

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster Universitario Biotecnología Clínica



EFFECTO ANTITUMORAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO-DMSA: DESDE LA FERROPTOSIS A LA MIGRACIÓN CELULAR

Autor: Carla Graciano Casero

Tutor: Domingo F. Barber Castaño

Cotutor: Neus Daviu Bou

Villaviciosa de Odón, **17 de julio 2025**

AGRADECIMIENTOS

A Domingo, por darme esta oportunidad tan bonita que me ha hecho enamorarme del tema y disfrutar de cada minuto de esta experiencia. Gracias por tu confianza y por abrirme las puertas a un grupo que me ha hecho crecer como estudiante y como persona.

A Neus, gracias por estar conmigo todos estos meses, por explicarme cada cosa con paciencia y por hacerme sentir acompañada durante todo el proceso. Eres una persona muy especial, y tu alegría ha hecho que incluso los días más duros fueran llevaderos. Me llevo mucho de ti, no solo a nivel académico, sino también personal. Te deseo toda la suerte del mundo en esta nueva etapa, tus futuros alumnos no pueden ser más afortunados. Ojalá todos tuvieran la suerte de cruzarse con alguien como tú.

A María, Elena y Sonia, gracias por ayudarme en todo lo que he necesitado, por hacerme sentir parte de este grupo desde el primer día. Gracias por todos los consejos, las bromas y por este ambiente tan humano que habéis creado. Ha sido un verdadero placer trabajar con vosotras.

A toda la gente que he conocido en el CNB, gracias por acogerme con los brazos abiertos, por integrarme siempre, por los desayunos tan necesarios, por las charlas hablando de cualquier cosa después de comer y por todo el compañerismo que me habéis regalado.

A mis padres y mi hermano, gracias por ser mi base, mi refugio y mi impulso. Gracias por enseñarme a no rendirme, por apoyarme incondicionalmente, por querer siempre lo mejor para mí y por luchar a mi lado. Gracias por darme todo lo que tenéis y mucho más. Sois lo mejor que tengo y todo lo que consiga será siempre también vuestro.

A mis abuelos, gracias por cuidarme desde siempre, por estar pendientes de cada pequeño logro y celebrarlo conmigo como si fuera un gran triunfo. Vuestro amor es el ejemplo más puro y desinteresado que he conocido, y me siento tremendamente afortunada por teneros en mi vida. Gracias por enseñarme con hechos lo que significa querer sin medida. Deberíais ser eternos. Os quiero con todo mi corazón.

A Ares, por ser mi fiel compañero. Me has enseñado que, aunque los comienzos sean duros y nada sea lineal, con amor y paciencia todo se consigue. Gracias por cada paseo, por tu forma de querer sin palabras y por convertirte en una parte fundamental de mi vida. Eres, sin duda, un hermano más.

A Diana, por estar conmigo en las buenas y en las malas desde el primer día. Qué importante es elegir al lado de quien te sientas el primer día de universidad... Gracias por convertirte en familia.

A Irene, por ser mi calma, por tener siempre la palabra justa y por esa fidelidad tuya que es tan difícil de encontrar. El mundo necesita más personas como tú.

A Pablo, por recordarme siempre que sí puedo, que tengo que confiar en mí, y por quererme sin condiciones. Gracias por tu apoyo constante, por levantarme siempre que me caigo y por hacerme sentir tan valiosa.

