, por tu respeto y contención desde que entré, por escucharme. Cada vez que necesité ayuda en momentos críticos de entregas estuviste horas sentada al lado mío, ayudándome y conteniéndome. Admiro tu conocimiento y tu forma de ver la ciencia. Sos un ejemplo a seguir como científica y como persona.

A Yayi, mi Gachi. Mi compañera de mesada, de tantos pipeteos y cuentitas, de viajes, de disfraces, de bombas de humo y charlas místicas, de hipocondrías. De congresos, de experimentos, de cursos, de charlas cómplices en el cuarto de revelado. Es un honor haber podido trabajar y aprender tanto de vos, Llegamos al punto de entendernos con miradas para no tener que hablar. Me hace feliz haber encontrado en mi compañera de

trabajo a una gran amiga. Gracias por tantas risas y tantos trabajos y momentos compartidos, cada uno hizo la diferencia en el día a día. A Chiari, que se convirtió en mi amiguita más chiquita y con su dulzura me acompañó desde el principio del doctorado.

Quiero especialmente agradecer a las dos personas que empezaron siendo mis directoras y que hoy son dos personas a las que no solo respeto sino que también quiero muchísimo. Que confiaron en mí y me eligieron para formar parte de su grupo de trabajo, les debo todo lo que soy como profesional. Les quiero agradecer por su dedicación durante toda la tesis. Por cada una de esas charlas tan formativas, discusiones enriquecedoras de resultados, por todo lo que aprendí de ustedes. Por las charlas por las mañanas con Fer sobre la vida. Por el “¿estás bién?” de Pau cada vez que me veía pensativa. Por las horas y horas en las noches con mi tesis para que cada detalle quedé bien. Por guiarme en este camino. Por saber cuándo pedirme un resultado, o cuando darme una palabra de aliento. Porque se pusieron a mí lado para sacar la tesis adelante cuando para mí sola hubiera sido imposible y por acompañarme de una forma que va más allá de lo profesional y por lo que siempre les voy a estar agradecida. Sin ustedes esta tesis no existiría. Gracias por ayudarme a llegar hasta acá.

A la Dra. Carmen, a la Dra. Maritza, y a su grupo de trabajo, por abrirme las puertas en su laboratorio en Chile y recibirme tan amablemente.

A todas las personas que estuvieron conmigo durante este proceso. A mis amigos y amigas de la vida, de cerca y de lejos, que me apoyaron, escucharon y aconsejaron de muchas formas distintas. Gracias por ser ese sostén. A mis amigas de la carrera por haber compartido nuestra formación y tantas experiencias juntas, sin ustedes la carrera no hubiera sido ni la mitad de hermosa. Gracias por estar en casa paso, las quiero. Gracias Mary por ser una gran amiga y consejera, te quiero mucho. Gracias Lari por estar siempre, sos única. Por nuestras charlas ininterrumpidas hace años, por ser esa persona con la que compartimos todo.

A Moni, Cachi, Ale, Juli y la hermosa de Guada, por el buen corazón con el que siempre me acompañan. Gracias por siempre preguntar por las células y apoyar mi trabajo. Gracias Moni por rezar para que esta tesis se concrete. Gracias Moni y Cachi por las

viandas cuando el trabajo nos tapaba. Gracias Guadita por todos los mensajitos y dibujitos hermosos.

A mis padres. Mami, gracias por ser la mejor mamá del mundo siempre. Por cada charla, cada desayuno cuando empecé el doctorado, por siempre decirme “sos vos”, y darme toda la confianza que necesito para hacer lo que sea. Por estar en todos los detalles cuidándonos. Por cada abrazo que me devuelve la vida. Gracias papi porque das todo por nosotros, por ser todo lo que se puede querer en un padre, por confiar en mí, por apoyarme siempre en cada paso con tanto amor, por transmitirme el amor por los libros. Gracias a ustedes es que pude dar cada uno de mis pasos profesionales. Porque me apoyaron durante el estudio y siempre confiaron en mí. Me hacen ser lo que soy. Realmente no puedo escribir todo lo que significan para mí porque no me alcanzan las palabras, son mi vida. Esta tesis es de ustedes.

A mis hermanos y hermanas, que amo con todo mi corazón. Gracias Cris por ser mi consejero, por escucharme y empujarme a ir por lo que necesito cuando dudo o tengo miedo. Porque me hacés sentir que puedo ser cualquier cosa que sueñe. Porque me motivás a pensar distinto, a romper barreras, a desafiar lo convencional. Te admiro y sos una inspiración para mí. Polito, gracias por tu dulzura, por ser tan atento, por darme tanto amor y cuidarme tanto en todo momento. Por un mate, los jueguitos, por siempre preocuparte y ser tan bueno, por anticiparte a sorprendernos con cosas que nos hacen felices. Sos una persona increíble y muy especial, un ejemplo a seguir. Alito, mi hermanito menor, gracias por motivarme a hacer cosas nuevas. Por siempre estar, por todas las ideas y soluciones que buscás cada vez que algo no me sale, preocupándote y ayudándome. Por cuidarme y apoyarme, por aconsejarme. Por hacerme reír, por las bromas. Amo y admiro las nuevas experiencias por las que vas, me inspiran. Cathe, sos una persona tan dulce y atenta, que siempre nos está cuidando y en cada detalle. Sos luz y risas, y me hace feliz cuando te tengo cerca y hacemos locuras juntas. Transmitís cosas hermosas. Gracias por alentarme a seguir siempre con la tesis. Nahia, el bebé de la familia, sos mágica. Gracias por teletransportarme a mundos distintos, de zombies y juegos, cada vez que lo necesité. Por los momentos de cada fin de semana, que me renovaban el alma y me daban felicidad. Vos sabés todo lo que eso significa para mí. Gracias por ser parte de ese lugar seguro al que ir, ese lugar que me salva, y por tu apoyo toda la tesis para terminar.

A Sonia, mi abuela hermosa, que siempre que me ve me pregunta cómo va la tesis, que anota de la tele datos científicos para mostrarme, que confía tanto en mí y me lo transmite con tanto amor. Que siempre tiene una sorpresa para sacarme una sonrisa. Gracias por tu apoyo durante toda la tesis.

A Mauricio porque me dio luz, inocencia y juego en los momentos oscuros de la pandemia. Siempre te voy a llevar en mi corazón. A mi Morita, Boxy, Denji, Mocca, Yago, Nala, tortus y a todas mis mascotas amadas.

A Seba, mi compañero de vida desde hace diez años, por apoyarme con amor en cada momento. Por tenerme paciencia, acompañar mis miedos, mis dudas, por escuchar mis charlas de horas, por bancar mis debates existenciales sobre la vida. Por apoyar como si fuera lo más normal del mundo cada una de mis ideas alocadas y por darme el apoyo hasta para saltar al vacío. Por las series, los tecitos, los masajitos, los chocolates y todos los gestos de amor con los que me acompañaste en este proceso de escritura. Por cuidar de nuestros bebés gatunos este tiempo en que la tesis me absorbió. Vos, más que nadie, sabés todo lo que implicó este proceso y sin tu amor y acompañamiento nada hubiera sido lo mismo. Te amo. Y los michis también.

A mi Jesi de seis años atrás. A la que quiso dejar la biología apenas se recibió porque no entendía muy bien el sistema de la vida. A la que a veces sigue sin entenderlo. A la que se repetía como un mantra que el que abandona no tiene premio. Que no se acostumbraba a los horarios ni a ver menos a su familia. A la que arruinó su primer western blot y sintió que no servía para esto. A la que le agarró la mano a los experimentos y sintió que era perfecta para esto. A la que en la pandemia se la comieron la ansiedad y los miedos. A la que aun así siguió haciendo. A la que se sigue armando y a la que cada tanto se desarma. A la que buscó mil formas para estar bien. A la que busca mil formas para que los demás estén bien. A la que pensó que no iba a pasar el primer mes. A la que siguió. A la que lo logró.

Gracias a la vida. A la Virgencita y a San Expedito por la fuerza.

Gracias, siempre, a Dios.

“Un pájaro posado en un árbol nunca
tiene miedo de que la rama se rompa,
porque su confianza no está en la rama
sino en sus propias alas”

Dedicado a mi mamá, a mi papá,
y a mis seres amados, que son mi
razón de vivir

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

4-OHTAM	4-hidroxitamoxifeno
8Br-AMPc	8-bromoadenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
AA	Ácido araquidónico
AA-CoA	Araquidonoil-Coenzima A
ABC	ATP binding cassette
ABCG2	ATP-binding cassette super-family G member 2
ACOT2	Acil-Coenzima A tioesterasa mitocondrial 2
ACS	Acil-Coenzima A sintetasa
ACSL	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena larga
ACSL1	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena larga 1
ACSL3	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena larga 3
ACSL4	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena larga 4
ACSL5	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena larga 5
ACSL6	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena larga 6
ACSM	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena media
ACSS	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena corta
ACSVL	Acil-Coenzima A sintetasa de cadena muy larga
ACTH	Adrenocorticotropina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AKT	Proteína quinasa B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Seroalbúmina bovina
CAS	Chemical Abstracts Service
CoA	Coenzima A
COE	Cáncer de ovario epitelial
COX	Ciclooxigenasa
CPM	Cuentas por minuto
CREB	Proteína de unión a elemento de respuesta al AMPc
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CYP	Citocromo P450
Cys	Cisteína
DAB	3,3-diaminobencidina
DBI	Inhibidor de unión al diazepam
DHETE	Ácido dihidroxieicosatetraenoico
DMEM	Medio Dulbecco's modified Eagle
DMSO	Dimetil sulfóxido
dpm	Desintegraciones por minuto
DO	Densidad óptica
DS	Desvío estándar
DTT	Ditiotreitol
E2	Estradiol
EDTA	Ácido etilen diamino-tetracético

ERR α	Receptor α relacionado con estrógenos
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N, N, N', N' tetraacético
EM	Espectrometría de masa
FDR	False Discovery rate
g	Fuerza g o fuerza centrífuga relativa
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutación
GPX4	Glutación peroxidasa 4
GSK3 $\alpha\beta$	Glucógeno sintasa quinasa 3 $\alpha\beta$
H ₂ O _d	Agua destilada
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
HRMS-ESI	Espectrometría de masas por ionización por electroespray de alta resolución
HS	Suero de caballo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
kDa	Kilo Dalton
LB	Medio para bacterias Luria Bertani
LH	Hormona luteinizante
lncRNA	ARN largo no codificante

LOX	Lipooxigenasa
LSD1	Lisina demetilasa 1
LT	Leucotrieno
LXs	Lipoxinas
Lys	Lisina
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MAMs	Membranas del retículo endoplásmico asociadas a mitocondrias
miRNA	microARN
mLST8	Mammalian Lethal with SEC13 protein 8
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	Bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolio
MS-MS	Espectrometría de masa en tándem
oxoETE	Ácido oxoeicosatetraenoico
p70S6K	Ribosomal Protein S6 Kinase B1 o RPS6KB1
PARP	Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa
P4	Progesterona
P450scc	Complejo enzimático de escisión de la cadena lateral del colesterol
P5	Pregnenolona
pAKT	Proteína quinasa B fosforilada
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer fosfato salina
PG	Prostaglandinas
pGSK3 $\alpha\beta$	Glucógeno sintasa quinasa 3 $\alpha\beta$ fosforilada
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A

PKC β II	Proteína quinasa C β II
PLA2	Fosfolipasa A2
P/S	Solución de penicilina-estreptomicina
PSA	Antígeno prostático específico
pS6	Proteína S6 fosforilada
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPi	Pirofosfato
ppm	Partes por millón
PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RA	Receptor de andrógenos
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
RE	Receptor de estrógenos
RE α	Receptor de estrógenos α
RNA-seq	Secuenciación de ARN
RIA	Radioinmunoensayo
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP	Receptor de progesterona
RPKM	Lecturas por kilobase por millón de lecturas asignadas
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
SERD	Reguladores negativos del receptor de estrógeno
SERM	Moduladores selectivos del receptor de estrógeno
SFB	Suero fetal bovino

shARN	Short hairping RNA
SIN1	Stress-activated protein kinase-interacting protein 1
SREBP-1C	Proteína 1 de unión a los elementos regulatorios de esteroides
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TAE	Solución amortiguadora Tris acetato EDTA
TBP	Proteína de unión a TATA
TBS	Solución buffer salina de Tris
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TP53	Proteína tumoral 53
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
TSPO	Proteína translocadora
TTBS	Solución salina Tris Tween
TZDs	Tiazolidinedionas
Tx	Tromboxano
ULK1	Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
UTR	Untranslated region
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VPA	Ácido valproico
Wnt	Wingless-Type MMTV Integration Site Family

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS	14
INTRODUCCIÓN	27
1. Familia de enzimas acil-CoA sintetasas	28
2. Acil-CoA sintetasas de cadena larga	30
3. Acil-CoA sintetasa 4	31
3.1. Estructura génica y proteica.....	31
3.2. Localización celular y tisular	33
3.3. Regulación de la expresión de ACSL4	33
3.4. Funciones de ACSL4.....	36
3.4.1. ACSL4 en apoptosis	36
3.4.2. ACSL4 en ferroptosis	37
3.4.3. ACSL4 en patologías.....	37
4. Metabolismo del ácido araquidónico	38
5. Síntesis de hormonas esteroideas	40
6. ACSL4 en la esteroidogénesis	42
7. Breves Conceptos sobre el Cáncer	44
7.1. Cáncer de mama.....	45
7.1.1. Clasificación	46
7.1.2. Tratamientos.....	48
7.1.3. Cáncer de mama triple negativo.....	49
7.2. Cáncer de próstata.....	50
7.2.1. Clasificación y tratamientos	51
7.3. Cáncer de ovario	53
7.3.1. Cáncer de ovario epitelial	54
7.3.2. Tratamientos.....	56
7.4. Ácido araquidónico y cáncer.....	57
8. ACSL4 y cáncer	59
8.1. Cáncer de mama y ACSL4.....	59
8.1.1. Vías de señalización	61

8.1.2. Tratamientos y mecanismos de resistencia	63
8.2. Cáncer de próstata y ACSL4.....	65
8.3. Cáncer de ovario y ACSL4	65
8.4. Inhibidores de la enzima ACSL4	66
HIPÓTESIS.....	70
OBJETIVOS	70
MATERIALES Y REACTIVOS	73
1. Cultivos celulares.....	74
1.1. Líneas celulares humanas no tumorales	74
1.1.1. Línea celular HEK-293	74
1.1.2. Línea celular HOSE.....	74
1.2. Línea celular tumoral murina	75
1.2.1. Línea celular MA-10.....	75
1.3. Línea celular humana de cáncer de mama	75
1.3.1. Línea celular MDA-MB-231	75
1.4. Línea celular humana de cáncer de próstata	76
1.4.1. Línea celular PC-3	76
1.5. Líneas celulares tumorales humanas de ovario	76
1.5.1. Línea celular A2780	76
1.5.2. Línea celular OV-90	76
1.5.3. Línea celular SKOV-3.....	76
1.6. Morfología celular.....	77
METODOLOGÍA.....	81
1. Modelado de ACSL4 humana y cribado <i>in silico</i>	81
2. Síntesis y caracterización del compuesto PRGL493	81
3. Preparación del plásmido	83
3.1. Cepa bacteriana.....	83
3.2. Preparación de bacterias <i>Escherichia coli</i> competentes	83
3.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue competentes	83
3.4. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico	84
3.5. Digestión con endonucleasas de restricción	85
3.6. Electroforesis en geles de agarosa	85
4. Producción de ACSL4 recombinante	85
5. Ensayo de actividad enzimática con proteína recombinante	87

6.	Ensayo de actividad enzimática en líneas celulares	88
7.	Cuantificación de esteroides	89
7.1.	Tratamientos para evaluar la producción de esteroides	89
7.2.	Concentración del medio para la determinación de esteroides	89
7.3.	Determinación de esteroides por radioinmunoanálisis (RIA).....	90
7.4.	Cuantificación de pregnenolona por ELISA	91
7.5.	Determinación de corticosterona por ensayo fluorométrico.....	91
8.	Proliferación celular	92
8.1.	Ensayo de proliferación por MTT.....	92
8.2.	Ensayo de proliferación por Bromodesoxiuridina (BrdU).....	93
9.	Ensayo de migración celular por cierre de herida	93
10.	Inmunohistoquímica	94
11.	Ensayos <i>in vivo</i>	95
11.1.	Producción de esteroides <i>in vivo</i> en ratones.....	95
11.2.	Modelos de xenoinjerto de cáncer de mama y próstata	96
12.	Análisis de proteínas	97
12.1.	Obtención de proteínas totales desde el cultivo celular.....	97
12.2.	Cuantificación de proteínas	97
12.3.	Preparación de muestras para la siembra	97
12.3.1.	Preparación de los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	98
12.3.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	98
12.4.	Western blot	99
13.	Ensayos de eflujo	100
13.1.	Eflujo de Hoechst.....	100
13.2.	Eflujo de doxorubicina	101
14.	Análisis bioinformático.....	101
15.	Cálculo de la concentración inhibitoria media (IC50)	102
16.	Análisis estadístico	102
	RESULTADOS	103
	CAPÍTULO 1	104
1.	Desarrollo de un nuevo compuesto inhibidor de la enzima ACSL4.....	105
1.1.	Búsqueda bioinformática de posibles compuestos inhibidores de ACSL4	105

1.2.	Síntesis y caracterización del compuesto PRGL493.....	107
1.3.	Estudio de la efectividad del compuesto PRGL493 como inhibidor de ACSL	109
2.	Efecto de la inhibición de ACSL4 en líneas celulares tumorales.....	116
2.1.	Efecto de PRGL493 en la proliferación celular	116
2.2.	Efecto de PRGL493 en la migración celular.....	118
3.	Efecto del compuesto PRGL493 sobre la expresión de proteínas asociadas a resistencia	120
4.	Análisis del uso de PRGL493 en combinación con fármacos terapéuticos	122
5.	Análisis del efecto de PRGL493 sobre la vía mTOR.....	125
6.	Impacto de la inhibición de ACSL4 por PRGL493 en la esteroidogénesis.....	127
6.1.	Estudio del efecto de PRGL493 sobre la esteroidogénesis en líneas celulares	127
6.2.	Estudio del efecto de PRGL493 sobre los niveles hormonales <i>in vivo</i>	131
7.	Evaluación de la capacidad inhibitoria de PRGL493 en el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	133
CAPÍTULO 2	137
1.	Análisis bioinformático entre la firma genética de ACSL4 y biopsias de COE ...	138
2.	Expresión de ACSL4 en tejidos de ovario	141
3.	Expresión de ACSL4 en líneas celulares de ovario.....	143
4.	Estudio del papel de ACSL4 en la proliferación celular en líneas celulares de ovario.....	145
5.	Análisis del uso de PRGL493 en combinación con fármacos terapéuticos en COE	147
6.	Efecto del compuesto PRGL493 en la migración celular en el COE	149
7.	Estudio funcional de los transportadores ABC en COE.....	151
7.1.	Eflujo de doxorubicina con PRGL493.....	151
7.2.	Eflujo de Hoechst con PRGL493.....	153
DISCUSIÓN	157
1.	Capítulo 1	157
1.1.	Desarrollo, optimización y caracterización de PRGL493.	157
1.2.	La inhibición de ACSL4 en modelos de cáncer de próstata y mama.....	162
1.3.	Inhibición de ACSL4 en la síntesis de hormonas esteroideas	164
1.4.	Inhibición de ACSL4 y la vía mTOR.	166
2.	Capítulo 2.....	168

2.1. ACSL4 y cáncer de ovario.	168
3. Estudios realizados sobre la inhibición de ACSL4 y PRGL493 en la actualidad....	170
4. Perspectivas a futuro	171
CONCLUSIONES.....	174
REFERENCIAS.....	178

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son moléculas orgánicas que desempeñan roles fundamentales en la fisiología humana. Su variedad tanto estructural como funcional abarca desde la constitución de membranas celulares y reservas de energía, hasta la regulación de procesos metabólicos y la señalización celular (1).

Además de su importancia metabólica y estructural, los lípidos han tenido relevancia en la investigación por su implicancia en diversos escenarios patológicos. La desregulación o el metabolismo alterado de los lípidos se encuentra asociada a trastornos cardiovasculares, trastornos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes, y cáncer (1).

Se ha evidenciado que los lípidos desempeñan un papel crucial en el desarrollo, la progresión y la respuesta al tratamiento de diversas neoplasias. La proliferación celular anormal, la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis y la invasión metastásica, entre otros, son procesos tumorales que se ven influenciados por el metabolismo lipídico y el microambiente celular (1). En particular, el ácido araquidónico (AA), un ácido graso poliinsaturado de cadena larga emerge como una molécula clave en la señalización lipídica relacionada al cáncer. La regulación precisa de los niveles intracelulares de AA y de sus metabolitos, los eicosanoides, es crucial para mantener la homeostasis celular. La desregulación del AA, y por lo tanto niveles aumentados de eicosanoides como las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos conducen a un entorno inflamatorio patológico, como en el cáncer de mama triple negativo (TNBC)(2-4).

Las acil-Coenzima A sintetasas de cadena larga (ACSL) catalizan la activación de ácidos grasos de cadena larga mediante la esterificación con una molécula de coenzima A (CoA). Los ácidos grasos, una vez activados, se encuentran disponibles para participar en las distintas vías metabólicas en que están involucrados. La activación de los ácidos grasos es fundamental para la homeostasis de sus niveles intracelulares, siendo ésta un paso crítico. La enzima acil-CoA sintetasa de cadena larga 4 (ACSL4), perteneciente a la familia de las ACSL, es una enzima clave en la regulación del metabolismo lipídico, y tiene al AA como sustrato preferencial (5).

Se ha observado elevados niveles de expresión ACSL4 en distintos tipos de cáncer agresivos, como el TNBC y el cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), encontrándose una relación causal entre la desregulación y niveles aumentados de la enzima y la malignidad tumoral. La sobreexpresión de la enzima ACSL4 conduce a un aumento en parámetros tales como la proliferación y la migración en TNBC y en CRPC. También, en los tipos tumorales más agresivos de cáncer de mama, la actividad de la enzima se encuentra asociada a los mecanismos de resistencia a los tratamientos actuales con quimioterapéuticos y terapia hormonal (6–9).

Dada la ausencia de inhibidores específicos de ACSL4, el presente trabajo se centró en la búsqueda y desarrollo de un inhibidor eficaz para la enzima, necesario para el avance en el estudio y la comprensión de su rol en cáncer. El desarrollo de un nuevo inhibidor permite explorar nuevas combinaciones terapéuticas que disminuyan los efectos colaterales de los tratamientos actuales y que permita contrarrestar la resistencia a los quimioterapéuticos utilizados en la clínica en los tipos tumorales agresivos de cáncer de mama, de ovario y de próstata, para los cuales no se cuenta con tratamientos efectivos a la fecha.

1. Familia de enzimas acil-CoA sintetasas

Los ácidos grasos son la principal fuente de energía para los mamíferos, liberando mediante su catabolismo cantidades muy grandes de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP). Los ácidos grasos deben activarse antes de su incorporación a las vías anabólicas y catabólicas en que participan, siendo el paso clave en su biodisponibilidad.

La activación de los ácidos grasos sucede con gasto de ATP a través de la esterificación del ácido graso con una molécula de CoA, dando como producto la formación del acil-CoA. En este primer paso de activación intervienen enzimas de la familia de las acil-CoA sintetasas (ACS) (10). Las ACS se conservan evolutivamente entre los grupos de seres vivos en los que se expresan al intervenir en reacciones fundamentales, necesarias para el correcto funcionamiento celular (11).

Con respecto a la naturaleza química de los ácidos grasos, constan de un grupo carboxilo con una cola hidrocarbonada de longitudes variables, que puede poseer

distintos grados de insaturación. De acuerdo con el largo de la cola hidrocarbonada, los ácidos grasos son sustratos de diferentes miembros de la familia de las ACS, que se subclasifican en acil-CoA sintetetasas de cadena corta (ACSS), acil-CoA sintetetasas de cadena media (ACSM), acil-CoA sintetetasas de cadena larga (ACSL), y acil-CoA sintetetasas de cadena muy larga (ACSVL) (12).

En cuanto al mecanismo de acción enzimática de las ACS, la reacción de esterificación del ácido graso con la molécula de CoA se lleva a cabo en pasos sucesivos, especificados a continuación (12) (Figura 1):

- A. Unión del ácido graso: el ácido graso libre ingresa a un dominio denominado GATE, que se encuentra conservado en la familia de las ACS.
- B. Activación: La ACS utiliza moléculas de ATP para activar el ácido graso. Durante este paso, se transfiere un grupo adenosina monofosfato (AMP) desde el ATP al ácido graso, formando un intermediario llamado acil-adenilato (o acil-AMP) y liberando un pirofosfato (PPi).
- C. Formación del enlace tioéster: La CoA ataca al acil-AMP, liberando AMP y formando el enlace tioéster entre el ácido graso y la CoA, resultando en acil-CoA.
- D. Liberación del producto final: El éster de acil-CoA es liberado y se encuentra activado para participar en diversas vías metabólicas celulares tanto anabólicas como catabólicas, como la síntesis de lípidos o la generación de energía a través de la β -oxidación.

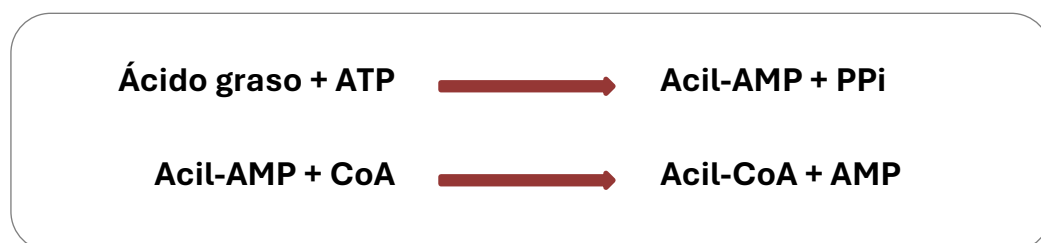


Figura 1. Reacción enzimática catalizada por la familia de las ACS. Este proceso implica la esterificación de una molécula de ácido graso con una molécula de CoA, utilizando ATP y resultando en la formación de acil-CoA. AMP: adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato; acil-AMP: acil-adenilato; CoA: coenzima A; PPi: pirofosfato.

En resumen, las ACS facilitan la activación de ácidos grasos previo a su metabolización, permitiendo su participación en procesos celulares esenciales. Este mecanismo es fundamental para el equilibrio energético y la homeostasis lipídica de las células (12).

2. Acil-CoA sintetasas de cadena larga

Los ácidos grasos son sustrato de una amplia gama de vías metabólicas esenciales. En particular, los ácidos grasos de cadena larga poseen variedad en cuanto a su estructura y función. En la infancia, son necesarios para el crecimiento y la maduración del cerebro. Intervienen en procesos metabólicos como la generación de energía por β -oxidación y la síntesis de lípidos para almacenamiento celular, intervienen en modificaciones postraduccionales, y toman roles predominantes como precursores en distintos procesos de señalización celular (13). El AA de cadena larga poliinsaturado es también precursor de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que intervienen en la regulación de procesos vitales variados, como la respuesta inflamatoria, los procesos de coagulación sanguínea y la regulación de la temperatura corporal (2). En cuanto las funciones de tipo estructural, la activación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) permite su incorporación a membranas lipídicas celulares, mejorando su fluidez y facilitando el transporte de sustancias a través de ellas para el mantenimiento normal de las condiciones fisiológicas en las células. Dada la relevancia de los ácidos grasos en el metabolismo celular, las ACSL desempeñan un papel clave al mediar su activación (12).

Dentro de la familia de las ACS se encuentra la subfamilia de las ACSL, que catalizan la activación de ácidos grasos de cadena larga que poseen colas hidrocarbonadas de un largo de entre 12 y 22 carbonos, saturados o con una o más insaturaciones. Dentro de la subfamilia de las ACSL, en humanos, se han descrito 5 miembros con sus variantes de *splicing*, codificado cada una por distintos genes: ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5 y ACSL6. ACSL1, el primer miembro descrito, conserva un 60% de homología de secuencia de aminoácidos con las variantes ACSL5 y ACSL6, mientras que entre ACSL3 y ACSL4 se encuentra un 68% de homología de secuencia (12,14).

Los distintos miembros de la familia de las ACSL poseen expresión tejido-específica, y especificidad de sustrato. ACSL1 es la forma que se expresa preferencialmente en hígado, representando el 50% del total de la actividad hepática asociada a ACSLs. Posee localización citoplasmática, pero también se detectó en el retículo endoplásmico. ACSL3 presenta principalmente expresión durante el desarrollo fetal, y se localiza en el retículo endoplásmico y en las gotas lipídicas. Presenta también localización citoplasmática. Se expresa en varios tejidos, como músculo esquelético, corazón, riñón, hígado y tejido adiposo. ACSL5 se expresa principalmente en el intestino delgado y tendría un papel clave en la absorción de ácidos grasos de la dieta. Se encuentra también en el hígado. Su localización es principalmente citoplasmática. ACSL6, por su parte, también se localiza predominantemente en el citoplasma. Se expresa en tejidos como el cerebro, el hígado, el corazón y el músculo esquelético. Posee la capacidad de catalizar la activación tanto de ácidos grasos de cadena larga como de ácidos grasos de cadena muy larga (15).

Entre las ACSL, la enzima ACSL4 destaca por su preferencia por varios ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico (AA), lo que implica un rol esencial en su metabolismo (5). En este trabajo, nos enfocaremos en esta enzima y, en las siguientes secciones, describiremos los antecedentes sobre su estructura y funciones.

3. Acil-CoA sintetasa 4

3.1. Estructura génica y proteica

El gen que codifica para ACSL4 se encuentra en la región Xq22.3-q23 del cromosoma X (16). Posee una longitud de 90 kb, y se compone de 16 exones separados por 15 intrones. ACSL4, así como los otros miembros de la familia de las ACSL, poseen diferentes variantes de ARNm que son traducidas generando distintas isoformas. El gen de ACSL4 codifica para dos isoformas, una larga y otra más corta. La región 5' UTR se transcribe a partir de la secuencia de los exones 1 y 2 y la primera parte del exón 3. El exón 3 contiene dos codones de inicio ATG en el mismo marco de lectura. El primer codón es el inicio de la isoforma larga de ACSL4 humana, de 711 aminoácidos y 79 kDa que, si es removido por un sitio aceptor de empalme alternativo, da lugar al inicio de la

traducción en el segundo codón, dando como resultado la isoforma corta de 670 aminoácidos y 74 kDa (12).

Actualmente, no se dispone de la estructura cristalográfica de ACSL4 en mamíferos. Sin embargo, la estructura de una ACSL perteneciente a la especie bacteriana *Thermus thermophilus* HB8 (17) ha sido determinada. A través de análisis de homología con otras especies, se han podido inferir los dominios estructurales de la enzima ACSL4. Entre estos dominios se encuentra un dominio conservado que determina la especificidad de sustrato, conocido como el dominio GATE. Como se mencionó anteriormente, este dominio está involucrado en el acceso del sustrato al sitio catalítico de la enzima, formando una especie de túnel en el que el sustrato ingresa de manera unidireccional y permanece durante la formación del enlace éster con la molécula de CoA, con el correspondiente consumo de ATP (Figura 2). La especificidad de sustrato estaría entonces determinada por la profundidad y el ancho del túnel o bolsillo de la enzima, correspondientes al dominio GATE.

El centro activo de ACSL4 es muy similar al de otras ACSL e incluye una tríada de aminoácidos conservada (Lisina (Lys) - Aspartato (Asp) - Cisteína (Cys)). En esta tríada, Lys y Asp desempeñan funciones de protonación y desprotonación durante la catálisis de la reacción de acilación, mientras que Cys actúa como el sitio de unión de los ácidos grasos a la CoA (18).

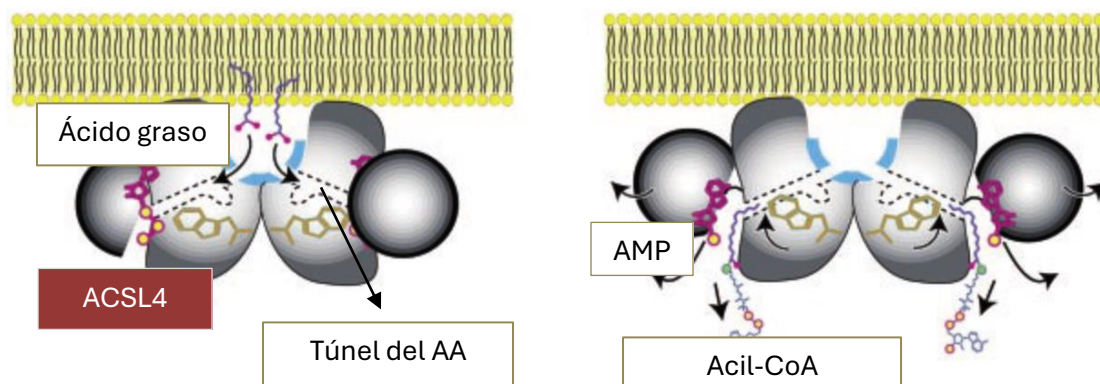


Figura 2. Mecanismo de acción de ACSL4. En este esquema se muestra el ingreso de dos moléculas de ácido graso al túnel de la enzima que determina la especificidad de sustrato (indicados en línea punteada), y la liberación del producto esterificado con una molécula de CoA, con consumo de ATP. Imagen modificada de la figura de Yuko Hisanaga y col 2004 (17).

3.2. Localización celular y tisular

La enzima ACSL4 es una proteína periférica de membrana, localizada preferentemente en la membrana del retículo endoplasmático, en microsomas y en las fracciones de membranas asociadas a mitocondrias (MAMs), que se encuentran altamente enriquecidas en la enzima (19,20). También, la enzima se puede localizar en la membrana de los peroxisomas y en las gotas lipídicas (19). En relación con la localización en las MAMs, ACSL4 participa en la esteroidogénesis, en la activación de ácidos grasos y, en el retículo endoplásmico, promueve la síntesis de glicerolípidos y la ω -oxidación, vía principal para el catabolismo de ácidos grasos cuando se encuentra alterada la β -oxidación (17,21).

Con respecto a la localización tisular, la enzima ACSL4 se expresa predominantemente en tejidos esteroidogénicos, especialmente en células de las zonas *fasciculata* y *reticularis* de la corteza de la glándula suprarrenal, en células de Leydig de los testículos, y en las células lúteas y en el estroma del ovario (22). También, se encuentra expresión de ACSL4 en el cerebro en estadios embrionarios. En adultos se expresa también en el sistema nervioso central, con mayor nivel de expresión en células del giro dentado, en neuronas piramidales del hipocampo y la capa de células granulares y de Purkinje del cerebelo (23).

Mientras que en la adultez hay menor expresión de la enzima en otros tejidos distintos a los mencionados previamente, se reportó que la enzima ACSL4 se encuentra expresada en altos niveles en muestras de tejido tumoral de mama, próstata, colon e hígado, en comparación a muestras de tejido adyacente no tumoral (7,8,24,25).

3.3. Regulación de la expresión de ACSL4

La regulación transcripcional del gen ACSL4 es compleja, e implica múltiples niveles, incluidos diversos factores de transcripción y ARN no codificantes como los ARN largos no codificantes (lncRNAs) y microARN (miRNAs), que pueden actuar reprimiendo o induciendo la expresión de ACSL4. La enzima también se encuentra regulada por distintas modificaciones post-traduccionales (26).

Las secuencias promotoras del gen humano y murino de ACSL4 han sido ya descritas y caracterizadas. El promotor de ACSL4 no presenta la secuencia

característica TATA, tal como sucede en aproximadamente el 80% de los promotores de mamíferos, pero presenta una caja CCAAT. Los promotores sin TATA box suelen ser ricos en islas CpG, y presentar distintos sitios de inicio de la transcripción. En este tipo de promotores, el factor de transcripción Sp1(27) cobra especial relevancia dado que tiene un rol clave en la activación de la transcripción mediante el reclutamiento de TBP (proteína de unión a TATA), y por lo tanto en el posicionamiento del complejo de pre-iniciación de la ARN polimerasa II (28). Tanto para los promotores de ACSL4 murino como humano, se determinó que existen tres secuencias consenso para la familia de factores de transcripción Sp1 localizadas en el extremo 3' del promotor de ACSL4, y que el promotor presenta islas CpG cercanas a los sitios de inicio de la transcripción. En la secuencia promotora de ACSL4 en murinos se encontró que Sp1 se encuentra asociado a transcripción basal, mientras que el factor CREB (proteína de unión a elemento de respuesta al AMPc), interviene en la regulación transcripcional de la enzima por AMPc en células de Leydig (29). ACSL4 posee sitios de unión para múltiples factores de transcripción, entre ellos, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (30) y el receptor α relacionado con estrógenos (ERR α) (27).

En relación con el cáncer de mama, estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la agresividad tumoral está relacionada con diferencias en la regulación transcripcional de ACSL4. El receptor de estrógeno α (RE α) regula negativamente la expresión de la enzima, mientras que el ERR α está implicado en la inducción de la transcripción de ACSL4 en células de TNBC. (27).

ACSL4 también se encuentra regulada en forma post-transcripcional por miRNAs, pequeñas moléculas reguladoras de ARN no codificante de entre 17 y 25 nucleótidos, y por lncRNAs, moléculas de ARN transcrito de más de 200 nucleótidos que no codifican para proteínas. Recientemente, se vio que el lncRNA H19, el cual protege contra lesiones por hemorragia intracerebral, actúa mediante el eje mi-106b-5p-ACSL4 (31).

Los miRNAs modifican la expresión de los genes blanco al unirse a sus correspondientes moléculas de ARN mensajero (ARNm), generando su escisión o impidiendo la traducción. Se han descubierto en virus, plantas y animales, y regulan una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos. Se unen a las regiones 3' UTR de ARNm, y se ha descubierto que pueden unirse a otras regiones, como los 5' UTR, las regiones codificantes o regiones promotoras, teniendo en esa última situación un efecto

promotor en vez de silenciador en la expresión génica (32). Se ha demostrado previamente la regulación de ACSL4 por distintos miRNAs, como el miR-34a en células de cáncer de colon, regulando el metabolismo lipídico (33). También, el miR-34a estaría modulando la expresión de ACSL4 en adipocitos intramusculares en porcinos, reduciendo la expresión de ACSL4 y de genes asociados a lipogénesis, como PPAR γ y SREBP-1C (proteína 1 de unión a los elementos regulatorios de esteroides), y aumentando genes asociados a procesos de la emulsión y posterior hidrólisis de las grasas (34). En el carcinoma hepatocelular se demostró la regulación de ACSL4 por el miR-211-5p, en el que la inhibición de ACSL4 por dicho miRNA disminuye la agresividad tumoral (35). Recientemente, se encontró que la expresión de ACSL4 se encuentra regulada en forma directa por otros miRNAs, como el miR-211, involucrado en la homeostasis metabólica en el meduloblastoma (36), y el miR-20a-5p, inhibiendo la ferroptosis dependiente de ACSL4 (37).

La enzima ACSL4 se encuentra también regulada por distintas modificaciones, tanto a nivel transcripcional como post-traducciona. Se mencionan a continuación las principales modificaciones:

- 1. Fosforilación.** Se han identificado en ACSL4 sitios de fosforilación por PKA (proteína quinasa A) y PKC β II (proteína quinasa C β II), que impactan en actividad y su distribución subcelular, regulando su localización intracelular (38,39).
- 2. O-GlcNAcilación.** Otra modificación postraducciona de ACSL4 descrita recientemente con posible relevancia para la hepatocarcinogénesis es su O-GlcNAcilación catalizada por la N-acetilglucosaminiltransferasa, que se asocia con la señalización mTOR (por sus siglas en inglés: Mammalian Target of Rapamycin) regulada por ACSL4 (40).
- 3. Ubiquitinación.** La ubiquitinación regula la degradación, localización, actividad e interacción de proteínas mediante su unión a ubiquitina. La degradación de ACSL4 por esta vía podría conducir a una inhibición en la ferroptosis en células tumorales (41).

3.4. Funciones de ACSL4

La enzima ACSL4 interviene en una variedad de procesos biológicos y en el desarrollo, incluida la diferenciación neuronal, la diferenciación de adipocitos, la secreción de insulina, y la fusión de membranas entre otros. La enzima cumple un papel clave tanto en la síntesis de lípidos como en la beta oxidación, participando en diversas vías de señalización (5,26). Además, ACSL4 participa en la regulación de la composición de la membrana plasmática, la esteroidogénesis y la biosíntesis de eicosanoides (5,42). A continuación, se resumen algunas de las principales funciones celulares en que interviene la enzima ACSL4.

3.4.1. ACSL4 en apoptosis

La apoptosis puede ser activada de una forma intrínseca o extrínseca. La extrínseca se da mediante la unión de ligandos a los receptores de superficie de las células, como el factor de necrosis tumoral y el ligando Fas. Esto conduce a la formación de un complejo que recluta y activa la caspasa-8, una caspasa iniciadora que activa caspasas río abajo, conduciendo a la apoptosis (43). La vía intrínseca, por su parte, es activada por variadas señales intracelulares de estrés, tales como el daño al ADN, daño oxidativo, y deprivación del factor de crecimiento. La liberación de citocromo C desde la mitocondria al citosol termina en la formación de un complejo del apoptosoma. Este complejo activa una nueva cascada de caspasas, terminando en apoptosis (43).

ACSL4 está implicada en la regulación de la apoptosis mediante la síntesis y el metabolismo de diversos metabolitos lipídicos, lo cual influye en la supervivencia y muerte celular. Por ejemplo, la oxidación de ácidos grasos activa al factor de transcripción STAT3 mediante la acetilación de la CoA, consecuentemente aumentando la expresión de ACSL4. Esta regulación positiva conduce a una mayor síntesis de fosfolípidos, elevando los niveles de fosfolípidos en la membrana mitocondrial. Esto fortalece la integridad mitocondrial, permitiendo a las células tumorales resistir la apoptosis inducida por la quimioterapia (44). Existen otros mecanismos por los que la regulación alterada de la enzima puede conducir a la apoptosis, como en la isquemia, donde su expresión aumentada por el miR-347 promueve la apoptosis neuronal. ACSL4 posee, por lo tanto, un rol dual en la apoptosis, inhibiéndola a través de la síntesis

aumentada de fosfolípidos o puede promoverla al promover la formación de radicales libres lipídicos y regular directamente vías de señalización apoptótica (45).

3.4.2. ACSL4 en ferroptosis

La ferroptosis es un tipo de muerte celular programada dependiente del hierro y caracterizada por la acumulación de peróxidos lipídicos, y es genética y bioquímicamente distinta de otras formas de muerte celular regulada como la apoptosis. La ferroptosis se ha implicado recientemente en múltiples enfermedades y funciona como un mecanismo de supresión tumoral (46). A nivel molecular, la disponibilidad de cisteína, la biosíntesis de glutatión (GSH) y el funcionamiento adecuado de la enzima glutatión peroxidasa (GPX4) son claves para mantener bajo control la ferroptosis. Recientemente, se han descrito otros actores capaces de inducir la ferroptosis, los cuales están involucrados en el metabolismo de los PUFAs, que, en última instancia, modulan la composición de los lípidos celulares ya que los fosfolípidos que contienen PUFAs son susceptibles a la peroxidación (47). En la actualidad, ACSL4 es considerada un componente clave en la ferroptosis ya que modula la composición lipídica celular, dictaminando la sensibilidad a este mecanismo (26,42,46).

Recientemente, se descubrió que ACSL4 sirve como un regulador de la ferroptosis específica del contexto (48), destacando el papel de ACSL4 en la inducción de la ferroptosis. Se demostró que ACSL4 es necesaria en la ferroptosis inducida por erastina o por inhibidores de GPX4, mientras que es prescindible en la ferroptosis mediada por P53 (49), o en otros escenarios en que la peroxidación lipídica no es mediada por ACSL4 (50).

3.4.3. ACSL4 en patologías

ACSL4 se encuentra involucrada en el desarrollo de diversas enfermedades. Controla el desarrollo de la obesidad a través de la regulación del metabolismo lipídico y la secreción hormonal. La síntesis y el metabolismo de ácidos grasos, incrementados por la sobreexpresión de ACSL4, contribuye a la enfermedad de isquemia-reperfusión (51). También, numerosos estudios han demostrado la sobreexpresión de ACSL4 en tejido de hígado de pacientes con enfermedad hepática grasa no alcohólica y se

encuentra implicada en la respuesta inflamatoria y en la fibrosis hepática (52). La enzima se encuentra también implicada en la insuficiencia renal hepática, por estar involucrada en el metabolismo lipídico de las células tubulares renales y en la respuesta inflamatoria de dichas células (53). En otros trabajos se ha mostrado que la formación alterada de acil-CoA por parte de ACSL4 da lugar a estrés oxidativo y muerte celular en neuronas (54). Además, la enzima está involucrada en la construcción y mantenimiento de las membranas neuronales, por lo que alteraciones en su expresión conducen a inestabilidad y disfunción en las mismas (43).