Muchísimas gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. El cáncer.....	5
1.2. Estrés oxidativo y su impacto en células tumorales	5
1.3. Nanomedicina: nanopartículas de óxido de hierro como terapia antitumoral.....	6
1.4. Mecanismos de muerte celular: ferroptosis.....	8
1.5. Migración celular y nanopartículas de óxido de hierro	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. METODOLOGÍA	10
3.1. Síntesis de IONPs por coprecipitación recubiertas de DMSA.....	10
3.1.1. Dispersión de luz dinámica (DLS)	10
3.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	11
3.1.3. Técnica de espectrofotometría por emisión atómica de plasma (ICP-OES)	11
3.2. Cultivos celulares	11
3.3. Medición de internalización de IONPs	12
3.4. Microscopía confocal	12
3.4.1. Análisis de estrés oxidativo con DHR.....	13
3.4.2. Análisis de la peroxidación de lípidos con Bodipy	13
3.5. Determinación de muerte celular	14
3.5.1. Análisis de inducción de muerte celular mediante PI	14
3.5.2. Presencia de caspasa 3 total o cortada	15
3.6. Esferoides	15
3.6.1. Ensayo de adhesión celular con IONPs.....	16
3.7. Ensayo de migración celular	16
3.8. Análisis estadístico	17
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Caracterización de DMSA-IONPs	17
4.2. Internalización de las IONPs en las líneas celulares	18
4.3. Efecto sobre el estrés oxidativo.....	18
4.4. Inducción de muerte celular	20
4.4.1. Análisis de peroxidación de lípidos.....	22
4.4.2. Presencia de caspasa 3 cortada y total	23
4.5. Análisis de la capacidad migratoria y de adhesión	24
4.5.1. Migración celular	25
4.5.2. Adhesión celular en modelos tridimensionales	25
5. DISCUSIÓN.....	27
6. CONCLUSIONES.....	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32
8. ANEXOS	37

RESUMEN

Las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con ácido dimercaptosuccínico (DMSA-IONPs) presentan propiedades prooxidantes con potencial terapéutico frente al cáncer. En este estudio se evaluaron sus efectos sobre el estrés oxidativo, la viabilidad, el tipo de muerte celular y la capacidad de migración y adhesión en las líneas tumorales humanas MDA-MB-231 y U87MG, mediante modelos en 2D y 3D. El tratamiento con DMSA-IONPs indujo un aumento significativo de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución de la viabilidad celular dependiente de dosis y tiempo, más acentuada en la línea celular MDA-MB-231. No se observó activación de caspasa-3, pero sí peroxidación lipídica, lo que sugiere que la muerte celular está mediada por ferroptosis. En los ensayos de migración y adhesión, los efectos fueron específicos de cada modelo. En la línea celular MDA-MB-231 no se observaron cambios relevantes en adhesión, mientras que en U87MG se redujo significativamente la movilidad de los esferoides tratados. Estos resultados indican que las DMSA-IONPs pueden inducir ferroptosis y alterar procesos asociados a la progresión tumoral, lo que las posiciona como candidatas prometedoras en terapias oncológicas basadas en el estrés oxidativo.

ABSTRACT

Dimercaptosuccinic acid-coated iron oxide nanoparticles (DMSA-IONPs) exhibit pro-oxidant properties with potential antitumor activity. This study evaluated their effects on oxidative stress, cell viability, cell death mechanisms, and migration and adhesion capacity in human tumor cell lines MDA-MB-231 and U87MG, using 2D and 3D models. DMSA-IONPs significantly increased reactive oxygen species (ROS) and reduced cell viability in a dose- and time-dependent manner, with stronger effects in MDA-MB-231. Caspase-3 was not activated, but lipid peroxidation was detected, suggesting ferroptosis. In migration and adhesion assays, effects varied by model: no significant changes were seen in MDA-MB-231 spheroid adhesion, while U87MG spheroid motility was notably reduced after treatment. These findings support the potential of DMSA-IONPs to induce ferroptosis and modulate tumor cell behavior, positioning them as promising candidates for oxidative stress-based cancer therapies.

Palabras clave/Keywords: DMSA-IONPs, estrés oxidativo/*oxidative stress*, ferroptosis, cáncer/*cancer*, migración celular/*cell migration*, adhesión celular/*cell adhesion*, terapia antitumoral/*antitumor therapy*

Anexo 1: Listado de abreviaciones

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

Según el Instituto Nacional del Cáncer, este se define como un grupo de enfermedades multifactoriales que pueden afectar a cualquier parte del organismo en las que existen cambios dinámicos en el genoma de las células que provocan su división rápida y descontrolada formando tumores. Estos tumores en ocasiones pueden propagarse a otros tejidos en un proceso llamado metástasis ¹.

Actualmente, según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo contando con 20 millones de nuevos casos y 9,7 millones de muertes en el año 2022. Se estima que para 2050 los casos aumenten en un 77% alcanzando los 35 millones ², lo que representa un desafío para los sistemas de salud y destaca la necesidad de tratamientos más eficaces y accesibles.

A lo largo de los años, se han descrito ciertas características comunes en las células que les permiten desarrollarse y adquirir un fenotipo cancerígeno. Estas propiedades, conocidas como *Hallmarks of Cancer* ³⁻⁵ buscan representar los principales procesos biológicos implicados en el cáncer a pesar de su heterogeneidad. Uno de los factores determinantes tanto en el desarrollo del tumor como en la resistencia a las terapias es lo que se conoce como reprogramación metabólica. Este proceso, que desarrolla con más en profundidad en el siguiente apartado, está influenciado por diversos elementos como oncogenes, factores de crecimiento, condiciones de hipoxia y pérdida de función de genes supresores, lo que contribuye a la aparición de alteraciones metabólicas características de las células cancerosas ⁶.

1.2. Estrés oxidativo y su impacto en células tumorales

El estrés oxidativo es una de las principales causas de daño celular que se atribuye un desequilibrio entre la producción de radicales libres, predominantemente las especies reactivas de oxígeno (ROS), y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlos ⁷. Las células, en presencia de este estrés oxidativo, reprograman su metabolismo con el fin de satisfacer las altas demandas redox, activando o suprimiendo diferentes vías metabólicas ⁸. Un ejemplo clásico de esto es el efecto Warburg o glicolisis aerobia en la que se fermenta glucosa a lactato en presencia de oxígeno y mitocondrias funcionales ⁹, cuya importancia reside en la activación de otras vías clave en el control redox como la ruta de las pentosas fosfato (PPP) principal proveedora de NADPH, cofactor que regula el estrés oxidativo ^{10,11}. Las ROS son agentes biológicos derivados del oxígeno molecular que surgen tanto de procesos celulares internos como de factores

externos, tienen capacidad oxidativa y actúan como moléculas de señalización importantes ^{7,12}; las principales son los radicales hidroxilos (OH^\cdot), el superóxido (O_2^\cdot) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2)¹³.

El O_2^\cdot se genera principalmente por los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, como resultado de la interacción de los electrones y el oxígeno molecular, sin embargo, dependiendo del tipo celular, también puede producirse a través de las NADPH oxidasas. Por otro lado, el H_2O_2 se origina a partir de la dismutación del O_2^\cdot por superóxido oxidasas o por procesos no enzimáticos, además de por el plegamiento oxidativo de proteínas en el retículo endoplasmático (RE). Por último, el OH^\cdot , altamente reactivo, se forma cuando el H_2O_2 oxida a el Fe^{2+} produciendo OH^\cdot y Fe^{3+} en una reacción conocida como la reacción de Fenton ^{14,15}.

En el cáncer, las ROS juegan un papel fundamental en la supervivencia, proliferación y migración celular. A niveles moderados, las ROS activan vías de señalización como MAPK/ERK, PI3K/AKT o NF- κ B, así como factores como de crecimiento vascular (VEGF) favoreciendo la angiogénesis y crecimiento tumoral⁷. Para adaptarse al estrés oxidativo, las células tumorales incrementan la producción de NADPH y activan la expresión de genes antioxidantes como NRF2 permitiéndoles mantener la homeostasis redox y evitar la toxicidad ¹⁶. Además, la sobreexpresión de enzimas como NADPH oxidasas promueve la transformación maligna y facilita procesos clave como la transición epitelio-mesénquima (EMT) que favorece a la migración e invasión celular ¹⁷.