Una reducción de la actividad de ACSL4 puede llevar a un metabolismo alterado de los ácidos grasos en neuronas, causando alteraciones en el crecimiento neuronal, sinaptogénesis y otras funciones importantes para el desarrollo cerebral normal. Se ha demostrado que una disminución de ACSL4 reduce la formación de espinas dendríticas, lo que le sugiere que esta proteína juega un papel clave en la maduración y remodelación de las neuronas (55).

Se han reportado mutaciones puntuales en el gen de ACSL4, vinculadas al retraso mental asociado al cromosoma X (56). Los varones afectados demostraron discapacidad intelectual no específica y no progresiva, que van de severa a moderada sin convulsiones, mientras que en mujeres portadoras se mostraron capacidades cognitivas altamente variables, desde discapacidad intelectual moderada hasta inteligencia normal. Otras deleciones en el gen de ACSL4 están asociadas a discapacidad intelectual (57).

Finalmente, la asociación entre ACSL4 y el cáncer ha sido ampliamente demostrada, y se trata más adelante en el presente trabajo.

4. Metabolismo del ácido araquidónico

El AA actúa como segundo mensajero dado que puede mimetizar la acción de las hormonas u agonistas que desencadenan su liberación, pudiendo actuar en forma directa o a través de sus metabolitos (2).

Los niveles de AA libre dentro de la célula son claves dado que su metabolización da como resultado la producción de eicosanoides, moléculas lipídicas biológicamente

activas que tienen efecto sobre un amplio rango de órganos, entre los que se pueden mencionar los vasos sanguíneos, el útero, los riñones, el estómago, los intestinos, y el eje hipotalámico y pituitario (2,58).

Los eicosanoides impactan en variados procesos fisiológicos críticos, como la permeabilidad vascular, la protección de la mucosa gástrica, la agregación plaquetaria y la regulación del tono del músculo liso. Se ha encontrado que los eicosanoides intervienen en aspectos muy importantes de la inmunidad, como la producción de anticuerpos, citocinas, la diferenciación celular, la proliferación y migración, y la presentación de antígenos (2,58).

La oxidación del AA para producir eicosanoides es mediada principalmente por las vías de las lipooxigenasas (LOX), las ciclooxigenasas (COX) y la familia del citocromo P450 (CYP) (59–61) (Figura 3):

- I. **Ciclooxigenasas:** Catalizan la conversión del AA a prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs).

- II. **Lipooxigenasas:** Producen ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs), que son convertidos en ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). Hay al menos tres tipos de LOX que añaden un grupo hidroperoxi (-OOH) a la posición 5, 12 o 15 del AA para formar ácido 5-, 12- o 15-HPETE, que posteriormente se convierten en los correspondientes 5-, 12- ó 15-HETE, los que luego pueden convertirse en derivados ácidos oxoeicosatetraenoicos (oxoETEs). Los leucotrienos (LTs) se generan a partir del 5-HPETE. A partir de diferentes metabolitos de esta vía se pueden producir las lipoxinas (LXs).

- III. **Citocromo P450:** Esta familia de enzimas, con sus actividades ω -hidroxilasas producen derivados HETEs, mientras que las actividades epoxigenasas producen epoxiácidos como los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) que pueden convertirse en sus respectivos ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DHETs).

Los eicosanoides actúan en las células blanco con receptores nucleares, o en la superficie celular a través receptores acoplados a proteína G (2,62).

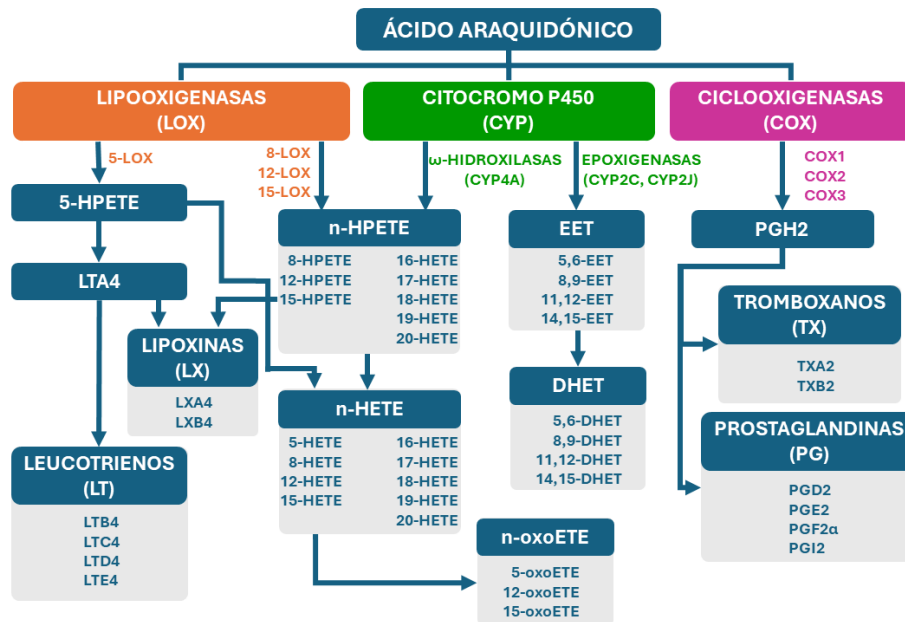


Figura 3. Metabolismo del ácido araquidónico y producción de eicosanoides. En el esquema se señalan las enzimas lipooxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX) y citocromo P450 (CYP) que metabolizan al ácido araquidónico y los principales eicosanoides generados. DHETE: ácido dihidroxieicosatetraenoico; EET: ácido epoxieicosatrienoico; HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico; LT: leucotrienos; LX: lipoxinas; oxoETE: ácido oxoeicosatetraenoico; PG: prostaglandinas; TX: tromboxanos.

5. Síntesis de hormonas esteroides

La esteroidogénesis, síntesis de hormonas esteroides, es un proceso crucial en el organismo humano para el mantenimiento de diversas funciones fisiológicas. Estas hormonas, derivadas del colesterol, incluyen glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales como los estrógenos, progesterona y testosterona. La síntesis tiene lugar principalmente en las glándulas suprarrenales y en las gónadas, bajo la influencia de complejas cascadas de eventos regulados por sistemas de retroalimentación. La regulación precisa de la síntesis de hormonas esteroides implica la participación de diversas moléculas señaladoras, como la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona luteinizante (LH), que estimulan la producción hormonal según las necesidades del organismo. A su vez, mecanismos de retroalimentación aseguran un equilibrio hormonal adecuado, permitiendo adaptaciones a cambios ambientales, estrés o demandas metabólicas, y contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis en el cuerpo humano (63).

El paso limitante en la generación de esteroides es el transporte de colesterol desde la membrana externa mitocondrial, hacia la membrana interna mitocondrial (64,65). Este paso es crítico, ya que el colesterol es el precursor fundamental para la síntesis de todas las hormonas esteroides. Una vez dentro de las mitocondrias, el colesterol puede ser convertido en pregnenolona (P5), el precursor común de diversas clases de hormonas esteroides.

El paso limitante se encuentra regulado por la proteína StAR (por sus siglas en inglés: Steroidogenic Acute Regulatory Protein), que actúa en células especializadas productoras de esteroides. StAR juega un papel clave como mediadora en la entrada del colesterol, dado que se localiza en la membrana externa de las mitocondrias y tiene la capacidad de unirse al colesterol y facilitar su transporte a través de dicha membrana, superando la barrera lipídica mitocondrial. De esta forma, StAR controla el primero de los pasos en la formación de esteroides, que es la conversión de colesterol a P5 por la enzima P450_{scc} (complejo enzimático de escisión de la cadena lateral del colesterol o CYP11A1), precursor común de todos los esteroides (66).

La regulación de la expresión y actividad de la proteína StAR es esencial para mantener un equilibrio adecuado en la producción de hormonas esteroides. Diversos factores, como las hormonas LH y ACTH, así como la concentración intracelular de esteroides, participan en la regulación de la expresión de la StAR. La coordinación fina de estos mecanismos asegura una respuesta adaptativa y equilibrada del organismo a las demandas hormonales específicas en diferentes situaciones fisiológicas. La expresión de StAR es regulada por múltiples mecanismos (66).

Se encuentra ampliamente documentado que la estimulación hormonal de la síntesis de esteroides en la corteza adrenal y en las células testiculares de Leydig implica un aumento en los niveles de AA (67). En las células de Leydig, la liberación de AA ocurre aproximadamente un minuto después de la estimulación con LH (68,69). La liberación de AA en células de Leydig estimuladas con gonadotropinas y en células suprarrenales estimuladas con la hormona ACTH es dependiente de la dosis y del tiempo (70). La inhibición de la liberación de AA disminuye la acción de LH y ACTH sobre la producción de esteroides, lo que sugiere que es un evento necesario para la esteroidogénesis (71).

Se ha demostrado que los metabolitos del AA desempeñan un papel en la regulación de la esteroidogénesis. Por ejemplo, en las células de la zona *fasciculata* de

la corteza adrenal, se ha observado un efecto directo de los metabolitos 15-lipoxigenados en la regulación de la síntesis de P5 (72). El tejido adrenocortical posee las vías 5-LOX y 15-LOX, que generan 5-HETE y 15-HETE respectivamente a partir de AA. En células de Leydig MA-10, se ha demostrado que 5-HPETE o 5-HETE están involucrados en el aumento de la producción de progesterona (P4) (73).

6. ACSL4 en la esteroidogénesis

Se ha establecido que el AA y sus metabolitos desempeñan un papel en la regulación de la expresión de la proteína StAR, ya que, en la fase aguda de la síntesis de esteroides, la liberación de AA en la mitocondria constituye un estímulo para el transporte de colesterol (64). En células de Leydig, los metabolitos del AA producidos por la 5-LOX participan en la señalización inducida por hormonas tróficas y activan la expresión génica de la proteína StAR, ya que el promotor de la proteína contiene el elemento de respuesta al AA (64). Además, se ha descrito en células de Leydig que los metabolitos de la epoxigenasa tienen un efecto regulatorio sobre la expresión del gen de la proteína StAR y la esteroidogénesis.

Anteriormente, se consideró que la fosfolipasa A2 (PLA2) participaba en la liberación de AA regulada por hormonas tróficas. Sin embargo, no existe evidencia directa que respalde la idea de que la PLA2 libere AA en tejidos esteroidogénicos ni de que las hormonas esteroidogénicas activen a la PLA2. Estas observaciones sugirieron la existencia de otro mecanismo de liberación de AA en la regulación de la biosíntesis de esteroides desencadenado por hormonas tróficas. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha identificado un mecanismo de liberación de AA en el cual interviene la enzima ACSL4 (21). En este mecanismo regulado hormonalmente, ACSL4 participa al secuestrar el ácido graso del *pool* libre citosólico y esterificarlo para formar AA-CoA (67,74). Posteriormente, actúa una acil-CoA tioesterasa denominada ACOT2, localizada en la membrana mitocondrial interna. ACOT2 pertenece a una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de diversos ésteres de CoA, dando como producto el ácido graso libre más la molécula de CoA. Por ende, estas enzimas influyen en la regulación de los niveles intracelulares de estas moléculas y, consecuentemente, en los procesos celulares relacionados con estos compuestos. En la membrana mitocondrial, ACOT2

hidroliza el AA-CoA, liberando los productos AA y CoA en el interior de la mitocondria (21).

La inhibición tanto de la expresión de ACOT2 como de ACSL4 ha demostrado inhibir la producción de esteroides y la expresión de StAR (21). Los efectos mencionados se revierten con la adición de AA o derivados permeables del colesterol, pero no con la adición de otros ácidos grasos, lo que indica la participación específica de ACSL4 en este mecanismo. Además, se ha comprobado que el inhibidor de ACSL4, triacsina C, bloquea la esteroidogénesis estimulada por AMPc y la expresión de StAR. En este mecanismo, el AA-CoA podría ser transportado hacia la mitocondria unido al inhibidor de unión al diazepam (DBI) (75,76), una proteína de unión a acil-CoA expresada en altas concentraciones en células esteroidogénicas (77,78). El DBI es ligando de la proteína translocadora (TSPO), situada en la membrana mitocondrial externa. Esto facilitaría posiblemente la transferencia de AA-CoA a las mitocondrias, con la consiguiente disponibilidad del sustrato para ACOT2 en su sitio de acción (21). Estos estudios fueron los primeros en proporcionar evidencia de una vía alternativa de generación de AA que involucra a ACSL4/ACOT2 y que compartimentaliza el AA y el AA-CoA. En conjunto, estos resultados establecen un papel coordinado entre ACSL4 y ACOT2 frente al estímulo trófico, generando la liberación de AA en el interior de la mitocondria e induciendo la expresión de StAR, estimulando así la síntesis de hormonas esteroides (Figura 4).

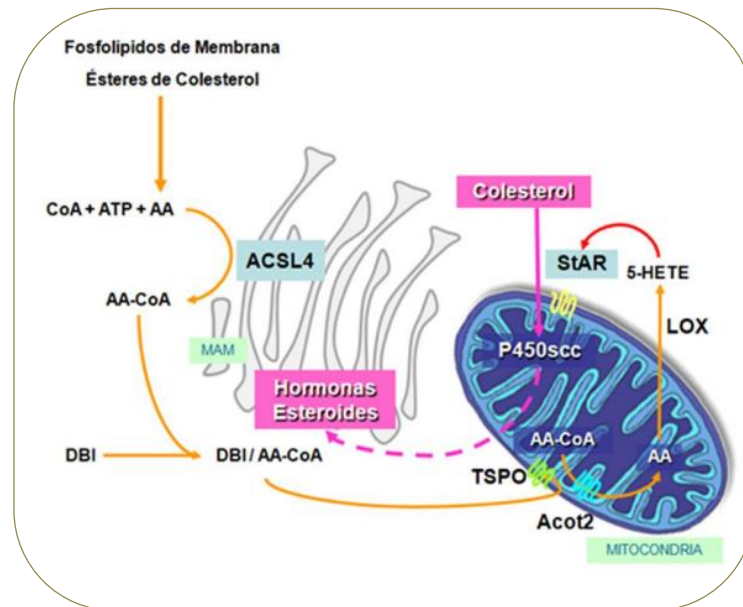


Figura 4. Modelo de liberación de AA al interior de la mitocondria y su relación con la esteroidogénesis. Esquema de esterificación por ACSL4 del ácido araquidónico con una molécula de CoA, y su transporte y entrada a la mitocondria, en el que intervienen DBI, TSPO y ACOT2. También, se muestra el ingreso del colesterol a la mitocondria mediado por StAR. Imagen tomada y modificada de “ACSL4”. Encyclopedia of Signaling Molecules (79).

7. Breves Conceptos sobre el Cáncer

La tumorigénesis, un proceso que genera un desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular, dando lugar a la formación de neoplasias que pueden ser benignas o malignas. Las neoplasias benignas se presentan como tumores localizados, delimitados por una cápsula fibrosa, con células bien diferenciadas y una estructura regular. Estos tumores benignos causan daño por compresión a órganos o tejidos vecinos, siendo no recurrentes tras su extirpación quirúrgica. En cambio, las neoplasias malignas, o cánceres, se caracterizan por un crecimiento celular descontrolado y la capacidad de invasión, pudiendo diseminarse a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático, dando lugar a metástasis (80,81).

A nivel global, el cáncer constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Los tipos más comunes de cáncer en hombres incluyen pulmón, próstata,

colon y recto, estómago e hígado; mientras que en mujeres destacan mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (82).

Desde una perspectiva molecular, el cáncer surge de la acumulación de aberraciones genéticas que desregulan diversas vías celulares. Análisis genéticos recientes han permitido identificar conjuntos de genes cuya expresión en tumores primarios se asocia con un mayor riesgo de metástasis y un pronóstico desfavorable. La desregulación de vías de señalización en el cáncer conlleva eventos como la dediferenciación celular, la evasión de la apoptosis, el aumento de la proliferación, la migración y la invasión celular, favoreciendo la formación de tumores y metástasis (80,81).

En el desarrollo de tumores malignos, las células tumorales interactúan constantemente con el microambiente circundante, influyendo en procesos como la proliferación, la transición epitelio-mesenquimal (TEM), la migración, la invasión, la angiogénesis y la metástasis. La TEM, por ejemplo, marca la transición de células epiteliales diferenciadas hacia un fenotipo mesenquimal, con pérdida de adhesión y polaridad celular. Cuando el tumor crece, las células centrales experimentan un entorno hipóxico, estimulando la expresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), promoviendo así la formación de nuevos vasos sanguíneos y facilitando el crecimiento tumoral (83).

En resumen, el cáncer es una enfermedad compleja que involucra alteraciones genéticas y procesos celulares desregulados, dando lugar a tumores malignos con potencial metastásico. Comprender estos procesos es esencial para desarrollar estrategias efectivas de prevención, diagnóstico y tratamiento.

7.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad maligna que se origina en las células del tejido mamario y es la forma más común de cáncer en mujeres, pero también puede afectar a los hombres en casos menos frecuentes (82).

El cáncer de mama se origina a partir de los diversos elementos que conforman la anatomía del tejido mamario. Según la *American Cancer Society*, los carcinomas más comunes en el seno son los ductales y los lobulillares. Si no se ha propagado, se clasifican como "*in situ*", mientras que los que se han esparcido al tejido mamario circundante se clasifican como "invasivos" o "infiltrantes".

Si bien los síntomas del cáncer de mama pueden variar, suelen incluir la presencia de un bulto en la mama, cambios en el tamaño o forma de la mama, secreción del pezón, enrojecimiento o descamación en la piel de la mama, y cambios en la apariencia de la areola. Dado que el diagnóstico temprano es fundamental para el tratamiento exitoso del cáncer de mama, es importante detectar cualquier cambio y realizarse autoexámenes mamarios regularmente. Las mujeres deben también someterse a exámenes mamarios, como la ecografía mamaria o la mamografía, especialmente aquellas que posean antecedentes familiares o factores de riesgos conocidos para la enfermedad (84,85).

El tratamiento del cáncer de mama abarca diversas modalidades, como cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y terapias dirigidas. La elección del tratamiento depende del estadio del cáncer, el tipo de tumor y las características individuales de la paciente.

7.1.1. Clasificación

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, por lo que su tratamiento para que resulte eficaz, depende de la correcta categorización de su subtipo molecular. De acuerdo con el estado del receptor de estrógenos (RE), los tumores de mama se clasifican en dos categorías principales, aquellos que expresan el RE (RE+) y aquellos que no lo expresan (RE-). Los carcinomas RE+ tienden a ser menos agresivos y responder bien al tratamiento, mientras que los RE- son más agresivos y aún carecen de un tratamiento adecuado. Es importante destacar que un cáncer de mama puede comenzar siendo RE+ y evolucionar gradualmente hacia RE- a medida que progresa la TEM (86).

Durante las últimas décadas, la clasificación se ha basado en el estado de los receptores RE, de progesterona (RP) y HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano). Más recientemente, se han generado datos de expresión genética

que estratifican aún más los cánceres con receptores positivos y negativos. La clasificación molecular establece cuatro tipos de cáncer de mama: luminal A, luminal B (pudiendo ser HER2 negativo o positivo), HER2 y *basal like* (triple negativo). La clasificación de los tumores de mama se amplía aún más al considerar la expresión de PR, según los perfiles de expresión génica. A continuación, se presenta una tabla con los principales subtipos de cáncer de mama (Tabla 1).

Subtipo molecular	Análisis inmunohistoquímico	Características
Luminal A	Luminal A	-RE positivo -HER2 negativo -Ki67 bajo -RP alto -Plataforma molecular de bajo riesgo
Luminal B	Luminal B (HER2 -)	-RE positivo -HER2 negativo -Ki67 alto o RP bajo -Plataforma molecular de alto riesgo
	Luminal B (HER2 +)	-RE positivo -HER2 positivo -Ki67 indistinto -RP indistinto
HER2 <i>enriched</i>	HER2 + (no luminal)	-HER2 positivo -RE y RP negativos
<i>Basal like</i>	Triple negativo (ductal)	-HER2 negativo -RE y RP negativos

Tabla 1. Clasificación de los tumores de mama. Clasificación de los tumores mamarios de acuerdo con su subtipo molecular, evaluación inmunohistoquímica y características moleculares. Cuadro tomado del artículo “Cáncer de mama”. Dra. Beltrán, 2023. Sociedad Española de Oncología Médica (86).

Dentro de los distintos tipos tumorales, el subtipo luminal A es el de mejor pronóstico, mientras que el TNBC representa el subtipo más agresivo, caracterizado por la ausencia de expresión de RE α , PR y HER2 (86).

7.1.2. Tratamientos

Las terapias actuales para el cáncer de mama incluyen la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y las terapias dirigidas, así como el uso de inhibidores de receptores hormonales y anticuerpos monoclonales. La terapia para aplicar depende de muchos factores. Se consideran las características personales del paciente, como la edad y su estado de salud en general. Se evalúa el estadio del tumor a tratar, considerando si hay diseminación a ganglios linfáticos cercanos o metástasis a otras partes del cuerpo. El tratamiento varía según el tipo tumoral, considerando si responde o no a terapias hormonales, y es útil realizar pruebas genéticas para orientar el esquema médico, identificando mutaciones específicas que podrían afectar la efectividad de los tratamientos (87).

En la actualidad, existen tres clases principales de terapia endócrina para el cáncer positivo para el RE: los moduladores selectivos del RE (SERM), los reguladores negativos del RE (SERD) y los inhibidores de la aromatasa. El tamoxifeno, un SERM prototipo, compite con el estradiol (E2) por la unión al RE, y actúa antagonizando las acciones mitogénicas de los estrógenos en el tejido mamario. Sin embargo, tiene funciones parcialmente estrogénicas en ciertos tejidos. Por otro lado, el fulvestrant, un SERD, es un antagonista del RE en todos los tejidos, compitiendo por la unión de E2 y acelerando la degradación del receptor (88,89).

En el TNBC se utilizan actualmente terapias que abarcan inhibidores de la PARP (poli-(ADP-ribosa)-polimerasa), del EGFR (receptor de EGF), de la vía PI3K/AKT/mTOR, de CDK4/6, de VEGF y de los puntos de control del sistema inmune (Tabla 2).

Terapias	Mecanismo de acción
Inhibidores PARP	Inhiben a PARP generando acumulación de daño en el ADN, y la muerte por coexistencia de mutaciones en dos genes (letalidad sintética) en tumores TNBC mutados
Puntos de control inmunitarios	Bloqueo de los puntos de control inmunitarios, como PD-1/PD-L1
Inhibidores	Potencian la respuesta inmune antitumoral mediada por células T, superando la evasión inmune
Inhibidores EGFR	Inhiben el receptor del factor de crecimiento epidérmico para inhibir vías de crecimiento y supervivencia tumorales
Inhibidores PI3K/AKT/mTOR	Inhiben la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, suprimiendo la proliferación, la supervivencia y el metabolismo celular
Inhibidores CDK4/6	Bloquean la quinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6) para inhibir la progresión del ciclo celular y la proliferación en células de TNBC
Inhibidores VEGF	Inhiben la señalización del VEGF, suprimiendo la angiogénesis y la vascularización tumoral

Tabla 2. Inhibidores empleados en el TNBC y sus mecanismos de acción. Resumen de los principales tipos de inhibidores utilizados actualmente en el TNBC y los mecanismos de acción de cada uno de ellos. Tabla adaptada del trabajo “Advancements and challenges in TNBC” (90).

La falta de tratamientos efectivos y la asociación con un mayor riesgo de metástasis y recurrencia hacen que el TNBC sea un área crítica de investigación en la lucha contra el cáncer de mama. A pesar de los avances, la resistencia a los tratamientos sigue siendo un desafío, especialmente en pacientes con enfermedad metastásica.

7.1.3. Cáncer de mama triple negativo

Con una incidencia de aproximadamente entre el 15% y 20% de los diagnósticos de cáncer de mama, el TNBC se caracteriza por su comportamiento agresivo, las limitadas opciones de tratamientos disponibles y una mala prognosis, en comparación a los otros subtipos (85,91).

El TNBC, tal como se mencionó, se define por la ausencia de expresión del RE α , del RP, y de HER2, lo que lo vuelve resistente a las terapias utilizadas en los otros subtipos. Representa un grupo heterogéneo de tumores, con características moleculares y comportamientos clínicos distintivos. Suele presentarse en un estadio avanzado, presentando una mayor probabilidad de metástasis hacia órganos cercanos, como los pulmones, el hígado y el cerebro, lo que contribuye a su baja prognosis (92).

La patogénesis del TNBC involucra la desregulación de múltiples vías de señalización, entre las que se encuentran las vías PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK, and JAK/STAT, conduciendo a proliferación tumoral, invasión y metástasis (93).

7.2. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una enfermedad de gran relevancia en la salud masculina y representa un desafío significativo en el ámbito médico. Es el segundo tipo de cáncer más común en hombres a nivel mundial, con una incidencia que alcanza aproximadamente el 7,1% de todos los casos de cáncer en el género masculino. Según estadísticas de la *American Cancer Society* del año 2024, representa el 29% de todos los casos de cáncer masculino y ocupa el segundo lugar después del cáncer de pulmón en términos de muertes (94). Esta neoplasia tiene una marcada predisposición en hombres mayores, siendo más frecuente en aquellos mayores de 50 años.

El cáncer de próstata es una neoplasia maligna epitelial que se produce en la glándula prostática. En sus etapas tempranas no presenta síntomas específicos que puedan indicar su presencia, pero con la progresión de la enfermedad los pacientes pueden experimentar micción frecuente, urgencia para orinar, disuria, obstrucción intestinal, entre otras manifestaciones clínicas. En sus estadios iniciales el cáncer de próstata presenta una progresión lenta y es dependiente de andrógenos (95).

En la etapa inicial del tumor, casi todos los pacientes con cáncer de próstata responden a las terapias clásicas de privación de andrógenos. Sin embargo, después de una media de 18 a 24 meses de tratamiento, casi todos los pacientes progresan a cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) (96), que no responde a los andrógenos y que suele tener un pronóstico malo, con una tasa de supervivencia a cinco años de sólo el 15% (97).

El CRPC es generalmente una afección fatal, con una media de tiempo hasta la muerte de 1 a 2 años luego de haber ingresado a esta etapa. Es un estado heterogéneo con características moleculares complejas, con mal pronóstico y alta tasa de mortalidad, en el que la enfermedad progresa a pesar de la deprivación hormonal. La progresión natural del CRPC metastásico a menudo implica un agravamiento en los síntomas, como fatiga y dolor óseo, que pueden ser perjudiciales para la calidad de vida global del paciente. Por lo tanto, los objetivos de los tratamientos no solo son mejorar la supervivencia, sino también preservar la calidad de vida de los pacientes y aliviar el dolor y los síntomas relacionados con el cáncer (97).

Para el diagnóstico del cáncer de próstata el indicador más utilizado es el antígeno prostático específico (PSA). Niveles elevados de PSA son indicativos de alteraciones en la estructura de la glándula prostática (98) y, si bien son usados para el diagnóstico del cáncer de próstata, sus niveles también pueden elevarse en la hiperplasia prostática benigna o en la enfermedad inflamatoria de la próstata (99).

La aparición y el desarrollo del CRPC son el resultado de interacciones entre diversos mecanismos que no se encuentran completamente descritos. El receptor de andrógenos (RA) desempeña un papel clave en el cáncer de próstata, dado que es el gen con mayor porcentaje de mutación (62,7%) en el CRPC (100). Diferentes mutaciones en el RA pueden llevar a su hiperactivación, o a una activación en vías de señalización alternativas, promoviendo la supervivencia celular independientemente de la presencia de andrógenos.

La activación del RA aún en una situación de deprivación de andrógenos promueve la proliferación celular, llevando a una mayor progresión tumoral y a la resistencia a los tratamientos hormonales (101). Aunque la actividad aberrante del RA puede ser perjudicial al promover la proliferación celular y la progresión del cáncer, la restauración funcional del RA en células tumorales puede hacerlas nuevamente susceptibles a terapias de deprivación hormonal.

7.2.1. Clasificación y tratamientos

En cuanto a los tratamientos del cáncer de próstata, cuando se considera que las células tumorales no se han extendido fuera de la glándula prostática se suele

realizar una cirugía denominada prostatectomía radical, que consiste en extirpar la glándula prostática, el tejido que la rodea y las vesículas seminales. También, se pueden extirpar algunos de los ganglios linfáticos de la pelvis para evitar que el cáncer se propague a otras partes del cuerpo (102).

Entre los tumores hormono dependientes se encuentra el cáncer de próstata receptor de andrógenos positivo (RA+), lo que implica que su desarrollo y progresión están fuertemente influenciados por la acción de las hormonas sexuales masculinas, principalmente los andrógenos.

La terapia inicial para el cáncer de próstata metastásico se centra en la deprivación de andrógenos, ya sea mediante castración química o quirúrgica, siendo esta última una estrategia comúnmente empleada como primera línea de este tipo de tratamientos (103). En el CPRC la terapia de primera línea consiste en la combinación de docetaxel más prednisona, las opciones de segunda línea incluyen docetaxel, mitoxantrona, cabazitaxel, sipuleucel-T y la terapia hormonal secundaria, consistente en ketoconazol, corticoides y dietilestilbestrol. El docetaxel es el tratamiento de primera línea para pacientes que no recibieron terapias quimioterapéuticas, con buen estado funcional, y en aquellos que aún no han progresado bajo docetaxel al CPRC. Otros agentes androgénicos novedosos, como la abiraterona y la enzalutamida, son opciones terapéuticas efectivas que se utilizan como opciones de segunda línea. Estos medicamentos pueden considerarse inicialmente en pacientes frágiles o pacientes que no han recibido previamente tratamiento con estos mismos compuestos o que desean evitar las terapias citotóxicas (97).

El docetaxel es un agente antineoplásico citotóxico que actúa estimulando el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos estables inhibiendo su despolimerización, lo que conduce a un marcado descenso de tubulina libre sin alterar el número de protofilamentos. El docetaxel altera la red tubular de las células, esencial para las funciones vitales de la mitosis e interfase celular (104).

La abiraterona es un inhibidor potente, selectivo e irreversible, de la enzima 17 α -hidroxilasa/C17,20-liasa (CYP17) que cataliza la conversión de P5 y progesterona a dehidroepiandrosterona y androstenodiona, respectivamente. Esta enzima es fundamental para la síntesis de andrógenos en testículos, glándulas suprarrenales y

tejidos prostáticos tumorales. En el tratamiento en una fase tan temprana se reducen los niveles de testosterona a valores nanomolares (105).

A pesar de los avances en la terapia de deprivación de andrógenos, la respuesta a este tratamiento es temporal, y muchos pacientes experimentan una transición hacia el estado de CRPC. Esta fase representa un desafío clínico significativo, ya que los tumores se vuelven hormono-independientes y, por ende, insensibles a la terapia hormonal convencional y a menudo a la quimioterapia (103,106).

La falta de respuesta a la terapia de privación de andrógenos no se acompaña de la pérdida de la expresión o actividad transcripcional del RA, y su actividad sigue siendo crítica para el crecimiento tumoral en el CRPC (101). La expresión de RA generalmente aumenta en CRPC, con restauración de la actividad del RA a través de una variedad de mecanismos que incluyen la amplificación y sobreexpresión de RA, mutaciones (principalmente en el dominio de unión al ligando, que confiere promiscuidad), aumento de la síntesis de andrógenos intratumorales, activación de RA por citoquinas y factores de crecimiento y variantes de empalme del RA constitutivamente activas (101).

En la investigación terapéutica del CRPC, se han identificado biomarcadores en múltiples niveles biológicos, incluyendo genes, ARN, proteínas y metabolitos, mediante métodos computacionales y experimentales. Estos biomarcadores están dirigidos a la predicción temprana, el pronóstico preciso y la personalización de la terapia para el CRPC. A pesar del aumento en enfoques basados en moléculas, la alta heterogeneidad en la evolución del CRPC sigue limitando la confiabilidad y eficacia de las estrategias terapéuticas actuales en la práctica clínica (95).

7.3. Cáncer de ovario

El cáncer de ovario constituye un desafío significativo en el campo de la oncología ginecológica y representa una de las principales causas de mortalidad por cáncer en mujeres. Esta neoplasia ocupa el quinto lugar en términos de incidencia entre los cánceres ginecológicos y es conocida por su tendencia a diagnosticarse en etapas avanzadas, lo que contribuye a su alta letalidad (82).

Dada la falta de síntomas específicos en las primeras etapas y la ubicación anatómica de los ovarios en la cavidad pélvica, el cáncer de ovario suele diagnosticarse tardíamente, cuando la enfermedad ya se ha diseminado a otras estructuras abdominales. Esta característica hace que la tasa de supervivencia sea más baja en comparación con otros cánceres ginecológicos (107).

Desde un punto de vista histológico, el cáncer de ovario es diverso, clasificándose principalmente en carcinomas epiteliales, tumores de células germinales y tumores del estroma ovárico. Cada subtipo presenta características distintivas en términos de comportamiento clínico y respuesta a tratamientos específicos (108).

El cáncer de ovario epitelial (COE) representa aproximadamente el 90% de todos los casos de cáncer de ovario diagnosticados, con tasas de supervivencia a cinco años que son inferiores al 40% en etapas avanzadas de la enfermedad. Presenta desafíos significativos en términos de detección temprana y tratamiento efectivo, dado que suele ser diagnosticado en estadíos avanzados. Además, la resistencia a los tratamientos actuales y otros desafíos terapéuticos resaltan la necesidad de desarrollar nuevas terapias que puedan mejorar o complementar las actuales (109).

Dado que es el tipo más predominante de cáncer de ovario, y el mal pronóstico que presenta, dentro de los tipos tumorales de ovario en el presente trabajo vamos a profundizar en el COE.

7.3.1. Cáncer de ovario epitelial

El COE se origina en el epitelio que recubre la superficie externa del ovario y puede desarrollarse a partir de células epiteliales superficiales o de células que recubren los conductos de los órganos reproductivos femeninos. Este tipo de cáncer puede manifestarse como seroso, mucinoso, endometriode o de células claras, cada uno con características histológicas distintas y diferentes pronósticos. La comprensión de los factores de riesgo específicos y los avances en la detección temprana son claves para mejorar los resultados de los pacientes con COE (110).

El COE se clasifica en tipos I y II según sus características histológicas y moleculares, cada uno con perfiles genéticos distintos que influyen en su desarrollo y respuesta al tratamiento (111).

El COE de tipo I, que representan el 28% de los casos de cáncer de ovario, suelen ser tumores que son descubiertos en el examen pélvico cuando están localizados en el ovario, teniendo un mejor pronóstico en comparación con el COE de tipo II. Son generalmente de bajo grado, genéticamente estables y raramente presentan mutaciones en el gen supresor tumoral p53. Cada subtipo morfológico dentro de esta categoría es altamente heterogéneo y presenta un perfil molecular único definido por la activación de vías específicas de señalización celular (112).

Dentro de este contexto, el carcinoma de células claras y el cáncer endometriode de ovario se asocian con endometriosis y representan aproximadamente el 10% de los casos de cáncer de ovario. A pesar de ser clasificados como tumores de tipo I, el carcinoma de células claras puede adquirir mutaciones y fenotipos que lo posicionan como una categoría intermedia entre los tumores tipo I y tipo II (112).

Los carcinomas mucinosos de ovario son un subtipo histológico raro de COE, representando aproximadamente el 3% de estas malignidades. Se originan de células epiteliales que producen mucina en la superficie del epitelio ovárico y suelen presentarse como enfermedad metastásica invadiendo el tracto gastrointestinal en el 80% de los casos. Las alteraciones genéticas más comunes en este tipo tumoral afectan la vía MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos), además de mutaciones en otras vías oncogénicas (113).

El cáncer ovárico seroso de bajo grado representa menos del 2% de todos los cánceres ováricos y se origina más probablemente del epitelio de la trompa de Falopio en lugar del epitelio superficial del ovario, como se pensaba anteriormente. Estos tumores muestran una alta tasa de mutaciones activadoras en la vía MAPK, junto con alteraciones en la vía PI3K (fosfoinositol 3-quinasa) (114).

El COE de tipo II, que constituye el 75% de todos los casos de cáncer de ovario, se caracteriza por su naturaleza agresiva, alta prevalencia de mutaciones en TP53 (proteína tumoral 53) y presentación en estadios avanzados que requieren cirugía y quimioterapia basada en terapias con platinos. El carcinoma seroso de alto grado es el cáncer de ovario de tipo II más diagnosticado y se presenta típicamente en estadios avanzados con alta recurrencia, lo cual contribuye a su baja tasa de supervivencia a cinco años. Se asocia comúnmente con mutaciones en TP53 y alteraciones en vías oncogénicas que se encuentran activadas, como PI3K y RAS (115).

7.3.2. Tratamientos

Aunque no es comúnmente utilizada para el cáncer de ovario epitelial, la terapia hormonal se emplea más frecuentemente para los tumores del estroma ovárico (116).

Los agonistas de la hormona liberadora de LH, como la goserelina y la leuprolida, reducen la producción de estrógeno en mujeres premenopáusicas mediante inyecciones periódicas. Pueden causar efectos secundarios similares a los de la menopausia, y pueden debilitar los huesos con el uso prolongado (117).

El tamoxifeno, conocido por su uso en cáncer de mama, también se usa para tratar tumores del estroma ovárico, y ocasionalmente el cáncer de ovario epitelial avanzado. Actúa como anti-estrógeno en varios tejidos del cuerpo para inhibir el crecimiento de células cancerosas. Puede provocar efectos secundarios similares a los de la menopausia y existe un riesgo aumentado de coágulos sanguíneos graves en las piernas (116).

Los inhibidores de la aromataasa, como el letrozol, anastrozol y exemestano, bloquean la enzima que convierte otras hormonas en estrógeno en mujeres posmenopáusicas. No impiden que los ovarios produzcan estrógeno, por lo que sólo son útiles para reducir los niveles de estrógeno en las mujeres después de la menopausia. Estos medicamentos se usan principalmente para tratar el cáncer de mama, pero también se pueden usar para tratar algunos tumores del estroma ovárico que han reaparecido después del tratamiento, así como carcinomas serosos de bajo grado. Pueden causar sofocos, dolor articular y muscular, y adelgazamiento óseo, aumentando el riesgo de osteoporosis y fracturas óseas (110).

Estas terapias hormonales son selectivas según la situación del paciente y el tipo de cáncer de ovario, buscando equilibrar beneficios terapéuticos con riesgos potenciales.

Particularmente, entre los compuestos utilizados en el tratamiento del COE podemos encontrar al paclitaxel, carboplatino y doxorubicina, descritos a continuación con más detalle (118).

-Paclitaxel. El paclitaxel es un quimioterapéutico que se utiliza comúnmente en el tratamiento del COE, ya sea en regímenes de quimioterapia de primera línea o mantenimiento y recidiva. El paclitaxel se combina a menudo con otros agentes

quimioterapéuticos para potenciar su eficacia en el tratamiento. Es un compuesto que pertenece a la clase de los taxanos, y actúa estabilizando los microtúbulos en las células cancerosas, lo que interfiere con su capacidad para dividirse, llevando a la detención del ciclo celular y muerte de las células (119).

-Carboplatino. Es uno de los fármacos de elección en los tratamientos de quimioterapia de primera línea para el COE, tanto en combinación con paclitaxel como en otros esquemas de quimioterapia combinada. El carboplatino es un compuesto de metal pesado que actúa generando daño en el ADN de las células cancerosas mediante la formación de enlaces cruzados entre las cadenas de ADN, lo que interfiere en su replicación (110).

-Doxorrubicina. La doxorrubicina pertenece a las antraciclinas, interfiere en la replicación del ADN y la síntesis de ARN al intercalarse entre las bases de los ácidos nucleicos, provocando daño en el ADN y la inhibición de la síntesis de proteínas necesarias para la supervivencia celular. De este modo, interfiere con la proliferación de las células cancerosas. Aunque la doxorrubicina no se utiliza comúnmente como tratamiento de primera línea para el cáncer de ovario epitelial, a menudo se incluye en esquemas de quimioterapia combinada para casos avanzados o recurrentes (120).

Como ya se mencionó, el pronóstico en el COE es variable según el subtipo histológico y el estadio de la enfermedad al momento del diagnóstico, por lo que es necesaria la profundización en su estudio y el desarrollo de terapias más efectivas.

7.4. Ácido araquidónico y cáncer

Se ha evidenciado que la alteración en el metabolismo del AA contribuye de manera significativa a la tumorigénesis y a la progresión tumoral (4,121). La metabolización del AA desempeña un papel crucial en la carcinogénesis en órganos como el colon, el hígado, la mama y la próstata. Estudios epidemiológicos, clínicos y en animales han proporcionado pruebas de que la activación de las vías de la COX y LOX

durante la inflamación crónica y la carcinogénesis resulta en un metabolismo anómalo del AA, lo cual puede contribuir al proceso carcinogénico (58).

Se ha informado que los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tienen efectos beneficiosos en la reducción del riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, colon, pulmón y próstata (122). Estos AINEs ejercen sus efectos antiinflamatorios y antitumorales al reducir la producción de PGs mediante la inhibición de la COX.

Aumentos en la actividad de las LOX estimula la proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis de células cancerosas. Las LOX se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de cáncer, como el gástrico, de mama y de tiroides anaplásico, y dicha sobreexpresión potencia la proliferación celular y la angiogénesis tumoral en distintos tipos de tumores. La sobreexpresión de la COX-2 se detectó en tumores de mama, colon, páncreas y pulmón, correlacionándose con pronóstico desfavorable (123).

Los eicosanoides proinflamatorios son generados en abundancia por varios tipos de células cancerosas y las células circundantes al tumor. La inflamación se reconoce como un componente crítico en la iniciación y progresión tumoral. El microambiente tumoral está infiltrado por células inflamatorias que producen diversos mediadores citotóxicos, entre los que se incluyen los eicosanoides que contribuyen a la inflamación, proliferación, supervivencia y migración celular. Las PGs y los LTs pueden influir en estos mecanismos mediante múltiples vías de señalización, ya sea de forma autocrina o paracrina. En términos generales, el microambiente inflamatorio, que está vinculado a cambios en los perfiles y funcionalidades de los leucocitos, puede desencadenar la transformación de células epiteliales y promover el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Las PGs y los LTs son clave como inmunomoduladores, mediando la interrelación de señales entre las células epiteliales y las células estromales circundantes en el microambiente tumoral (124,125).

La inducción o sobreexpresión de la COX-2 se asocia con un aumento en la producción de PGE₂, uno de los principales productos de la COX. La PGE₂ proinflamatoria destaca como la más abundante en varios tipos de cáncer humano, incluyendo el de colon y recto, pulmón, mama y cabeza y cuello, y frecuentemente se asocia con un pronóstico adverso (123). Se reconoce que la PGE₂ desempeña un papel

predominante en la promoción del crecimiento tumoral, regulando la proliferación, muerte celular e invasión tumoral en numerosos tipos de cáncer.

8. ACSL4 y cáncer

Se ha demostrado en numerosos estudios de otros grupos y nuestros, el rol clave de ACSL4 en la progresión tumoral. Se ha corroborado un aumento en la expresión de ACSL4 en varios tipos de cáncer, como en el carcinoma hepatocelular, en cáncer de colon, pulmón, pancreático, de hígado, gástrico, mama y próstata, asociando la sobreexpresión de la enzima a una mayor agresividad tumoral (8,126). Por otro lado, la expresión de la enzima sensibiliza las células a la ferroptosis como en el cáncer de pulmón, cáncer de mama con RE+ y cáncer de cuello uterino a través de la promoción en la acumulación de productos de peroxidación lipídica y especies reactivas de oxígeno (127). En el presente trabajo nos vamos a centrar en el rol de ACSL4 en los tipos agresivos de cáncer de mama, próstata y ovario.

8.1. Cáncer de mama y ACSL4

En relación con el cáncer de mama, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que ACSL4 participa en la agresividad tumoral.

Tanto para cáncer de mama, como de próstata, ACSL4 exhibe una expresión diferencial según el estado del RE α o del RA, respectivamente (6,7). Se ha evidenciado una relación inversa entre la expresión del RE α y ACSL4, fenómeno también observado para el estado del RA, tanto en cáncer de mama como de próstata (6). Esta correlación inversa se confirma en tumores de pacientes, destacándose una mayor expresión de ACSL4 en muestras de TNBC, donde la inducción de ACSL4 se asocia a la pérdida de sensibilidad a hormonas esteroideas (7,128).

En nuestro laboratorio, se ha establecido que ACSL4 desempeña un papel causal en el control del fenotipo agresivo en el cáncer de mama. La sobreexpresión de ACSL4, tanto a nivel proteico como de ARNm, contribuye a una mayor agresividad, impulsando la proliferación, invasión y migración celular (128,129).

En células TNBC, la sobreexpresión de ACSL4 conlleva a un aumento en la producción de agentes potenciadores de la agresividad tumoral, como el ácido araquidónico intramitocondrial y los metabolitos derivados de las enzimas COX-2 y 5-LOX, también incrementadas en estas células (128,129).

En este contexto, se ha logrado reducir la proliferación celular *in vitro* en líneas de TNBC y la formación de tumores *in vivo* mediante una combinación de inhibidores de ACSL4, de 5-LOX y de COX-2, en dosis que, por sí solas, no son efectivas, sugiriendo una sinergia entre estos inhibidores. Se postula que las enzimas ACSL4, COX-2 y 5-LOX interactúan funcionalmente, operando de manera coordinada para regular el crecimiento tumoral, siendo posibles blancos terapéuticos para el control de la proliferación y el potencial metastásico de células de cáncer de mama (128).

Los niveles de ACSL4 se encuentran elevados en la línea celular de TNBC altamente agresiva, MDA-MB-231, en contraste con las células de la línea MCF-7, menos agresivas y positivas para la expresión del REα. En experimentos *in vitro*, la sobreexpresión transitoria de ACSL4 en células de la línea MCF-7 ha generado una mayor agresividad tumoral, aumentando la invasión, migración y proliferación celular. Por otro lado, la inhibición de la expresión de ACSL4 mediante la utilización de un shARN (short hairpin RNA) en células MDA-MB-231 ha generado una disminución en la agresividad de la línea (128,129).

En nuestro laboratorio, utilizando las células estables MCF-7 Tet-Off/ACSL4 reprimibles por tetraciclina, se observó que la sobreexpresión de ACSL4 modula negativamente la expresión del REα y RP, tanto a nivel de ARNm como proteico, siendo esta respuesta revertida mediante el tratamiento con doxiciclina (128). Otros autores han silenciado el REα en células de la línea MCF-7 que sobreexpresaban ACSL4, y han observado que dicho silenciamiento induce aún más la expresión de ACSL4 (8,130). Se ha reportado además que el silenciamiento de ACSL4 en la línea MDA-MB-231 restablece la expresión de REα (8). Estos datos confirman la relación inversa entre la expresión de la enzima ACSL4 y el REα.

Además, utilizando las células MCF-7 Tet-Off/ACSL4, se realizaron experimentos *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos *in vitro*. Al inocular estas células en un modelo xenoinjerto (ratones hembra *nude* atímicas), se observó el desarrollo de tumores con un marcado polimorfismo nuclear, alto índice mitótico y baja expresión de REα y RP,

tanto a nivel de ARNm como de proteína. El crecimiento de estos tumores fue inhibido al disminuir la expresión de ACSL4 con doxiciclina. Cabe destacar que las células de la línea MCF-7 no desarrollan tumores cuando son inoculadas en los ratones mencionados previamente; sin embargo, al sobreexpresar ACSL4, pueden generar tumores incluso sin el agregado de estrógenos. De este modo, la sola sobreexpresión de ACSL4 es capaz de transformar a las células MCF-7 en generadoras de tumores *in vivo* (128) . Resultados similares a este hallazgo fueron observados también por otros autores (131).

8.1.1. Vías de señalización

Previo a este trabajo de tesis doctoral, en nuestro laboratorio se realizaron análisis de transcriptómica y proteómica funcional en las células MCF-7 Tet-Off/ACSL4, así como en la respectiva línea control, sirviendo como base para la presente investigación (8,132).

Utilizando la línea MCF-7 Tet-Off/ACSL4 que sobreexpresa ACSL4, y la línea control MCF-7 Tet-Off/vector vacío (control) se realizó un análisis transcripómico (RNA-seq), de modo de identificar genes regulados por ACSL4. Los datos obtenidos fueron analizados con el software IPA (por sus siglas en inglés: Ingenuity Pathway Analysis), utilizado para la interpretación de experimentos ómicos. Se encontró que, con la sobreexpresión de ACSL4, las vías enriquecidas fueron p70S6K (o RPS6KB1, por sus siglas en inglés: Ribosomal Protein S6 Kinase B1) y mTOR, así como la señalización de los mecanismos moleculares del cáncer. Además, se llevó a cabo un análisis de proteómica mediante microarreglos de proteínas en fase inversa (RPPA, por sus siglas en inglés), descubriendo que vías canónicas obtenidas con la firma transcriptómica de ACSL4 correlacionan con la firma proteómica funcional de ACSL4. El análisis de RPPA mostró que la vía de señalización AKT/mTOR/p70S6K es una de las firmas más importantes de ACSL4 (8).

Por lo mencionado, a partir de los datos obtenidos previamente, se identificó a la vía mTOR como una de las principales firmas específicas para la expresión de ACSL4. mTOR es una quinasa que posee un papel crucial en la integración de múltiples estímulos que afectan las vías metabólicas relacionadas con el crecimiento celular. La desregulación de las vías de señalización dependientes de mTOR se encuentra

estrechamente vinculada a la fisiopatología de enfermedades como la diabetes, la obesidad, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, entre otras (133).

mTOR forma parte de dos complejos funcionales y estructuralmente distintos: mTORC1, un complejo multiproteico sensible a la rapamicina y a los nutrientes, y mTORC2, sensible a los factores de crecimiento, pero insensible a los nutrientes (134). En mamíferos, los componentes esenciales de mTORC1 son Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) y mLST8 (*mammalian Lethal with SEC13 protein 8*), mientras que en mTORC2 son Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) y SIN1 (*stress-activated protein kinase-interacting protein 1*). mTORC1 es activado por factores de crecimiento, nutrientes y el estado energético celular. Bajo condiciones favorables de nutrientes, mTORC1 inhibe la autofagia mediante la fosforilación de ULK1 (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*), impidiendo la formación del autofagosoma. En contraste, la escasez de nutrientes y ATP es detectada por la AMPK (proteína quinasa activada por AMP), que inhibe al complejo mTORC1, desencadenando así la autofagia. Este sistema asegura el reciclaje de proteínas y organelos dañados, proporcionando nutrientes esenciales a la célula y regulando el proceso de eliminación celular (135).

La enzima ACSL4 regula componentes de los complejos mTORC1 y mTORC2, así como a sus reguladores y sustratos río arriba. Se encontró un aumento significativo en la fosforilación de la quinasa de p70S6K (treonina 389), y de la fosforilación de su sustrato, la proteína ribosomal S6. Se observó también un aumento en la fosforilación de Rictor (treonina 135), sustrato de p70SK6. Se detectó también un aumento en la fosforilación de la proteína quinasa B, AKT (serina 473). También, en respuesta a la expresión de ACSL4, aumentaron los niveles de fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa 3 α y β (GSK3 α y GSK3 β) (serinas 21/9), inhibiendo la actividad de la enzima y contribuyendo de esa forma a la activación de mTOR (8). ACSL4 es, por lo tanto, un activador de la vía mTOR, tanto para los componentes de mTORC1 como de mTORC2, y su expresión puede desencadenar distintos mecanismos para regularla.

En nuestro laboratorio se observó también que la combinación de rapamicina y rosiglitazona, inhibidor de ACSL4, aumentó la inhibición de la proliferación celular en comparación con los tratamientos individuales, lo que sugiere efectos aditivos (8).

Otras vías de señalización afectadas por la expresión de ACSL4, que se encuentran desreguladas en el cáncer de mama, modulando también la respuesta

celular tumoral, son las vías del RE α , RP y de HER2, la vía de Wnt/ β -catenina (Wnt por sus siglas en inglés: *Wingless-Type MMTV Integration Site Family*) y la vía de la MAPK (8,132).

8.1.2. Tratamientos y mecanismos de resistencia

La resistencia a las terapias clínicas es uno de los desafíos más significativos en la actualidad en el tratamiento del cáncer. Como se mencionó anteriormente, en las células tumorales se desarrolla resistencia mediante múltiples mecanismos, como la activación de vías de señalización claves en la regulación celular como lo es la vía mTOR, promoviendo la supervivencia celular, o a través de alteraciones genéticas que afectan la respuesta al tratamiento, y que pueden conducir a tipos tumorales más agresivos, como el crecimiento independiente de hormonas y, por lo tanto, resistentes a los tratamientos hormonales.

Mientras que la resistencia a la quimioterapia puede ser multifactorial, se sabe que el aumento en la expresión y la actividad de transportadores de múltiples fármacos desempeña un papel clave (136). Los transportadores de la familia ABC (por sus siglas en inglés: *ATP binding cassette*) desempeñan un papel crucial en la resistencia a tratamientos al facilitar la expulsión de agentes terapéuticos de las células cancerosas (137).

Los transportadores ABC constituyen una super familia de proteínas esenciales para la translocación de una amplia gama de compuestos a través de las membranas celulares, impulsada por la hidrólisis de ATP. Son esenciales para la homeostasis y fisiología celular. En humanos existen 48 genes ABC organizados en siete familias distintas. De estos genes, 44 (integrando cinco familias distintas) codifican transportadores de membrana, de los cuales varios están involucrados en la resistencia a los fármacos y en distintas vías resultantes en enfermedades por disfunciones del transportador (138).

La expresión aumentada de ABCG2 (por sus siglas en inglés: *ATP-binding cassette super-family G member 2*) es asociada con la resistencia a fármacos en líneas celulares de cáncer de vejiga, riñón, glioma y glioblastoma (139–142) y es parcialmente

responsable del eflujo de fármacos de las células tumorales (143,144). ABCG2 es también un marcador de células madre cancerosas de diferentes tipos de tumores.

Recientemente se ha descubierto ACSL4 forma parte de los mecanismos de resistencia a la quimioterapia en cánceres de mama y próstata, potenciando la actividad y la expresión de ABCG2, lo que se correlaciona con un aumento en la resistencia celular a la quimioterapia y la agresividad celular (9). En el carcinoma suprarrenocortical ABCG2 se encuentra modulado junto a la enzima ACSL4 por los tratamientos quimioterapéuticos. ACSL4 y ABCG2 se encuentran sobreexpresados en células resistentes a tratamientos, favoreciendo la viabilidad, la proliferación y la salida de compuestos de las células tumorales (136).

Previamente, los transportadores ABCG2, ABCC4 y ABCC8 fueron identificados mediante el RNA-seq previamente descrito, realizado en nuestro laboratorio, como genes de resistencia a fármacos que responden a ACSL4. Se observó el aumento en su expresión mediante ensayos de sobreexpresión de ACSL4 en células tumorales MCF-7, así como fue posible inhibirlos mediante el silenciamiento de ACSL4 en células de la línea MDA-MB-231 (9).

Otro mecanismo de resistencia a los tratamientos ocurre en relación con la vía del RE. Como mencionamos existe una regulación recíproca entre ACSL4 y el RE α (8). Dado que la expresión de ACSL4 se encuentra regulada negativamente por el RE α y que esta, a su vez, regula los niveles del RE α , la presencia de ACSL4 podría ser un factor pronóstico de resistencia hormonal en tejidos de cáncer de mama RE $^+$. En este contexto, una terapia combinada de inhibidores de ACSL4 y del RE α podría resultar muy útil para revertir la resistencia hormonal. El silenciamiento de ACSL4 da como resultado la regulación positiva de RE α , con cambios en el fenotipo celular y en la sensibilidad al tratamiento con tamoxifeno. Además, el tratamiento con rosiglitazona, un inhibidor de ACSL4, aumentó la expresión de RE α (8). La combinación de rosiglitazona y 4-hidroxitamoxifeno (4-OHTAM) sobre la proliferación de células MDA-MB-231 fue mucho más eficiente, mostrando un efecto sinérgico, que los tratamientos en forma individual. En estudios *in vivo*, se observó una inhibición significativa en el volumen promedio del tumor y en la tasa de crecimiento en ratones de xenoinjerto sometidos a la terapia combinada de rosiglitazona y 4-OHTAM en comparación con aquellos que recibieron un sólo fármaco o el vehículo después de la inyección de células MDA-MB-231(8).

8.2. Cáncer de próstata y ACSL4

En análisis inmunohistoquímicos de muestras de tejido humano de cáncer de próstata se observó expresión aumentada de ACSL4 en células malignas, en comparación con células epiteliales benignas adyacentes. La expresión de la enzima ACSL4 se encontró particularmente aumentada en muestras de CRPC, en comparación con cáncer de próstata no tratado hormonalmente (6).

La expresión ectópica de ACSL4 en células de cáncer de próstata negativas para ACSL4 aumenta la proliferación, migración e invasión, regulando positivamente vías en que se encuentran implicadas pAKT, LSD1 (lisina demetilasa 1) y β -catenina. Por otro lado, el silenciamiento de ACSL4 en células que expresan niveles elevados de ACSL4 reduce la proliferación celular, migración e invasión. Los efectos proliferativos celulares fueron observados tanto *in vitro* como *in vivo* (6).

También, en líneas celulares que coexpresan tanto ACSL4 como RA, la proliferación fue independiente de los andrógenos exógenos, sugiriendo que la expresión de ACSL4 puede conducir a CRPC (6). La expresión ectópica de ACSL4 indujo resistencia al tratamiento con casodex (bicalutamida), mediante una disminución de la apoptosis.

Un estudio demostró que RA actuó como un supresor de la transcripción al unirse a la región promotora de ACSL4 e inhibir su transcripción. La inhibición de la señalización del receptor de RA redujo significativamente los niveles de PSA, pero elevó los niveles de ACSL4. La inhibición de ACSL4 mediante la reducción de su expresión inhibió la proliferación, migración, invasión y crecimiento de xenoinjertos de células de cáncer de próstata independientes de RA (145).

8.3. Cáncer de ovario y ACSL4

Pocos estudios han analizado el rol de ACSL4 en cáncer de ovario. En un trabajo se analizó la correlación entre la expresión de ACSL4 y los parámetros clinicopatológicos en 38 pacientes con cáncer de ovario. Los resultados revelaron que la expresión de ACSL4 se asociaba positivamente con el estadio tumoral y la metástasis. Además, los pacientes con una expresión elevada de ACSL4 presentaban tiempos de supervivencia global significativamente más cortos en comparación con aquellos con una expresión

baja de ACSL4. El análisis de muestras de cáncer de ovario y de tejidos ováricos no tumorales reveló que la expresión proteica ACSL4 en el cáncer de ovario era significativamente mayor que en los tejidos normales. Más aún, ACSL4 se asocia a una menor supervivencia global en los pacientes con cáncer de ovario. Se demostró que miR-424-5p regula negativamente la ferroptosis suprimiendo la expresión de ACSL4 en células de cáncer de ovario (146).

Recientemente, se encontró que compuestos que aumentan la ferroptosis mediada por ACSL4 pueden inhibir efectivamente el desarrollo del cáncer de ovario, como es el caso del polisacárido antitumoral obtenido de *Portulaca oleracea* (147).

En un estudio reciente identificaron a ACSL4 entre las proteínas que se encuentran en exosomas como biomarcadores de cáncer de ovario, demostrando que estas exoproteínas podrían discriminar con precisión entre el cáncer de ovario y 12 tipos de cáncer comúnmente diagnosticados en mujeres. Estos nuevos biomarcadores podrían detectar el cáncer de ovario con alta especificidad y sensibilidad de forma precoz cuando los resultados de las pacientes son más favorables (148).

8.4. Inhibidores de la enzima ACSL4

Numerosos trabajos han postulado a la enzima ACSL4 como una diana terapéutica en el ámbito de la investigación biomédica. Como se ha mencionado, esta enzima desempeña un papel crucial en el metabolismo del AA y participa en una amplia gama de procesos celulares, incluyendo la proliferación, la ferroptosis y la respuesta inflamatoria. Su sobreexpresión o actividad anómala se encuentra asociada con variadas enfermedades, que van desde cáncer hasta trastornos neurodegenerativos. En este contexto, los inhibidores de ACSL4 han ganado atención como posibles agentes terapéuticos.

El primer inhibidor utilizado en la bibliografía como inhibidor de la enzima ACSL4 es la triacsina C, un compuesto natural que pertenece a la familia de los ácidos tricíclicos insaturados. Fue aislada inicialmente del microorganismo *Streptomyces sp.* en estudios de investigación sobre productos naturales marinos y cobró relevancia en las investigaciones por su capacidad para inhibir a ACSL4 (149). La triacsina C ha demostrado actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica en células tumorales,

induciendo la apoptosis y bloqueando la proliferación de células cancerosas en varios tipos de cáncer, lo que podría posicionarla como agente terapéutico en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, es importante destacar que la triacsina C también puede tener efectos secundarios y toxicidad, especialmente a concentraciones elevadas o con un uso prolongado (150).

Otro compuesto que se ha estudiado ampliamente como inhibidor de ACSL4 es la rosiglitazona. Este es un fármaco oral utilizado principalmente para tratar la diabetes tipo 2. Pertenece a la clase de medicamentos conocidos como tiazolidinedionas (TZDs) o glitazonas. Estos medicamentos actúan como agonistas selectivos del receptor activado por PPAR- γ , que se encuentran en tejidos adiposos, musculares y hepáticos (151). Al activar el receptor PPAR- γ , la rosiglitazona puede modular la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de los lípidos, la glucosa y la inflamación. La rosiglitazona no se recomienda como monoterapia en el tratamiento de la diabetes tipo 2, sino que se usa en combinación con otros medicamentos antidiabéticos cuando la monoterapia no es suficiente para controlar los niveles de glucosa en sangre. A pesar de su eficacia en el control de la glucosa en sangre, la rosiglitazona ha sido objeto de controversia debido a preocupaciones sobre su seguridad cardiovascular (150).

Otra molécula que se ha descrito como inhibidor de la enzima ACSL4 es el valnoctamida, derivado del ácido valproico (VPA) (152), un fármaco utilizado en medicina principalmente como antiepiléptico, pero también empleada en el tratamiento de trastornos psiquiátricos, como el trastorno bipolar, y en la prevención de la migraña (153,154). Aunque no se conoce exactamente su mecanismo de acción, se cree que el VPA ejerce su efecto antiepiléptico al aumentar los niveles de ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el cerebro, un neurotransmisor inhibitorio. Además, puede afectar la actividad de los canales de sodio y calcio, lo que puede contribuir a su eficacia anticonvulsivante. Aunque es generalmente bien tolerado, el VPA puede causar efectos adversos, incluyendo aumento de peso, temblores, somnolencia, náuseas y vómitos, entre otros. En casos raros, puede provocar efectos adversos más graves, como hepatotoxicidad o pancreatitis (155,156).

A pesar de los resultados preclínicos de los compuestos mencionados, los inhibidores de ACSL4 todavía deben ser optimizados en cuanto a su selectividad, biodisponibilidad y, principalmente, seguridad. A medida que continúa la investigación en este campo, se espera que se aclare aún más el papel de ACSL4 en la fisiopatología

de diferentes trastornos y se identifiquen nuevas oportunidades para el desarrollo de inhibidores más efectivos y seguros.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La inhibición de la enzima acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) disminuye la agresividad tumoral al afectar parámetros como proliferación y migración celular, y mecanismos de resistencia a tratamientos quimioterapéuticos y hormonales. Además, la inhibición de la enzima afecta la esteroidogénesis *de novo* impactando en la progresión de tumores dependientes de estos mecanismos.

El desarrollo de nuevos compuestos inhibidores de la actividad de la enzima ACSL4 tendrá aplicación terapéutica al afectar el comportamiento agresivo de células tumorales y disminuir la progresión tumoral. Estos compuestos permitirán una reducción en la esteroidogénesis *de novo* y en los parámetros de la biología tumoral asociados a la malignidad. Asimismo, la inhibición de la enzima ACSL4 facilitará la sensibilización de las células tumorales a otras drogas utilizadas en los tratamientos antitumorales, lo que podría aumentar la efectividad de estos tratamientos y disminuir los efectos colaterales asociados al uso de altas dosis de estos medicamentos.

OBJETIVOS

La enzima acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) es una enzima clave en el metabolismo lipídico que ejerce su función a través de la regulación de los niveles del ácido araquidónico intracelulares. Dado que la desregulación de los niveles de ácido araquidónico está vinculada con enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, trastornos neurodegenerativos y cáncer, esta enzima se ha convertido en un blanco terapéutico clave. Numerosos trabajos demostraron el rol de ACSL4 en la agresividad tumoral en cáncer de mama y próstata. Por esta razón se ha incrementado el interés en la búsqueda de inhibidores de la enzima con potencial uso terapéutico.

Estudios previos han sugerido que la inhibición de ACSL4 podría ser una estrategia terapéutica viable en el cáncer de mama, en conjunto con la inhibición del RE α . La inhibición conjunta de ACSL4 y RE α ha demostrado revertir la resistencia a la terapia hormonal en células derivadas de tumores triple negativos de cáncer de mama. Más aún, la expresión de la enzima regula la expresión de transportadores ABC

involucrados en la resistencia a quimioterapéuticos. Por lo tanto, la inhibición de la enzima puede revertir la resistencia a estos tratamientos.

El objetivo general de esta tesis es desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan revertir la resistencia a tratamientos convencionales y reducir los efectos colaterales asociados a los tratamientos actuales para el cáncer, mediante la inhibición de la enzima ACSL4. Se postula que las terapias futuras deberán incluir combinaciones de fármacos que abarquen un mayor espectro de la biología tumoral. Dentro de este marco, el objetivo global de la tesis busca diseñar estrategias para desarrollar compuestos que inhiban con especificidad y eficacia la actividad de ACSL4.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de la tesis doctoral consisten en:

- Objetivo 1.** Identificar nuevas moléculas inhibidoras de la actividad enzimática de ACSL4.
- Objetivo 2.** Analizar la acción del inhibidor de ACSL4 sobre la agresividad de las células tumorales, los mecanismos de resistencia y las vías de señalización reguladas por la enzima.
- Objetivo 3.** Investigar el efecto del nuevo inhibidor sobre la esteroidogénesis en modelos celulares e *in vivo*.
- Objetivo 4.** Evaluar el efecto del uso combinado del inhibidor de ACSL4 con fármacos de uso clínico en células tumorales.
- Objetivo 5.** Analizar en modelos *in vivo* el efecto del nuevo inhibidor de ACSL4 sobre el crecimiento tumoral.
- Objetivo 6.** Estudiar el papel de ACSL4 y el efecto de su inhibidor en el cáncer de ovario epitelial.

MATERIALES Y REACTIVOS

MATERIALES Y REACTIVOS

Los reactivos listados a continuación fueron provistos por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): puromicina, bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), seroalbúmina bovina (BSA), BSA libre de ácidos grasos, estándares de peso molecular para electroforesis, ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA), hidroximetil amino metano (Tris), dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, Temed™, 8-Br-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (8Br-AMPC), ácido araquidónico (AA), 22(R)-OH-colesterol.

De Bio-Rad Laboratories (Hércules, California, USA) fueron adquiridas las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), reactivos (acrilamida, bisacrilamida, Bradford, otros), y equipos de electroforesis (Mini-Protean II, equipos de transferencia y de secado de geles).

El reactivo de detección por quimioluminiscencia (ECL) utilizado para western blot fue adquirido en Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK). Para la MIDIPREP se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega).

La agarosa D1-LE fue adquirida en Biodynamics (Ciudad de Bs. As., Argentina). El equipo de electroforesis para geles de agarosa Gel XL ultra V-2 provino de Labnet International (Edison, NJ, USA).

El material plástico para los cultivos celulares fue obtenido de Biofilm. La solución de penicilina-estreptomicina (P/S), solución tripsina-EDTA, el suero de caballo (HS), la Lipofectamina™ 2000 y los medios de cultivo Opti-MEM, TRIzol®, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), DMEM/F-12, RPMI 1640, HAM-F10, Waymouth MB752/1, fueron provistos por Gibco® Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA). El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Internegocios S.A. (Mercedes, Bs As., Argentina).

El ácido araquidónico [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H (N)], actividad específica 62,0 Ci mmol⁻¹ ([³H]-AA) fue adquirido de Perkin Elmer (Boston, MA, EE.UU.). La hormona Gonadotropina Coriónica humana (hCG) fue donada gentilmente por el Dr. Parlow, National Hormone and Pituitary Program, NIDDK, NIH (Bethesda, MD, USA).

Los reactivos utilizados en todo el trabajo presentan la mayor calidad y pureza disponibles.

1. Cultivos celulares

Para el desarrollo del presente trabajo fueron utilizadas líneas celulares humanas, tumorales y no tumorales, y líneas celulares murinas tumorales. Dentro de las líneas humanas tumorales se trabajó con células provenientes de cáncer de mama, próstata y ovario.

Todas las células fueron mantenidas en estufa a 37°C, en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂. Los medios empleados para mantener los cultivos celulares fueron suplementados con suero inactivado por calor y antibióticos, según los requerimientos de cada línea celular. Las particularidades de cada línea celular, y la descripción para la preparación de sus medios de cultivo, se describen a continuación.

1.1. Líneas celulares humanas no tumorales

1.1.1. Línea celular HEK-293

Es una línea celular inmortalizada derivada de células renales embrionarias humanas que se utiliza por su alta eficiencia de transfección, rápida tasa de crecimiento y capacidad para producir proteínas recombinantes.

Para el mantenimiento de esta línea celular se utilizó el medio DMEM suplementado con 10% de SFB y con 1% de P/S (DMEM completo).

1.1.2. Línea celular HOSE

Es una línea celular de epitelio primario de superficie de ovario humano, inmortalizada con un vector retroviral (LXSN-16E6E7) que expresa los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano.

Para el mantenimiento esta línea celular se utilizó el medio DMEM/F12 sin rojo fenol, suplementado con 10% de SFB y con 1% de P/S (F12 completo).

1.2. Línea celular tumoral murina

1.2.1. Línea celular MA-10

La línea deriva de un tumor de células de Leydig de ratón, con morfología epitelial. Las células tienen la capacidad de sintetizar progesterona como principal esteroide en respuesta a la gonadotropina coriónica humana (hCG), dado que poseen dichos receptores funcionales.

Para el mantenimiento de esta línea celular se utilizó medio Waymouth MB 752/1 suplementado con 15% de suero de caballo (HS), 1,1 g/l de NaHCO₃, Hepes 20 mM y 50 mg/ml de gentamicina (Waymouth completo).

La línea celular fue provista generosamente por el Dr. Mario Ascoli (Universidad de Iowa, Ciudad de Iowa, Estados Unidos).

1.3. Línea celular humana de cáncer de mama

1.3.1. Línea celular MDA-MB-231

Es una línea epitelial de glándula mamaria proveniente de efusión pleural, derivada de adenocarcinoma mamario metastásico, perteneciente a una mujer blanca de 51 años. Se caracterizan por sus células adherentes de morfología epitelial. Esta es una línea celular altamente agresiva, invasiva y poco diferenciada, que se caracteriza por su carencia de REα y RP, y de la amplificación de HER2. Se utiliza como modelo para el estudio del cáncer de mama triple negativo.

Para el mantenimiento se utilizó medio de cultivo DMEM completo. La línea celular fue generosamente provista por el Dr. Vasilios Papadoupoulos (Universidad del Sur de California, Los Ángeles, Estados Unidos), obtenida del Lombardi Comprehensive Cancer Center (Georgetown University Medical Center, Washington D.C., Estados Unidos).

1.4. Línea celular humana de cáncer de próstata

1.4.1. Línea celular PC-3

Esta línea celular de próstata proviene de metástasis de hueso, perteneciente a un hombre caucásico de 62 años. Son células de adenocarcinoma de grado IV y de morfología epitelial. Es una línea de alta agresividad y que no responde a andrógenos.

Para el mantenimiento de esta línea celular se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con un 10% de SFB y 1% P/S (RPMI completo).

Esta línea celular fue provista generosamente por la Dra. Susana Nowicki (Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” (CEDIE), Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina).

1.5. Líneas celulares tumorales humanas de ovario

1.5.1. Línea celular A2780

Es una línea celular que deriva de tejido tumoral de adenocarcinoma de ovario de una paciente no tratada de 60 años. Se caracterizan por ser células sensibles a una gran variedad de agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento del cáncer, tales como el cisplatino, la doxorubicina y la adriamicina.

1.5.2. Línea celular OV-90

Es una línea celular de tipo epitelial aislada del ovario de una paciente con adenocarcinoma seroso papilar maligno. Deriva de la ascitis maligna de una paciente no expuesta a quimioterapia o radioterapia. La línea conserva las características de los cánceres epiteliales de ovario originales a partir de los que fue derivada.

1.5.3. Línea celular SKOV-3

Es una línea celular de cáncer de ovario humano con morfología de tipo epitelial, establecida a partir de la ascitis de una mujer caucásica de 64 años con adenocarcinoma

de ovario. Las células son resistentes al factor de necrosis tumoral y a variados fármacos citotóxicos, tales como la toxina diftérica, el cisplatino y la adriamicina.

Para el mantenimiento de estas líneas celulares se utilizó el medio RPMI completo.

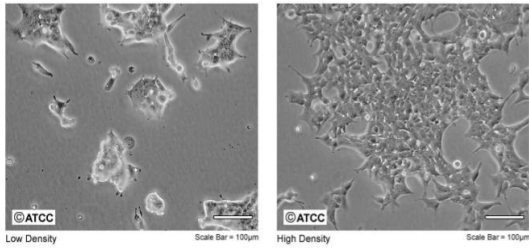
Las cuatro líneas celulares de ovario fueron generosamente provistas por el laboratorio de la Dra. Carmen Romero (Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile) y provienen de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC).

1.6. Morfología celular

A continuación, puede observarse la morfología de la líneas celulares anteriormente mencionadas y empleadas en este trabajo de tesis, en alta y baja confluencia (Figura 5).

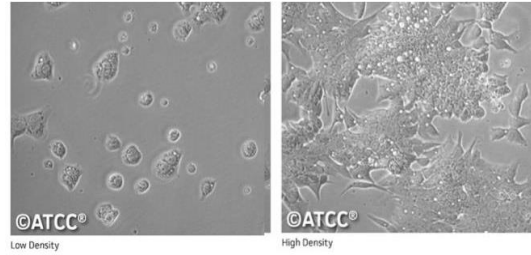
Línea no tumoral humana

HEK-293



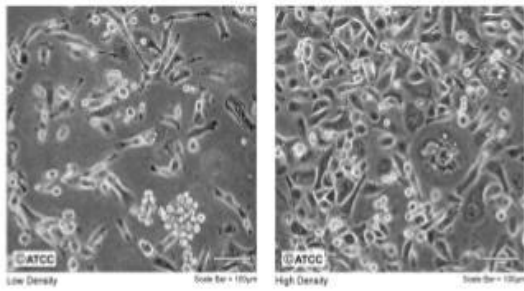
Línea tumoral murina

MA-10

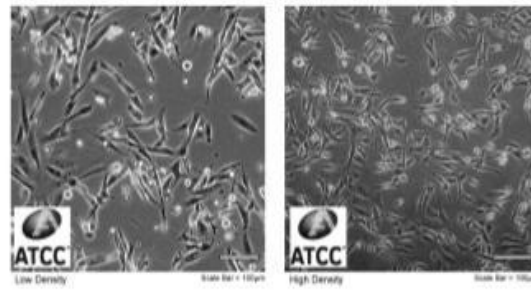


Líneas celulares humanas de próstata y mama

PC-3

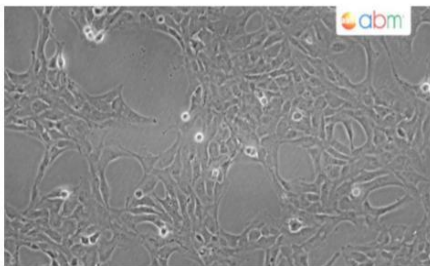


MDA-MB-231

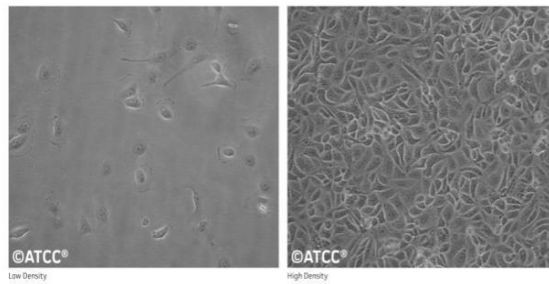


Líneas celulares humanas de ovario

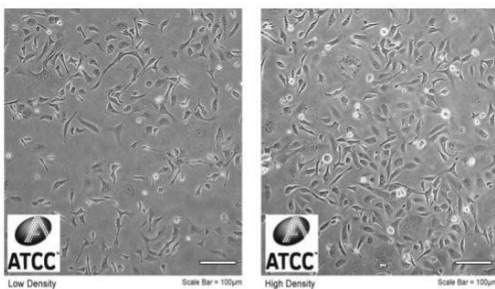
HOSE



OV-90



SKOV-3



A2780

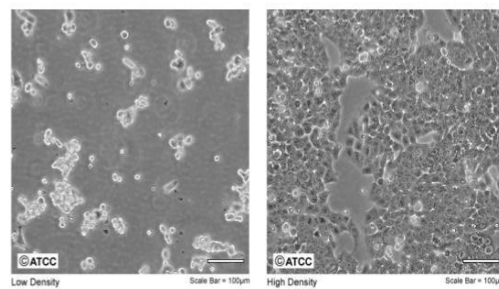


Figura 5. Líneas celulares empleadas como modelo. Líneas celulares correspondientes a células no tumorales humanas (HEK-293), línea tumoral murina (MA-10), línea humana tumoral de cáncer de próstata (PC-3) y de cáncer de mama (MDA-MB-231). Líneas celulares correspondientes a células humanas de ovario no tumorales (HOSE) y de COE (A2780, OV-90 y SKOV-3). Para cada línea celular se presenta su correspondiente morfología en baja y alta confluencia (primer y segundo panel, respectivamente, en cada línea celular). Imágenes obtenidas de la ATCC (por sus siglas en inglés: American Type Culture Collection) y de ABM (Applied Biological Materials Inc.), según indicación para cada línea.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1. Modelado de ACSL4 humana y cribado *in silico*

El modelado de la enzima ACSL4 y los estudios de *docking* se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Daniel Gómez (Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina).

El modelado por homología de la enzima ACSL4 se realizó con el *software* MODELLER (<https://bio.tools/modeller>), que permite realizar un modelado comparativo al realizar la estructura 3D de una proteína con estructura desconocida, partiendo de otra conocida. La estructura a partir de la cual se realizó el modelado fue la de única ACSL determinada al momento, de la especie bacteriana *Thermus thermophilus HB8* (17) que comparte alta homología de secuencia con las enzimas ACSL4 en humanos.

Una vez obtenida la estructura de ACSL4 en mamíferos, se buscaron potenciales inhibidores farmacológicos mediante un cribado *in silico*, evaluando la biblioteca de compuestos químicos de Enamine Advanced Collection para identificar aquellos que pudieran interactuar y bloquear la actividad enzimática.

Para realizar el *docking* entre la enzima y las posibles moléculas inhibidoras, se utilizó el dominio hidrofóbico perteneciente al túnel del ácido graso que contiene además un residuo aromático clave en la unión del sustrato. Se utilizó como diana este residuo que corresponde a la lisina 572 (K572) de la isoforma 2 de ACSL4 humana (secuencia de referencia NCBI: NP_001305438.1) y a lisina 531 (K531) en la secuencia de la isoforma 1 de ACSL4 (secuencia de referencia NCBI: NP_004449.1). Se utilizó el programa AutoDockVina (<https://vina.scripps.edu>) para realizar el cribado virtual (157).

2. Síntesis y caracterización del compuesto PRGL493

La síntesis y caracterización del compuesto se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Juan Bautista Rodríguez (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a Química Orgánica (UMYMFOR), Argentina).

La síntesis del compuesto 4-(3-(5-metilfuran-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a][1,3,5]triazin-2-acetamida (PRGL493) se llevó a cabo mediante la acetilación del compuesto 4-(3-(5-metilfuran-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a][1,3,5]triazin-2-amina (P-PRGL493). Se realizó bajo una atmósfera de argón seca, y el material de vidrio utilizado se secó previamente a la llama, dado que la reacción es sensible a la humedad. Los productos químicos utilizados son de uso comercial y se usaron sin purificación adicional. La piridina se destiló a partir de gránulos de hidróxido de potasio.

La solución de P-PRGL493 (40 mg, 97,7 μmol) en piridina (1 ml) a 0°C fue tratada con anhídrido acético (1 ml) y la mezcla fue agitada a 0°C durante 1 hora. Luego, el solvente fue evaporado y el producto fue purificado por cromatografía en columna con placas de gel de sílice de E. Merck (Kieselgel 60, de 230 a 400 mallas). Luego fue eluido con cloruro de metileno, obteniéndose 36 mg (79,7 μmol , 86% de rendimiento) de PRGL493.

El compuesto PRGL493 es sólido amarillo pálido, cuya fórmula molecular es $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_2$ y su masa molecular es 451,18.

Se procedió a la caracterización del compuesto PRGL493 sintetizado. Se determinó su punto de fusión utilizando un aparato Fisher-Johns y resultó ser mayor de 210°C. Se sometió a una cromatografía de capa fina (TLC) analítica empleando placas de gel de sílice comerciales revestidas de 0,2 mm (E. Merck, Láminas de aluminio DC recubiertas con Kieselgel 60 F254) y una fase móvil de cloruro de metileno-metanol en una proporción 9:1, obteniéndose un factor de retención (R_f) de 0,65. Se realizó su caracterización empleando resonancia magnética nuclear (RMN) con el dispositivo Bruker Avance NEO 500. Los cambios químicos se informan en partes por millón (ppm) en relación con el tetrametilsilano. Los espectros de ^{13}C RMN se desacoplaron completamente. En el espectro ^1H RMN, se observó un pico a 2,52 ppm como un singlete, lo que confirmó definitivamente la incorporación del grupo acetilo en su precursor sintético. En el espectro correspondiente de ^{13}C RMN, el pico que apareció a 21,3 ppm indicó la presencia del grupo metilo ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$) unido al grupo acetilo, mientras que el pico observado a 173,7 ppm mostró la incorporación de este grupo funcional, es decir, la parte carbonílica del grupo acetilo ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$). El compuesto fue caracterizado finalmente por espectrometría de masas por ionización por electroespray de alta resolución (HRMS-ESI) utilizando un espectrómetro Bruker micrOTOF-Q II, un

espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo híbrido con capacidad MS-MS. Los datos de la espectrometría de masa (restando la masa del protón adicional de la técnica) indicaron claramente que la fórmula molecular del compuesto obtenido fue $C_{25}H_{21}N_7O_2$, con una masa calculada de 451,1835 y una masa encontrada de 451,1822 (la proximidad entre ambos datos confirma la identidad del compuesto).

3. Preparación del plásmido

3.1. Ceba bacteriana

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en las transformaciones de plásmidos fue XL1- Blue de Stratagene Labs Systems (La Jolla, CA, USA) cuyo genotipo es: endA1, gurA96, hsdR17, recA1, relA1, supE44, thi-1, F' lacqZ Δ M15, proAB, Tn10.

3.2. Preparación de bacterias *Escherichia coli* competentes

Para la preparación de bacterias competentes, se inoculó una colonia aislada de la cepa *Escherichia coli* XL1-Blue en 5 ml de medio LB (Luria-Bertani) (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl para 1 litro de volumen) y se incubó a 37°C con agitación continua durante toda la noche. A continuación, se sembró una alícuota de 0,1 ml del cultivo de bacterias en 10 ml de medio LB fresco y se incubó nuevamente a 37°C con agitación hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial ($DO_{600nm} = 0,4 - 0,6$). Luego, el cultivo fue centrifugado a 5.000 rpm (Sorvall SS34) durante 10 minutos y el sedimento fue resuspendido en 5 ml de $CaCl_2$ 50 mM frío y estéril. La suspensión fue mantenida en hielo durante 20 minutos, repitiendo posteriormente el paso de centrifugación. En este caso, el sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de solución fría de $CaCl_2$ 50 mM y se incubó durante toda la noche a 4°C con el agregado de glicerol estéril (25%). A continuación, las células fueron fraccionadas en alícuotas de 200 μ l y se conservaron a -70°C.

3.3. Transformación de *Escherichia coli* XL1-Blue competentes

Todos los materiales para el procedimiento de transformación, incluyendo las soluciones y los tubos de polipropileno, se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso. Las bacterias competentes se descongelaron durante 30 minutos en un baño de

hielo/H₂O. En un tubo Eppendorf frío se colocaron 10 µl de la solución de ADN plasmídico (0,1 µg) y se adicionaron 200 µl de la suspensión de bacterias competentes mezclando con pipeta para homogeneizar la mezcla. Se dejó estabilizar durante 30 minutos a 4°C y luego se realizó un choque térmico a 42°C por 45 segundos, seguido inmediatamente por una incubación en hielo durante otros 2-3 minutos. Posteriormente se adicionaron 800 µl de medio LB y se incubaron a 37°C durante 60 minutos, para lograr la recuperación de las células. Finalmente se centrifugó a temperatura ambiente a 10.000 rpm durante 3 minutos y las bacterias del residuo se plaquearon en placas conteniendo LB agar-ampicilina (50 µg/mL). Las placas se incubaron en estufa durante toda la noche a 37°C.

3.4. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

Para la purificación del ADN plasmídico a mediana escala (MIDIPREP) se utilizó el sistema Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) procediendo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Colonias bacterianas aisladas transformadas seleccionadas se inocularon en 100 ml de LB ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación continua. El cultivo obtenido se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en 3 ml de una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y ARNasa A 100 mg/ml. A continuación, se agregaron 3 ml de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y 3 ml de solución de neutralización (acetato de potasio 1,32 M, pH 4,8). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La suspensión resultante se centrifugó a 14.000 xg durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se trasvasó a un tubo conteniendo la resina DNA Wizard®. La mezcla ADN/resina se trasvasó a una columna conectada a una bomba de vacío. Luego de aplicar vacío, el ADN plasmídico quedó retenido en la columna. La matriz se lavó dos veces con 15 ml de una solución de lavado conteniendo AcK 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 10 mM y etanol 55%. Luego de secar la resina durante 30 segundos, se cortó la columna y la parte inferior de la misma se transfirió a un tubo Eppendorf. El sistema se centrifugó a 10.000 x g durante 2 minutos. Finalmente, el ADN de la resina se incubó con 300 µl de H₂O libre de nucleasas a 60°C durante 1 minuto y posteriormente se eluyó por centrifugación a 10.000 x g durante 20 segundos.

3.5. Digestión con endonucleasas de restricción

Para verificar la identidad de los plásmidos obtenidos se realizó un mapa de restricción. Para la digestión con endonucleasas de restricción, 1 µg de ADN se digirió con 5 UI de enzimas de restricción en una mezcla de digestión conteniendo 2 µl del buffer de reacción 10X adecuado para la reacción, 2 µl de BSA acetilada (2 mg/ml) y H₂O hasta un volumen final de 20 µl. Se incubó durante 2 h a 37°C con agitación suave. Los productos de la digestión se resolvieron en gel de agarosa.

3.6. Electroforesis en geles de agarosa

Para la resolución de muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa de 1,5% p/v conteniendo 0,5 mg/ml de bromuro de etidio y preparados en solución TAE (solución amortiguadora Tris acetato EDTA) (4,84 g Tris-HCl; 1,14 ml ácido acético glacial; 0,74 g Na₂EDTA.2H₂O pH 8,3, en volumen de 1 litro). La separación se realizó en un aparato de electroforesis horizontal conteniendo solución TAE a voltaje constante (80 voltios). La visualización de los fragmentos se realizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de 305 nm. Se obtuvieron fotografías con una cámara digital Nikon y las imágenes de los geles se cuantificaron con el *software* Gel-Pro analyzer (IPS, North Reading, MA, USA).

4. Producción de ACSL4 recombinante

Para la obtención de la proteína recombinante se utilizó la línea celular HEK-293. Las células fueron cultivadas en una botella T75 a una confluencia del 70%. Para la transfección de las células se utilizó el plásmido de expresión en mamíferos pCMV6-Entry (Figura 6, A), conteniendo en el sitio de clonado múltiple la secuencia correspondiente a ACSL4 (plásmido FACL4 Human Tagged ORF Clone) (Figura 6, B) de Origene® (Rockville, MD, USA). Dicho vector contiene la secuencia de la proteína ACSL4 unida a una etiqueta FLAG (DDK-Myc), utilizada para la inmunoprecipitación de la proteína recombinante ACSL4-FLAG. El gen de ACSL4 se encuentra regulado por el promotor constitutivo de citomegalovirus humano (promotor CMV) y se encuentra clonado en el vector entre los sitios de restricción Sgfl y Mlul. La transfección se realizó utilizando Lipofectamina 2000™ (Invitrogen) según indicaciones del fabricante.

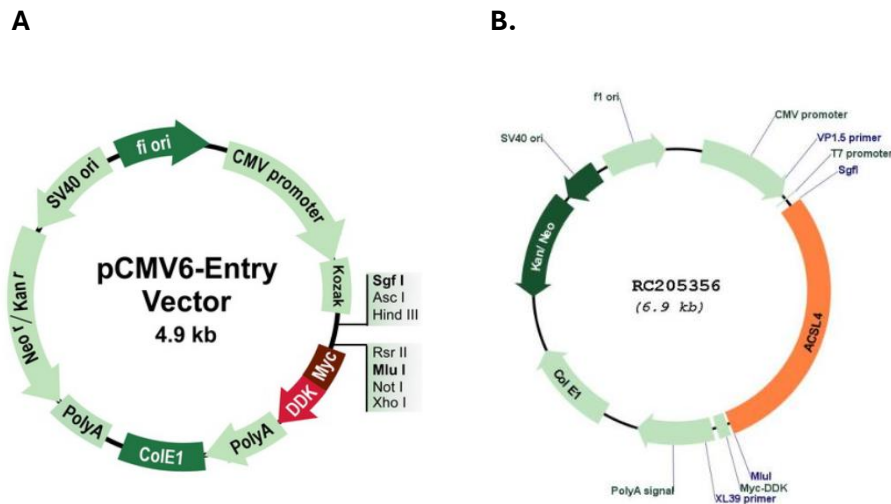


Figura 6. Mapa de los vectores plasmídicos pCMV6-Entry y RC205356 (ACSL4-FLAG). (A). Mapa del plásmido comercial pCMV6-Entry. (B). Mapa del plásmido comercial RC205356 (ACSL4 Human Tagged ORF Clone) conteniendo a la proteína ACSL4 clonada en el sitio múltiple de clonado junto a una secuencia DDK-Myc (FLAG), bajo el promotor fuerte CMV.