No obstante, cuando los niveles de ROS superan el umbral de la capacidad antioxidante de las células, se desencadenan daños en lípidos, proteínas y ADN, que activan rutas de muerte celular como apoptosis, necrosis o ferroptosis ^{16,17}. Este desequilibrio redox también puede inducir disfunción mitocondrial, inflamación y acumulación de mutaciones comprometiendo la viabilidad celular ¹⁸. Por ello, las terapias basadas en estrés oxidativo resultan útiles ya que, al encontrarse bajo elevados niveles de ROS, son más susceptibles a un aumento adicional de estos compuestos, provocando daños en las estructuras celulares y conduciendo finalmente a la muerte celular ^{19,20}.

1.3. Nanomedicina: nanopartículas de óxido de hierro como terapia antitumoral

La nanomedicina se define como el uso de materiales de tamaño nanométrico para el diagnóstico, seguimiento, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades ²¹. Las

nanopartículas (NPs), son partículas cuya dimensión varía entre 1 y 100 nm y que presentan diferentes propiedades según su tamaño y funcionalidad de la superficie. Existen diferentes tipos de estas, como las basadas en lípidos, polímeros, carbono o nanopartículas sólidas. Estas últimas comprenden estructuras formadas por diferentes metales como oro, plata, y óxido de hierro ²².

En este trabajo se utilizaron nanopartículas de óxido de hierro (IONPs); han sido ampliamente estudiadas como nanotransportadores magnéticos eficaces para diversas cargas ²³. El creciente interés en las IONPs se debe a varios motivos: su núcleo de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita (Fe_2O_3) ²⁴ presenta propiedades superparamagnéticas, lo que permite direccionarlas al sitio de acción mediante la aplicación de un campo magnético externo, mejora de las imágenes tomadas por resonancia magnética (MRI) y la inducción de hipertermia local ^{23,25}. Gracias al eficiente metabolismo del hierro de los mamíferos, estas NPs presentan una alta biocompatibilidad, reduciendo el riesgo de toxicidad relacionada con el hierro, además, su superficie puede ser fácilmente modificada con polímeros o diversas moléculas bioactivas ²³. En el grupo de investigación de Domingo F. Barber, se han estudiado diferentes recubrimientos para las IONPs como dextrano (DEX), 3-aminopropil-trietoxisilano (APS) ²⁶, ácido dimercaptosuccínico (DMSA) ^{13,26,27} o polietilenamina (PEI) ²⁸ con el fin de evaluar como estos afectan a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Los resultados de su trabajo más reciente demuestran que las IONPs recubiertas con DMSA (DMSA-IONPs) formadas por un núcleo esférico de 10-12 nm, poseen una mayor capacidad para generar estrés oxidativo en distintas líneas celulares. Esta propiedad se atribuye, por un lado, a la baja densidad de su recubrimiento, que facilita la degradación de su núcleo de óxido de hierro en compartimentos ácidos como los lisosomas, donde la superficie metálica del núcleo se vuelve más accesible para enzimas degradativas, permitiendo una rápida liberación de iones Fe que promueven la reacción de Fenton. Por otro lado, contribuye también la presencia de grupos funcionales reactivos, como los tioles (-SH) y carboxilos (-COOH) en las moléculas de DMSA que recubren la superficie. Gracias a esta mayor capacidad para generar estrés oxidativo, las DMSA-IONPs se consideran potenciales inductoras de ferroptosis. Además, también han demostrado que las DMSA-IONPs inducen daño mitocondrial afectando a la proliferación y migración celular ¹³.