Luego de 48 horas posteriores a la transfección, se descartó el medio de incubación y se lavó 3 veces con solución buffer fosfato salino (PBS) que contiene NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM (pH 7,4). Las células fueron cosechadas con PBS conteniendo inhibidores de proteasas y ditioneitol (DTT) (1mM), en un volumen de 500 μ l (buffer de lisis). La ruptura celular fue realizada mediante ultrasonido con un sonicador Branson 250 (VWR International, Radnor, PA, EE. UU.), realizando tres ciclos de pulsos de duración de diez segundos cada uno, con una amplitud del 10%.

La obtención de la proteína recombinante ACSL4-FLAG se realizó mediante inmunoprecipitación con anticuerpo anti-FLAG (anti-DDK, OTI4C5, Origene Technology, Inc.), incubando por 2 horas a 4°C con agitación lenta. Cumplido el tiempo, se agregaron esferas de agarosa con proteína A/G (Invitrogen) y se continuó agitando por otras 2 horas. Posterior a la incubación, las esferas fueron colectadas por centrifugación (1000 xg a 4°C, durante 5 minutos). Se descartó el sobrenadante, y se conservó y lavó el pellet con PBS, repitiendo el procedimiento tres veces desde el paso de centrifugado.

La presencia de la proteína recombinante fue evidenciada mediante un ensayo de western blot, utilizando anti-FLAG 1/2500 (Origene). Para realizar la separación de las esferas de agarosa de la proteína recombinante se hirvieron las muestras en 20 µl de buffer de siembra. Las muestras fueron corridas en un gel SDS-PAGE 10%.

5. Ensayo de actividad enzimática con proteína recombinante

Una vez obtenida la proteína recombinante se realizó el ensayo de actividad, utilizando el protocolo de Kim y col. (158) con modificaciones menores.

Brevemente, se realizó la cuantificación de la formación del producto a partir del sustrato marcado radiactivamente con tritio, siguiendo de esta forma la actividad enzimática de la proteína recombinante ACSL4-FLAG. Es decir, se cuantificó la formación de [³H]-AA-CoA a partir de [³H]-AA. La reacción de formación de producto comienza al realizar el agregado de la enzima recombinante, y finaliza con el agregado de acetato de etilo. Para el ensayo se preparó un buffer adecuado para el desarrollo de la actividad enzimática (Tris 175 mM (pH 7,4), MgCl₂ 8 mM, DTT 5 mM, ATP 10 mM, y CoA 250 µM, AA 50 µM y [³H]-AA (0.25 µCi)). La enzima ACSL4-FLAG recombinante, obtenida previamente, fue utilizada para los distintos tratamientos a estudiar. Se incubó fracciones de la enzima en presencia de distintas concentraciones del inhibidor PRGL493 (en un rango de 0 a 100 µM) o de rosiglitazona (en una concentración de 100 µM), durante 10 minutos a 37°C en la solución buffer de actividad.

Luego, se procedió a la extracción del [³H]-AA-CoA formado mediante el agregado de acetato de etilo (seis volúmenes por cada volumen de solución de actividad). Se centrifugó a una velocidad de 800 xg durante 5 minutos para separar las fases, quedando la fase orgánica en la parte superior del tubo y la fase acuosa en la inferior. Se colocaron los tubos cinco minutos en el freezer a temperatura -70°C, de modo de congelar la fase acuosa. Con el procedimiento descrito, mientras que la fase acuosa se congela, la fase orgánica (superior) permanece líquida, permitiendo descartarla por volcado. Se realizó la extracción con el procedimiento descrito tres veces sucesivamente.

De la fase acuosa se tomó una alícuota y se colocó en un tubo de polipropileno, conteniendo 1 ml de solución de centelleo Optiphase® para realizar la medición en el

contador β de centelleo Rackbeta 1214. Como controles se emplearon: buffer de actividad sin enzima (cuentas totales) y la solución buffer de actividad con enzima previamente inactivada por calor (blanco, control inespecífico). Para calcular la actividad enzimática total se utilizó el valor de radioactividad obtenido (cuentas por minuto, CPM), y el resultado se expresó como porcentaje de actividad para cada una de las concentraciones ensayadas.

6. Ensayo de actividad enzimática en líneas celulares

Para medir la actividad de ACSL4 en diferentes líneas celulares se empleó la medición de la transformación de [^3H]-AA hacia [^3H]-AA-CoA, de acuerdo con el protocolo descrito previamente. Este ensayo se realizó en las líneas celulares MA-10, MDA-MB-231 y PC-3.

Para realizar el ensayo se reemplazó el medio de cultivo completo en el que se cultivaron las distintas líneas celulares por medio de cultivo libre de suero, conteniendo 0,5% de BSA libre de ácidos grasos y [^3H]-AA 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ y se incubó durante 3 horas a 37°C. Luego, se incubó durante 3 horas con PRGL493 o rosiglitazona, en un rango variable de concentraciones. Posteriormente, a la línea celular MA-10 se adicionó el análogo permeable del AMPc, el 8Br-AMPc (0,5 mM), y se incubó durante 1 hora. En cambio, a las líneas MDA-MB-231 y PC-3 se les agregó SFB y se incubó durante 48 horas.

Se obtuvieron los lisados celulares utilizando un buffer de lisis de composición Tris 20 mM (pH 7,4), Triton X-100 0,5%, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, y NaCl 130 mM.

La extracción lipídica se realizó utilizando acetato de etilo (seis volúmenes de solvente por cada volumen de lisado celular). Se centrifugó a una velocidad de 800 xg durante cinco minutos y se separaron las fases, quedando la fase orgánica en la parte superior del tubo y la fase acuosa en la inferior. Se colocaron los tubos cinco minutos a -70°C, de modo de congelar la fase acuosa. Se separaron las fases descartando por volcado la fase orgánica. Este procedimiento se realizó dos veces para aumentar la eficiencia de la extracción, tal como se mencionó anteriormente.

Para evaluar la formación del producto [^3H]-AA-CoA, se tomó una alícuota de la fase acuosa y se colocó en tubos conteniendo 1 ml de solución de centelleo Optiphase® para realizar la medición en el contador β de centelleo Rackbeta 1214.

7. Cuantificación de esteroides

7.1. Tratamientos para evaluar la producción de esteroides

Las células de línea celular de Leydig MA-10 fueron tratadas durante 3 horas con PRGL493 (concentraciones entre 1 y 50 μM) o con rosiglitazona 200 μM . Células consideradas control fueron incubadas con el vehículo correspondiente (dimetil sulfóxido, DMSO). Posteriormente, las células fueron estimuladas durante 1 hora con 8Br-AMPC 0,5 mM o con 22(R)-(OH)-colesterol 5 μM .

Las células de la línea celular de cáncer de próstata PC-3 fueron tratadas durante 48 horas en presencia del inhibidor PRGL493 50 μM o vehículo (DMSO).

Finalizado el tiempo de tratamiento, se recolectaron los medios de incubación para medir los niveles de P4 por radioinmunoanálisis (RIA).

7.2. Concentración del medio para la determinación de esteroides

Dado que la línea PC-3 es una línea celular con baja producción de esteroides, para realizar la determinación por RIA a partir del medio de cultivo fue necesario aumentar al máximo la superficie de células sembradas (botella T-75), y por lo tanto el volumen de medio de cultivo, para posteriormente concentrarlo, utilizando un protocolo modificado de concentración de esteroides.

Para realizar la concentración y extracción de esteroides a partir del medio de incubación, se recolectó el medio (5 ml) de los T-75 luego de los tratamientos. Se agregó a las muestras una mezcla de metanol en agua (relación 2:10), de modo de diluir al quinto el medio de cultivo recolectado (conformando esta mezcla la fase móvil), y se procedió a realizar la extracción de esteroides. Para el proceso se utilizaron columnas Strata C18-T de fase reversa (Phenomenex, Torrance, CA, USA), requiriendo la aplicación de presión negativa en la extracción de la fase móvil. Para la elución se utilizó 1 ml de éter sulfúrico, solvente no polar, teniendo la precaución al eluir de no permitir la salida del rojo fenol presente en el medio de cultivo, que se evidencia por una banda roja en la columna. Al no incorporar dicha fracción se evitan interferencias posteriores por la presencia del colorante.

Luego de la recolección, la fase eluída se secó el solvente bajo una atmósfera de N₂(gas), quedando en el tubo el concentrado de los esteroides. Luego, para su disolución, se agregó un volumen de 100 µl de una solución conteniendo gelatina 0,1% en PBS (PBS-gelatina). El total de los 100 µl fue utilizado como alícuota para la determinación de los correspondientes esteroides por la técnica de RIA.

7.3. Determinación de esteroides por radioinmunoanálisis (RIA)

Para la determinación de los valores de P4 o testosterona por RIA se partió de una alícuota del medio de cultivo recolectado (línea MA-10) o de la alícuota del extracto concentrado en PBS-gelatina (línea PC-3).

Para las determinaciones de P4, a cada una de las alícuotas de muestras se le agregó 100 µl de P4 radioactiva (10.000 dpm) y 100 µl de anticuerpo anti-P4 (1/42000 disuelto en PBS-gelatina 1%). Para las determinaciones de testosterona en plasma de ratones, a cada una de las alícuotas de muestra se le agregó 100 µl de testosterona radioactiva (10000 dpm) y 100 µl de anticuerpo anti-testosterona (1/3000 disuelto en PBS-gelatina 1%). En ambos casos, se incubó durante toda la noche a 4°C.

Al cabo de este período, los tubos se colocaron en una bandeja conteniendo en agua-hielo, y se les adicionó en cada uno un volumen de 200 µl de carbón activado (0,625% P/V), de modo de separar por precipitación la hormona libre que no se hubiera unido al anticuerpo agregado. Luego de 7 minutos desde que se adicionó el carbón activado, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, los sobrenadantes se transfirieron de forma inmediata a tubos conteniendo 1 ml de solución centelleadora Optiphase®. La medición se realizó en el contador β de centelleo Rackbeta 1214, y se calcularon los valores totales de esteroides en base al volumen total y a la alícuota utilizada en cada caso.

7.4. Cuantificación de pregnenolona por ELISA

Para la determinación de los niveles de P5 circulante en plasma de ratones, se empleó un kit de ELISA (por su acrónimo en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)(Abnova, Taipei City, Taiwan).

Se pipetearon 50 µl de cada muestra estándar, controles y muestras de plasma de ratones en los pocillos etiquetados correspondientes por duplicado. Luego se colocaron 100 µL de la solución de trabajo P5 conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) en cada pocillo. Se incubó en un agitador de placas a 200 rpm durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se lavó tres veces cada pocillo con 300 µl de buffer de lavado, sacando cada vez el líquido por volcado y golpeo firme de la placa contra papel absorbente para asegurarse de que no quedaran restos líquidos. Posteriormente, se colocaron 150 µl del sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno) en cada pocillo, incubando en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se pipetearon 50 µl de solución de finalización del ensayo (ácido sulfúrico 1 M) en cada pocillo, teniendo en cuenta que se respetaran los mismos intervalos de tiempo empleados en la colocación del sustrato. A los 20 minutos desde la adición de la solución de finalización, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas multimodo Synergy HT (Biotek, Winooski, Vermont, USA).

7.5. Determinación de corticosterona por ensayo fluorométrico

El material de vidrio utilizado fue lavado con detergente, enjuagado con alcohol y secado antes de su uso. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en el fluorómetro Jasco.

A las alícuotas de plasma de ratones se les adicionó agua destilada hasta completar un volumen de 3 ml. Se utilizó como blanco agua destilada, en el mismo volumen, adicionando a la medición del ensayo tubos patrones con diferentes concentraciones de corticosterona (entre 0 y 750 ng de corticosterona). Los patrones se realizaron en una fase acuosa total de 3 ml. Se adicionó a cada uno de los tubos 2 ml de diclorometano, y se agitaron vigorosamente los tubos conteniendo la mezcla durante 15

segundos. A continuación, se centrifugó durante diez minutos a 2500 rpm, de modo de separar las fases.

La fase acuosa (superior) fue descartada por aspiración con pipetas de punta fina, conservándose la fase inferior perteneciente a la fase orgánica. Se adicionó a cada tubo 1,8 ml de una mezcla de ácido sulfúrico con etanol (7:3, V/V), agitando vigorosamente durante 15 segundos. Se centrifugó durante diez minutos a 2500 rpm y se descartó la fase superior con pipetas de vidrio de punta fina. Se conservaron las fases orgánicas y, pasados 40 minutos, se realizaron las mediciones. La capa de ácido sulfúrico fue pipeteada en una cubeta de fluorómetro y se midió la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$: 470 nm, $\lambda_{\text{emisión}}$: 520 nm).

Los resultados se calcularon en base a la curva estándar realizada. La concentración (C) en microgramos por 100 ml se obtuvo mediante la fórmula: $C = A \times 100/V$, donde V es el volumen (en ml) de plasma utilizados.

8. Proliferación celular

8.1. Ensayo de proliferación por MTT

Para el ensayo de proliferación por MTT (bromuro 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolio) se sembraron 3000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente las células fueron incubadas en medio libre de suero, y a las 24 horas se colocaron los tratamientos correspondientes. Se incubaron durante 72 o 96 horas, según el tratamiento.

Cumplido el tiempo, en cada pocillo conteniendo 200 μ l de medio se colocó un volumen de 20 μ l de solución MTT (5 mg/ml en PBS) y se incubó durante 2,5 horas a 37°C, cubriendo la placa con papel aluminio para resguardarla dado que el reactivo MTT es sensible a la luz. Posteriormente, se retiró el medio y se agregaron 200 μ l de DMSO por pocillo, de modo de solubilizar los cristales de formazán formados por la actividad metabólica celular de las células viables. La placa se agitó vigorosamente durante 15

minutos en oscuridad. Luego, se midió la absorbancia a 570 nm, utilizando el lector de microplacas (Synergy HT).

8.2. Ensayo de proliferación por Bromodesoxiuridina (BrdU)

Para la determinación de la proliferación celular por ensayo de BrdU se realizó la siembra de 3000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente se reemplazó el medio celular completo por medio libre de suero. Luego de 24 horas se colocaron los tratamientos correspondientes y se realizó una incubación de 96 horas.

Cumplido el tiempo, se procedió a la determinación de la proliferación celular utilizando el kit comercial (Roche). Se agregó en cada pocillo solución de BrdU 10 μ M final y se incubó a 37°C durante 2 horas. Se removió el medio celular y se fijaron las células con la solución de fijación/desnaturalización provista por el kit durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se removió nuevamente el medio y se agregó una solución conteniendo el anticuerpo conjugado anti-BrdU, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Luego de 90 minutos, se removió el medio y se realizaron tres lavados con PBS, de modo de eliminar el anticuerpo no unido.

Posteriormente, se agregaron 100 μ l de una solución conteniendo al sustrato, y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Previo a la medición se frenó la reacción con 25 μ l de H₂SO₄ 1 M, incubando un minuto en agitación al resguardo de la luz a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 450 nm y a 690 nm (longitud de onda de referencia) en el lector de microplacas (Synergy HT).

9. Ensayo de migración celular por cierre de herida

Para el estudio de la migración celular se realizó un ensayo de cierre de herida. Se sembraron 200.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se coloraron los tratamientos y se incubaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 48 horas. Con las células en confluencia, se realizaron dos líneas rectas perpendiculares entre ellas, realizando dicha herida con una

punta de pipeta de 10 µl. Se lavó 3 veces con PBS para eliminar las células levantadas, y se consideró el momento de la herida como tiempo 0. Se tomaron fotos monitoreando el cierre de la herida a distintos tiempos hasta alcanzar las 24 horas, o hasta cerrarse la herida por completo.

Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio óptico de contraste Olympus BX50, con un aumento 40X, conteniendo una cámara digital Cool/Snap Proof Color PM-c35 acoplada. El ancho de cierre de las heridas se determinó a partir de las fotos a través de la utilización del *software* de análisis de imágenes Image Pro-Plus.

10. Inmunohistoquímica

Las secciones histológicas tumorales de todos los grupos de los modelos de xenoinjerto se procesaron para inmunohistoquímica con el fin de evidenciar la localización de la expresión proteica de Ki67, REα y RA. El método de inmunoperoxidasa con estreptavidina-biotina utilizado ha sido descrito previamente por (159). Se realizó la desparafinación e hidratación de los preparados, para luego inhibir la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% (vol/vol) en metanol. Los antígenos se recuperaron incubando las muestras en solución buffer citrato 0,01 M (pH 6) en un microondas durante 30 minutos. Todas las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios y la detección se realizó con el Biotinilated Link (Cell Marque). Los antígenos se visualizaron con el sistema de detección CytoScan HRP (Cell Marque), y se utilizó 3,3-diaminobencidina (Liquid DAB-Plus Substrate Kit; Zymed, San Francisco, CA, EE. UU.) como cromógeno. Por último, los portaobjetos se lavaron con agua destilada, se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron. Para validar el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena, algunas secciones se incubaron sólo con DAB. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Ki67 Clon 7B11 (Invitrogen) 1:50, anti-REα (1D5) (Dako) 1:50 y anti-Androgen Receptor-Affinity PA1-110 (Thermo Fisher Scientific) 1:200.

Las secciones histológicas de biopsias ováricas se procesaron para inmunohistoquímica con el fin de evidenciar la localización de la expresión proteica de ACSL4.

Las pacientes fueron reclutadas del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y el Instituto Nacional de Cáncer de Chile (160). Cada paciente firmo un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de ambas instituciones. Los tejidos fueron clasificados por un experto en patología. Todas las pacientes eran menopaúsicas o post menopaúsicas al tiempo del estudio sin diferencias estadísticas en la edad.

La inmunotinción se realizó en secciones de 5 μ m de biopsias ováricas fijadas en formol e incluidas en parafina. Brevemente, las secciones de tejido se desparafinaron en xileno y se hidrataron en una serie de alcoholes graduados. Las secciones se reconstituyeron con 10 mM de buffer citrato de sodio a 95°C durante 20 minutos. Las secciones fueron enjuagadas en PBS e incubadas con solución de bloqueo (1,5% suero de cabra en 0,3% Triton-X100 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente e incubada con anticuerpo de conejo policlonal anti-ACSL4 (1/100) en cámara húmeda por 24 horas at 4°C. La detección del anticuerpo primario fue realizada mediante la incubación con el anticuerpo de cabra anti- conejo conjugado a Cy2 (Molecular Probes, Eugene, OR). Después de lavados con PBS, las secciones fueron montadas con el reactivo FluorSave (Calbiochem, CA, USA) y examinada en un microscopio Olympus BX 50 de epifluorescencia.

11. Ensayos *in vivo*

11.1. Producción de esteroides *in vivo* en ratones

Para la producción de esteroides en ratón todos los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal según los Procedimientos Operativos Estandarizados del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral) y por el Comité de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

Para el estudio, ratones BALB/c machos de 30 días de edad se trataron con una inyección intraperitoneal (50 μ l por ratón) del compuesto PRGL493, con concentraciones en un rango entre 250 y 2500 μ g/kg de peso corporal, o con solución salina (para los ratones control). Luego de 3 horas del comienzo del tratamiento, los animales fueron inyectados por una única vez con hCG en forma subcutánea (300

U/ratón), de modo de activar la esteroidogénesis testicular. Luego de 3 horas, los animales fueron sacrificados y se les extrajo plasma para evaluar los niveles de distintas hormonas esteroides. Se analizaron los niveles de P4 y testosterona por RIA, los niveles de P5 a través de ELISA y los niveles de corticosterona mediante ensayo fluorométrico.

11.2. Modelos de xenoinjerto de cáncer de mama y próstata

Para el modelo de xenoinjerto se utilizaron ratones nude NLAE: NIH(S)Fox1^{nu}, de entre 7 y 8 semanas de edad. Se realizaron suspensiones celulares de las líneas MDA-MB-231 o PC-3, en una cantidad de 5×10^6 células, y se mezclaron con el soporte Matrigel® (BD Biociencias), manteniendo una relación 3:1.

Las suspensiones de células MDA-MB-321 (para el modelo de cáncer de mama) o de células PC-3 (para el modelo de cáncer de próstata) fueron inyectadas en el flanco derecho de los ratones, y se esperó la formación de tumores. Al quinto día de la inoculación de las células, los ratones que desarrollaron tumores se separaron aleatoriamente en dos grupos (4 ratones por grupo). A uno de los grupos se le administró inyecciones intraperitoneales diarias con el compuesto inhibidor PRGL493 (250 µg/kg de peso corporal) y al otro grupo se le administró inyecciones diarias con vehículo (grupo control). El tratamiento se extendió durante 43 días en el modelo de cáncer de mama, y durante 34 días en el modelo de cáncer de próstata.

El volumen tumoral (mm³) fue determinado semanalmente usando un calibre y se calculó usando la fórmula: Volumen= ancho² (mm) x longitud (mm)/2. y los ratones fueron pesados una vez a la semana. El peso promedio corporal al principio del tratamiento fue de 22,5 gramos. Los ratones dispusieron durante todo el tratamiento de acceso libre a comida, agua y camas, y se mantuvieron expuestos a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, en jaulas con filtro superior.

El experimento se finalizó según las guías vigentes aprobadas institucionalmente. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y luego necrosados. Los tumores fueron removidos, fotografiados y procesados para inmunohistoquímica.

12. Análisis de proteínas

12.1. Obtención de proteínas totales desde el cultivo celular

Se cultivaron 1×10^6 células en placas de 6 pocillos. Finalizados los diferentes tratamientos, se aspiraron los medios de cultivo y se lavó cada pocillo con 1 ml de PBS 1X. Luego, las células fueron lisadas utilizando un buffer hipotónico denominado buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 125 mM y Tritón® X-100 1%) al que se le adicionaron inhibidores de fosfatasa y de proteasas (leupeptina 10 mM, pepstatina A 1 mM, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 200 mM, NaF 50 mM y β -glicerol fosfato 40 mM).

La lisis celular se realizó colocando en cada pocillo un volumen de buffer de lisis variable entre experimentos, usando entre 100 y 200 μl dependiendo la concentración final buscada de la proteína en estudio. Las células se lisaron mecánicamente en frío. Posteriormente, se centrifugó a 3000 xg por 10 minutos a 4°C y se continuó trabajando con el lisado celular contenido en el sobrenadante, descartando el pellet.

12.2. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método colorimétrico de Bradford (161) adaptado a micrométodo. Brevemente, se colocaron 200 μl de una dilución acuosa 1:4 del reactivo de Bradford (Bio-Rad protein Assay) en pocillos de una placa de 96. Luego, se agregaron alícuotas de las muestras de extractos proteicos. En paralelo, se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA como solución patrón. Cada determinación se realizó por duplicado. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Synergy HT) y se determinó la concentración de proteínas a partir de la curva estándar.

12.3. Preparación de muestras para la siembra

Luego de realizada la cuantificación, se agregó al lisado celular de cada muestra procesada buffer de siembra conteniendo SDS (Tris- HCl pH 6,8 62 mM, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,1%).

Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos, de modo de provocar la desnaturalización de las proteínas.

12.3.1. Preparación de los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Se prepararon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en vidrios que permitían geles de un grosor de 0,75 mm (con calles de 20 µl de volumen máximo), utilizando los armadores y elementos del sistema MiniProtean III System de Bio-Rad.

El gel concentrador se preparó utilizando acrilamida 5% y bisacrilamida 0,136% en Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) conteniendo SDS 0,1%. En la preparación del gel separador se utilizó con bisacrilamida 0,22% en Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) conteniendo SDS 0,1%. Al preparar el gel separador se tuvo en cuenta el peso molecular de las proteínas de interés a utilizar en la corrida electroforética, por lo que la cantidad de acrilamida del gel separador variaba entre un 8 y un 12%.

12.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas obtenidas y cuantificadas fueron sembradas en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se realizó la corrida electroforética a temperatura ambiente y voltaje constante, utilizando el buffer de corrida electroforética conteniendo Tris-HCl 0,025 M (pH 8,3), glicina 0,19 M y SDS 0,1%.

Para la corrida electroforética se aplicaron 80 V durante la fase en que las proteínas se encontraban en el gel concentrador, aumentando a 110 V cuando ya se encontraban en el gel separador.

El volumen de cada muestra a sembrar se corresponde con un total de 20 µg de proteínas. Junto con las muestras se sembró también un marcador preteñido de peso molecular para proteínas (Blue Plus® Protein Marker. 14-100 kDa).

12.4. Western blot

Al finalizar la separación electroforética de proteínas, se realizó su electrotransferencia a una membrana de PVDF con amperaje constante de 0,07 A durante 90 minutos, utilizando un buffer de transferencia conteniendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM, SDS 0,001% y metanol 20%.

Para evidenciar por tinción la presencia de las proteínas se mantuvo la membrana sumergida en una solución de Ponceau S (Ponceau S 0,2% en ácido acético 1%), por 2 minutos. Se lavó tres veces con metanol para eliminar los restos presentes de colorante en las zonas donde no se transfirieron proteínas.

Para la detección de proteínas específicas, la membrana debe estar activada. Si bien al finalizar el proceso de lavar la membrana ya se encuentra activada, en caso de dejarse secar la membrana debe ser activada por inmersión en metanol durante un minuto.

Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se procedió a bloquear la membrana. La solución de bloqueo se preparó partiendo de solución salina Tris Tween (TTBS), conteniendo NaCl 500 mM, Tris- HCl 20 mM (pH 7.5), y Tween 20 0.5%, se preparó la solución de bloqueo. Para bloquear la membrana se utilizó BSA 1% en TTBS o leche en polvo libre de grasas 5% en TTBS, según el anticuerpo utilizado. Se incubó durante 60 minutos en solución de bloqueo con agitación a temperatura ambiente.

Se prepararon las diluciones a utilizar de los anticuerpos primarios (Tabla 3) en la correspondiente solución de bloqueo y se incubaron las membranas durante toda la noche a 4°C con agitación. Al día siguiente se lavó con TTBS durante 10 minutos tres veces. Se preparó una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario correspondiente en TTBS y se incubó la membrana 2 horas a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo, se realizaron 3 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno con agitación, y 3 lavados con solución salina Tris (TBS) (NaCl 500 mM, Tris- HCl 20 mM (pH 7.5)) de 10 minutos con agitación, todo a temperatura ambiente.

El procedimiento de revelado se realizó mediante la utilización del sustrato quimioluminiscente del reactivo comercial ECL y la utilización de placas radiográficas.

La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó utilizando el *software* de procesamiento de imágenes Gel Pro Analyzer.

Anticuerpo primario	Dilución empleada
Anti-ACSL4	1/4000
Anti-RE α	1/500
Anti-RA	1/500
Anti-ABCG2	1/1000
Anti-pAKT	1/500
Anti-pGSK3 $\alpha\beta$	1/500
Anti-GSK3 $\alpha\beta$	1/500
Anti-pS6	1/1000
Anti-StAR	1/500

Tabla 3. Anticuerpos primarios. Listado de anticuerpos primarios empleados en las determinaciones por western blot, con sus correspondientes diluciones.

Los anticuerpos policlonales obtenidos de conejo anti-ACSL4 fueron desarrollados previamente en nuestro laboratorio (162). Los anticuerpos monoclonales anti-RE α , anti-RA, anti-pAKT, anti-pGSK3 $\alpha\beta$, anti-GSK3 $\alpha\beta$, anti-p-S6, anti-GAPDH y el anticuerpo policlonal anti-StAR fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Los anticuerpos policlonales anti-ABCG2 y el anticuerpo monoclonal anti-AKT fueron obtenidos de OriGene Technologies (Rockville, MD, USA).

Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y de conejo desarrollados en cabra y conjugados con peroxidasa fueron adquiridos a Bio-Rad Laboratories (Hércules, California, USA).

13. Ensayos de eflujo

13.1. Eflujo de Hoechst

El ensayo de exclusión de Hoechst se llevó a cabo (9) células de las líneas SKOV-3 y OV-90, en densidades de 6×10^4 y 8×10^4 , respectivamente. Las células se incubaron con concentraciones 25 y 50 μM del compuesto PRGL493 durante 48 horas en estufa a

37°C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X. Se incubó con buffer fisiológico 1X conteniendo Hoechst 33342 en concentración 5 µg/ml durante 30 minutos en estufa a 37°C, protegido de la luz. Luego de cumplido el tiempo de incubación con el tratamiento, se lavó con PBS 1X tres veces, y se agregó a cada pocillo buffer fisiológico 1X durante 30 minutos, de modo de analizar el eflujo de Hoechst. Se montaron los vidrios y se observaron en un microscopio de epifluorescencia, a 480 nm de excitación. Se tomaron fotos con un aumento 40X y con el programa de análisis de imágenes *ImageJ* se cuantificó la intensidad de fluorescencia de las células, y se relativizó al área.

13.2. Eflujo de doxorubicina

El ensayo de fluorescencia con doxorubicina fue realizado siguiendo el protocolo de Chen et al. (163) con modificaciones. Se plaquearon células de la línea SKOV-3 en vidrios cubreobjetos en una densidad de 6×10^4 por vidrio, mientras que de la línea OV-90 se plaquearon 8×10^4 por vidrio. Se incubaron las células por 48 horas con el compuesto PRGL493 en las concentraciones 25 y 50 µM. Posteriormente, se sacó el medio de cada pocillo y se lavó con PBS 1X de modo de eliminar células levantadas y medio celular. Las células fueron tratadas con buffer fisiológico 1X con agregado de doxorubicina 10 µM durante 3 horas en estufa a 37°C, protegido de la luz. Cumplido el tiempo de incubación, se lavó cada pocillo con 1 ml de PBS 1X (tres veces), y se incubó con buffer fisiológico libre de doxorubicina por 30 minutos, de modo de analizar el eflujo de doxorubicina. Se montaron los vidrios y se observaron al microscopio de epifluorescencia a 480 nm. Se tomaron fotos de cada vidrio, con el aumento 40X, para su posterior análisis por el programa de análisis de imágenes *ImageJ*. Se cuantificó la fluorescencia de las células relativizada al área.

14. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se realizó utilizando el lenguaje de programación de fuente abierta R. Utilizando un script R, se aplicó el método de correlación de Pearson para analizar los niveles de expresión de ACSL4 junto con un grupo de genes seleccionados del set de datos ID: GSE49997. La base de datos utilizada es de muestras

de 204 pacientes con cáncer de ovario epitelial (164). Previamente los datos RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas asignadas) se transformaron aplicando $\log_{10}(\text{RPKM}+1)$ para ajustarlos a una distribución normal. Se calcularon los valores de p y el FDR (por sus siglas en inglés: False Discovery Rate) utilizando el método de Benjamín y Hochberg. Las librerías de R empleadas para generar el gráfico fueron ggplot2, hrbrthemes y coorspace.

15. Cálculo de la concentración inhibitoria media (IC50)

El cálculo de IC50 se realizó con el recurso bioinformático gauss.inf.um.es:8080/IC50/ (165).

16. Análisis estadístico

Los resultados se mostraron como la media \pm el desvío estándar (DS). La significancia estadística fue determinada a través del análisis de la varianza (ANOVA) seguida por los análisis de significancia estadística indicados en cada figura. En otros casos, se empleó Kruskal-Wallis seguido por la prueba de comparación múltiple de Dunns. En cada ensayo se consideró significativo un valor con $p < 0,05$. Se determinó * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Desarrollo de un nuevo
inhibidor de ACSL4 y estudio
de sus efectos en cáncer de
mama, próstata y
esteroidogénesis

1. Desarrollo de un nuevo compuesto inhibidor de la enzima ACSL4

1.1. Búsqueda bioinformática de posibles compuestos inhibidores de ACSL4

Dada la relevancia de ACSL4 como blanco terapéutico en cáncer, especialmente en sus formas más agresivas y resistentes a los tratamientos actuales, el primer objetivo de la tesis fue desarrollar un nuevo inhibidor para esta enzima. Si bien actualmente existen compuestos que pueden inhibir su actividad, como rosiglitazona y triacsina C, no son específicos para la enzima y su uso terapéutico es limitado.

La estrategia elegida se basó en realizar un cribado *in silico* evaluando una biblioteca de compuestos químicos para identificar aquellos que pudieran interactuar y bloquear la actividad enzimática. Este proceso comenzó con la obtención de la estructura tridimensional de la enzima. Hasta ese momento no se disponían de estructuras cristalizadas de las ACSLs humanas. Por este motivo, para el modelado de ACSL4 se utilizó como base la única estructura descrita de una enzima de la familia de las ACSLs, perteneciente a la especie de bacterias termófilas *Thermus thermophilus* HB8 (17). Las enzimas de la subfamilia de las ACSLs tienen un alto nivel de homología, por lo que ciertas estructuras que determinan sus funciones esenciales se encuentran altamente conservadas entre las distintas especies.

El modelado por homología se realizó con el *software* MODELLER, que permite realizar un modelado comparativo al realizar la estructura 3D de una proteína con estructura desconocida, partiendo de otra conocida. El análisis de la estructura reveló que la enzima contiene distintos dominios conservados, inferidos a partir de la estructura bacteriana, entre los que se encuentra el denominado GATE, un túnel del ácido graso, que determina la especificidad de sustrato y que permite en forma unidireccional la entrada del sustrato (166). Este túnel se ubica en el dominio N-terminal, que se extiende desde una cavidad cóncava hasta el sitio de unión al ATP.

Una vez obtenida la estructura de ACSL4 en mamíferos, se buscó potenciales inhibidores farmacológicos. Para estudiar las posibles uniones de los sustratos al sitio activo de la enzima, es decir para realizar el *docking* entre la enzima y las posibles moléculas inhibidoras, se utilizó la estructura obtenida, en particular el dominio

hidrofóbico perteneciente al túnel del ácido graso que contiene además un residuo aromático clave en la unión del sustrato. Se utilizó como diana este residuo que corresponde a la lisina 572 (K572) de la isoforma 2 de ACSL4 humana (secuencia de referencia NCBI: NP_001305438.1) y a lisina 531 (K531) en la secuencia de la isoforma 1 de ACSL4 (secuencia de referencia NCBI: NP_004449.1). Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo liderado por el Dr. Daniel Gómez (Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina).

A partir del análisis realizado, se obtuvieron los 10 compuestos que presentaron un mayor valor de *score* en el *docking* de afinidad. Los compuestos seleccionados se obtuvieron de la colección Enamine Advanced Collection y fueron adquiridos para su posterior caracterización en el laboratorio.

A través de diferentes ensayos preliminares, se comparó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad y proliferación celular, así como su capacidad para inhibir la esteroidogénesis. Se realizaron también ensayos para estudiar su efecto en la captación de AA en ensayos en líneas celulares. Del análisis de estos resultados se seleccionó para continuar trabajando el compuesto 4-(3-(5-metilfuran-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidrobenczo[4,5]imidazo[1,2-a][1,3,5]triazin-2-amina, que presentó actividad biológica significativa tanto en las líneas de cáncer de mama como de cáncer de próstata, y se lo denominó P-PRGL493.

En la siguiente figura se muestra la unión de P-PRGL493 al carbono alfa del residuo K572 y otros aminoácidos cercanos a la región del túnel del AA de la enzima (Figura 7).

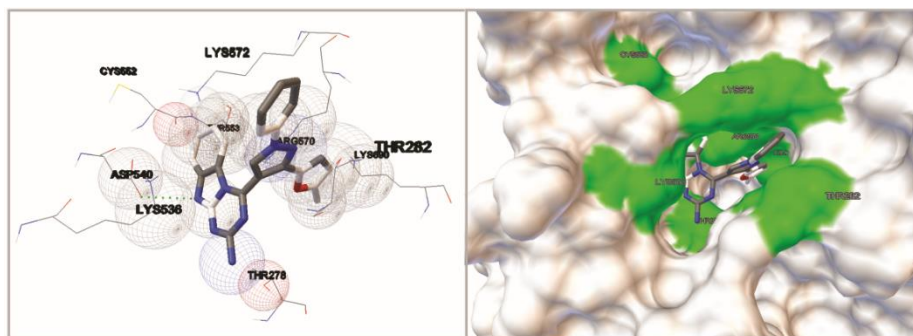


Figura 7. Modelado de la estructura 3D de la ACSL4 humana y del compuesto P-PRGL493.

En el panel de la izquierda se muestra el acoplamiento del compuesto P-PRGL493 y los residuos en contacto cercano con ACSL4 (esferas). En el panel de la derecha se presenta un modelado de superficie de la estructura tridimensional de la enzima ACSL4 humana obtenida por modelado por homología mostrando el *docking* del compuesto P-PRGL493 en la entrada del túnel del ácido araquidónico.

1.2. Síntesis y caracterización del compuesto PRGL493

El compuesto P-PRGL493 fue optimizado con el objetivo de mejorar su solubilidad en solventes orgánicos. La adición de un grupo acetilo generalmente aumenta la hidrofobicidad de un compuesto, lo que puede mejorar su capacidad para atravesar membranas celulares. Se realizó una acetilación del compuesto mediante el tratamiento con anhídrido acético, usando piridina como solvente. El tratamiento se realizó durante dos horas a 0°C. De esta forma, se obtuvo el compuesto acetilado, denominado PRGL493 (Figura 8). La síntesis y caracterización del compuesto se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Juan Bautista Rodríguez (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a Química Orgánica (UMYMFOR), Argentina).

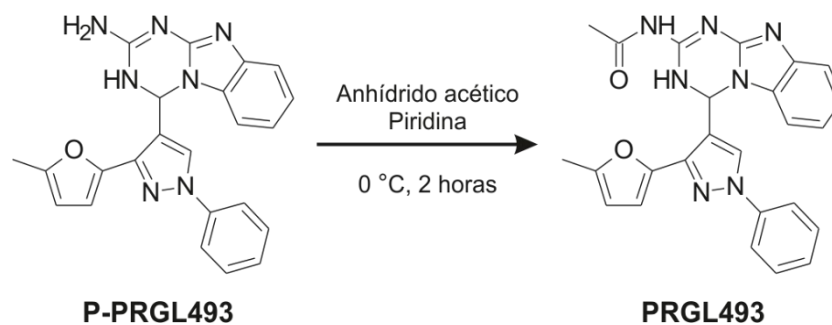


Figura 8. Síntesis del compuesto PRGL493 por acetilación de P-PRGL493. A la izquierda se muestra la estructura química del compuesto P-PRGL493. Luego del tratamiento con anhídrido acético, durante 2 horas a 0°C con piridina como solvente, se obtiene el derivado acetilado PRGL493, cuya estructura se muestra a la derecha.

Se procedió a la caracterización del compuesto PRGL493 por RMN y HRMS-ESI, técnicas que permitieron confirmar la adición del grupo acetilo, confirmando su fórmula molecular y su masa molecular calculada. También se determinó su punto de fusión. Se detallan a continuación las características de PRGL493 (Tabla 4).

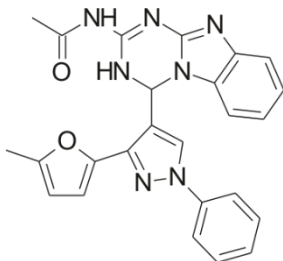
PRGL493	
Estructura	
Nombre formal	4-(3-(5-metilfuran-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a][1,3,5]triazin-2-acetamida
Fórmula molecular	C ₂₅ H ₂₁ N ₇ O ₂
Masa molecular	451,18
Punto de fusión	> 210°C
Solubilidad	5 mg/ml en DMSO (11,07 mM) sonicando y calentando a 60°C
Número CAS	2479378-45-3

Tabla 4. Estructura y características del compuesto PRGL493. Se detallan las propiedades del compuesto PRGL493, incluyendo su estructura química, nombre, fórmula y masa molecular, punto de fusión, solubilidad y número CAS (*Chemical Abstracts Service*), fundamentales para la identificación y caracterización del compuesto.

1.3. Estudio de la efectividad del compuesto PRGL493 como inhibidor de ACSL4

Una vez caracterizado el compuesto PRGL493, se analizó su posible actividad inhibitoria *in vitro*. Para dicho ensayo fue necesaria la obtención de la proteína ACSL4 recombinante. Se empleó el plásmido pCMV6-ACSL4 que contiene la secuencia de la enzima fusionada a una secuencia FLAG o etiqueta (ACSL4-FLAG) que permite su purificación. Se transfectó este plásmido en la línea celular HEK-293, obteniendo luego la proteína por inmunoprecipitación mediante el uso de un anticuerpo anti-FLAG.

Con la proteína ACSL4 recombinante purificada, se procedió a evaluar el efecto de PRGL493 en un ensayo de actividad enzimática. En este ensayo, se utilizó [³H]-AA como sustrato y se midió la formación de [³H]-AA-CoA como producto final de la enzima. Para esto, se incubó a la enzima recombinante con diferentes concentraciones del inhibidor PRGL493. Además, de manera comparativa, se realizó el ensayo en presencia de rosiglitazona, una molécula previamente descrita como inhibidor de ACSL4. La medición de actividad se realizó a 37°C durante 10 minutos. Finalizado el ensayo, se cuantificó el producto formado en un contador β de centelleo.

Las concentraciones de PRGL493 evaluadas abarcaron un rango entre 0 y 100 μM. La concentración de rosiglitazona empleada fue 100 μM, similar a la descrita en trabajos previos (8) (Figura 9).

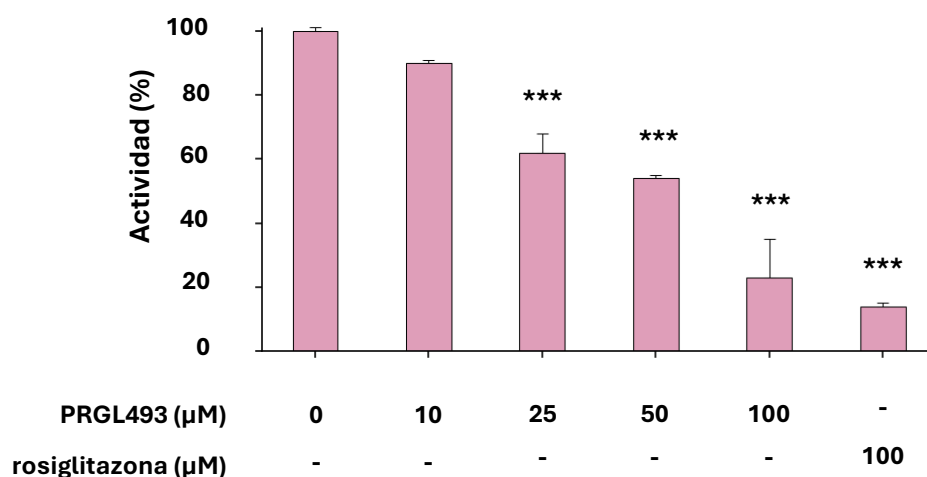


Figura 9. Efecto de PRGL493 sobre la actividad de la enzima ACSL4 recombinante. La enzima ACSL4 recombinante se incubó en presencia o ausencia de inhibidores, utilizando concentraciones crecientes del compuesto PRGL493 entre 0 y 100 μM, o una concentración de rosiglitazona 100 μM, durante 10 min a 37°C. La actividad de la acil-CoA sintetasa se midió a través de la formación de [³H]-AA-CoA a partir de [³H]-AA. Los resultados se presentan como porcentaje de actividad respecto al control. Media ± DS de tres experimentos independientes. ***p < 0,001 vs. control sin inhibidor. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

Se observó que el compuesto PRGL493 fue capaz de inhibir significativamente la actividad de la enzima ACSL4 en forma dosis dependiente, teniendo un efecto significativo a partir de la concentración 25 μM . Para la concentración 100 μM se encontró que PRGL493 tuvo una capacidad inhibitoria comparable a la de rosiglitazona a la misma concentración.

Después de evidenciar el efecto del compuesto PRGL493 en la actividad de la enzima recombinante, se evaluó si tenía efecto inhibitor sobre ACSL4 en ensayos en células en cultivo.

Como hemos mencionado, ACSL4 se expresa y juega un rol clave en las células tumorales altamente agresivas de cáncer de mama y próstata. Además, esta enzima tiene un rol determinante en la síntesis de esteroides de las células de Leydig (6,8,67). Por lo tanto, para este ensayo se utilizaron líneas celulares en las que la actividad de ACSL4 está demostrada y es relevante: la línea de células tumorales de Leydig de ratón MA-10, la línea de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231 y la línea de cáncer de próstata humano PC-3.

Los cultivos celulares se incubaron con [^3H]-AA (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ en medio de cultivo libre de suero) durante 3 horas. Luego, fueron tratados con DMSO (vehículo) o con distintas concentraciones (en un rango de 0 y 50 μM) de PRGL493 en medio completo. Se utilizó nuevamente rosiglitazona como compuesto testigo para la inhibición de la enzima.

Las células de la línea MA-10 fueron incubadas con los compuestos inhibidores durante 3 horas. Luego fueron estimuladas durante 1 hora con el análogo permeable del AMPc (8Br-AMPc, 0,5 mM), segundo mensajero de las hormonas tróficas que inducen la expresión y actividad de ACSL4 (29), a fin de poder evaluar el efecto inhibitorio de las moléculas testeadas.