1.4. Mecanismos de muerte celular: ferroptosis

Durante muchos años, la apoptosis dependiente de caspasas fue considerada la única forma de muerte celular regulada, lo que llevó al desarrollo de numerosos tratamientos contra el cáncer que basan su efecto terapéutico en este mecanismo ²⁹. No obstante, a lo largo de los años se han ido identificando otras formas de muerte celular no apoptóticas como la piroptosis y necroptosis ^{30,31}.

En 2012 se describió un nuevo tipo de muerte celular regulada, dependiente de hierro, denominada ferroptosis, caracterizada por una peroxidación lipídica letal debido a la acumulación excesiva de ROS ³². Esta presenta rasgos distintivos tanto a nivel morfológico como funcional, se manifiesta principalmente por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, una contracción marcada de las mitocondrias, acompañada de un aumento en la densidad de su membrana y una reducción o pérdida de las crestas mitocondriales ^{32,33}.

Además, las células tumorales, que suelen mostrar resistencia a apoptosis debido a mutaciones como la pérdida de función del gen TP53 ^{3,4}, tienen una mayor demanda de hierro que las células sanas ³⁴. Esta característica ha sido aprovechada en diversas estrategias para inducir ferroptosis aumentando la acumulación intracelular de hierro mediante una mayor captación de iones férricos o la inhibición de su salida de la célula ³⁵.

El exceso de hierro puede generar directamente ROS mediante la reacción de Fenton o activar enzimas que lo contienen, como lipoxigenasas promoviendo la peroxidación lipídica especialmente de los ácidos grasos poliinsaturados que son más propensos a la peroxidación dando lugar a hidroperóxidos lipídicos y diferentes aldehídos secundarios que causan daño a las bicapas lipídicas y afectan a la función de la membrana ^{36,37}.

En este contexto, la ferroptosis ha emergido como una vía prometedora para la terapia antitumoral. Actualmente, existen fármacos aprobados por la FDA que inducen esta forma de muerte celular, y se ha observado que su activación, además, puede potenciar el efecto de las terapias convencionales. Por otro lado, se está estudiando el potencial efecto de las IONPs para inducir la ferroptosis específicamente en células tumorales, abriendo nuevas posibilidades para superar la resistencia terapéutica en distintos tipos de cáncer ³⁴.

1.5. Migración celular y nanopartículas de óxido de hierro

La metástasis es la causa principal de mortalidad en el cáncer. Esta consiste en la migración y propagación de las células tumorales desde el tumor primario a tejidos circundantes u órganos

distantes ^{38,39}. En relación con esto, la migración celular es clave en la metástasis, es un proceso polarizado y estrechamente regulado por el citoesqueleto de actina.

Durante este proceso, la actina experimenta dinámicos ciclos de ensamblaje y desensamblaje ⁴⁰ que permiten la formación de estructuras en el frente celular denominadas lamelipodios que requieren del funcionamiento adecuado de proteínas asociadas a la actina y una abundante disponibilidad de adenosín trifosfato (ATP)^{41,42}. Es por ello que las mitocondrias son desplazadas a distintas ubicaciones celulares, generalmente a este borde delantero para proporcionar el ATP, calcio u otros metabolitos, siendo entonces la reorganización y localización mitocondrial fundamentales en la metástasis y migración ⁴³.

El estrés oxidativo también puede causar una reorganización del esqueleto de actina afectando a la oxidación de esta, de moléculas de señalización o proteínas de unión a la actina ⁴⁴ por lo que, en el contexto de este trabajo, las IONPs que producen estrés oxidativo y que, como ha demostrado el grupo, afectan al metabolismo mitocondrial¹³, podrían ser útiles en el tratamiento de la metástasis.

2. OBJETIVOS

Las terapias basadas en estrés oxidativo están tomando protagonismo como estrategias antitumorales debido a la elevada susceptibilidad de las células cancerosas al desequilibrio redox. A pesar de que estas células presenten niveles basales elevados de ROS sumado a una alta actividad antioxidante, las hace vulnerables a un incremento adicional de este, lo que puede causar que se supere el límite de tolerancia y desencadenar la muerte celular.