Tanto las células MDA-MB-231 como las PC-3, que presentan alta expresión endógena de ACSL4, fueron incubadas con los compuestos inhibidores durante 48 horas.

Una vez finalizados los tratamientos, se evaluó la formación de [^3H]-AA-CoA extraído de los lisados celulares (Figura 10).

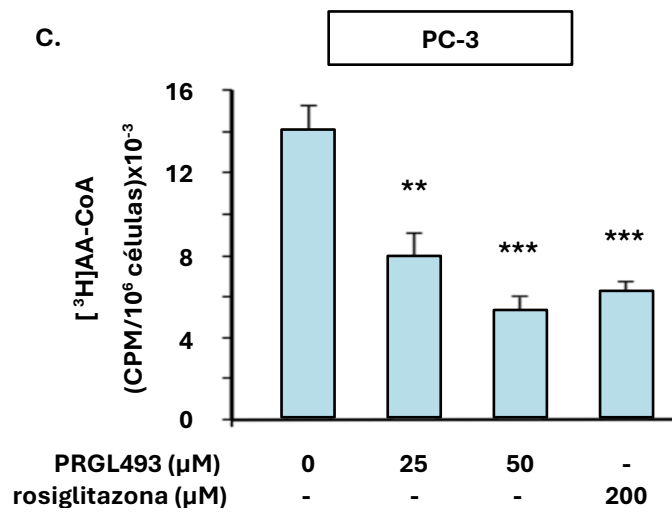
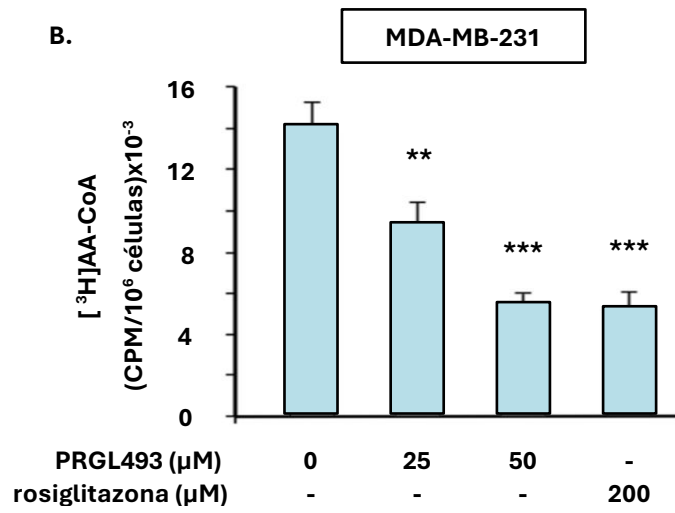
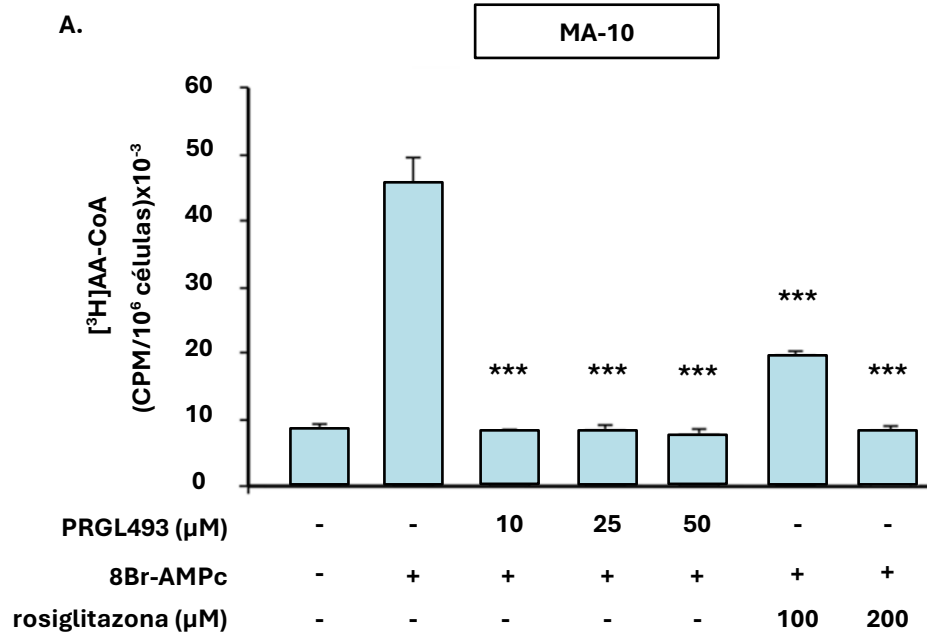


Figura 10. Efecto de PRGL493 sobre la actividad de ACSL4 en líneas celulares. Las líneas celulares se incubaron con [³H]-AA (0,5 µCi/ml en medio libre de suero) durante 3 horas y posteriormente se trataron con el inhibidor PRGL493 en diferentes concentraciones (entre 0 y 50 µM) o con rosiglitazona (100 o 200 µM). **(A)** Las células de Leydig MA-10 fueron tratadas con los inhibidores durante 3 horas y luego estimuladas con 8Br-AMPc (0,5 mM) durante 1 hora. ***p < 0,001 vs. células estimuladas sólo con 8Br-AMPc. La línea de cáncer de mama MDA-MB-231 **(B)** y la línea de cáncer de próstata PC-3 **(C)** fueron incubadas con los inhibidores por 48 horas. Al finalizar los tratamientos, se evaluó la formación de [³H]-AA-CoA y se expresó como cuentas por minuto normalizadas por un millón de células (CPM/10⁶ células). Los resultados se representan como la media ± DS de tres experimentos independientes. **p < 0,01 y ***p < 0,001 vs. células control sin inhibidor. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

En las tres líneas celulares se observó una disminución significativa en la producción de [³H]-AA-CoA para todas las concentraciones ensayadas del compuesto, lo cual refleja una menor actividad de la enzima ACSL4 posterior al tratamiento con el compuesto PRGL493.

En la línea de células de Leydig MA-10 se observó un incremento en los niveles de [³H]-AA-CoA luego de la estimulación con 8Br-AMPc, lo que era esperable dado que este segundo mensajero induce y activa a ACSL4 en estas células. Se observó que, en presencia de PRGL493, se redujo significativamente la formación del producto de la enzima en todas las concentraciones evaluadas. Al compararlo con el efecto inhibitorio producido por rosiglitazona, se observó que PRGL493 mostró una mayor potencia inhibitoria.

En las líneas celulares MDA-MB-231 y PC-3 hay una alta expresión constitutiva de la enzima ACSL4, por lo tanto, se anticipaba la formación de [³H]-AA-CoA en ausencia del tratamiento con los inhibidores. Al utilizar el compuesto PRGL493 se observó una disminución significativa en la formación del producto de la enzima, evidenciando el efecto inhibitorio de este compuesto sobre la actividad de ACSL4 en dichas líneas celulares de cáncer. Nuevamente, este efecto resultó comparable al obtenido con rosiglitazona.

Con los ensayos realizados, tanto con la enzima recombinante como con las tres líneas celulares estudiadas, se demostró que el compuesto PRGL493 puede inhibir la actividad de la enzima ACSL4.

Posteriormente, se quiso estudiar si este compuesto modificaba los niveles proteicos de la enzima ACSL4. Células de las líneas MDA-MB-231 y PC-3 fueron tratadas con el compuesto PRGL493 durante 48 horas en medio completo. Para este ensayo, se escogió la concentración 50 μ M de PRGL493, aquella en la que se observó una inhibición significativa de la actividad de ACSL4 en las líneas de cáncer de mama y próstata. Se evaluó por western blot los niveles de ACSL4 y los de la proteína GAPDH, empleada como control de carga (Figura 11).

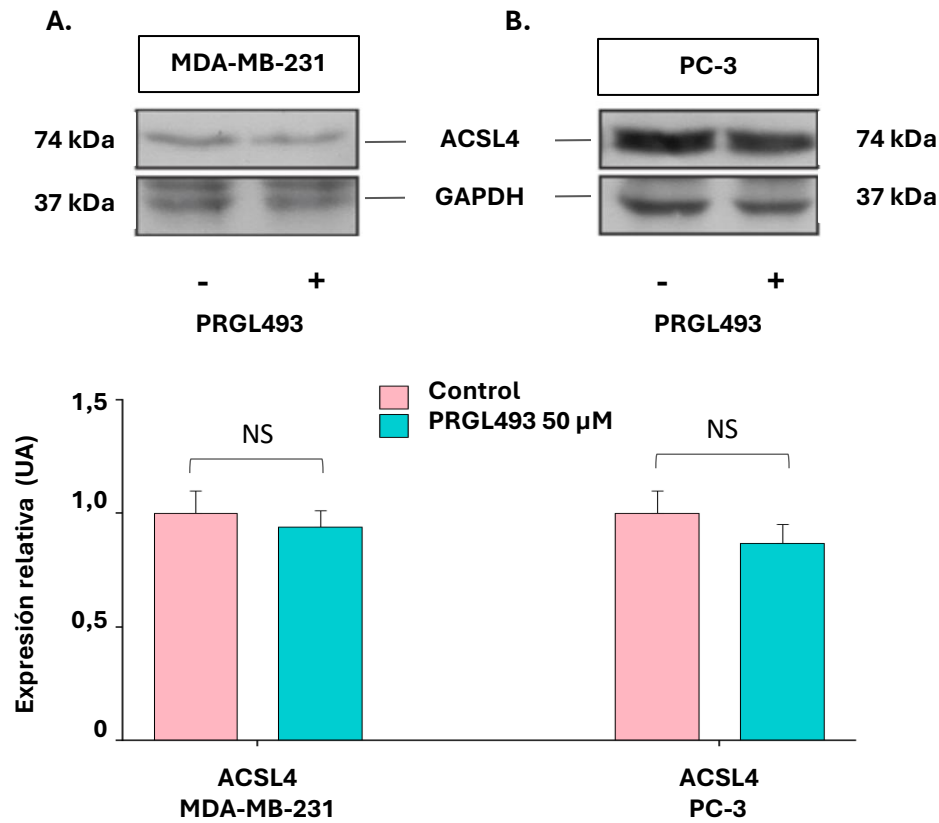


Figura 11. Efecto de PRGL493 sobre los niveles proteicos de ACSL4. Células de las líneas MDA-MB-231 (A) y PC-3 (B) fueron tratadas con el compuesto PRGL493 (50 μM) o DMSO (vehículo) durante 48 horas. Luego fueron lisadas y a partir de sus extractos proteicos se realizó el análisis por western blot de los niveles de expresión de ACSL4 y GAPDH (como control de carga). Se muestran imágenes representativas (paneles superiores) para cada línea celular. Las señales obtenidas fueron cuantificadas por densitometría, y la expresión de ACSL4 fue relativizada a la de GAPDH y graficada (panel inferior). Los resultados se muestran como la media ± DS de tres experimentos independientes. NS: no significativo. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Se observó que, al evaluar la expresión de ACSL4 luego del tratamiento con el compuesto PRGL493, no hubo cambios significativos tanto en la línea MDA-MB-231 como en la línea PC-3. Este resultado estaría indicando que el inhibidor PRGL493 ejerce su efecto sobre la actividad de ACSL4, sin afectar sus niveles proteicos.

2. Efecto de la inhibición de ACSL4 en líneas celulares tumorales

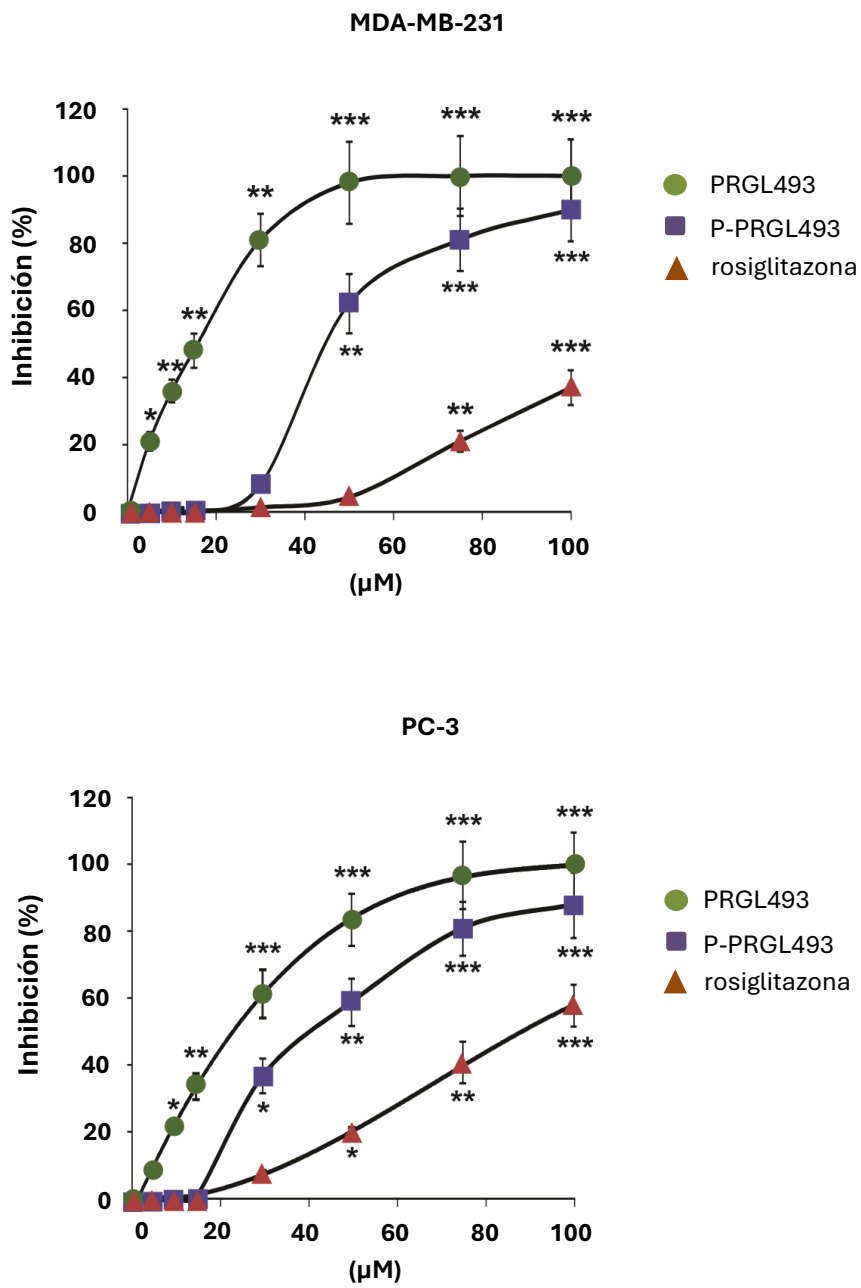
2.1. Efecto de PRGL493 en la proliferación celular

La enzima ACSL4 juega un papel crucial tanto en el cáncer de mama como en el cáncer de próstata. ACSL4 participa del fenotipo agresivo contribuyendo a la proliferación, migración e invasión de las células tumorales y a la resistencia a tratamientos hormonales y quimioterapéuticos.

Por lo tanto, para continuar con el estudio de la inhibición de ACSL4 por el compuesto PRGL493 se analizó su efecto sobre la proliferación celular. Se realizó un ensayo de BrdU en microplaca utilizando células de las líneas MDA-MB-231 y PC-3. Las células fueron incubadas durante 72 horas con concentraciones de PRGL493 que abarcaron un rango entre 0 y 100 μM . En paralelo y de forma comparativa, se evaluó en ambas líneas celulares el efecto de su precursor no acetilado P-PRGL493 y de rosiglitazona en las mismas concentraciones.

Los resultados fueron representados gráficamente como el porcentaje de inhibición en la proliferación celular de las células tratadas con los compuestos PRGL493, P-PRGL493 y rosiglitazona para cada una de las concentraciones ensayadas, normalizados respecto a células control. A partir de los datos obtenidos se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los compuestos PRGL493 y P-PRGL493 en ambas líneas (Figura 12).

A.



B.

Compuesto	PRGL493		P-PRGL493	
	MDA-MB-231	PC-3	MDA-MB-231	PC-3
IC50	19,9 µM	20,07 µM	45,8	36,5

Figura 12. Ensayo de proliferación celular utilizando los compuestos P-PRGL493, PRGL493 y rosiglitazona en líneas de cáncer de mama y próstata. A. Las líneas celulares MDA-MB-231 y PC-3 fueron tratadas con las concentraciones indicadas de los compuestos P-PRGL493,

PRGL493 y rosiglitazona durante 72 horas. Las células control fueron tratadas con el vehículo correspondiente (DMSO). Luego se midió la proliferación celular por ensayo de BrdU. Se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación de cada compuesto con respecto a su control. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición en la proliferación celular, y se representan como la media \pm DS de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. células control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls. **B.** A partir de los valores obtenidos se calculó el IC50 para los compuestos P-PRGL493 y PRGL493, que se presentan en la tabla.

Se observó que el compuesto PRGL493 produce una significativa inhibición en la proliferación tanto en la línea MDA-MB-231 como en la línea PC-3, de manera dosis dependiente. El compuesto P-PRGL493, su precursor no acetilado, también resultó efectivo en inhibir la proliferación celular, pero con menor potencia que PRGL493, dado que, a mismas concentraciones, éste produjo mayor porcentaje de inhibición. Además, para cada concentración testeada, se observó un mayor efecto inhibidor de PRGL393 en comparación con el de rosiglitazona en ambas líneas celulares de cáncer. El IC50 de PRGL493 calculado fue de 19,7 μM para las células MDA-MB-231 y 20,07 μM para las PC-3. En ambos casos el IC50 de P-PRGL493 fue mayor.

Para los siguientes estudios del efecto inhibidor del compuesto PRGL493 se empleó una concentración 50 μM , ya que con ésta se observaron efectos inhibitorios significativos en la proliferación sin presentar cambios morfológicos en las células.

2.2. Efecto de PRGL493 en la migración celular

Se continuó estudiando el efecto del compuesto PRGL493 sobre otro de los parámetros de agresividad tumoral como es la migración celular. Para esto se realizó un ensayo de cierre de herida, utilizando células de las líneas tumorales MDA-MB-231 y PC-3. Las células fueron tratadas por 48 horas con una concentración 50 μM del compuesto PRGL493 o con DMSO como control, estando en total confluencia al momento de evaluar la migración celular. Con una punta de pipeta se realizó la herida en cada pocillo, tomando ese momento como el tiempo cero, y luego se tomaron fotos periódicamente en cada uno de los distintos tiempos elegidos. La distancia entre los dos márgenes de cada una de las heridas se cuantificó con el *software* de análisis de imágenes *ImageJ*. Se

graficó el porcentaje de cierre de herida para cada uno de los tiempos evaluados (Figura 13).

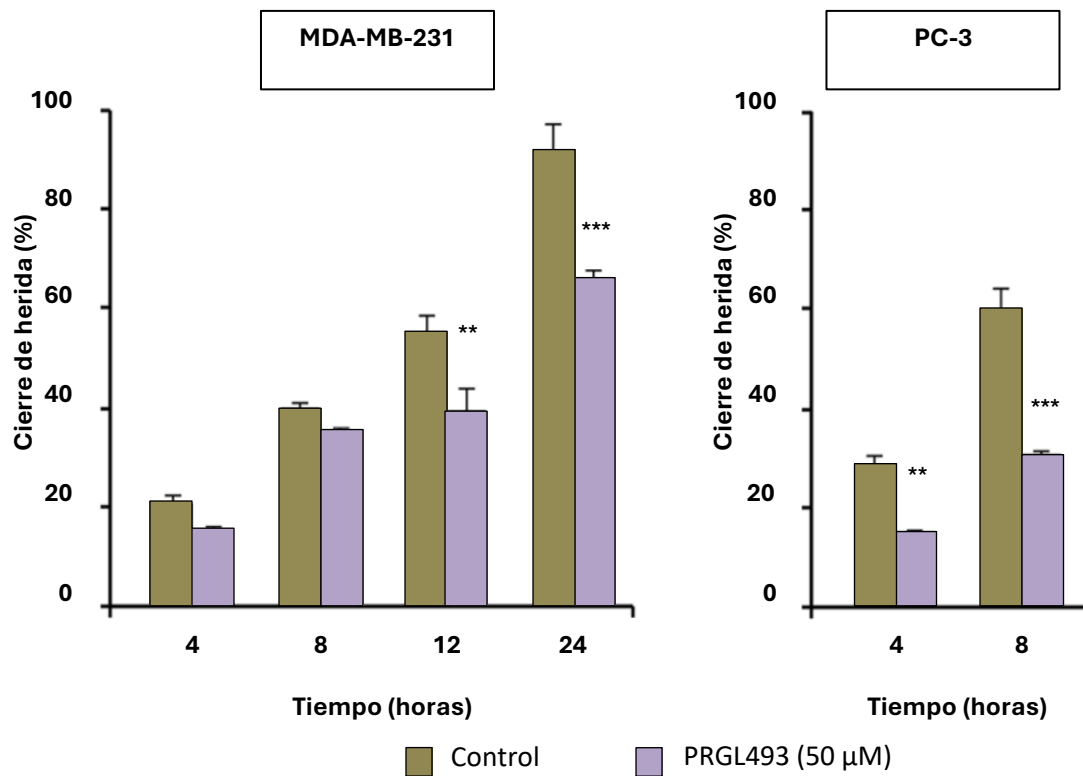


Figura 13. Ensayo de migración celular por cierre de herida en células de las líneas MDA-MB-231 y PC-3 tratadas con el compuesto PRGL493. Ensayo de migración en células MDA-MB-231 (gráfico de la izquierda), y PC-3 (gráfico de la derecha), tratadas con PRGL493 50 µM o con DMSO durante 48 horas. Cumplido el tiempo de incubación y con las células en confluencia total se realizó la herida en cada pocillo y se cuantificó la distancia entre las márgenes con el *software* de análisis de imágenes *ImageJ*. En los gráficos, los valores se presentan como porcentaje de cierre de herida a distintos tiempos, para ambas condiciones en las dos líneas celulares. Los datos representan la media ± DS de tres experimentos independientes. **p < 0,01 y ***p < 0,001 vs. células control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Se observó que el compuesto PRGL493 disminuyó la migración de ambas líneas celulares. En la línea MDA-MB-231 se observaron diferencias significativas en el cierre de herida de las células tratadas con respecto a las células control desde las 12 horas. En la línea PC-3 la migración disminuyó significativamente con el tratamiento con el compuesto inhibidor desde las 4 horas de la formación de la herida.

A partir de estos ensayos, se puede concluir que el compuesto PRGL493 demostró un efecto inhibitorio de los parámetros de agresividad tumoral, específicamente la proliferación y la migración celular, en las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 y PC-3.

3. Efecto del compuesto PRGL493 sobre la expresión de proteínas asociadas a resistencia

La enzima ACSL4 está implicada en la resistencia a tratamientos hormonales y quimioterapéuticos tanto en cáncer de mama como de próstata (6,8,9,136). Se ha descrito que la expresión de ACSL4 en estos tumores correlaciona negativamente con la expresión del RE α y el RA, y positivamente con la expresión de algunos transportadores asociados a la resistencia a fármacos antitumorales, en particular ABCG2 (6–9,128,130).

Para evaluar el efecto del PRGL493 sobre la expresión del RE α y el RA, se trataron células de las líneas MDA-MB-231 y PC-3 con este compuesto en una concentración 50 μ M, durante 48 horas. A partir del lisado celular se realizó un western blot para evaluar los niveles de expresión del RE α en la línea de cáncer de mama y del RA en la línea de cáncer de próstata. Además, se analizó la expresión del transportador ABCG2 en ambas líneas. Para relativizar sus niveles de expresión se utilizó la proteína GAPDH y posteriormente se cuantificó la intensidad de las bandas utilizando el *software* Gel-Pro (Figura 14).

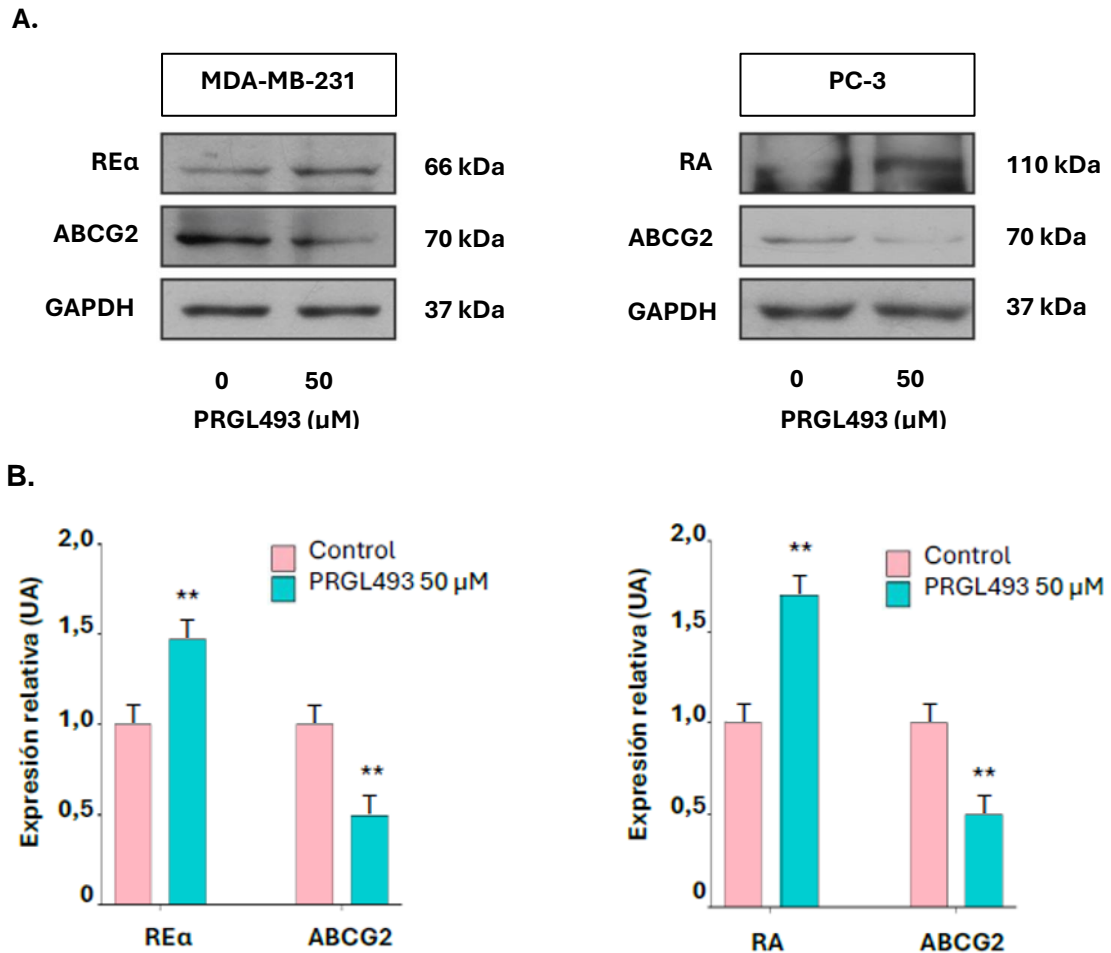


Figura 14. Niveles proteicos del RE α , el RA y del transportador ABCG2 en células MDA-MB-231 y PC-3 luego del tratamiento con PRGL493. Células de las líneas MDA-MB-231 y PC-3 fueron tratadas con PRGL493 50 μ M durante 48 horas. A partir de los lisados celulares se evaluaron los niveles proteicos del RE α , RA y ABCG2. Las señales obtenidas fueron cuantificadas por densitometría, y la expresión de las proteínas fue relativizada a la de GAPDH, tomada como control de carga. Para cada línea celular, se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas (**A**) y los resultados de la expresión relativa (**B**) se expresan como la media \pm DS de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$ vs. células control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Se observó que la inhibición de la actividad de ACSL4 por el uso del compuesto PRGL493 aumenta la expresión del RE α y del RA en las líneas celulares de cáncer de mama y de próstata, respectivamente. Además, PRGL493 genera una reducción en los niveles del transportador ABCG2 en ambas líneas celulares.

4. Análisis del uso de PRGL493 en combinación con fármacos terapéuticos

El tratamiento del cáncer de mama y de próstata sigue siendo un gran desafío en el campo de la oncología. A pesar de los avances en terapias, muchos pacientes desarrollan resistencia a los tratamientos estándar, aumentando el riesgo de recurrencia. El estudio de tratamientos combinados podría ofrecer nuevas estrategias para superar estas limitaciones. En ese contexto, investigamos a continuación el efecto de una combinación del inhibidor PRGL493 y fármacos terapéuticos sobre la proliferación de células MDA-MB-231 y PC-3.

En células de cáncer de mama MDA-MB-231 analizamos el efecto de la combinación de PRLG493 con diferentes compuestos utilizados clásicamente en la quimioterapia de este tipo de cáncer (Figura 15), tales como el cisplatino, la doxorubicina y el paclitaxel, cada uno con diferentes mecanismos de acción y ampliamente reconocidos en la práctica clínica (110). Las células fueron incubadas durante 72 horas con concentraciones submáximas de estos compuestos (cisplatino 1 μM , doxorubicina 0,025 μM y paclitaxel 0,1 μM) de manera individual o en combinación con PRGL493 10 μM .

Por otro lado, dado que se ha demostrado que la inhibición de ACSL4 en células MDA-MB-231 incrementa la expresión del RE α , estudiamos el efecto de PRGL493 en conjunto con 4-OHTAM, un modulador selectivo del RE.

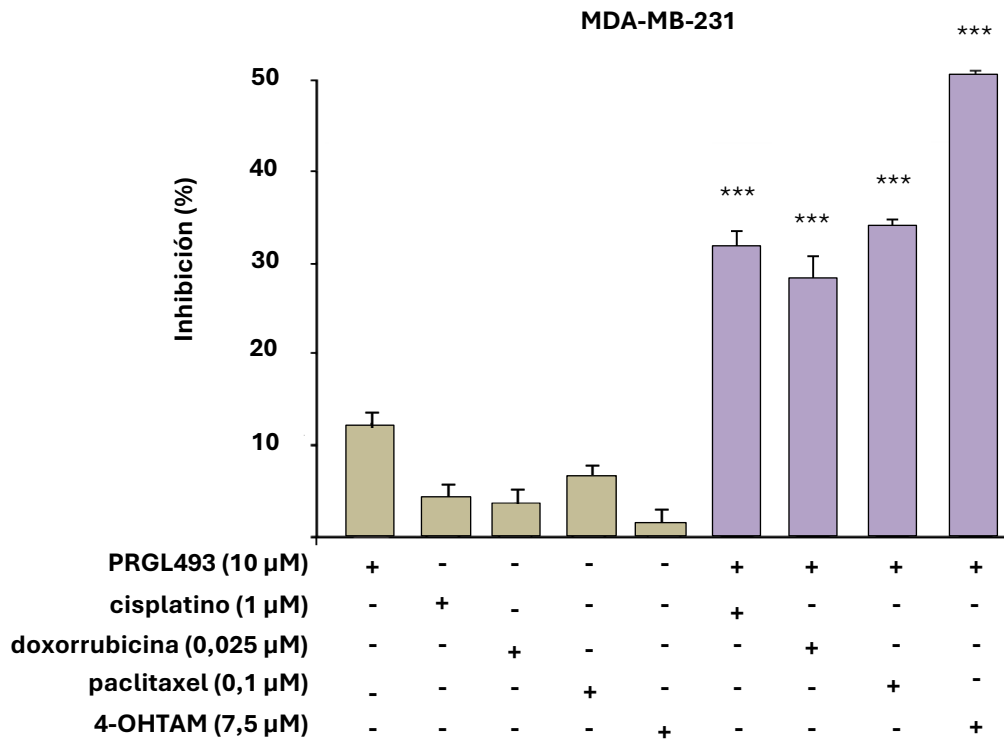


Figura 15. Ensayo de proliferación utilizando PRGL493 y agentes terapéuticos en la línea celular MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 fueron tratadas durante 72 horas con 4-OHTAM (7,5 µM), cisplatino (1 µM), doxorubicina (0,025 µM) o paclitaxel (0,1 µM) de manera individual o en combinación con PRGL493 (10 µM). Se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo de incorporación de BrdU, y se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación respecto a las células control. Los resultados se presentan como la media ± DS de tres experimentos independientes. ***p < 0,001 vs. respectivos compuestos ensayados individualmente. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

El tratamiento de células MDA-MB-231 con una combinación de cada fármaco quimioterapéutico evaluado y PRGL493 resultó ser significativamente más eficaz en inhibir la proliferación celular en comparación con cada compuesto por separado mostrando un efecto sinérgico.

Además, se observó que, en estas células, que son un modelo de TNBC y naturalmente insensibles al 4-OHTAM, el tratamiento con este fármaco en forma conjunta con 10 µM de PRGL493 produjo una inhibición significativa de la proliferación celular.

Por otro lado, considerando que el docetaxel es una de las opciones terapéuticas más utilizada en el tratamiento de pacientes con CRPC, evaluamos el efecto de este agente quimioterapéutico en conjunto con la inhibición de la enzima ACSL4 sobre la proliferación de células PC-3.

Para este estudio, las células se trataron durante 72 horas con concentraciones subóptimas de ambos compuestos, utilizando PRGL493 5 y 10 μM , y docetaxel 1 nM. Se evaluaron estos compuestos tanto de manera individual como combinada, y se evaluó la proliferación celular mediante la técnica de incorporación de BrdU (Figura 16).

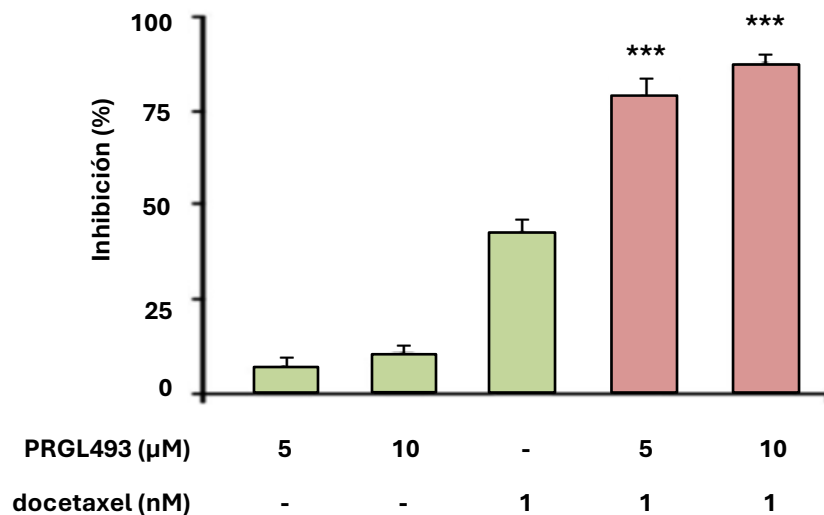


Figura 16. Ensayo de proliferación utilizando los compuestos PRGL493 y docetaxel en la línea celular PC-3. Células PC-3 fueron tratadas durante 72 horas con concentraciones 5 y 10 μM de PRGL493 y/o 1 nM de docetaxel. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de incorporación de BrdU, y se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación respecto a las células control. Los resultados se presentan como la media \pm DS de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$ vs. respectivos compuestos ensayados individualmente. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

El uso combinado de concentraciones subefectivas de PRGL493 (5 μM y 10 μM) con docetaxel muestra un efecto sinérgico significativo en la inhibición de la proliferación celular en comparación con los tratamientos individuales con cada droga.

Estos ensayos demuestran la capacidad de este nuevo inhibidor para sensibilizar las células a los agentes terapéuticos a dosis bajas que producen poco o ningún efecto *per se*. Estos resultados indicarían que el uso combinado de PRGL493 con otros agentes terapéuticos podría potenciar y mejorar la eficacia del tratamiento. Además, el uso de menores concentraciones de drogas podría ayudar a disminuir los efectos secundarios adversos asociados a su uso.

5. Análisis del efecto de PRGL493 sobre la vía mTOR

La vía mTOR es fundamental en el cáncer, ya que regula el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular. Su activación anormal contribuye a la progresión tumoral y la resistencia a las terapias en diversos tipos de cáncer. En estudios previos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la sobreexpresión de ACSL4 induce la activación de esta vía, lo que conduce a un aumento en diversos parámetros de agresividad tumoral (8). Dada la relevancia de dicha vía, se buscó estudiar el rol de ACSL4, mediante el uso del nuevo inhibidor, en un modelo de cáncer de próstata.

Se estudiaron entonces los niveles de expresión de distintos componentes de la vía PI3K/AKT/mTOR, inhibiendo la actividad de ACSL4. Para esto, se trataron células PC-3 con el compuesto PRGL493 (50 μ M) o con DMSO durante 48 horas. Del extracto total de proteínas, se analizó por western blot si existía variación en los niveles de las proteínas pAKT, pGSK3 α β , GSK3 α β y pS6 (Figura 17).

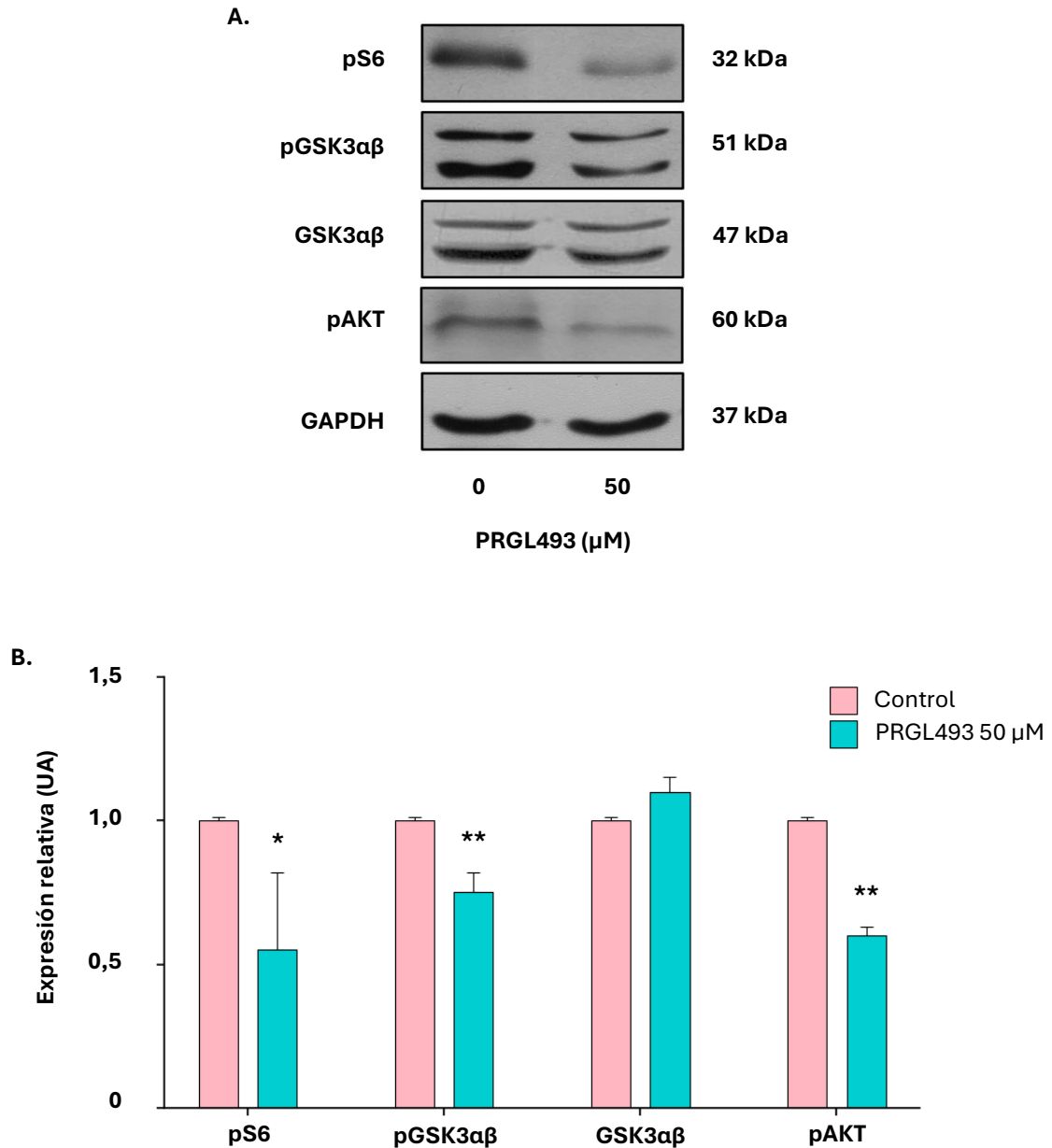


Figura 17. Efecto de PRGL493 sobre la expresión de proteínas de la vía mTOR. Células PC-3 fueron tratadas durante 48 horas con PRGL493 (50 μM) o vehículo (DMSO) como control. Se analizó por western blot los niveles proteicos de diferentes miembros de la vía mTOR: pS6, pAKT, pGSK3 $\alpha\beta$ y GSK3 $\alpha\beta$. Se muestran imágenes representativas de las bandas obtenidas (**A**). Las señales obtenidas fueron cuantificadas por densitometría y normalizadas con la de GAPDH (1/5000), tomada como control de carga (**B**). Los resultados de la expresión relativa a células control (panel derecho) se expresan como la media \pm DS de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. células control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Se observó que, luego de la inhibición de ACSL4, hubo una disminución significativa en los niveles de las proteínas pS6, pAKT y pGSK3 $\alpha\beta$, mientras que no se observaron variaciones en los niveles totales de la proteína GSK3 $\alpha\beta$.

De esta forma es posible concluir que la inhibición de la actividad de ACSL4 mediante PRGL493 permite disminuir los niveles de distintos efectores de la vía PI3K/AKT/mTOR, la cual tiene un papel esencial en el cáncer de próstata y otros tipos de cáncer, al regular el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular.

6. Impacto de la inhibición de ACSL4 por PRGL493 en la esteroidogénesis

6.1. Estudio del efecto de PRGL493 sobre la esteroidogénesis en línea celulares

Las hormonas esteroideas, como progesterona (P4) y testosterona, desempeñan roles fundamentales en la regulación de diversos procesos fisiológicos, incluyendo el crecimiento, la reproducción y la respuesta al estrés. La proteína StAR participa en un paso clave de la síntesis de esteroides, interviniendo en el transporte del colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde se convierte en sustrato para la biosíntesis de esteroides (66). La enzima ACSL4 cumple un rol en la esteroidogénesis a través de la regulación del metabolismo de AA y la producción de eicosanoides que regulan la expresión de StAR (21).

Se evaluó el efecto de PRGL493 sobre la producción de esteroides en la línea de células de Leydig murinas MA-10. Estas células producen P4 como principal esteroide. Las células fueron tratadas durante 3 horas con concentraciones variables de PRGL493 (entre 1 y 50 μ M) o con rosiglitazona 200 μ M. Luego, fueron estimuladas durante 1 hora con 8Br-AMPC 0,5 mM o con 22(R)-(OH)-colesterol, para posteriormente medir los niveles de P4 por RIA en el medio de cultivo (Figura 18).

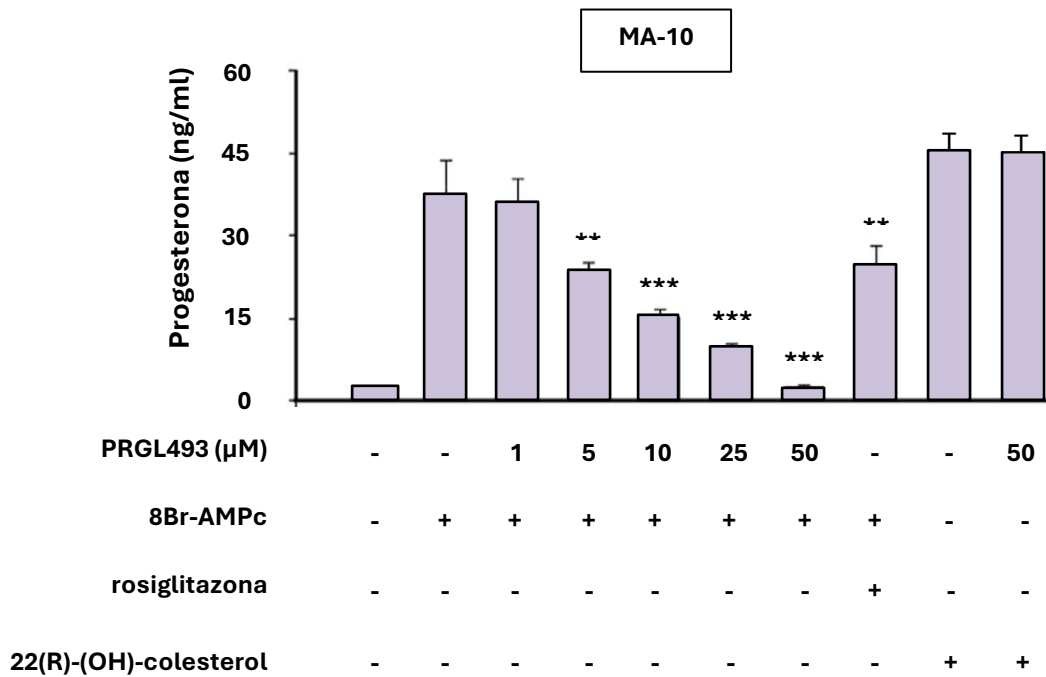


Figura 18. Medición de los niveles de progesterona por RIA en células MA-10. Células de la línea MA-10 fueron tratadas durante 3 horas con concentraciones variables del compuesto PRGL493 (entre 1 y 50 μM) o con rosiglitazona 200 μM. Luego, las células fueron estimuladas durante 1 hora con 8Br-AMPC 0,5 mM o con 22(R)-(OH)-colesterol 5 μM. Se recogió el medio de las células y se evaluó la producción de progesterona por RIA. Se graficaron los niveles de progesterona en ng/ml para cada condición ensayada. Los datos se presentan como la media ± DS de tres experimentos independientes. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. células estimuladas con 8Br-AMPC. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Se observó que PRGL493 produjo una inhibición dosis-dependiente de la síntesis de P4 inducida por el análogo permeable del AMPC, siendo estadísticamente significativa a partir de una concentración de 5 μM. La reducción en los niveles de P4 observada a esta concentración del compuesto fue comparable a la alcanzada con una concentración 200 μM de rosiglitazona, mientras que a concentraciones más altas de PRGL493, la inhibición fue aún mayor.

Por otro lado, se observó que PRGL493 no tuvo ningún efecto sobre la esteroidogénesis sustentada por 22(R)-(OH)-colesterol. Éste es un derivado del colesterol que puede atravesar las membranas mitocondriales sin necesidad de ser transportado por StAR y, por lo tanto, evitando el punto acción ejercido por ACSL4. La ausencia de efecto de PRGL493 en este contexto demuestra que su acción inhibitoria de

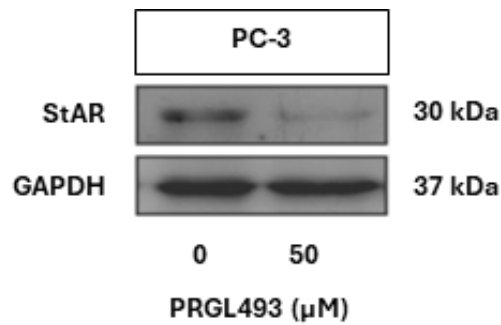
la esteroidogénesis no se debe a una alteración de las enzimas de biosíntesis de esteroides ni de la integridad mitocondrial.

Dado el efecto de ACSL4 en la regulación de la expresión de la proteína StAR, se buscó analizar si la inhibición de ACSL4 con PRGL494 modificaba los niveles de StAR en este modelo. Para ello, se utilizaron extractos de proteínas totales de células PC-3 tratadas en presencia o ausencia de PRGL493 en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, y se analizaron los niveles de StAR mediante western blot (Figura 19, A).

Posteriormente, para continuar el estudio de PRGL493 sobre la esteroidogénesis, se evaluó su efecto sobre la producción de P4 en células PC-3. Estas células tumorales de próstata son capaces de producir esteroides en bajas cantidades (167).

Las células PC-3 fueron tratadas con una concentración 50 μ M del compuesto o con vehículo (DMSO) durante 48 horas. Al finalizar el tratamiento, se recolectaron los medios de cultivo y se procedió a realizar la determinación de P4 por RIA. Debido a la baja cantidad de esteroides producidos por estas células, no se pudieron detectar niveles significativos, incluso tomando la máxima alícuota permitida según el protocolo de la técnica. Por ello, fue necesario concentrar los esteroides a partir de mayores volúmenes de medio. Los tratamientos se realizaron en frascos con un mayor número de células y se recolectaron volúmenes mayores de medio de cultivo. Estos fueron concentrados a través de columnas de fase reversa, utilizando éter sulfúrico para la elución. La fase eluída se secó bajo una atmósfera de nitrógeno y se disolvió posteriormente en un pequeño volumen para realizarse la determinación de P4 mediante RIA (Figura 19, B).

A.



B.

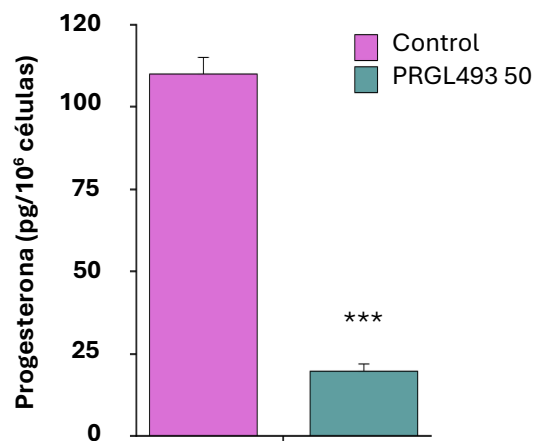


Figura 19. Medición de los niveles de progesterona y expresión de StAR en células PC-3 tratadas con PRGL493. Células de la línea PC-3 fueron tratadas durante 48 horas con PRGL493 (50 μM) o con DMSO como control. (A) Se obtuvieron los lisados celulares y se evaluaron por western blot los niveles proteicos de StAR y de GAPDH (como control de carga). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (B) El medio de cultivo fue recolectado, concentrado y resuspendido para ser utilizado en la determinación de los niveles de P4 por RIA. Los resultados se expresan como pg/10⁶ células y se muestra la media ± DS de tres experimentos independientes. ***p < 0,001 vs. células control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Se observó una disminución significativa en los niveles de P4 luego del tratamiento con el inhibidor, mostrando que la inhibición de ACSL4 por PRGL493 inhibe la esteroidogénesis también en esta línea celular.

Luego del tratamiento con PRGL493, se observó una disminución significativa en los niveles proteicos de StAR en las células PC-3.

En conjunto, la observación de una reducción en los niveles de P4 acompañada de una disminución en la expresión de StAR permite relacionar al inhibidor de ACSL4 con la inhibición de la esteroidogénesis *de novo*, un aspecto de gran relevancia para el tratamiento del cáncer de próstata agresivo.

6.2. Estudio del efecto de PRGL493 sobre los niveles hormonales *in vivo*

Con el objetivo de profundizar en la evaluación del impacto del nuevo inhibidor de ACSL4 sobre la esteroidogénesis, se procedió a estudiar su efecto en modelos *in vivo*, analizando si el inhibidor afecta los niveles de distintas hormonas esteroideas.

Para este estudio se trataron ratones macho BALB/c de treinta días de edad con una inyección intraperitoneal de PRGL493, en un rango entre 250 y 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, o con solución salina. A las 3 horas postratamiento se les inyectó hCG (300 unidades por ratón) en forma subcutánea, de modo de activar la esteroidogénesis testicular. Luego de 3 horas, los animales fueron sacrificados y se evaluaron los niveles de testosterona, P4, P5 y corticosterona, presentes en el plasma de los ratones. Los niveles de testosterona y P4 se evaluaron por RIA, los niveles de P5 por ELISA y los niveles de corticosterona por ensayo fluorométrico, tal como se detalla en la sección Metodología (Figura 20).

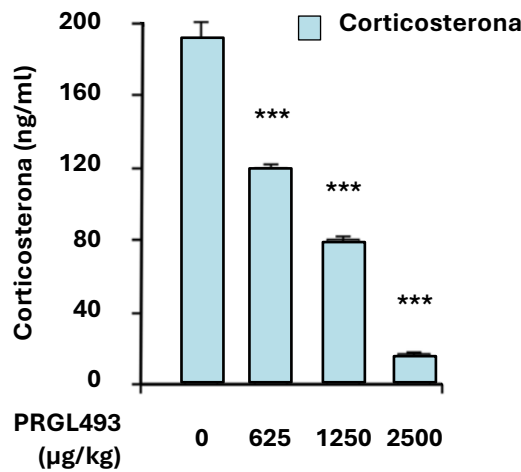
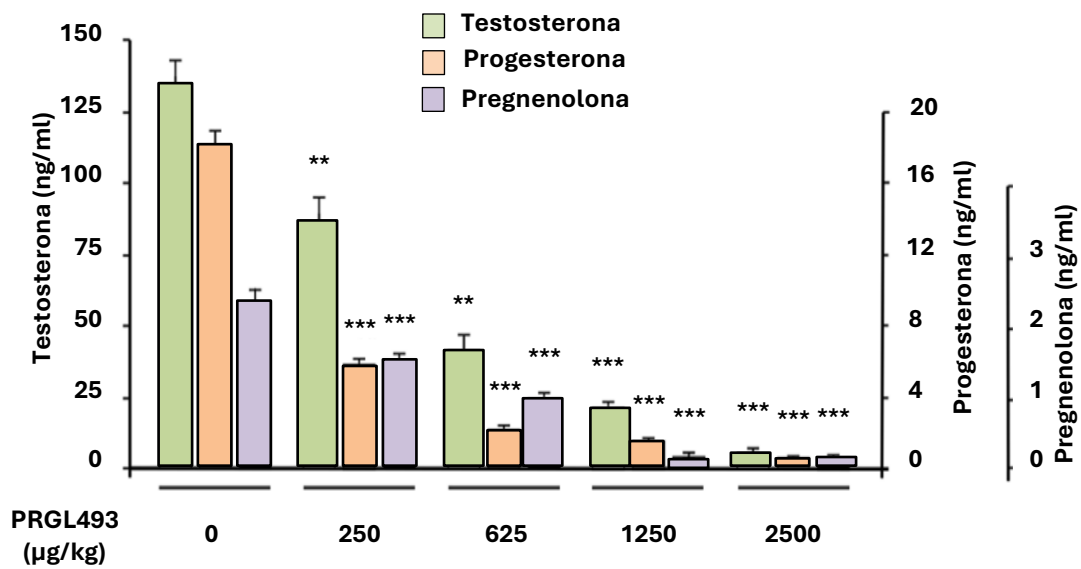


Figura 20. Evaluación de niveles hormonales en plasma de ratones tratados con PRGL493.

Ratones BALB/c machos de treinta días de edad fueron tratados con una inyección intraperitoneal de PRGL493 (rango de concentraciones: 250 - 2500 µg/kg de peso corporal) o de solución salina (control). A las 3 horas post-tratamiento se les inyectó hCG (300 U/ratón) de forma subcutánea, y 3 horas después fueron sacrificados, obteniéndose plasma para realizar las distintas mediciones hormonales. Los niveles de testosterona y progesterona fueron evaluados por RIA, los niveles de pregnenolona por ELISA, y los de corticosterona por ensayo fluorométrico. Los resultados se expresan como ng/ml de cada una de las hormonas y representan la media ± DS (n=3 para cada tratamiento). **p < 0,01 y ***p < 0,001 vs. ratones control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Para todas las concentraciones de PRGL493 probadas, se observó una disminución significativa en los niveles plasmáticos de testosterona, progesterona,

pregnenolona y corticosterona. En todos los casos, el efecto de PRGL493 fue dependiente de la dosis.

Nuestros resultados demuestran que el compuesto PRGL493, inhibidor de ACSL4, es capaz de inhibir la esteroidogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*.

7. Evaluación de la capacidad inhibitoria de PRGL493 en el crecimiento tumoral *in vivo*

Dados los resultados hasta aquí obtenidos, el siguiente paso fue analizar el efecto de PRGL493 sobre el crecimiento de tumores en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama y de próstata. Este estudio se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Hugo Ortega (Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Santa Fe, Argentina).

Se emplearon ratones *nude* de la cepa NLAE:NIH(S)Fox1^{nu} a los que se les inyectó en el flanco derecho una suspensión de células MDA-MB-321 (para el modelo de cáncer de mama) o de células PC-3 (para el modelo de cáncer de próstata). Cinco días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones que desarrollaron tumores se separaron aleatoriamente en dos grupos. Uno de ellos, recibió inyecciones intraperitoneales del inhibidor PRGL493 (250 µg/kg de peso animal) y el otro recibió inyecciones de vehículo (control) durante 43 o 34 días consecutivos para los tumores de mama y de próstata, respectivamente. Una vez por semana se monitoreó el volumen tumoral con calibre y se calculó el volumen tumoral (mm³) tanto para ratones control como para los tratados con el inhibidor, en ambos modelos de xenoinjerto, y se graficaron (Figura 21).

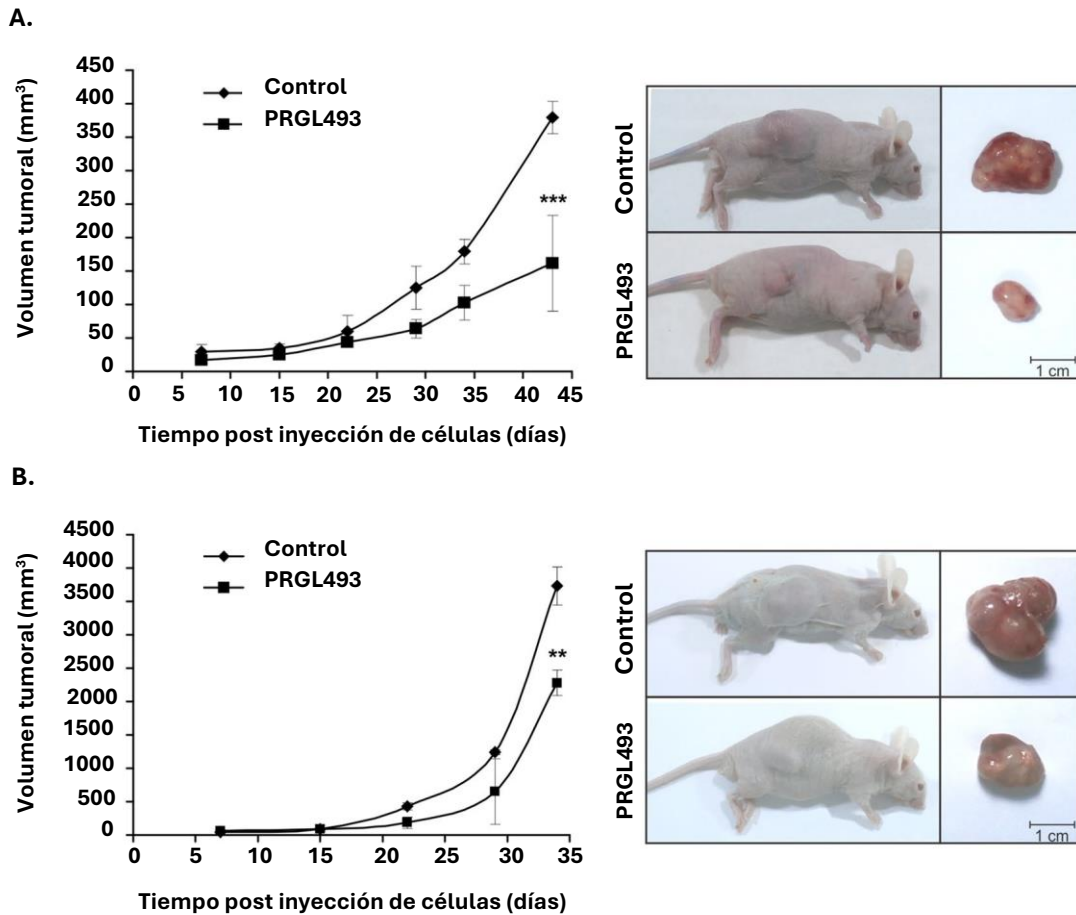


Figura 21. Efecto de PRGL493 en el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama y próstata. Ratones NLAE: NIH(S)Fox1^{nu} de 7 a 8 semanas de edad fueron inyectados en su flanco derecho con una suspensión de 5×10^6 células MDA-MB-231 (A) o PC-3 (B) mezcladas con Matrigel® Matrix (relación 3:1). A los 5 días posteriores, los ratones fueron asignados aleatoriamente a dos grupos para recibir inyecciones intraperitoneales diarias de PRGL493 (250 μ g/kg de peso corporal) o vehículo (control). Se realizaron mediciones del volumen tumoral y del peso corporal semanalmente. Se graficó el volumen tumoral (mm³) en función de los días posteriores a la inyección de la suspensión celular. Los valores representan la media \pm DS (n=4 para cada tratamiento de cada modelo de xenoinjerto). **p < 0,01 y ***p < 0,001 vs. ratones control (vehículo). Al finalizar el experimento, se fotografiaron los laterales de los ratones con las formaciones tumorales. Posterior a su sacrificio, los tumores fueron extraídos y fotografiados. Se muestran imágenes representativas. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Los resultados mostraron que el compuesto PRGL493 produjo disminución significativa en el volumen tumoral tanto en el modelo de cáncer de mama como en el de cáncer de próstata. Las imágenes de los laterales de los ratones y de los tumores

extraídos ilustran claramente la reducción en el tamaño tumoral debido al tratamiento del inhibidor. Durante el protocolo, los animales no mostraron signos de toxicidad ni efectos adversos relevantes.

Se realizó un análisis por inmunohistoquímica de los tumores extraídos de los ratones, con el fin de evaluar los niveles de expresión de Ki67, un marcador de proliferación celular, y de los receptores hormonales RE α y RA (Figura 22).

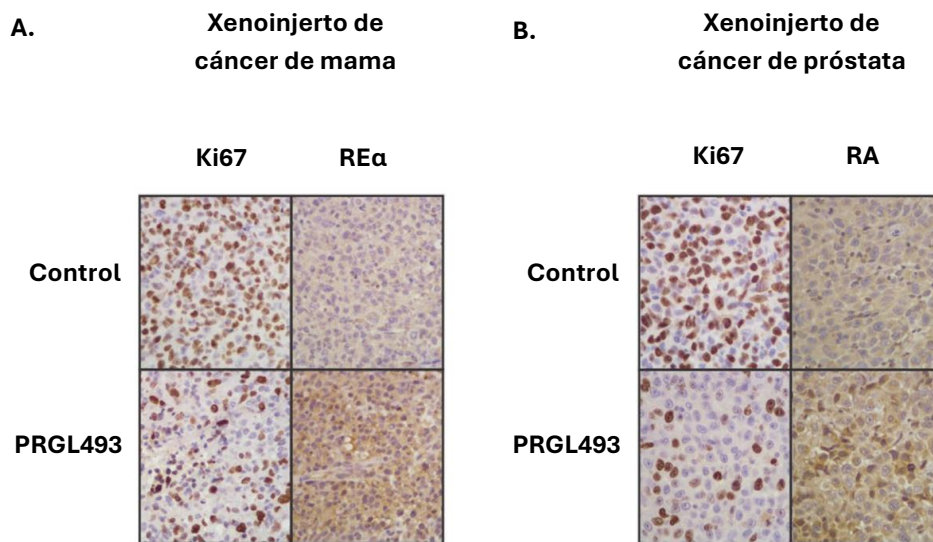


Figura 22. Evaluación por inmunohistoquímica del efecto de PRGL493 sobre la expresión de Ki67 y receptores hormonales en tumores de modelos de xenoinjerto de cáncer de mama y próstata. Se obtuvieron muestras de tejido tumoral luego del sacrificio de los ratones modelos de xenoinjerto de cáncer de mama (A) y de próstata (B). Se procesaron secciones tumorales histológicas de todos los grupos para inmunohistoquímica con el fin de localizar la expresión de las proteínas Ki67 (A y B), RE α (A) y RA (B). Se empleó el método de inmunoperoxidasa con estreptavidina-biotina. Se muestran imágenes representativas.

Se observó una menor expresión de Ki67 en tumores proveniente de ratones tratados con PRGL493, en ambos modelos de xenoinjerto, indicando que el compuesto fue capaz de disminuir la proliferación celular de estos tumores. Este hallazgo es consistente con lo observado sobre la proliferación de células tumorales *in vitro*.

En relación con los receptores hormonales, en los tumores de ratones tratados con el inhibidor se observó una mayor expresión del RE α en el modelo de xenoinjerto de

mama y del RA en el de próstata. Este resultado también concuerda con lo observado *in vitro* en células MDA-MB-231 y PC-3, respectivamente.

La correlación entre los modelos *in vivo* e *in vitro* fortalece la evidencia de la acción de PRGL493 sobre los mecanismos de proliferación y expresión de receptores hormonales en diferentes tipos de cáncer.

CAPÍTULO 2

Papel de ACSL4 y su inhibición
en el cáncer de ovario epitelial

El cáncer de ovario se encuentra entre las principales causas de muerte asociada a cáncer en mujeres alrededor del mundo. Si bien es la tercera causa de malignidad ginecológica, es la primera en cuanto a tasa de mortalidad, y suele ser diagnosticada en forma tardía, lo que empeora la prognosis (109). Entre los diversos subtipos histológicos, el cáncer de ovario epitelial (COE) es el más frecuente y relevante clínicamente, ya que representa aproximadamente el 90% de todos los casos de cáncer de ovario. A pesar de los avances en la comprensión de su patogénesis y el desarrollo de tratamientos, las tasas de supervivencia a largo plazo para las pacientes con cáncer de ovario epitelial siguen siendo bajas.

1. Análisis bioinformático entre la firma genética de ACSL4 y biopsias de COE

En trabajos previos, nuestro grupo ha estudiado mediante RNA-seq la firma de expresión génica inducida por la sobreexpresión de ACSL4 en cáncer de mama. Este análisis reveló que ACSL4 regula genes asociados a los procesos de invasión, migración, proliferación y transducción de señales, como así también a genes involucrados en la resistencia a drogas (8,132).

Para determinar si la firma de expresión genética obtenida previamente se observa en los tumores de pacientes, analizamos la correlación con los datos de RNAseq de 204 tumores de cáncer de ovario epitelial (GEO ID: GSE49997) (164). A partir de los datos obtenidos, se realizó un *heatmap* que muestra, mediante un gradiente colorimétrico, la correlación de los genes evaluados (Figura 23).

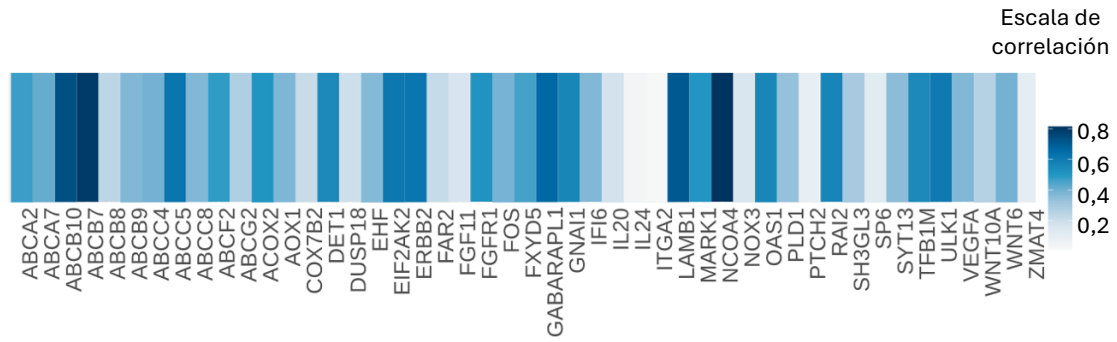


Figura 23. Correlación de ACSL4 y los genes de su firma genética en COE. *Heatmap* en el que, mediante una escala colorimétrica, se representan los valores de correlación entre ACSL4 y los genes de su firma genética en muestras de 204 pacientes con COE (GEO ID: GSE49997).

En las siguientes tablas se muestra, para algunos de los genes identificados en el análisis comparativo, el coeficiente de correlación, con su p-valor y su FDR que ajusta el p-valor para considerar múltiples pruebas simultáneas y controlar así el número esperado de falsos positivos (Tabla 5).

A.

Gen	Correlación con ACSL4	p-valor	FDR
NCOA4	0,8140637	8,50 ⁻⁵⁰	2,04 ⁻⁴⁸
LAMB1	0,70624313	2,82 ⁻³²	2,70 ⁻³¹
GABARAPL1	0,66241194	2,88 ⁻²⁷	2,31 ⁻²⁶
ERBB2	0,6218789	2,49 ⁻²³	2,31 ⁻²⁶
EIF2AK2	0,61283629	1,58 ⁻¹⁸	8,43 ⁻¹⁸
ULK1	0,6017617	1,40 ⁻¹⁷	6,71 ⁻¹⁷
RAI2	0,56503261	1,09 ⁻¹⁴	4,77 ⁻¹⁴
GNAI1	0,55696077	4,24 ⁻¹⁴	1,64 ⁻¹³
OAS1	0,55668394	4,44 ⁻¹⁴	1,64 ⁻¹³
DET1	0,54487409	3,02 ⁻¹³	9,93 ⁻¹³
TFB1M	0,5446939	3,10 ⁻¹⁴	9,93 ⁻¹³

B.

Gen	Correlación con ACSL4	p-valor	FDR
ABCA2	0,469498661	1,24 ⁻¹²	2,97 ⁻¹²
ABCA7	0,41438626	6,54 ⁻¹⁰	1,43 ⁻⁰⁵
ABCB10	0,73073359	1,68 ⁻³¹	2,02 ⁻³⁰
ABCB7	0,79237038	1,88 ⁻⁴¹	3,02 ⁻⁴⁰
ABCB8	0,23734006	0,0006114	0,00079317
ABCB9	0,370206449	4,67 ⁻⁰⁴	7,73 ⁻⁰⁴
ABCC4	0,393766983	5,19 ⁻⁰⁵	1,04 ⁻⁰⁵
ABCC5	0,620063214	3,63 ⁻¹⁹	2,18 ⁻¹⁸
ABCC8	0,368911113	5,24 ⁻⁰⁴	8,39 ⁻⁰⁴
ABCF2	0,479310129	3,58 ⁻⁰⁹	9,05 ⁻⁰⁹
ABCG2	0,271381411	8,29 ⁻⁰¹	0,00011365

Tabla 5. Análisis bioinformático comparativo entre ACSL4 y su firma genética en biopsias de pacientes con COE. Se presentan los genes que correlacionan con ACSL4 en 204 muestras de pacientes con COE (dataset GEO ID: GSE49997) obtenida por RNA-seq. Se indica para cada gen coeficiente de correlación, el p-valor y el FDR, para evaluar la significancia de cada correlación. En (A) se muestran los datos de algunos de los genes asociados a diversas vías, mientras que en (B) se muestran los genes de los transportadores ABC que correlacionan con ACSL4 en las muestras de COE.

El análisis comparativo reveló en COE una correlación positiva con ACSL4 para 32 de los 48 genes analizados, con un coeficiente de correlación máximo de 0,81 (p

<0,05). En particular, para el panel de genes correspondiente a proteínas asociadas a la resistencia a drogas, como los transportadores ABC (ATP- binding cassette), se obtuvo un coeficiente de correlación máximo de 0,46 ($p < 0,05$).

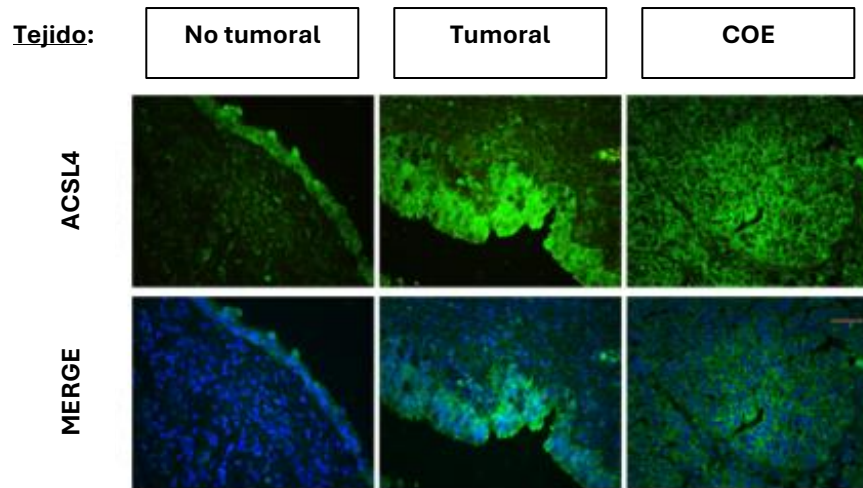
La correlación entre estos genes revela que la expresión de muchos de ellos, que están asociados a diversas vías de transducción de señales implicadas en la agresividad tumoral, así como a la resistencia a drogas, podrían ser regulados por ACSL4 en COE, como lo observado en cáncer de mama.

2. Expresión de ACSL4 en tejidos de ovario

Para avanzar en el estudio de la relación entre ACSL4 y el COE se trabajó en colaboración con el grupo de la Dra. Carmen Romero Osses, del Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, y el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se analizó por inmunohistoquímica los niveles de expresión proteica de ACSL4 en tejido de ovario. Se contó con muestras de tejido de ovario normal, tejido perteneciente a tumores de ovario en estadios iniciales, y tejido perteneciente a COE. Se realizó la tinción de los núcleos celulares con DAPI, y se detectó la proteína ACSL4 con un anticuerpo específico (Figura 24).

A.



B.

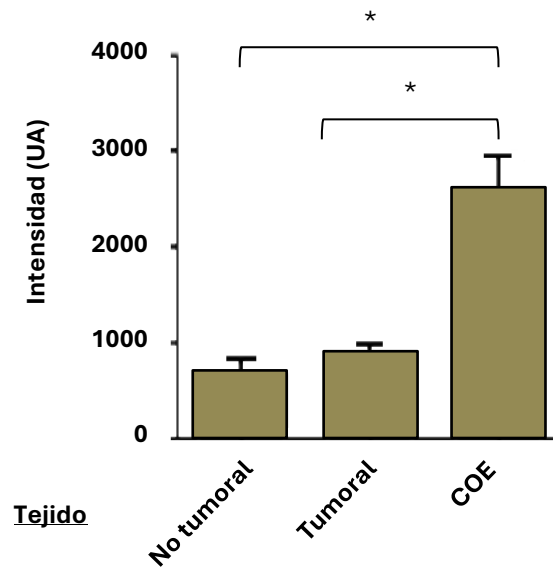


Figura 24. Análisis de la expresión de ACSL4 por inmunohistoquímica en tejidos de ovario.

Inmunohistoquímica en tejidos pertenecientes a muestras de biopsias ováricas de pacientes con ovario normal (No tumoral), tumores ováricos en estadios iniciales (Tumoral), y tumores clasificados como cáncer de ovario epitelial (COE). (A) Se muestran imágenes representativas. En azul se ven los núcleos teñidos con DAPI, mientras que en tinción verde se observa la localización de ACSL4. Se muestra el *merge* entre ACSL4 y DAPI. (B) La intensidad de fluorescencia observada fue cuantificada. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias como promedio \pm DS. * $p < 0,05$. Análisis estadístico Kruskal-Wallis y post-test de Dunn. N=4 para cada tipo de tejido.

El análisis de los tejidos a través de la inmunohistoquímica mostró niveles significativamente incrementados de ACSL4 en las muestras de COE, comparado con tejido normal de ovario o con muestras de tumores en fases iniciales.

3. Expresión de ACSL4 en líneas celulares de ovario

Dadas las diferencias en la expresión de ACSL4 observadas en los tejidos de pacientes, se analizó el rol de ACSL4 en el COE a través del empleo de diversas líneas celulares.

Para los estudios que se presentan a continuación se utilizaron las líneas celulares HOSE, A2780, OV-90 y SKOV-3. La línea celular HOSE pertenece a células epiteliales no tumorales de la superficie del ovario. La línea A2780 fue establecida a partir de un tumor de adenocarcinoma endometroide de ovario de una paciente no tratada. Por su parte, las células OV-90 son células tumorales de tipo endotelial de ascitis, aisladas del pulmón de una paciente no tratada con adenocarcinoma seroso papilar maligno de grado 3. La línea SKOV-3 fue establecida a partir de células de tipo endotelial establecida a partir de la ascitis de una paciente con adenocarcinoma de ovario. La línea es resistente a diversos fármacos.

Partiendo de cultivos de las cuatro líneas celulares, se realizó la extracción de las proteínas totales para cada una de ellas y se realizó un western blot utilizando anticuerpo anti-ACSL4 y anticuerpo anti- β -actina, como proteína para relativizar la cantidad de proteínas sembrada en cada calle del experimento (Figura 25).

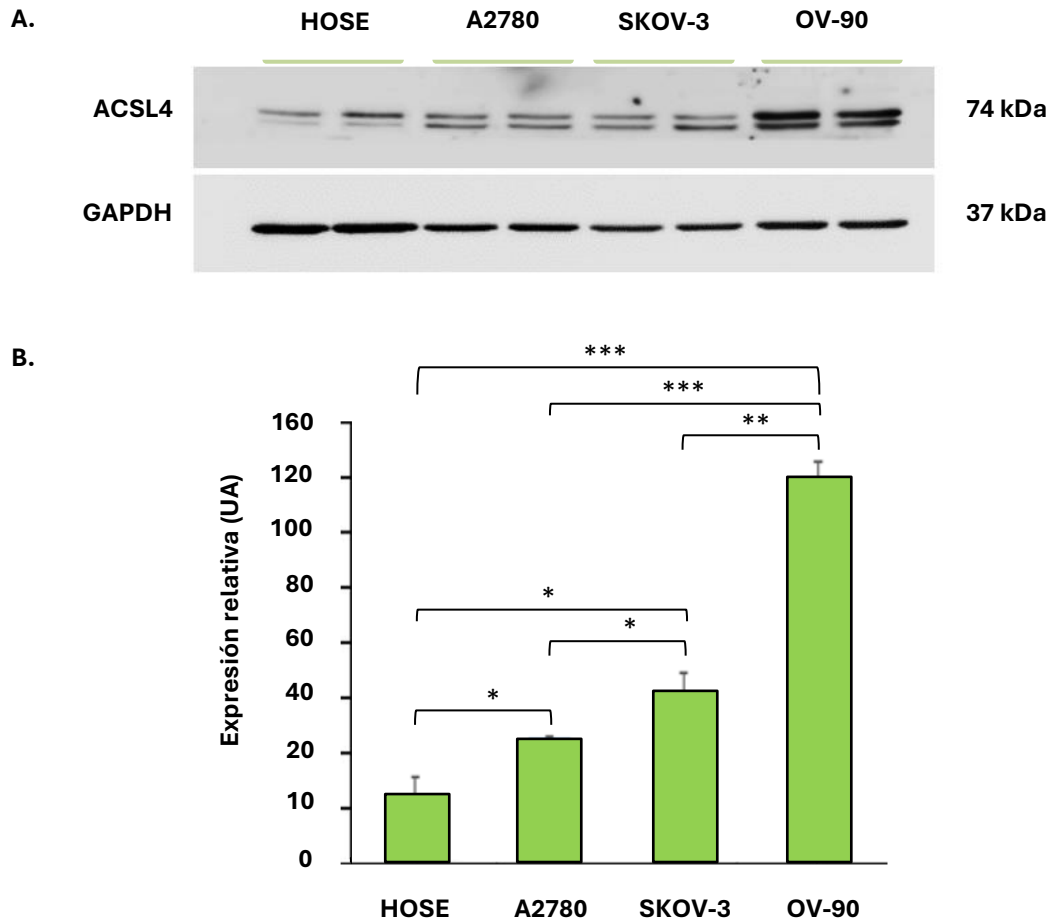


Figura 25. Análisis de la expresión de ACSL4 por western blot en líneas celulares de ovario. A partir de extractos de proteínas totales de la línea celular no tumoral HOSE, y las líneas celulares de COE (A2780, OV-90 y SKOV-3) se analizó la expresión de ACSL4 por western blot. Se muestran imágenes representativas (**A**). Se cuantificaron por densitometría las señales obtenidas y la expresión de ACSL4 se normalizó con la expresión de GAPDH, tomada como control de carga (**B**). Los resultados se expresan como la media \pm DS de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

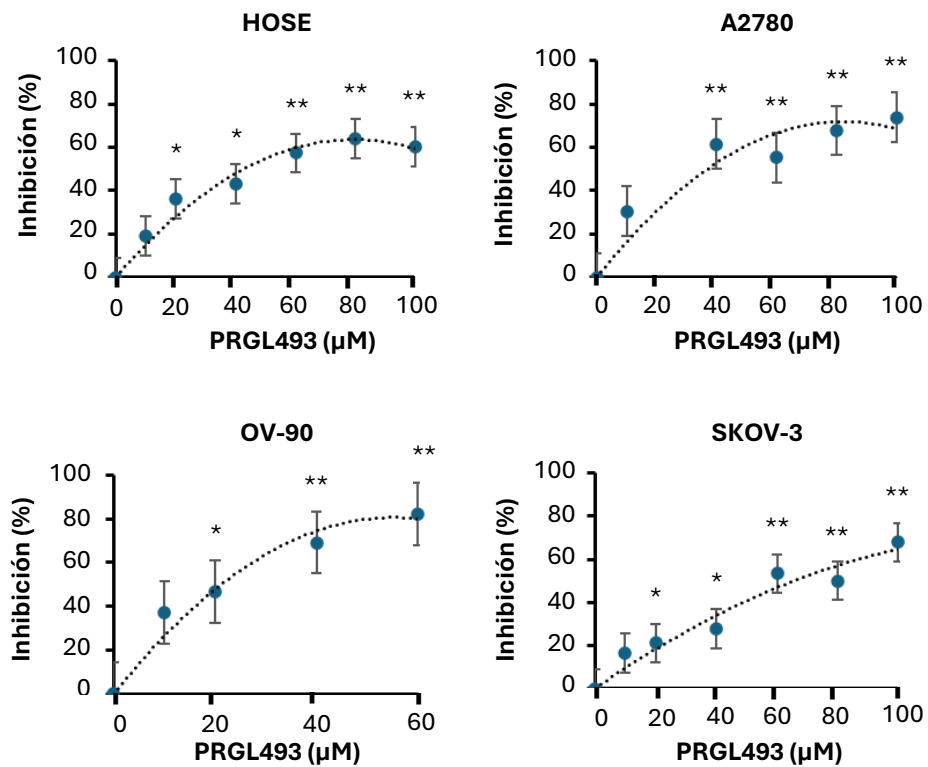
Se observó una mayor expresión de ACSL4 en las líneas celulares de COE en comparación con la línea no tumoral HOSE. Las células OV-90 presentaron la mayor expresión de la enzima.

4. Estudio del papel de ACSL4 en la proliferación celular en líneas celulares de ovario

Dado que observamos una mayor expresión de ACSL4 tanto en tejidos como en líneas celulares de COE, el siguiente paso fue estudiar si esta enzima tiene algún efecto en la proliferación celular de líneas celulares de ovario. Para ello, inhibimos la actividad de ACSL4 el nuevo compuesto que hemos desarrollado, PRGL493.

Se evaluó la proliferación por MTT en células HOSE, A2780, SKOV-3 y OV-90 a 96 horas, utilizando concentraciones del inhibidor PRGL493 en un rango entre 0 y 100 μM (Figura 26, A). A partir de los gráficos de inhibición en la proliferación se obtuvo para cada una de las líneas el valor IC₅₀ para el PRGL493 (Figura 26, B).

A.



B.

Línea celular	HOSE	A2780	SKOV-3	OV-90
IC50	48,12 μM	30,35 μM	65,44 μM	18,23 μM

Figura 26. Ensayo de proliferación celular en líneas celulares de ovario tratadas con el compuesto PRGL493. Líneas celulares de ovario HOSE, A2780, OV-90 y SKOV-3 fueron tratadas durante 96 horas con PRGL493, utilizando concentraciones entre 0 y 100 μM (A). Los resultados se representan como la media ± DS de 3 experimentos independientes. *p < 0,05, **p < 0,01 vs. células sin inhibidor. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls. (B) En la tabla se muestran los valores de IC50 calculados para las cuatro líneas celulares, determinados a partir de las curvas de proliferación celular con el compuesto PRGL493.

El tratamiento con el inhibidor PRGL493 produjo una disminución significativa en forma dosis-dependiente en la proliferación de las tres líneas de COE, siendo la línea OV-90 la más sensible al tratamiento, lo que coincide con su mayor expresión de ACSL4. Por su parte, la línea no tumoral HOSE también respondió al tratamiento con el compuesto PRGL493 de forma dosis-dependiente, pero con menor potencia que las líneas A2780 y

OV-90. Dicho resultado puede deberse a que, si bien la línea HOSE posee expresión de ACSL4, los niveles de la enzima son significativamente menores al de las líneas de COE. La línea SKOV-3 fue la de mostró menor sensibilidad al inhibidor con un mayor IC50 que las demás líneas celulares.

5. Análisis del uso de PRGL493 en combinación con fármacos terapéuticos en COE

Como ya se mencionó al comienzo de este capítulo, el tratamiento del COE representa un desafío clínico significativo debido a la resistencia a las terapias y a su alta tasa de recurrencia. Actualmente, entre los compuestos utilizados en su tratamiento se destacan el paclitaxel, el carboplatino y la doxorubicina, cada uno con diferentes mecanismos de acción y ampliamente reconocidos en la práctica clínica. El estudio de tratamientos combinados podría ofrecer nuevas estrategias para superar estas limitaciones. En ese contexto, investigamos a continuación el efecto de una combinación del inhibidor PRGL493 y fármacos terapéuticos sobre la proliferación de células SKOV-3.

Para analizar el efecto combinado del compuesto PRGL493 y los quimioterapéuticos, se comenzó estudiando el impacto de cada uno de ellos en la proliferación celular de la línea SKOV-3. Se realizaron curvas de inhibición de proliferación celular para determinar la concentración adecuada de cada compuesto. Así se determinaron las concentraciones subefectivas necesarias para avanzar en el análisis de los efectos combinados de las drogas junto con el inhibidor PRGL493.

Se trabajó con carboplatino 1 mg/l, paclitaxel 0,15 nM y doxorubicina 0,027 μ M. Las células fueron incubadas con las drogas durante 96 horas, de manera individual o en combinación con PRGL493 10 μ M. Luego se evaluó la proliferación celular por ensayo de MTT para cada una de las condiciones (Figura 27).

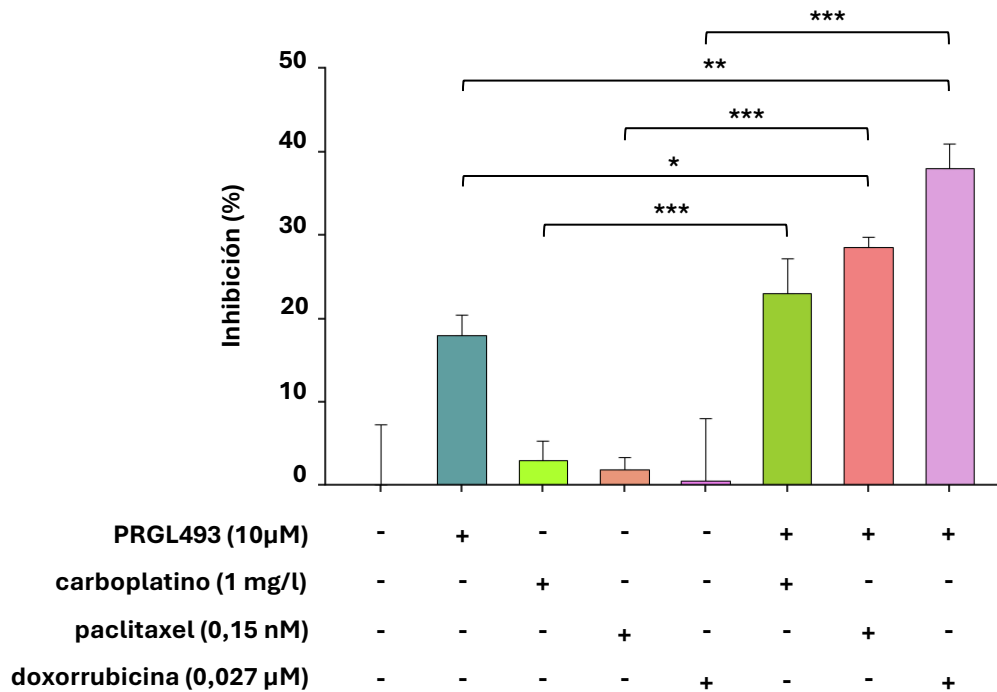


Figura 27. Ensayo de proliferación utilizando PRGL493 y agentes terapéuticos en la línea celular de ovario SKOV-3. Células SKOV-3 fueron tratadas durante 96 horas con carboplatino 1 mg/l, paclitaxel (0,15 nM) o doxorubicina (0,027 µM) de manera individual o en combinación con PRGL493 (10 µM). Se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo de MTT, y se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación respecto a las células control (sin tratamiento). Los resultados se presentan como la media ± DS de tres experimentos independientes. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. respectivos compuestos ensayados individualmente. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman–Keuls.

El tratamiento de células SKOV-3 con una combinación de cada fármaco quimioterapéutico evaluado y PRGL493 resultó ser significativamente más eficaz en inhibir la proliferación celular en comparación con cada compuesto por separado.

De los resultados obtenidos al momento en los ensayos combinatorios entre los terapéuticos de uso en el COE y el compuesto PRGL493 se observa que el inhibidor de ACSL4 permite sensibilizar las células tumorales a compuestos terapéuticos. Se puede concluir que, en las células SKOV-3 de COE, la combinación entre dosis subóptimas del compuesto PRGL493 y de los compuestos paclitaxel y doxorubicina generaría un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación celular.