Los estudios previos del grupo evidencian que las IONPs, en particular aquellas recubiertas con ácido dimercaptosuccínico (DMSA), poseen un elevado potencial pro-oxidante. Estas inducen la acumulación de ROS en distintas líneas celulares cancerosas asociada a daño lisosomal, disfunción de la distribución mitocondrial, agotamiento de glutatión y muerte celular.

En este trabajo se plantea la hipótesis de que las ROS generadas tras el tratamiento con DMSA-IONPs inducen muerte celular por elevado estrés oxidativo siendo uno de los mecanismos potencialmente involucrados la ferroptosis, considerando la composición química de los núcleos de las IONPs y su recubrimiento de DMSA. Además, se propone que las nanopartículas, debido a su acción en la dinámica mitocondrial y a la reorganización del esqueleto de actina a causa de este estrés oxidativo, pueden alterar la capacidad de migración y adhesión pudiendo tener implicaciones antimetastáticas. Por tanto, se establece como objetivo

principal estudiar los efectos de las DMSA-IONPs sobre el estrés oxidativo, la viabilidad, el mecanismo de muerte celular y la migración en diferentes líneas celulares.

Para ello se implementan diferentes objetivos específicos:

1. Estudio de acumulación de ROS a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento con IONPs.
2. Diferenciar el mecanismo de muerte celular con características específicas de apoptosis y ferroptosis como son la activación de la caspasa 3 y la peroxidación de lípidos.
3. Investigar el efecto de las DMSA-IONPs sobre la capacidad de migración y adhesión con modelos celulares en 2D y 3D.

3. METODOLOGÍA

3.1. Síntesis de IONPs por coprecipitación recubiertas de DMSA

Las nanopartículas de óxido de hierro utilizadas en este trabajo fueron sintetizadas y recubiertas por la Dra. Neus Daviu Bou, siguiendo los protocolos de coprecipitación del laboratorio en colaboración con la Dra. María del Puerto Morales (ICMM-CSIC).

Este método de coprecipitación es el más común para la síntesis de nanopartículas y se basa en precipitar una solución acuosa de sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} en una solución básica. Posteriormente se recubrieron los núcleos resultantes con un componente orgánico para mejorar su estabilidad, biocompatibilidad y farmacocinética que, en este caso, se trata de ácido dimercaptosuccínico (DMSA).

El primer paso será realizar diferentes procedimientos para caracterizar tanto física como químicamente las NPs, como medir la concentración de hierro, el diámetro medio del núcleo y el tamaño de las nanopartículas recubiertas.

3.1.1. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica es una técnica utilizada para la medición del tamaño y la distribución del tamaño de moléculas y partículas en suspensión, en este caso las nanopartículas de óxido de hierro. Se basa en incidir un haz de luz láser a través de la muestra en solución acuosa, las IONPs dispersan la luz en todas las direcciones llegando a un fotodetector con un ángulo fijo. El detector registra las fluctuaciones de la intensidad de luz a lo largo del tiempo debido al movimiento browniano de las partículas, pudiéndolo correlacionar con el tamaño hidrodinámico que estas IONPs adoptan en suspensión.

3.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para determinar la morfología y el tamaño del núcleo de las IONPs se utilizó la microscopía electrónica de transmisión. Primero, se preparó una solución diluida de nanopartículas y se puso una gota de 5 μ L en una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono que se dejó secando a temperatura ambiente. Las imágenes de la rejilla fueron tomadas con un microscopio electrónico JEOL y el diámetro de los núcleos de las IONPs se cuantificó mediante el *software* de análisis ImageJ.