6. Efecto del compuesto PRGL493 en la migración celular en el COE

Evaluamos el papel de ACSL4 en la migración celular en COE. Para ello, empleamos el compuesto inhibidor de su actividad y evaluamos su efecto mediante un ensayo de cierre de herida en la línea celular SKOV-3. Las células en confluencia fueron tratadas con una concentración 50 μ M de PRGL493, o con vehículo, durante 48 horas. Se prosiguió de acuerdo con el protocolo anteriormente mencionado y se evaluó el cierre de herida hasta un tiempo final de 20 horas, teniendo la precaución de no exceder su tiempo de división. La cuantificación del cierre de herida se realizó graficando la distancia entre los márgenes de cada una de las heridas al comienzo del experimento y a las 20 horas (Figura 28).

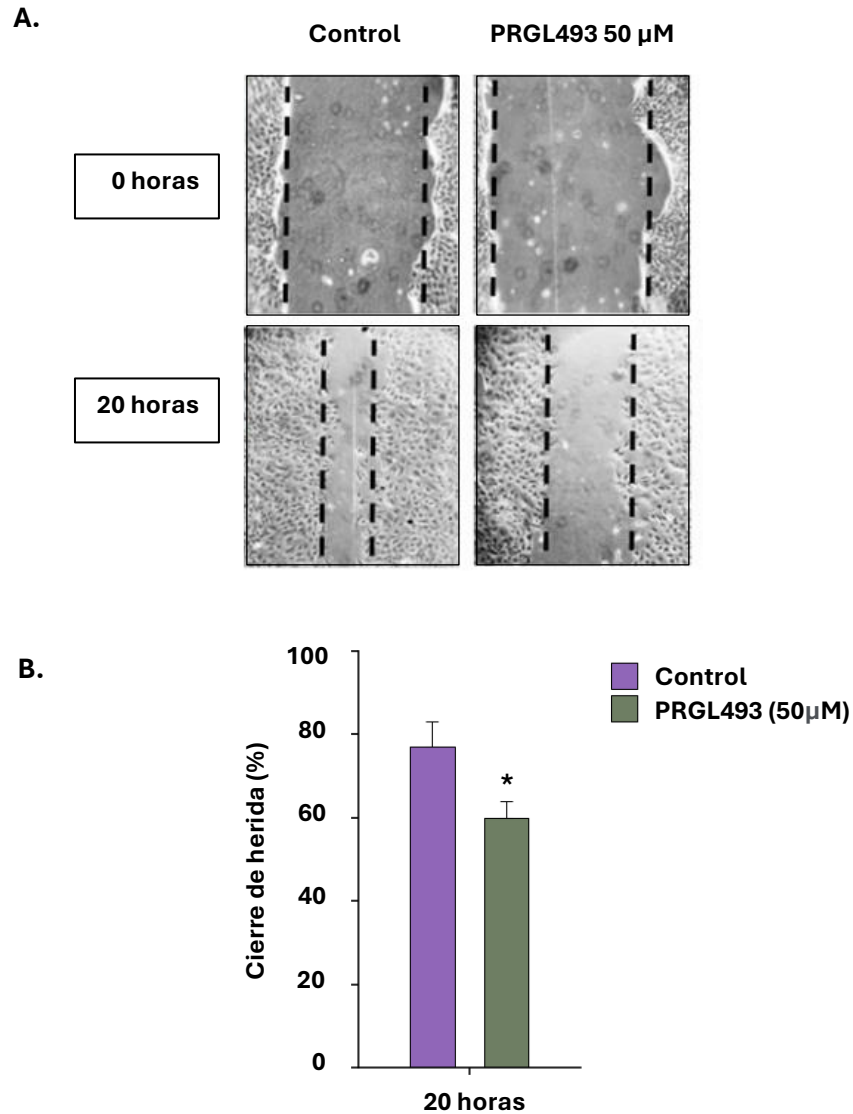


Figura 28. Ensayo de migración celular por cierre de herida en células SKOV-3 tratadas con PRGL493. Células SKOV-3 fueron tratadas durante 48 horas con PRGL493 50 μ M o con DMSO (control). Luego de la incubación, con las células en total confluencia, se realizó la herida en cada pocillo tomando ese momento como tiempo 0. El ensayo se continuó hasta un tiempo final de 20 horas. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los tiempos (**A**). Se cuantificó la distancia entre las márgenes de la herida con el programa *ImageJ*. Los resultados se presentan como porcentaje de cierre de herida para cada tiempo para ambas condiciones (**B**). Media \pm DS de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Se observaron diferencias significativas en el cierre de herida de las células tratadas respecto a las células control, permitiendo concluir que la inhibición de ACSL4 por el compuesto PRGL493 inhibe la migración celular en células SKOV-3 de COE.

7. Estudio funcional de los transportadores ABC en COE

Si bien la resistencia a los tratamientos con quimioterapéuticos actuales es un proceso multifactorial, es sabido que tanto la expresión como la actividad de los transportadores multidrogas juega un rol clave debido al eflujo de las drogas (9). Los transportadores de la familia ABC desempeñan un papel crucial en la resistencia a tratamientos al facilitar la expulsión de agentes terapéuticos de las células cancerosas. Como hemos mencionado, la expresión de ACSL4 en cáncer de mama se correlaciona positivamente con la expresión de algunos de estos transportadores, en particular ABCG2 (9).

Evaluamos seguidamente si en COE existe una relación entre la actividad de ACSL4 y los transportadores de la familia ABC. Para ello, se realizaron ensayos de eflujo en las líneas celulares SKOV-3 y OV-90 empleando el inhibidor PRGL493.

7.1. Eflujo de doxorrubicina con PRGL493

Se realizó el ensayo de acumulación intracelular y eflujo de doxorrubicina, un compuesto fluorescente que puede usar diferentes transportadores con diversos grados de afinidad, incluyendo ABCG2. Las células SKOV-3 y OV-90 fueron tratadas durante 48 horas con concentraciones 25 y 50 μM de PRGL493, o con DMSO como vehículo para la condición control. Posteriormente, se removió el medio, se lavó y se procedió al agregado de solución buffer fisiológico conteniendo doxorrubicina 10 μM . Se incubó durante 3 horas a 37°C a resguardo de la luz. Luego se lavó y se agregó solución buffer fisiológico libre de doxorrubicina, y se esperó durante 30 minutos. Se montaron los vidrios y se observaron al microscopio de epifluorescencia a 480 nm, tomando fotos con el aumento 40x para su posterior cuantificación de la fluorescencia (Figura 29, A). Se analizó el eflujo de doxorrubicina a través de la cuantificación de la fluorescencia de las células relativizada al área para cada uno de los tratamientos en las líneas OV-90 y SKOV-3 (Figura 29, B).

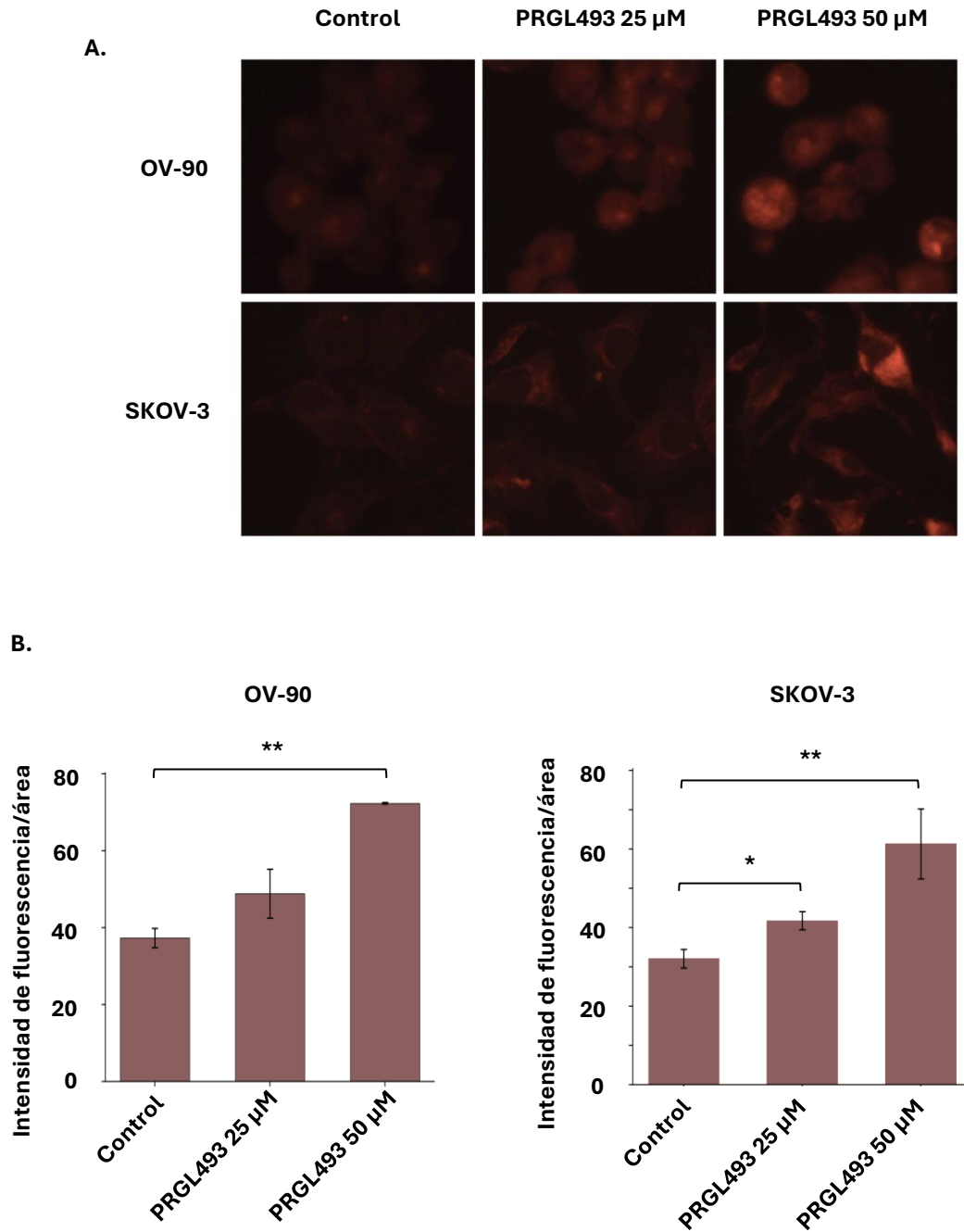


Figura 29. Ensayo de eflujo de doxorubicina en las líneas OV-90 y SKOV-3 tratadas con PRGL493. En vidrios cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, se plaquearon células de las líneas SKOV-3 y OV-90, en densidades de 6×10^4 y 8×10^4 , respectivamente. Las células fueron tratadas por 48 horas con PRGL493 (25 y 50 μM), usando DMSO (vehículo) en células control. Luego, se incubaron los vidrios con doxorubicina 10 μM en buffer fisiológico durante 3 horas, en estufa a 37°C protegido de la luz. Cumplido el tiempo, se lavó y se adicionó en cada pocillo buffer fisiológico. Pasados 30 minutos, se montaron los vidrios y se observaron al microscopio de epifluorescencia 40X. Se tomaron fotos que fueron cuantificadas con el programa de análisis de

imágenes *ImageJ*. Se muestran imágenes representativas (**A**). Se graficó la intensidad de fluorescencia relativizada al área para las condiciones control y tratadas con PRGL493 (**B**). Los datos se presentan como la media \pm DS de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. células control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Los resultados mostraron una mayor acumulación de doxorrubicina en las células previamente expuestas a PRGL493 en comparación con el tratamiento con vehículo, lo que indica una menor expulsión del compuesto.

7.2. Eflujo de Hoechst con PRGL493

Para corroborar este hallazgo, se realizaron ensayos adicionales sobre la actividad de los transportadores ABC utilizando Hoechst 33342, un compuesto fluorescente eficientemente transportado por ABCG2.

Células de las líneas de COE OV-90 y SKOV-3 se plaquearon en cubreobjetos. Se incubaron con el inhibidor PRGL493 en las concentraciones 25 y 50 μM , usando DMSO para la condición control. Se lavó y se agregó buffer fisiológico conteniendo Hoechst 33342 en concentración 5 $\mu\text{g/ml}$, incubando por 30 minutos en estufa a 37°C, al reparo de la luz. Cumplido el tiempo, se lavó y se agregó buffer fisiológico, para evaluar el eflujo por 30 minutos. Luego, se montaron los vidrios y se observaron al microscopio de epifluorescencia, tomando fotos con el aumento 40X para cada una de las condiciones en ambas líneas (Figura 30, A). Se analizó el eflujo de Hoechst a través de la cuantificación de la fluorescencia de las células, relativizada al área, para cada uno de los tratamientos en las líneas OV-90 y SKOV-3 (Figura 30, B).

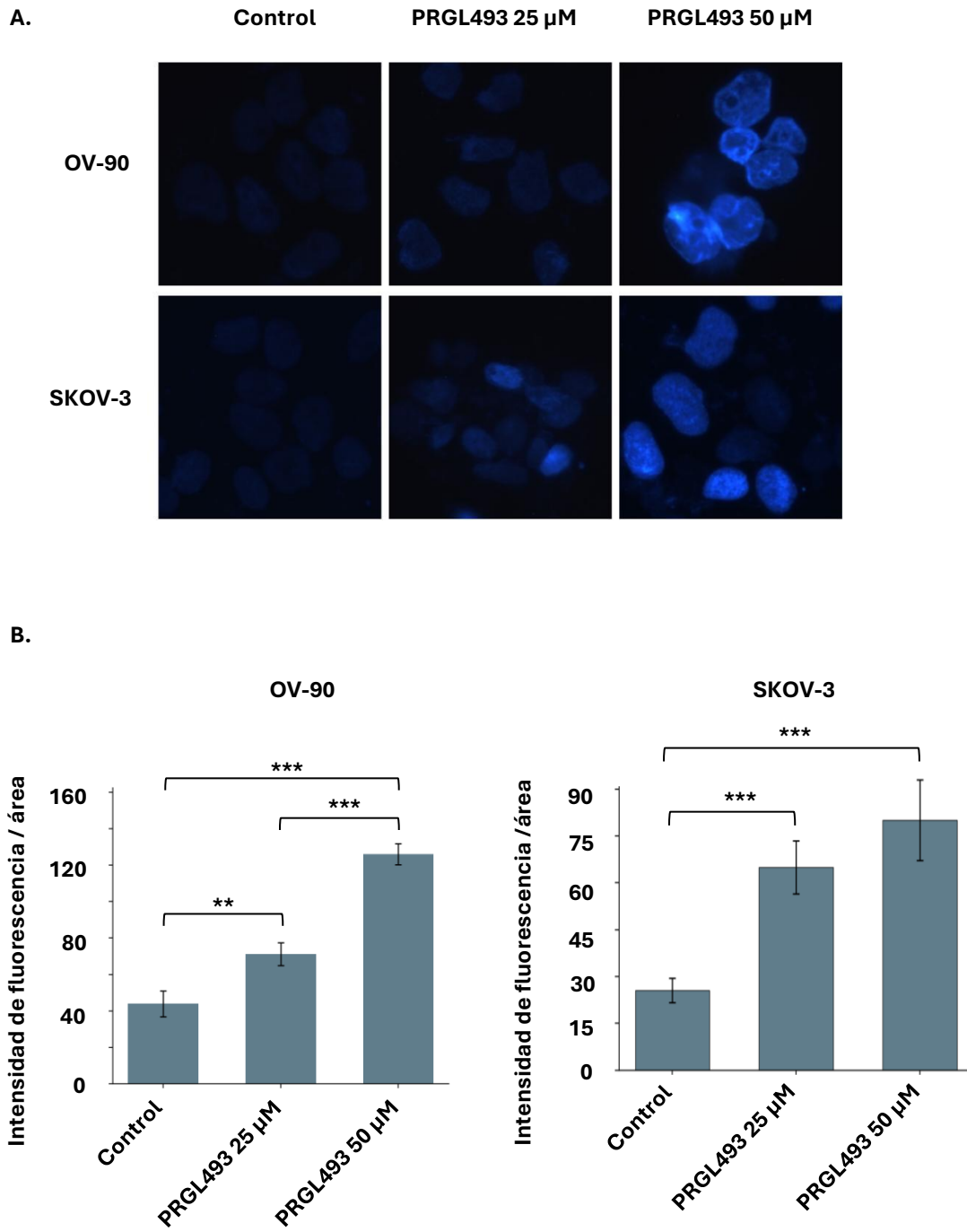


Figura 30. Ensayo de eflujo de Hoechst en las líneas OV-90 y SKOV-3 tratadas con PRGL493.

En vidrios cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, se plaquearon células de las líneas SKOV-3 y OV-90, en densidades de 6×10^4 y 8×10^4 , respectivamente. Las células fueron tratadas por 48 horas con el compuesto PRGL493 (25 y 50 μ M) o con DMSO (vehículo) como control. Luego del tratamiento, se incubaron los vidrios con Hoechst 5 μ g/ml en buffer fisiológico durante 30 minutos, en estufa a 37°C protegido de la luz. Cumplido el tiempo, se lavó con PBS 1X y se adicionó en cada pocillo buffer fisiológico. Pasados 30 minutos, se montaron los vidrios y se observaron al microscopio de epifluorescencia 40X. Se tomaron fotos para cada una de las tres

condiciones en cada línea celular y fueron cuantificadas con el programa de análisis de imágenes *ImageJ*. Se muestran imágenes representativas (**A**). Se graficó la intensidad de fluorescencia relativizada al área para las condiciones control y tratadas con PRGL493 (**B**). Los datos se presentan como la media \pm DS de tres experimentos independientes. **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. células control. ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Los resultados mostraron un aumento en los niveles intracelulares de Hoechst 33342 en las células previamente expuestas a PRGL493 en comparación con las células control, lo que indica una menor expulsión del compuesto.

La reducción del eflujo de doxorubicina y Hoechst 33342 en células de COE tras el tratamiento con PRGL493, inhibidor de ACSL4, indica una relación positiva entre la actividad de esta enzima y la actividad de los transportadores ABC. Esto sugiere que este inhibidor puede sensibilizar a estas células a los tratamientos quimioterapéuticos.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se ha descrito el desarrollo y caracterización de un nuevo inhibidor de la enzima ACSL4. Los resultados obtenidos proporcionan evidencia sólida de la eficacia de PRGL493 como inhibidor de la esteroidogénesis y del crecimiento tumoral en cáncer de mama y próstata. Además, hemos descrito la acción de este inhibidor en células tumorales de COE. La capacidad de PRGL493 para sensibilizar las células tumorales a los tratamientos quimioterapéuticos y hormonales refuerza su potencial como un agente terapéutico prometedor. A continuación, se discutirá en detalle la relevancia y el impacto de estos hallazgos.

1. CAPÍTULO 1

1.1. Desarrollo, optimización y caracterización de PRGL493.

Como hemos descrito, ACSL4 es un blanco terapéutico para un conjunto de enfermedades incluido el cáncer. A lo largo de estos años se han incrementado considerablemente las publicaciones que estudian a esta enzima en una diversidad muy amplia de patologías, en especial en el área de oncología y en aquellas donde se ha estudiado a la ferroptosis como mecanismo implicado. Por esta razón se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevos inhibidores de ACSL4 con potencial terapéutico.

Al comienzo del desarrollo de esta tesis, solo dos compuestos eran utilizados ampliamente en los estudios relacionados con la actividad de las ACSL como inhibidores de la actividad enzimática. El primer compuesto utilizado como inhibidor de estas enzimas fue triacsina C, un metabolito fúngico que inhibe principalmente a ACSL1 y ACSL4 al competir con los ácidos grasos para unirse a su dominio catalítico, mientras que tiene menor efecto sobre ACSL5 (149). Además, la triacsina C es tóxica para las células a altas concentraciones y su cadena poliinsaturada dificulta las propiedades farmacocinéticas y de penetración celular.

Las tiazolidinedionas (TZDs), familia de compuestos que son agentes sensibilizadores a la insulina de uso oral utilizados para el tratamiento de la diabetes tipo

2, también fueron descritos como inhibidores de estas enzimas. Sin embargo, estos compuestos son agonistas de los receptores PPAR, que regulan múltiples genes del metabolismo lipídico. Estos medicamentos han demostrado tener mejor efecto terapéutico y control glucémico en el tratamiento de la diabetes, pero también reacciones adversas. Los eventos cardiovasculares son actualmente los eventos adversos más graves. La rosiglitazona ha sido restringida o incluso retirada del mercado en la mayoría de los países debido a preocupaciones sobre su seguridad cardiovascular, aunque se ha demostrado su efecto beneficioso sobre la resistencia a la insulina. Por lo tanto, su uso debe ser evaluado cuidadosamente por médicos y pacientes, sopesando los posibles beneficios terapéuticos frente a los riesgos potenciales para la salud cardiovascular (168).

De los compuestos mencionados ninguno es selectivo. Como mencionamos, se ha intentado producir un nuevo inhibidor en base a la estructura de la triacsina C mediante el diseño racional de fármacos, pero hasta el día de hoy no se ha logrado obtener un compuesto nuevo selectivo para la inhibición de la enzima.

Además, la eficacia inhibitoria de los inhibidores de las ACSLs varía según las organelas subcelulares, lo que podría estar relacionado con la localización específica de cada miembro de las ACSLs en la célula. La N-etilmaleimida (NEM), que afecta residuos de cisteína en proteínas, inhibe la actividad de ACSL4 en un 47% en las fracciones de MAM (membranas asociadas a mitocondrias) y en un 28% en el retículo endoplásmico aislado del hígado de rata. Por otro lado, el troglitazone inhibe la actividad de ACSL en mitocondrias y microsomas aislados del hígado de rata en un 58% y 61%, respectivamente (169). La triacsina C reduce la actividad de ACSL en aproximadamente un 60% en mitocondrias, MAM y microsomas de manera similar (19).

Por lo tanto, la búsqueda de nuevos inhibidores de ACSL4 con potencial terapéutico consistió en el objetivo de este trabajo de tesis doctoral. El desarrollo del nuevo inhibidor incluyó una serie de pasos para seleccionar las moléculas candidatas. Se optó por realizar el modelado estructural de la enzima y luego, mediante cribado *in silico*, identificar y optimizar compuestos que puedan interactuar eficazmente con el dominio GATE de entrada del sustrato de ACSL4. Esta estrategia permite identificar compuestos con estructuras químicas diversas que podrían no ser considerados en el diseño racional.

No existen cristales de las enzimas ACSL humanas debido a la dificultad en la obtención de proteínas recombinantes de calidad para cristalografía y a que estas enzimas actúan preferentemente en un entorno lipídico. Por lo tanto, se optó por modelar por homología la estructura a partir del cristal de la proteína *Thermus thermophilus HB8* (17) utilizando el programa MODELLER (170,171). Los programas disponibles para el modelado de estructuras han mejorado continuamente a lo largo de estos años. Hoy en día, la estructura modelada de ACSL4 está disponible en la base de datos de proteínas Alphafold (172).

Hisanaga y col. (17) describieron la cristalografía de la acil-CoA sintetasa de *Thermus thermophilus HB8*, donde determinaron diferentes dominios relevantes a la actividad enzimática de ACSL (17). Uno de estos dominios es el sitio de unión al sustrato que determina la especificidad de las ACSL por el tipo de ácido graso que utilizan como sustrato. Este dominio GATE es un túnel hidrofóbico al cual el ácido graso accede, y la estructura de este dominio a nivel de aminoácidos y espacialmente determina a especificidad por el sustrato. En particular, se seleccionó un aminoácido perteneciente a la entrada a este túnel para realizar el *docking* y cribado de las moléculas. Por lo tanto, la estrategia se centró en seleccionar una molécula que interfiriera con el acceso del sustrato al GATE. Se utilizó la biblioteca Enamine, que contiene más de 400.000 estructuras de diferentes compuestos. Esta biblioteca es ampliamente utilizada en el cribado virtual y otras etapas del desarrollo de fármacos debido a la diversidad y calidad de sus compuestos. Los compuestos están disponibles en formatos que facilitan el cribado de alto rendimiento (HTS) y el cribado virtual. Esto incluye información estructural, datos de pureza y disponibilidad en cantidades adecuadas para ensayos experimentales.

A través de estos estudios, se seleccionaron los 10 primeros compuestos que presentaron mayor afinidad en el *docking* virtual. Estos compuestos fueron obtenidos de la empresa Enamine y para determinar su capacidad de inhibición se realizaron inicialmente diversos ensayos preliminares. De estos estudios preliminares seleccionamos uno para realizar su caracterización y optimización. Este compuesto fue modificado para mejorar su solubilidad en solventes orgánicos. La modificación que se realizó fue una acetilación. La acetilación de fármacos es una modificación química que puede influir significativamente en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de un compuesto (173,174). Este proceso implica la adición de un

grupo acetilo (-COCH₃) a una molécula, lo cual puede tener varias utilidades clave. La acetilación puede aumentar la solubilidad de un fármaco en lípidos, facilitando su absorción a través de las membranas biológicas y mejorando su biodisponibilidad. En el caso de la ACSL4, esto representa una ventaja dada su localización subcelular y el entorno lipídico en que cumple su función. También puede proteger al fármaco de la degradación metabólica rápida, prolongando su vida media y permitiendo una dosificación menos frecuente. Es importante destacar que la actividad inhibitoria del compuesto no fue afectada por esta modificación.

La validación de la actividad inhibitoria del compuesto se realizó a través de ensayos con la proteína purificada y en ensayos de actividad en células utilizando diferentes modelos de cáncer y esteroideogénicos. Para evaluar la efectividad del inhibidor utilizamos como compuesto testigo a la rosiglitazona. Para los ensayos *in vitro*, la producción de ACSL4 recombinante en bacterias genera cuerpos de inclusión y dificulta obtener la enzima en las condiciones ideales para medir su actividad. Por esta razón, se optó por expresar y purificar la proteína en el modelo de células HEK-293. Esto permitió obtener la enzima de manera que refleje más fielmente su actividad en las condiciones en las que se encuentra en las células eucariotas. La medición de la actividad enzimática de las ACSL es otro desafío, dado que no existe un método colorimétrico efectivo para poder medir la actividad enzimática. Por lo tanto, los estudios de estas enzimas se realizan a través de la esterificación del sustrato marcado radiactivamente, lo cual da mayor sensibilidad al ensayo. A través de los ensayos de actividad *in vitro* pudimos determinar que el compuesto efectivamente inhibe a la enzima ACSL4 en forma dosis dependiente y con igual o mayor eficacia que rosiglitazona.

En células tumorales y esteroideogénicas demostramos la inhibición de la actividad de la enzima al medir la formación de araquidonil-CoA (AA-CoA). En las tres líneas celulares observamos una disminución significativa en la producción de [³H]-AA-CoA en presencia del compuesto de forma dosis dependiente. Particularmente, en la línea esteroideogénica pudimos demostrar por primera vez un aumento en la producción de AA-CoA luego del estímulo hormonal lo cual acuerda con la inducción y activación de la enzima ACSL4 en su rol regulatorio de la esteroideogénesis (21,70).

Al comparar este efecto inhibitorio con el producido sobre la proteína recombinante, observamos que la inhibición es más efectiva al medir la actividad en las líneas celulares. Esto puede deberse a que la actividad enzimática medida en los

ensayos en líneas celulares refleja mejor la actividad de ACSL4 en su entorno celular. El efecto observado en este caso es mayor al compararlo con el de rosiglitazona, dado que a menores concentraciones se obtuvo mayor efecto que con el compuesto testigo. En particular para la línea MA-10, se observa la mayor inhibición a dosis bajas como 5 μM . Las diferencias observadas en la inhibición enzimática entre las líneas celulares pueden deberse a la biodisponibilidad del inhibidor en un tipo celular particular, así como la expresión de enzimas que faciliten su metabolización. Las proteínas de eflujo, como los transportadores de múltiples fármacos, podrían reducir la efectividad del inhibidor en ciertos tipos celulares al expulsarlo fuera de las células, como puede ser el caso de las células tumorales.

La disminución de la actividad enzimática en presencia de PRGL493 podría deberse también a que el inhibidor afecte la expresión de la enzima a través de mecanismos transcripcionales, o favoreciendo su degradación. A través de ensayos de western blot se demostró que la expresión de la enzima no se ve afectada por la presencia del inhibidor en los tiempos de incubación analizados.

Con respecto al mecanismo de inhibición de PRGL493, si bien no se realizaron estudios de cinética enzimática para determinarlo, podemos inferir que no sería un mecanismo de tipo competitivo dada la estrategia utilizada para su selección. El compuesto no competiría por la unión al sustrato, pero actuaría impidiendo la entrada del sustrato al sitio GATE. Por otro lado, no existen similitudes estructurales entre PRGL493 y los sustratos de la enzima, requeridas para la inhibición competitiva. PRGL493 no actuaría como un inhibidor irreversible dado que no reaccionaría químicamente con su sitio de unión a la enzima. Más determinaciones son necesarias para establecer el mecanismo de inhibición de PRGL493.

En conjunto, estos estudios demostraron que el compuesto es efectivamente inhibidor de la enzima. Estos estudios subrayan la robustez del compuesto y la validez del esquema *in silico* utilizado para su identificación.

1.2. La inhibición de ACSL4 en modelos de cáncer de próstata y mama

El siguiente paso consistió en analizar los efectos de PRGL493 en modelos de cáncer de mama y próstata en los que previamente se estudió el rol de ACSL4 en la agresividad tumoral. Se analizó el efecto del inhibidor sobre diferentes parámetros: proliferación y migración celular. En ambos modelos celulares, el inhibidor y su molécula precursora (P-PRGL493) redujeron significativamente la proliferación celular, y tuvieron un efecto significativamente mayor en comparación con el de rosiglitazona.

Al analizar los valores calculados de IC₅₀ de los compuestos PRGL493 y P-PRGL493 en las células MDA-MB-231 (19,9 y 45,8 μ M, respectivamente) y PC-3 (20,07 y 36,5 μ M, respectivamente) observamos que, para el caso de las células PC-3, el valor fue menor al reportado para la rosiglitazona (45 \pm 2 μ M a las 48 horas de tratamiento) (175). En el caso de las células MDA-MB-231 este efecto es aún más marcado, dado que en algunos trabajos reportan dosis efectivas cercanas o mayores a 100 μ M (176). Esto nos indica que PRGL493 sería más potente que rosiglitazona al inhibir la proliferación en estas líneas celulares.

Observamos que el compuesto P-PRGL493 es menos potente que su derivado acetilado PRGL493, demostrando la optimización del compuesto al modificarlo químicamente. Al analizar la migración celular observamos que el inhibidor PRGL493 disminuye significativamente este parámetro en ambas líneas celulares. La inhibición de la proliferación y migración celular observada en presencia del inhibidor de la enzima concuerda con los efectos observados con el silenciamiento de la enzima en estos modelos celulares (129). En conjunto estos resultados demuestran que PRGL493 es capaz de disminuir parámetros relacionados a la agresividad tumoral como la proliferación y migración en estos modelos de cáncer de mama y próstata.

Se ha reportado que la expresión de ACSL4 correlaciona inversamente a la expresión de receptores de andrógenos (RA) y estrógenos (RE α) en muestras de tumores de pacientes de próstata y mama respectivamente. En particular, se observa el aumento de la expresión de la enzima en TNBC y CPRC (6,7,130). Previamente en nuestro laboratorio, demostramos que la inhibición de la enzima ACSL4 produce un aumento en la expresión de RE α en modelos TNBC (8). Esto provoca que las células tumorales se sensibilicen al tamoxifeno, observando un efecto sinérgico al combinar este

quimioterapéutico con rosiglitazona (8). Por lo tanto, uno de nuestros objetivos fue analizar si el nuevo inhibidor producía efectos similares. Se observó un aumento de la expresión del RE α y el RA en presencia del inhibidor en las células MDA-MB-231 y en PC3, respectivamente. Además, PRGL493 inhibió la expresión del transportador ABCG2, involucrado en la resistencia a tratamientos con quimioterapéuticos. Estos resultados están en línea con los estudios realizados previamente sobre el efecto regulatorio de ACSL4 sobre los receptores hormonales y las proteínas ABC que median la resistencia a los tratamientos (8,9,136).

Estos resultados explican por qué el inhibidor resultó ser eficaz también al combinarlo en dosis subefectivas con quimioterapéuticos, observando efectos sinérgicos sobre la proliferación celular en células PC3 y MDA-MB-231. Estos resultados abren la posibilidad de analizar el efecto de combinaciones de otros tratamientos quimioterapéuticos y hormonales con PRGL493. La combinación del compuesto PRGL493 con quimioterapéuticos podría mejorar la eficacia del tratamiento en el TNBC, el CRPC y otros tipos de tumores, y contribuir en revertir la resistencia adquirida.

En este trabajo se estudió el efecto de PRGL493 *in vivo* en modelos de xenoinjerto de mama y próstata. En estos estudios se observó que el inhibidor redujo el tamaño del tumor en ambos modelos. Es importante destacar que no se observaron signos de toxicidad ni efectos adversos relevantes durante el tratamiento de los animales lo que sugiere una buena tolerancia al inhibidor. El análisis por inmunohistoquímica de los tumores mostró una disminución de marcadores de proliferación celular y un aumento del nivel de expresión de los receptores hormonales RE α y RA. Estos resultados concuerdan con los estudios *in vivo* previamente publicados que demuestran el rol de ACSL4 en la progresión tumoral y la restauración de la sensibilidad a tratamientos hormonales como tamoxifeno (8,128).

El CRPC representa una etapa avanzada y agresiva de la enfermedad, en la cual las terapias hormonales ya no resultan eficaces, dado que son tumores hormono-independientes con alteraciones significativas en su regulación. Entre los tratamientos disponibles para el CRPC, el docetaxel ha emergido como una de las opciones más utilizadas en la práctica clínica. Se ha demostrado que este agente quimioterapéutico mejora la supervivencia global y la calidad de vida en pacientes con CRPC. Sin embargo, existen distintas alteraciones en las células de CRPC que conducen en su conjunto a mecanismos de resistencia al docetaxel, dando como resultado una disminución en la

eficiencia en el tratamiento. Además, el uso de docetaxel lleva aparejada la aparición de una serie de efectos secundarios que pueden requerir la modificación de las dosis utilizadas o la interrupción del tratamiento (96,177).

En este trabajo se demostró que PRGL493 es efectivo en la inhibición de parámetros de agresividad tumoral, así como en el crecimiento tumoral. Además, la combinación del inhibidor con docetaxel produjo un efecto sinérgico en la proliferación celular, indicando que esta nueva estrategia de uso conjunto de ambas drogas en dosis más bajas podría ser más efectiva y evitaría la toxicidad generada por docetaxel en dosis altas.

A pesar de los avances en la comprensión de la biología tumoral subyacente, los resultados clínicos del TNBC siguen siendo desalentadores. Actualmente, la quimioterapia sigue siendo la base del tratamiento. La eficacia de una gran cantidad de nuevos agentes terapéuticos está siendo evaluada en TNBC (178). A medida que estos nuevos fármacos se incorporan a la práctica clínica, se hace evidente que la heterogeneidad tumoral y la evolución clonal pueden conducir a una resistencia al tratamiento. Por lo tanto, los resultados que muestran que la inhibición de ACSL4 puede revertir mecanismos de resistencia y disminuir la progresión tumoral son relevantes para ampliar los estudios de este inhibidor en TNBC en su uso clínico.

En conjunto, estos resultados constituyen una prueba de concepto para el uso terapéutico de PRGL493 y la importancia de continuar los estudios para su uso clínico.

1.3. Inhibición de ACSL4 en la síntesis de hormonas esteroideas

Respecto a otra función caracterizada de ACSL4, la regulación de la síntesis de hormonas esteroideas, se observó que el nuevo inhibidor es efectivo en reducir la esteroidogénesis. Estos resultados fueron realizados en modelos tanto de líneas celulares como *in vivo*. Para los ensayos en células analizamos la síntesis de esteroideas en la línea MA-10 luego del estímulo con 8Br AMPc, el análogo del segundo mensajero AMPc que mimetiza la estimulación hormonal. En este modelo, PRGL493 produjo la inhibición dosis dependiente de la síntesis de esteroideas. En presencia de 22(R)-(OH)-colesterol, análogo permeable del colesterol, no se observó inhibición de la síntesis de esteroideas cuando se incubaron las células con el inhibidor. Esto indica que el efecto

sobre la inhibición síntesis de esteroides se produce en un paso anterior a la primera reacción enzimática producida por el citocromo P450sc.

La capacidad de PRGL493 para inhibir la esteroidogénesis en tejidos testiculares y suprarrenales tiene implicancias significativas, dado que la esteroidogénesis es un proceso fundamental en la progresión de ciertos tipos de cáncer. Al inhibir este proceso, PRGL493 no solo reduce la proliferación tumoral, sino que también puede disminuir los niveles hormonales que a menudo impulsan el crecimiento de estos cánceres.

Se han sugerido varios mecanismos que causan la progresión del cáncer de próstata a CPRC en condiciones de privación de andrógenos. Entre ellos, la esteroidogénesis intratumoral ha recibido recientemente mucha atención. En este contexto, los resultados del presente trabajo concuerdan con informes previos que demuestran la capacidad de las células tumorales de próstata para sintetizar esteroides *de novo* (167). Se analizó la síntesis de esteroides producida por la línea PC-3. Estas células producen muy bajos niveles de esteroides, aunque son capaces de realizar esteroidogénesis *de novo*. Se observó una inhibición en la síntesis de hormonas producidas basalmente en estas células en presencia del inhibidor. Además, se analizaron los niveles de la proteína StAR, regulador del paso limitante de la esteroidogénesis, es decir, el transporte de colesterol entre las membranas mitocondriales. PRGL493 disminuyó significativamente los niveles de expresión de StAR demostrando nuevamente que la inhibición es ejercida a nivel del transporte de colesterol.

En la última década, se han desarrollado varios inhibidores que inhiben específicamente las enzimas involucradas en la esteroidogénesis intratumoral. Los ensayos clínicos han mostrado resultados prometedores, y el inhibidor de CYP17A, abiraterona, ahora está aprobado para el tratamiento del CRPC. Sin embargo, la inhibición de una sola actividad enzimática puede ser de utilidad limitada debido a la capacidad del tumor para utilizar diferentes fuentes de precursores de andrógenos y vías de esteroidogénesis para mantener los niveles de testosterona y dihidrotestosterona. Se demostró que PRGL493 puede inhibir la síntesis de novo de los esteroides, por lo tanto, el estudio de terapias combinadas junto a inhibidores de diferentes enzimas pueden ser la estrategia óptima para reducir los niveles intratumorales de andrógenos y, así, combatir el CRPC. Además, la terapia combinada podría permitir el uso de dosis más bajas de inhibidores, lo que reduciría los efectos secundarios y/o tóxicos (167).

Dado que ACSL4 actúa a nivel del paso limitante en la esteroidogénesis (66) PRGL493 tiene la capacidad de inhibir la síntesis *de novo* de esteroides. Los efectos de este inhibidor sobre la producción de progesterona demostraron ser más fuertes que sus efectos sobre la actividad enzimática de ACSL4 recombinante. La diferencia entre estos resultados puede deberse a la diferencia en la sensibilidad de las técnicas utilizadas. En el caso de la determinación de la actividad con la proteína recombinante y la actividad en células enteras, los resultados dependen de la actividad específica del sustrato, en este caso AA marcado radiactivamente, y de la sensibilidad en la extracción y medición del producto araquidonoil-CoA. En el caso de la síntesis de esteroides, la medida del producto final acumulado es del orden de picogramos, lo que permite medir indirectamente la acción del inhibidor sobre la actividad de ACSL4 con mayor sensibilidad. Aunque en la literatura se han descrito numerosos inhibidores de la síntesis de esteroides, la mayoría de ellos no actúan a nivel del paso limitante e inhiben enzimas esteroidogénicas dependientes del citocromo P450 (179). Algunos inhibidores actúan sobre la enzima que convierte el colesterol en pregnenolona, pero también actúan sobre otros citocromos P450 (179). Además, es notable que PRGL493 también fue eficaz en inhibir la síntesis de testosterona *in vivo*, sin una acumulación de pregnenolona o progesterona.

Los esteroides son críticos para diversos procesos biológicos como la proliferación, la regulación del metabolismo de las grasas y la señalización hormonal, e impulsan la progresión tumoral hormono-dependiente y aumentan los esteroides dentro de los tumores y en el microambiente tumoral. En este contexto, los resultados actuales concuerdan con informes previos que demuestran la capacidad de las células tumorales de próstata para sintetizar esteroides *de novo* (167), y la eficacia de PRGL493 para inhibir la síntesis de esteroides en células de cáncer de próstata.

1.4. Inhibición de ACSL4 y la vía mTOR

La vía PI3K/AKT/mTOR es fundamental en múltiples procesos celulares y está implicada en diversas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Algunas mutaciones genéticas en los componentes de esta vía se asocian con carcinomas de mama, tiroides y endometrio, glioblastoma multiforme, cáncer de próstata y linfomas (180). mTOR comprende un complejo multiproteico sensible a la rapamicina y a los

nutrientes (mTORC1) y un complejo insensible a los factores de crecimiento y a los nutrientes (mTORC2) (133). En cáncer de próstata, además de sus efectos directos, esta vía interactúa con otras rutas de señalización celular importantes para la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación celular, como la vía del RA y la vía RAS/RAF/MEK (181,182). En el cáncer de próstata, las alteraciones genéticas de los componentes de esta vía están relacionadas con la agresividad tumoral. Aunque las mutaciones en AKT son poco comunes en el cáncer de próstata, la amplificación génica de las isoformas de AKT es más frecuente y se correlaciona positivamente con la agresividad del tumor (183).

Previamente demostramos que ACSL4 regula la actividad de mTOR en células de cáncer de mama, regulando diferentes mecanismos que llevan a la activación del complejo (8).

Un mecanismo a través del cual ACSL4 regula la actividad de mTOR es el aumento de la fosforilación de AKT1S1. AKT participa en la activación de mTORC1 de forma independiente mediante la fosforilación de AKT1S1, provocando su disociación de Raptor y suprimiendo la inhibición de mTORC1. Diversas señales regulan TSC1/2, lo que sugiere que, al igual que mTORC1, TSC1/2 es un centro de integración de señales (184,185).

Otro de los mecanismos por el cual ACSL4 regula el complejo es el aumento de la fosforilación de GSK3, un potente inhibidor de mTORC. GSK3 es una proteína quinasa de serina/treonina que desempeña funciones en múltiples procesos bioquímicos normales, así como en diversas enfermedades. GSK3 suele considerarse un componente de la vía PI3K/PTEN/AKT/GSK3/mTORC1, ya que suele ser fosforilada por AKT, lo que regula su inactivación. AKT suele estar activa en el cáncer humano y, por tanto, GSK3 suele estar inactivada. Además, GSK3 también interactúa con la señalización WNT/ β -catenina, y β -catenina y otras proteínas de esta vía son dianas de GSK3. GSK3 puede modificar la actividad de NF- κ B, que suele expresarse a niveles elevados en las células cancerosas (184,186).

En células de cáncer de próstata, la inhibición de la GSK3 β mediante inhibidores como el cloruro de litio (LiCl) o el RO318220 reduce la actividad de los genes estimulados por andrógenos. La expresión de productos génicos estimulados por andrógenos, como el PSA y la metaloproteínasa-2 de matriz, también se ve afectada por estos inhibidores.

GSK3 β actúa como un supresor tumoral en el cáncer de próstata al inhibir el crecimiento celular mediado por el receptor de andrógenos (187).

Estos resultados sugieren que la expresión de ACSL4 regula la actividad de mTOR y el crecimiento celular a partir de diversas señales, regulando su señalización y sus efectores. En este contexto, p70S6K es uno de los principales componentes de la vía de señalización de mTOR, y su fosforilación en treonina 389 está regulada por ACSL4. La proteína pS6 (serinas 235/236) también estaba presente en niveles similares en estas líneas celulares, mostrando una vez más una correlación directa entre la regulación de la actividad mTOR por ACSL4 y el marcado aumento de los efectores mTORC1 (8).

En este trabajo evaluamos el efecto del inhibidor PRGL493 en el modelo de cáncer de próstata. Observamos que el compuesto inhibe los diferentes componentes de la vía mTOR, disminuyendo los niveles de pS6, los niveles de fosforilación de GSK3 sin modificar los niveles de la proteína, y los niveles de AKT fosforilado.

Estos resultados concuerdan con el rol regulatorio de ACSL4 sobre componentes de la vía mTOR en cáncer de mama y en estudios realizados en un modelo adrenal (8,188). Estos hallazgos abren la posibilidad de analizar el rol de esta enzima en procesos donde la vía AKT/mTOR este implicada. Por otro lado, a futuro sería de gran importancia analizar el efecto del inhibidor en combinación con inhibidores de la vía.

2. CAPÍTULO 2

2.1. ACSL4 y cáncer de ovario

Otro objetivo abordado en este trabajo consistió en analizar el rol de ACSL4 y el nuevo inhibidor en cáncer de ovario. En particular, el COE es una neoplasia que afecta las células del tejido epitelial que recubre los ovarios. Es una enfermedad grave y representa una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres. El diagnóstico suele realizarse en etapas avanzadas debido a la falta de síntomas específicos y a su ubicación anatómica (107,109).

Para abordar este estudio se analizó en tumores de pacientes con COE la firma genética de ACSL4 previamente descripta en nuestro laboratorio para cáncer de mama

(8,132). Los resultados obtenidos mostraron una alta correlación entre ACSL4 y los genes relacionados con el aumento de su expresión y, en particular, con la familia de transportadores ABC. El análisis de la expresión de ACSL4 en muestras de pacientes mediante inmunohistoquímica reveló un incremento significativo de esta enzima en los tejidos tumorales de COE en comparación con los tumores de bajo grado y el tejido no tumoral, demostrando que su expresión aumenta con el estadio de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con el análisis de expresión de ACSL4 en las distintas líneas de cáncer de ovario, donde los niveles de la enzima aumentaron respecto a la línea control HOSE.

PRLG493 redujo la migración de las células tumorales de ovario al igual a lo observado anteriormente en este trabajo para los modelos de mama y próstata. El compuesto inhibió la proliferación celular de las células HOSE y de las de cáncer de ovario. Las IC50 muestran que las células más sensibles al inhibidor son las células OV-90. Esto podría deberse a que estas células son las que expresan mayores niveles de ACSL4 produciendo mayor sensibilidad al compuesto. Las células HOSE, que expresan niveles bajos de la enzima, resultaron menos sensibles respecto a las otras líneas celulares, excepto la línea SKOV-3. Esta línea celular, como explicamos anteriormente, es resistente a múltiples tratamientos. La acción de un inhibidor puede verse afectada su metabolización o los transportadores ABC. En este sentido se analizó funcionalmente el efecto del inhibidor PRGL493 sobre la actividad de los transportadores a través de ensayos de eflujo con doxorubicina y Hoechst. A través de estos estudios, se observó que el compuesto es capaz de inhibir el eflujo de drogas en las líneas celulares OV-90 y SKOV-3. Esto indicaría que ACSL4, a través de la regulación de los transportadores ABC, puede mediar la resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos, como se describió anteriormente en los modelos de cáncer de mama y adrenal (8,188).

Consistentemente con estos resultados, la combinación de dosis subefectivas del compuesto con quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento del cáncer de ovario produjo un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación celular en la línea celular SKOV-3, en comparación con los tratamientos individuales. Esto indicaría que la inhibición de la enzima podría sensibilizar a las células tumorales de ovario a la quimioterapia, como se observó para mama y próstata, revirtiendo mecanismos de resistencia a las drogas. En conjunto estos resultados demuestran el rol de ACSL4 en cáncer de ovario donde existen limitadas opciones terapéuticas, indicando la

importancia de continuar los estudios para el uso de su inhibidor en tratamientos junto a drogas quimioterapéuticas.

3. Estudios realizados sobre la inhibición de ACSL4 y PRGL493 en la actualidad

Recientemente, durante el desarrollo de esta tesis, se han descrito nuevos inhibidores de ACSL4. Uno de ellos, el compuesto AS-252424, ha sido desarrollado como un inhibidor para el tratamiento de enfermedades relacionadas a la ferroptosis, tales como lesiones de isquemia/reperfusión y enfermedades neurodegenerativas (189). En ese trabajo identificaron al compuesto AS-252424 como un potente inhibidor de la ferroptosis mediante el cribado de una biblioteca de inhibidores de quinasas. AS-252424 es conocido y utilizado como un inhibidor potente y selectivo de PI3K γ , y está implicado en una variedad de acontecimientos fisiopatológicos al inhibir la actividad quinasa de esta enzima (189). AS-252424 se une directamente a la glutamina 464 de ACSL4 para inhibir su actividad enzimática, lo que resulta en la supresión de la peroxidación lipídica y la ferroptosis. En este trabajo muestran el efecto de este inhibidor en modelos de ferroptosis, pero no analizan el efecto de compuesto en modelos de cáncer o esteroidogénicos.

Notablemente, el inhibidor PRGL493 que hemos desarrollado, es actualmente comercializado para su uso en investigación por diversas empresas biotecnológicas, entre ellas Cayman (PRGL493 (CAS Number: 2479378-45-3) | Cayman Chemical). El compuesto se ha utilizado en trabajos publicados recientemente para demostrar el rol de la enzima en diferentes patologías principalmente relacionadas a la ferroptosis y cáncer (190–195).

En un estudio sobre cáncer de próstata se demostró que la pérdida del gen supresor tumoral de retinoblastoma RB1 sensibiliza a las células tumorales a la ferroptosis mediante el aumento de expresión de ACSL4 y, consecuentemente, el enriquecimiento de los fosfolípidos que contienen AA, componentes clave de la ejecución de la ferroptosis. La inhibición de ACSL4 mediante PRGL93, abolió la sensibilidad de las células silenciadas para la expresión de RB1 a la ferroptosis (195).

Guo, F y col., estudiando la pancreatitis aguda (PA), realizaron un análisis transcriptómico exhaustivo de la sangre periférica de pacientes con PA y del tejido pancreático de un modelo de PA en ratón. Estos análisis identificaron a ACSL4 dentro de los cuatro genes significativamente incrementados en PA. Los autores demostraron que PRGL493 reducía notablemente la expresión de IL-6 y TNF α , aliviaba el edema y la necrosis pancreáticas y disminuía la infiltración de células inflamatorias. En este estudio se sugiere el potencial de ACSL4 y su inhibición como un nuevo tratamiento (191).

En conjunto, éstos y otros trabajos validan el nuevo inhibidor de ACSL4 que hemos desarrollado en el marco de este trabajo doctoral, demostrando sus efectos en cáncer y ferroptosis, señalando su uso como un nuevo tratamiento para diversas patologías.

4. Perspectivas a futuro

Los resultados obtenidos en esta tesis destacan el potencial de los inhibidores de ACSL4 como una nueva clase de terapias contra el cáncer. En el futuro, será esencial realizar estudios adicionales para explorar las aplicaciones de los inhibidores de ACSL4 en otros tipos de cáncer y en combinación con diversas terapias antitumorales. Además, se requerirán investigaciones continuas para entender mejor los mecanismos moleculares subyacentes y optimizar las estrategias de tratamiento personalizadas.

La fase preclínica demuestra la posible utilidad terapéutica de una droga. En este trabajo, se realizaron una serie de pruebas *in vitro* e *in vivo* para evaluar la eficacia del nuevo inhibidor de ACSL4 en modelos de cáncer de próstata, mama y ovario. Más estudios son necesarios para evaluar en modelos animales las vías de administración, formulación, seguridad, biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinámica del compuesto PRGL493. Estos estudios son necesarios para poder posteriormente pasar a la fase clínica del desarrollo del fármaco.

La ferroptosis es ahora ampliamente aceptada como un mecanismo patogénico clave en una amplia gama de enfermedades y condiciones. Existen evidencias que sugieren que la ferroptosis puede proporcionar nuevas opciones prometedoras para el tratamiento de muchas enfermedades. En este sentido, ACSL4, al ser una enzima clave en este proceso, es también un blanco terapéutico prometedor para este tipo de

patologías. Esto amplía la posibilidad de la aplicación de PRGL493 en la clínica. Por lo tanto, en el futuro será relevante analizar en mayor profundidad el uso de PRGL493 en las estrategias terapéuticas para dichas patologías.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El tema de este trabajo fue el desarrollo de un nuevo inhibidor específico de la enzima acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) y su potencial aplicación en el tratamiento de cánceres de mama, ovario y próstata. ACSL4 es crucial en la regulación del metabolismo lipídico, especialmente en los niveles intracelulares de ácido araquidónico. Esta enzima está implicada en la agresividad tumoral y en la resistencia a terapias convencionales promoviendo la proliferación y migración celular, y la síntesis de esteroides.

Las principales conclusiones, basadas en los objetivos planteados, obtenidas a partir de los experimentos realizados son las siguientes:

Desarrollo y caracterización del compuesto PRGL493:

- I. El compuesto PRGL493 demostró ser un inhibidor eficaz de ACSL4, superando a inhibidores como la rosiglitazona en términos de potencia.
- II. PRGL493 demostró una eficacia inhibitoria significativa de la actividad de la enzima tanto en ensayos con la enzima recombinante como en líneas celulares. Se observó que el compuesto inhibe la actividad, y no la expresión, de ACSL4.

Efecto de PRGL493 sobre la agresividad de las células tumorales, los mecanismos de resistencia y las vías de señalización:

- I. PRGL493 redujo significativamente la proliferación y migración de células tumorales en modelos de cáncer de mama, ovario y próstata, indicando su potencial para limitar la progresión tumoral. Estos resultados son especialmente relevantes para cánceres agresivos y de difícil tratamiento.
- II. La inhibición de ACSL4 por PRGL493 resultó en un aumento en la expresión de receptores hormonales (de estrógenos y andrógenos) y una disminución de la expresión del transportador ABCG2. Estos efectos podrían mejorar la respuesta a terapias hormonales y reducir la resistencia a quimioterapéuticos.

- III. La inhibición de ACSL4 por PRGL493 afecta la vía PI3K/AKT/mTOR, reduciendo la fosforilación de proteínas clave como AKT y GSK3. Esto sugiere que PRGL493 podría interferir con múltiples mecanismos de señalización celular

Efecto de PRGL493 sobre la esteroidogénesis:

- I. PRGL493 fue capaz de inhibir la síntesis *de novo* de esteroides en modelos celulares e *in vivo*, lo que podría ser crucial en el tratamiento de cánceres hormono-dependientes, como el cáncer de próstata y de mama. La disminución de la esteroidogénesis podría limitar el crecimiento de estos tumores al reducir la disponibilidad de hormonas que los impulsan.

Combinación de PRGL493 con fármacos de uso clínico en células tumorales:

- I. PRGL493 mostró una sinergia significativa en la inhibición de la proliferación celular al combinarse con quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer de mama, de próstata y de ovario epitelial, indicando una sensibilización a dichos tratamientos.
- II. El inhibidor sensibilizó a células de cáncer de mama triple negativo al tamoxifeno.
- III. Estos efectos indicarían que el inhibidor podría reducir la resistencia a estos tratamientos en los modelos de cáncer estudiados. La combinatoria de compuestos con distinto mecanismo de acción puede dar como resultado un efecto sinérgico, obteniéndose un resultado más efectivo que con la utilización de los compuestos individuales. También, con el uso de dosis menores de los terapéuticos se minimizan los efectos secundarios aparejados al tratamiento, mejorando la tolerancia a los mismos.

Efecto de PRGL493 sobre el crecimiento tumoral en modelos *in vivo*

- I. En ratones con xenoinjertos de cáncer de mama triple negativo y cáncer de próstata resistente a la castración, el tratamiento con PRGL493 resultó en una disminución significativa del volumen tumoral.
- II. PRGL493 aumentó la expresión de receptores hormonales (RE α , y RA) y una disminución en los marcadores de proliferación celular (Ki67) en estos modelos de xenoinjerto, sugiriendo una reducción en la agresividad tumoral y una sensibilización a tratamientos hormonales.
- III. Estos resultados demuestran la efectividad de este compuesto para inhibir la progresión tumoral.

Papel de ACSL4 y el efecto de PRGL493 en el cáncer de ovario epitelial

- I. Se observó una mayor expresión de ACSL4 en el cáncer de ovario epitelial, tanto en muestras de tumores como en modelos celulares, al compararlas con tejido y células de ovario normal.
- II. PRGL493 inhibió la proliferación y migración celular, y actividad de los transportadores de drogas. Además, sensibilizó a las células a los tratamientos con quimioterapéuticos. Esto indica un rol relevante de ACSL4 en este tipo de cáncer como un blanco terapéutico.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral no solo validan la eficacia de PRGL493 como inhibidor de ACSL4, sino que también destacan su potencial como una herramienta terapéutica versátil y poderosa para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades relacionadas con la esteroidogénesis. Estos hallazgos abren nuevas vías para el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas, mejorando las perspectivas de tratamiento para diversas patologías.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Natesan V, Kim SJ. Lipid Metabolism, Disorders and Therapeutic Drugs – Review. *Biomol Ther (Seoul)*. 2021 Nov 11, 29(6):596.
2. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med*. 2008 Oct 1;14(10):461–9.
3. Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest*. 2001;107(11):1339–45.
4. Hyde CAC, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2009 Jun;9(6):701–15.
5. Kuwata H, Hara S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2019 Oct 1;144:106363.
6. Wu X, Deng F, Li Y, Daniels G, Du X, Ren Q, et al. ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. *Oncotarget*. 2015 Dec 12;6(42):44849.
7. Monaco ME, Creighton CJ, Lee P, Zou X, Topham MK, Stafforini DM. Expression of Long-chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 in Breast and Prostate Cancers Is Associated with Sex Steroid Hormone Receptor Negativity. *Transl Oncol*. 2010 Apr 1;3(2):91–8.
8. Orlando UD, Castillo AF, Dattilo MA, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ. Acyl-CoA synthetase-4, a new regulator of mTOR and a potential therapeutic target for enhanced estrogen receptor function in receptor-positive and -negative breast cancer. *Oncotarget*. 2015 Dec 12;6(40):42632.
9. Orlando UD, Castillo AF, Medrano MAR, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ. Acyl-CoA synthetase-4 is implicated in drug resistance in breast cancer cell lines involving the regulation of energy-dependent transporter expression. *Biochem Pharmacol*. 2019 Jan 1;159:52–63.
10. Talley JT, Mohiuddin SS. Biochemistry, Fatty Acid Oxidation. *StatPearls*. 2023 Jan 16.
11. Füllekrug J, Poppelreuther M. Measurement of Long-Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase Activity. *Methods Mol Biol*. 2016;1376:43–53.
12. Soupene E, Kuypers FA. Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 May;233(5):507.
13. Færgeman NJ, Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J*. 1997 Apr 1;323 (Pt 1)(Pt 1):1–12.

14. Yan S, Yang XF, Liu HL, Fu N, Ouyang Y, Qing K. Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: An update. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 28;21(12):3492–8.
15. Ellis JM, Frahm JL, Li LO, Coleman RA. Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr Opin Lipidol*. 2010 Jun;21(3):212.
16. Abe T, Fujino T, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Toh H, et al. Human Long-Chain Acyl-CoA Synthetase: Structure and Chromosomal Location. *The Journal of Biochemistry*. 1992 Jan 1;111(1):123–8.
17. Hisanaga Y, Ago H, Nakagawa N, Hamada K, Ida K, Yamamoto M, et al. Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jul 23;279(30):31717–26.
18. Shimbara-Matsubayashi S, Kuwata H, Tanaka N, Kato M, Hara S. Analysis on the Substrate Specificity of Recombinant Human Acyl-CoA Synthetase ACSL4 Variants. *Biol Pharm Bull*. 2019 May 1;42(5):850–5.
19. Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK, Coleman RA. Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Arch Biochem Biophys*. 2002 Aug 15;404(2):263–70.
20. Duarte A, Poderoso C, Cooke M, Soria G, Cornejo Maciel F, Gottifredi V, et al. Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis. *PLoS One*. 2012 Sep 21;7(9):e45829.
21. Maloberti P, Castilla R, Castillo F, Maciel FC, Mendez CF, Paz C, et al. Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J*. 2005 Apr 1;272(7):1804–14.
22. Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, et al. A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 4;94(7):2880.
23. Cao Y, Murphy KJ, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS Lett*. 2000 Feb 11;467(2–3):263–7.
24. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Bae HI, Kim WH, Kim JC, et al. Fatty acid-CoA ligase 4 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2003 May 1;94(5):421–4.
25. Cao Y, Dave K, Doan T, Prescott S. Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2001; 61(23):8429-8434.

26. Ding K, Liu C, Li L, Yang M, Jiang N, Luo S, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism. *Chin Med J (Engl)*. 2023 Nov 11;136(21):2521.
27. Dattilo MA, Benzo Y, Herrera LM, Prada JG, Castillo AF, Orlando UD, et al. Regulatory mechanisms leading to differential Acyl-CoA synthetase 4 expression in breast cancer cells. *Scientific Reports* 2019 9:1. 2019 Jul 16;9(1):1–13.
28. Butler JEF, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*. 2002 Oct 15;16(20):2583–92.
29. Orlando U, Cooke M, Cornejo Maciel F, Papadopoulos V, Podestá EJ, Maloberti P. Characterization of the mouse promoter region of the acyl-CoA synthetase 4 gene: Role of Sp1 and CREB. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Apr 30;369(1–2):15–26.
30. Kan CFK, Singh AB, Dong B, Shende VR, Liu J. PPAR δ activation induces hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 4 expression in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(5):577–87.
31. Chen B, Wang H, Lv C, Mao C, Cui Y. Long non-coding RNA H19 protects against intracerebral hemorrhage injuries via regulating microRNA-106b-5p/acyl-CoA synthetase long chain family member 4 axis. *Bioengineered*. 2021 Jan 1;12(1):4004–15.
32. Mohan Lal P, Hamza Siddiqui M, Soulat A, Mohan A, Tanush D, Tirath K, et al. MicroRNAs as promising biomarkers and potential therapeutic agents in breast cancer management: a comprehensive review. *Annals of Medicine & Surgery*. 2024 Jun;86(6):3543–50.
33. Kaller M, Liffers ST, Oeljeklaus S, Kuhlmann K, Röh S, Hoffmann R, et al. Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Aug;10(8).
34. Wang W, Li X, Ding N, Teng J, Zhang S, Zhang Q, et al. miR-34a regulates adipogenesis in porcine intramuscular adipocytes by targeting ACSL4. *BMC Genet*. 2020 Mar 14;21(1).
35. Qin X, Zhang J, Lin Y, Sun XM, Zhang JN, Cheng ZQ. Identification of MiR-211-5p as a tumor suppressor by targeting ACSL4 in Hepatocellular Carcinoma. *J Transl Med*. 2020 Aug 28;18(1):1–13.
36. Yuan M, Mahmud I, Katsushima K, Joshi K, Saulnier O, Pokhrel R, et al. miRNA-211 maintains metabolic homeostasis in medulloblastoma through its target gene long-chain acyl-CoA synthetase 4. *Acta Neuropathol Commun*. 2023 Dec 1;11(1):1–17.

37. Shi L, Song Z, Li Y, Huang J, Zhao F, Luo Y, et al. MiR-20a-5p alleviates kidney ischemia/reperfusion injury by targeting ACSL4-dependent ferroptosis. *Am J Transplant*. 2023 Jan 1;23(1):11–25.
38. Smith ME, Saraceno GE, Capani F, Castilla R. Long-chain acyl-CoA synthetase 4 is regulated by phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 4;430(1):272–7.
39. Zhang HL, Hu BX, Li ZL, Du T, Shan JL, Ye ZP, et al. PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis. *Nat Cell Biol*. 2022 Jan 1;24(1):88–98.
40. Wang J, Wang Z, Yuan J, Wang J, Shen X. The positive feedback between ACSL4 expression and O-GlcNAcylation contributes to the growth and survival of hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2020 May 5;12(9):7786.
41. Nguyen KT, Mun SH, Yang J, Lee J, Seok OH, Kim E, et al. The MARCHF6 E3 ubiquitin ligase acts as an NADPH sensor for the regulation of ferroptosis. *Nature Cell Biology* 2022 24:8. 2022 Aug 8;24(8):1239–51.
42. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology* 2016 13:1. 2016 Nov 14;13(1):91–8.
43. Chen F, Kang R, Liu J, Tang D. The ACSL4 Network Regulates Cell Death and Autophagy in Diseases. *Biology* 2023, Vol 12, Page 864. 2023 Jun 15;12(6):864.
44. Li YJ, Fahrman JF, Aftabizadeh M, Zhao Q, Tripathi SC, Zhang C, et al. Fatty acid oxidation protects cancer cells from apoptosis by increasing mitochondrial membrane lipids. *Cell Rep*. 2022 May 31;39(9).
45. Gubern C, Camões S, Ballesteros I, Rodríguez R, Romera VG, Cañadas R, et al. miRNA expression is modulated over time after focal ischaemia: up-regulation of miR-347 promotes neuronal apoptosis. *FEBS J*. 2013 Dec 1;280(23):6233–46.
46. Lei G, Zhang Y, Koppula P, Liu X, Zhang J, Lin SH, et al. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. *Cell Research* 2020 30:2. 2020 Jan 16;30(2):146–62.
47. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol*. 2016 Mar 1;26(3):165.
48. Magtanong L, Mueller GD, Williams KJ, Billmann M, Chan K, Armenta DA, et al. Context-dependent regulation of ferroptosis sensitivity. *Cell Chem Biol*. 2022 Sep 15;29(9):1409-1418.e6.

49. Chu B, Kon N, Chen D, Li T, Liu T, Jiang L, et al. ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway. *Nature Cell Biology* 2019 21:5. 2019 Apr 8;21(5):579–91.
50. Shui S, Zhao Z, Wang H, Conrad M, Liu G. Non-enzymatic lipid peroxidation initiated by photodynamic therapy drives a distinct ferroptosis-like cell death pathway. *Redox Biol.* 2021 Sep 1;45:102056.
51. Li Y, Feng D, Wang Z, Zhao Y, Sun R, Tian D, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death & Differentiation* 2019 26:11. 2019 Feb 8 ;26(11):2284–99.
52. Duan J, Wang Z, Duan R, Yang C, Zhao R, Feng Q, et al. Therapeutic targeting of hepatic ACSL4 ameliorates NASH in mice. *Hepatology.* 2022 Jan 1;75(1):140–53.
53. Su L, Zhang J, Gomez H, Kellum JA, Peng Z. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury. *Autophagy.* 2023 Feb 1;19(2):401–14.
54. Luoqian J, Yang W, Ding X, Tuo Q zhang, Xiang Z, Zheng Z, et al. Ferroptosis promotes T-cell activation-induced neurodegeneration in multiple sclerosis. *Cell Mol Immunol.* 2022 Aug 1;19(8):913–24.
55. Meloni I, Parri V, De Filippis R, Ariani F, Artuso R, Bruttini M, et al. The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture. *Neuroscience.* 2009 Mar 17;159(2):657–69.
56. Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I. Non-syndromic X-linked mental retardation: From a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol.* 2005 Jul 1;204(1):8–20.
57. Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, Jonsson JJ, Villanova M, et al. *FACL4*, a New Gene Encoding Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 4, Is Deleted in a Family with Alport Syndrome, Elliptocytosis, and Mental Retardation. *Genomics.* 1998 Feb 1;47(3):350–8.
58. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Mar;10(3):181–93.
59. Hu Y, Li W, Cheng X, Yang H, She ZG, Cai J, et al. Emerging Roles and Therapeutic Applications of Arachidonic Acid Pathways in Cardiometabolic Diseases. *Circ Res.* 2024 Jun 21;135(1):222–60.
60. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1. 2021 Feb 26;6(1):1–30.

61. Wang T, Fu X, Chen Q, Patra JK, Wang D, Wang Z, et al. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 1;20(15).
62. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem.* 2007 Aug 3;282(31):22254–66.
63. Mori Sequeiros Garcia MM, Paz C, Castillo AF, Benzo Y, Belluno MA, Balcázar Martínez A, et al. New insights into signal transduction pathways in adrenal steroidogenesis: role of mitochondrial fusion, lipid mediators, and MAPK phosphatases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14.
64. Wang XJ, Walsh LP, Reinhart AJ, Stocco DM. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):20204–9.
65. Castillo AF, Orlando U, Helfenberger KE, Poderoso C, Podesta EJ. The role of mitochondrial fusion and StAR phosphorylation in the regulation of StAR activity and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Jun 15;408:73–9.
66. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2007 Jun 1;1771(6):663–76.
67. Maloberti P, Maciel FC, Castillo AF, Castilla R, Duarte A, Toledo MF, et al. Enzymes involved in arachidonic acid release in adrenal and Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Feb; 265–266(SUPPL.):113–20.
68. Moraga PF, Llanos MN, Ronco AM. Arachidonic acid release from rat Leydig cells depends on the presence of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin receptors. *J Endocrinol.* 1997;154(2):201–9.
69. Cooke BA, Dirami G, Chaudry L, Choi MSK, Abayasekara DRE, Phipp L. Release of arachidonic acid and the effects of corticosteroids on steroidogenesis in rat testis Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991; 40(1–3):465–71.
70. Maciel FC, Maloberti P, Neuman I, Cano F, Castilla R, Castillo F, et al. An arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase is a hormone-dependent and obligatory protein in the signal transduction pathway of steroidogenic hormones. *J Mol Endocrinol.* 2005 Jun;34(3):655–66.
71. Didolkar AK, Sundaram K. Arachidonic acid is involved in the regulation of hCG induced steroidogenesis in rat Leydig cells. *Life Sci.* 1987 Jul 27; 41(4):471–7.

72. Nishikawa T, Omura M, Noda M, Yoshida S. Possible involvement of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in the regulation of pregnenolone synthesis in bovine adrenocortical mitochondria. *J Biochem.* 1994;116(4):833–7.
73. Wang XJ, Dyson MT, Jo Y, Eubank DW, Stocco DM. Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2003;85(2–5):159–66.
74. Fernanda Castillo A, Cornejo Maciel F, Castilla R, Duarte A, Maloberti P, Paz C, et al. cAMP increases mitochondrial cholesterol transport through the induction of arachidonic acid release inside this organelle in Leydig cells. *FEBS J.* 2006 Nov 1;273(22):5011–21.
75. Grevengoed TJ, Klett EL, Coleman RA. Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:1–30.
76. Papadopoulos V, Lecanu L, Brown RC, Han Z, Yao ZX. Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience.* 2006;138(3):749–56.
77. Knudsen J, Hojrup P, Hansen HO, Hansen HF, Roepstorff P. Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence. *Biochem J.* 1989; 262(2):513–9.
78. Kolmer M, Rovio A, Alho H. The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans. *Biochemical Journal.* 1995 Mar 3;306(Pt 2):327.
79. Maloberti PM, Castillo AF, Orlando U, Podesta EJ. ACSL4. *Encyclopedia of Signaling Molecules.* 2016;1–8.
80. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4; 144(5):646–74.
81. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan 1; 12(1):31–46.
82. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May 1;71(3):209–49.
83. Aftab DT, McDonald DM. MET and VEGF: synergistic targets in castration-resistant prostate cancer. *Clin Transl Oncol.* 2011 Oct;13(10):703.
84. Breast Cancer Early Detection and Diagnosis | How To Detect Breast Cancer | American Cancer Society.

85. Zagami P, Carey LA. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *npj Breast Cancer* 2022 8:1. 2022 Aug 20; 8(1):1–10.
86. Cáncer de mama - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.
87. Mehmood S, Faheem M, Ismail H, Farhat SM, Ali M, Younis S, et al. 'Breast Cancer Resistance Likelihood and Personalized Treatment Through Integrated Multiomics.' *Front Mol Biosci*. 2022 Apr 14;9:783494.
88. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2018 Jun 1;186:1–24.
89. Iacopetta D, Ceramella J, Baldino N, Sinicropi MS, Catalano A. Targeting Breast Cancer: An Overlook on Current Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 3643. 2023 Feb 11; 24(4):3643.
90. Xiong N, Wu H, Yu Z. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: a comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies. *Front Oncol*. 2024;14:1405491.
91. Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*. 2020 Dec 1; 57(6):1245–61.
92. Aysola K, Desai A, Welch C, Xu J, Qin Y, Reddy V, et al. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hereditary Genet*. 2012;2013(Suppl 2).
93. Jabbarzadeh Kaboli P, Luo S, Chen Y, Jomhori M, Imani S, Xiang S, et al. Pharmacotranscriptomic profiling of resistant triple-negative breast cancer cells treated with lapatinib and berberine shows upregulation of PI3K/Akt signaling under cytotoxic stress. *Gene*. 2022 Mar 30;816:146171.
94. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024 Jan;74(1):12–49.
95. Sekhoacha M, Riet K, Motloug P, Gumenku L, Adegoke A, Mashele S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*. 2022 Sep 1;27(17).
96. Cornford P. Evolution of Docetaxel-Based Therapy for Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer. <http://dx.doi.org/101016/j.bjmsu201008007>. 2010 Nov 1;3(6):225–30.
97. Kulasegaran T, Oliveira N. Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Advances in Treatment and Symptom Management. *Curr Treat Options Oncol*. 2024 Jun 24;1–18.

98. Chang CC, Lee YC, Tsai HW, Yii SC, Yen TH, Chu FY. Diagnostic Role of Serum Free-to-Total Prostate Specific Antigen (PSA) Ratio in Prostate Cancer with Serum Total Concentration of PSA below 4 ng/mL. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(13):5261–4.
99. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A, et al. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018 Sep 5;362.
100. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*. 2015 May 30;161(5):1215–28.
101. Decker KF, Zheng D, He Y, Bowman T, Edwards JR, Jia L. Persistent androgen receptor-mediated transcription in castration-resistant prostate cancer under androgen-deprived conditions. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov 1;40(21):10765–79.
102. D’Amico A V., Moul J, Carroll PR, Sun L, Lubeck D, Chen MH. Cancer-Specific Mortality After Surgery or Radiation for Patients With Clinically Localized Prostate Cancer Managed During the Prostate-Specific Antigen Era. <https://doi.org/101200/JCO200301075>. 2016 Sep 21;21(11):2163–72.
103. Dillard PR, Lin MF, Khan SA. Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Nov 25;295(1–2):115–20.
104. Puente J, Grande E, Medina A, Maroto P, Lainez N, Arranz JA. Docetaxel in prostate cancer: a familiar face as the new standard in a hormone-sensitive setting. <http://dx.doi.org/101177/1758834017692779>. 2017 Mar 1;9(5):307–18.
105. Pal SK, Sartor O. Phase III data for abiraterone in an evolving landscape for castration-resistant prostate cancer. *Maturitas*. 2011 Feb 1;68(2):103–5.
106. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer* 2015 15:12. 2015 Nov 13;15(12):701–11.
107. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs*. 2019 Apr 1;35(2):151–6.
108. Steven M. Penny. *Radiol Technol*. 2020. p. 561–75 Ovarian Cancer: An Overview - PubMed.
109. Sambasivan S. Epithelial ovarian cancer: Review article. *Cancer Treat Res Commun*. 2022 Jan 1;33.

110. Lliberos C, Richardson G, Papa A. Oncogenic Pathways and Targeted Therapies in Ovarian Cancer. *Biomolecules*. 2024 May 1;14(5).
111. Kurman RJ, Shih IM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*. 2011;42(7):918–31.
112. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int*; 2014.
113. Babaier A, Ghatage P. Mucinous Cancer of the Ovary: Overview and Current Status. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(1).
114. Babaier A, Mal H, Alselwi W, Ghatage P. Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary: The Current Status. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Feb 1;12(2).
115. Ducie J, Dao F, Considine M, Olvera N, Shaw PA, Kurman RJ, et al. Molecular analysis of high-grade serous ovarian carcinoma with and without associated serous tubal intra-epithelial carcinoma. *Nature Communications* 2017 8:1. 2017 Oct 17;8(1):1–9.
116. Paleari L, Gandini S, Provinciali N, Puntoni M, Colombo N, DeCensi A. Clinical benefit and risk of death with endocrine therapy in ovarian cancer: A comprehensive review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2017 Sep 1;146(3):504–13.
117. Kim SE, Kim WJ, Choi DS, Lee DY. Comparison of goserelin and leuprorelin for ovarian protection during chemotherapy in young patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2023 Feb 13;198(2):231–7.
118. Vergote I, Gonzalez-Martin A, Lorusso D, Gourley C, Mirza MR, Kurtz JE, et al. Clinical research in ovarian cancer: consensus recommendations from the Gynecologic Cancer InterGroup. *Lancet Oncol*. 2022 Aug 1; 23(8):e374–84.
119. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1996 Jan 4;334(1):1–6.
120. Markman M. Optimizing primary chemotherapy in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17(4):957–68.
121. Wang MT, Honn K V., Nie D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec;26(3–4):525–34.
122. Harris RE. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*. 2009 Apr;17(2):55–67.

123. Schneider C, Pozzi A. Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2011 Dec;30(3–4):277–94.
124. Stern N, Yanagawa N, Saito F, Hori M, Natarajan R, Nadler J, et al. Potential role of 12 hydroxyeicosatetraenoic acid in angiotensin II-induced calcium signal in rat glomerulosa cells. *Endocrinology*. 1993;133(2):843–7.
125. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Mar;27(1):31–40.
126. Yang Y, Zhu T, Wang X, Xiong F, Hu Z, Qiao X, et al. ACSL3 and ACSL4, Distinct Roles in Ferroptosis and Cancers. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 1;14(23).
127. Hou J, Jiang C, Wen X, Li C, Xiong S, Yue T, et al. ACSL4 as a Potential Target and Biomarker for Anticancer: From Molecular Mechanisms to Clinical Therapeutics. *Front Pharmacol*. 2022 Jul 13;13:949863.
128. Orlando UD, Garona J, Ripoll G V., Maloberti PM, Solano ÁR, Avagnina A, et al. The Functional Interaction between Acyl-CoA Synthetase 4, 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase-2 Controls Tumor Growth: A Novel Therapeutic Target. *PLoS One*. 2012 Jul 13;7(7):40794.
129. Maloberti PM, Duarte AB, Orlando UD, Pasqualini ME, Solano AR, Lopez-Otín C, et al. Functional Interaction between Acyl-CoA Synthetase 4, Lipoxygenases and Cyclooxygenase-2 in the Aggressive Phenotype of Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2010;5(11):e15540.
130. Wu X, Li Y, Wang J, Wen X, Marcus MT, Daniels G, et al. Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 Is a Biomarker for and Mediator of Hormone Resistance in Human Breast Cancer. *PLoS One*. 2013 Oct 14;8(10):e77060.
131. Wu X, Deng F, Li Y, Daniels G, Du X, Ren Q, et al. ACSL4 promotes prostate cancer growth, invasion and hormonal resistance. *Oncotarget*. 2015 Nov 30 ;6(42):44849–63.
132. Castillo AF, Orlando UD, Lopez PV, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ. Gene expression profile and signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells mediated by acyl-CoA synthetase 4 overexpression. *Transcr Open Access*. 2017;03(02).
133. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012 Apr 4;149(2):274.
134. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:5. 2009 Apr 2;10(5):307–18.

135. Shimobayashi M, Hall MN. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell Research* 2016 26:1. 2015 Dec 11;26(1):7–20.
136. Ríos Medrano MA, Bigi MM, Martínez Ponce P, Podesta EJ, Orlando UD. Exposure to anticancer drugs modulates the expression of ACSL4 and ABCG2 proteins in adrenocortical carcinoma cells. *Heliyon*. 2023 Oct 1;9(10).
137. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR, Chen ZS. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat*. 2015;18:1–17.
138. Alam A, Locher KP. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters. *Annu Rev Biophys*. 2023 May 9;52(Volume 52, 2023):275–300.
139. Jin Y, Bin ZQ, Qiang H, Liang C, Hua C, Jun D, et al. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Oct;135(10):1369–76.
140. Roh YG, Mun MH, Jeong MS, Kim WT, Lee SR, Chung JW, et al. Drug resistance of bladder cancer cells through activation of ABCG2 by FOXM1. *BMB Rep*. 2018 Feb 1;51(2):98–103.
141. Abdel Gaber SA, Müller P, Zimmermann W, Hüttenberger D, Wittig R, Abdel Kader MH, et al. ABCG2-mediated suppression of chlorin e6 accumulation and photodynamic therapy efficiency in glioblastoma cell lines can be reversed by KO143. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Jan 1;178:182–91.
142. Reustle A, Fisel P, Renner O, Büttner F, Winter S, Rausch S, et al. Characterization of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2018 Dec 15;143(12):3181–93.
143. Xu L, Huang J, Zheng Z, To KKW, Chen Z, Wang F, et al. CM082 Enhanced the Sensitivity of Chemotherapeutic Agents by Inhibiting the Function of ABCG2. *SSRN Electronic Journal*. 2019 Feb 15.
144. Guo X, To KKW, Chen Z, Wang X, Zhang J, Luo M, et al. Dacomitinib potentiates the efficacy of conventional chemotherapeutic agents via inhibiting the drug efflux function of ABCG2 in vitro and in vivo. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2018 Feb 20;37(1):1–13.
145. Ma Y, Zhang X, Alsaidan OA, Yang X, Sulejmani E, Zha J, et al. Long-Chain Acyl-CoA synthetase 4-mediated fatty acid metabolism sustains androgen receptor pathway-independent prostate cancer. *Molecular Cancer Research*. 2021 Jan 1;19(1):124–35.

146. Ma LL, Liang L, Zhou D, Wang SW. Tumor suppressor miR-424-5p abrogates ferroptosis in ovarian cancer through targeting ACSL4. *Neoplasma*. 2021;68(1):165–73.
147. Xia L, Yang M, Liu Y. *Portulaca oleracea* L. polysaccharide inhibits ovarian cancer via inducing ACSL4-dependent ferroptosis. *Aging* 2024;16(6):5108–22.
148. Trinidad C V., Pathak HB, Cheng S, Tzeng SC, Madan R, Sardu ME, et al. Lineage specific extracellular vesicle-associated protein biomarkers for the early detection of high grade serous ovarian cancer. *Scientific Reports* 2023 13:1. 2023 Oct 26;13(1):1–17.
149. Tomoda H, Igarashi K, Omura S. *Biochim Biophys Acta*. 1987. p. 595–8 Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsin.
150. Sebastiano MR, Konstantinidou G. Targeting Long Chain Acyl-CoA Synthetases for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol 20, Page 3624. 2019 Jul 24 ;20(15):3624.
151. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 May; 23(5):205–15.
152. Modi HR, Basselin M, Rapoport SI. Valnoctamide, a non-teratogenic amide derivative of valproic acid, inhibits arachidonic acid activation in vitro by recombinant acyl-CoA synthetase-4. *Bipolar Disord*. 2014 Dec;16(8):875–80.
153. Tronvik E, Giri S, Young W. Preventive treatment of migraine: Non-specific oral agents. *Handb Clin Neurol*. 2024 Jan 1;199:67–86.
154. Perković Vukčević N, Mijatović Jovin V, Vuković Ercegović G, Antunović M, Kelečević I, Živanović D, et al. Carbapenems as Antidotes for the Management of Acute Valproic Acid Poisoning. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024 Feb 17;17(2):257.
155. Isbister GK, Balit CR, Whyte IM, Dawson A. Valproate overdose: a comparative cohort study of self poisonings. *Br J Clin Pharmacol*. 2003 Apr 1; 55(4):398.
156. Merative M. Valproic Acid (Oral Route) Side Effects - Mayo Clinic. 2024.
157. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model*. 2021;61(8):3891–8.
158. Kim JH, Lewin TM, Coleman RA. Expression and Characterization of Recombinant Rat Acyl-CoA Synthetases 1, 4, and 5. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jan 1;276(27):24667–73.

159. Ortega HH, Salvetti NR, Padmanabhan V. Developmental programming: prenatal androgen excess disrupts ovarian steroid receptor balance. *Reproduction*. 2009;137(5):865–77.
160. Garrido MP, Hurtado I, Valenzuela-Valderrama M, Salvatierra R, Hernández A, Vega M, et al. NGF-Enhanced Vasculogenic Properties of Epithelial Ovarian Cancer Cells Is Reduced by Inhibition of the COX-2/PGE2 Signaling Axis. *Cancers (Basel)*. 2019 Dec 1;11(12).
161. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7; 72(1–2):248–54.
162. Maloberti P, Lozano RC, Mele PG, Cano F, Colonna C, Mendez CF, et al. Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells. *Eur J Biochem*. 2002; 269(22):5599–607.
163. Chen SF, Zhang ZY, Zhang JL. Meloxicam increases intracellular accumulation of doxorubicin via downregulation of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in A549 cells. *Genet Mol Res*. 2015 Nov 18;14(4):14548–60.
164. Pils D, Hager G, Tong D, Aust S, Heinze G, Kohl M, et al. Validating the impact of a molecular subtype in ovarian cancer on outcomes: A study of the OVCAD Consortium. *Cancer Sci*. 2012 Jul;103(7):1334.
165. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat*. 2011 Mar 1;10(2):128–34.
166. Chasalow F, Marr H, Haour F, Saez JM. Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization in rats. *Journal of Biological Chemistry*. 1979 Aug 10;254(13):5613–7.
167. Armandari I, Hamid AR, Verhaegh G, Schalken J. Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy. *Prostate Int*. 2014 Sep; 2(3):105.
168. Xu B, Xing A, Li S. The forgotten type 2 diabetes mellitus medicine: rosiglitazone. *Diabetol Int*. 2022 Jan 1;13(1):49.
169. Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pégorier JP. Troglitazone Inhibits Fatty Acid Oxidation and Esterification, and Gluconeogenesis in Isolated Hepatocytes from Starved Rats. *Diabetes*. 1996 Nov 1;45(11):1556–62.
170. Šali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993 Dec 5;234(3):779–815.

171. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016; 54:5.6.1-5.6.37.
172. David A, Islam S, Tankhilevich E, Sternberg MJE. The AlphaFold Database of Protein Structures: A Biologist's Guide. *J Mol Biol*. 2022 Jan 30;434(2).
173. Höltje HDieter, Folkers Gerd, Beier Thomas. *Molecular modeling: basic principles and applications*. 1997;194.
174. Patrick GL. *An introduction to medicinal chemistry*; 925.
175. Mansour M, Schwartz D, Judd R, Akingbemi B, Braden T, Morrison E, et al. Thiazolidinediones/PPAR γ agonists and fatty acid synthase inhibitors as an experimental combination therapy for prostate cancer. *Int J Oncol*. 2011 Feb;38(2):537–46.
176. Mody M, Dharker N, Bloomston M, Wang PS, Chou FS, Glickman TS, et al. Rosiglitazone sensitizes MDA-MB-231 breast cancer cells to anti-tumour effects of tumour necrosis factor- α , CH11 and CYC202. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun 1;14(2):305–15.
177. Sekino Y, Teishima J. Molecular mechanisms of docetaxel resistance in prostate cancer. *Cancer Drug Resistance*. 2020;3(4):676.
178. Obidiro O, Battogtokh G, Akala EO. Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. *Pharmaceutics*. 2023 Jul 1;15(7).
179. Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr Rev*. 2011 Feb 1;32(1):81–151.
180. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
181. Tortorella E, Giantulli S, Sciarra A, Silvestri I. AR and PI3K/AKT in Prostate Cancer: A Tale of Two Interconnected Pathways. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(3).
182. Bouyahya A, El Allam A, Aboulaghras S, Bakrim S, El Menyiy N, Alshahrani MM, et al. Targeting mTOR as a Cancer Therapy: Recent Advances in Natural Bioactive Compounds and Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 1;14(22).
183. Gasmi A, Roubaud G, Dariane C, Barret E, Beauval JB, Brureau L, et al. Overview of the Development and Use of Akt Inhibitors in Prostate Cancer. *J Clin Med*. 2022 Jan 1;11(1):160.
184. Reiling JH, Sabatini DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene*. 2006 Oct 16;25(48):6373–83.

185. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*. 2006 Sep 8;126(5):955–68.
186. Duda P, Akula SM, Abrams SL, Steelman LS, Martelli AM, Cocco L, et al. Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. *Cells*. 2020 Apr 30;9(5).
187. Liao X, Thrasher JB, Holzbeierlein J, Stanley S, Li B. Glycogen synthase kinase-3beta activity is required for androgen-stimulated gene expression in prostate cancer. *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2941–9.
188. Helfenberger KE, Argentino GF, Benzo Y, Herrera LM, Finocchietto P, Poderoso C. Angiotensin II Regulates Mitochondrial mTOR Pathway Activity Dependent on Acyl-CoA Synthetase 4 in Adrenocortical Cells. *Endocrinology*. 2022 Oct 23;163(12):1–19.
189. Huang Q, Ru Y, Luo Y, Luo X, Liu D, Ma Y, et al. Identification of a targeted ACSL4 inhibitor to treat ferroptosis-related diseases. *Sci Adv*. 2024 Mar 29;10(13):1200.
190. Sinha A, Saini KK, Tripathi K, Khan MA, Satrusal SR, Verma A, et al. ACSL4 activity drives TNBC metastasis by positively regulating Histone H3 Acetylation mediated SNAIL expression. *bioRxiv*. 2023 Oct 31;2023.10.16.562466.
191. Guo F, Lu Y, Du L, Guo X, Xie J, Cai X. ACSL4 could be a potential therapeutic target for severe acute pancreatitis. *Scientific Reports* 2024 14:1. 2024 Jun 12;14(1):1–11.
192. Yang L, Ye F, Liu J, Klionsky DJ, Tang D, Kang R. Extracellular SQSTM1 exacerbates acute pancreatitis by activating autophagy-dependent ferroptosis. *Autophagy* [Internet]. 2023;19(6):1733–44.
193. Han Y, Yuan H, Li F, Yuan Y, Zheng X, Zhang X, et al. Ammidin ameliorates myocardial hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting the ACSL4/AMPK/mTOR-mediated ferroptosis pathway. *BMC Complement Med Ther*. 2023 Dec 1;23(1).
194. Lv P, Liu F. Heme-deficient primitive red blood cells induce HSPC ferroptosis by altering iron homeostasis during zebrafish embryogenesis. *Development (Cambridge)*. 2023 Oct 1 [cited 2024 Jul 10];150(20).
195. Wang ME, Chen J, Lu Y, Bawcom AR, Wu J, Ou J, et al. RB1-deficient prostate tumor growth and metastasis are vulnerable to ferroptosis induction via the E2F/ACSL4 axis. *J Clin Invest*. 2023 May 15;133(10).

- Lo mejor será que bailemos.
- ¿Y que nos juzguen de locos, señor conejo?
- ¿Usted conoce cuerdos felices?
- Tiene razón, bailemos.