3.1.3. Técnica de espectrometría por emisión atómica de plasma (ICP-OES)

Esta técnica permite medir la concentración de un elemento específico, en este caso hierro. Para ello, se realizó una digestión ácida de 10 μ L de la muestra de IONPs con 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) durante 1h a 90°C y o/n a temperatura ambiente. Posterior a esto, se enrasaron los tubos Falcon a 10 mL con agua MilliQ y se llevaron las muestras a analizar al Instituto de Ciencias Materiales de Madrid (ICMM-CSIC).

3.2. Cultivos celulares

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares distintas, **MDA-MB-231** y **U87MG**, ambas líneas tumorales humanas:

- **MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)**: es una línea establecida de un adenocarcinoma de mama humano que se caracteriza por su naturaleza agresiva e invasiva. Además, este modelo celular se considera triple negativo porque carece de receptores de estrógenos (ER⁻), progesterona (PR⁻) y factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (HER2⁻), lo que hace que estas células sean resistentes a terapias hormonales reflejando un reto clínico.
- **U87MG (ATCC® HBT-14™)**: esta línea procede de un glioblastoma humano, un tumor maligno del sistema nervioso central que se caracteriza por su rápida proliferación, gran capacidad de invasión y gran variabilidad genética y fenotípica.

Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*, FBS), 1% de aminoácidos no esenciales, 2mM de L-Glutamina, 1mM de Piruvato Sódico, 100IU/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. Se mantuvieron en un incubador a 37°C en unas condiciones de 90% de humedad relativa y 5% de CO₂.

3.3. Medición de internalización de IONPs

Para determinar la cantidad de nanopartículas que internalizan las células se empleó de nuevo la técnica de ICP-OES, pero esta vez con un *pellet* de células tratadas con nanopartículas a diferentes concentraciones.

En una placa de 12 pocillos se sembraron 3×10^5 células por pocillo de ambas líneas celulares (MDA-MB-231 y U87MG) utilizando 4 pocillos para cada línea celular y se dejaron crecer durante 24h en el incubador en condiciones estándar. Pasado este tiempo, se aspiró el medio y se trataron las células con 1 mL de una dilución de nanopartículas en medio DMEM por pocillo, en los que se establecieron diferentes condiciones de concentración que se utilizaron a lo largo de este trabajo y se incubaron durante otras 24h:

- Control de células sin tratar
- Tratamiento con nanopartículas a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$
- Tratamiento con nanopartículas a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$
- Tratamiento con nanopartículas a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$

Posterior a esto, se retiró el medio con las IONPs y se lavaron los pocillos con PBS 1X dos veces, para luego añadir 300 μL de Tripsina-EDTA para levantar las células y finalizando con 1,2 mL de DMEM para resuspender las células. Con una cámara de Neubauer se hizo un recuento de del número de células para poder realizar los cálculos de internalización al final de este procedimiento en función del número de células, se centrifugaron las células a 1300 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 200 μL de PBS después de aspirar el medio sobrante. Para continuar, se añadió 1mL de ácido nítrico (HNO_3), se incubó a 90°C 1 hora, o/n a RT y por último se enrasó a 10 mL con agua MilliQ de la misma forma que se mencionó anteriormente para mandar las muestras a analizar al ICM-MS.

La cantidad de hierro se expresó con la siguiente fórmula en relación con la cantidad de células contadas previamente antes de centrifugar:

$$Fe \text{ internalizado } \left(\frac{pgFe}{célula} \right) = \frac{[Fe]_{\text{muestra tratada NPs}}}{n^\circ \text{ de células muestra NPs}} - \frac{[Fe]_{\text{muestra control sin NPs}}}{n^\circ \text{ de células muestra control}}$$

3.4. Microscopía confocal

La microscopía confocal se utilizó con el fin de observar la localización subcelular de las NPs, así como el estrés oxidativo generado por las mismas y la presencia de peroxidación de lípidos causada por la ferroptosis, utilizando diferentes microscopios y sondas según el objetivo del ensayo.

3.4.1. Análisis de estrés oxidativo con DHR

Para detectar las especies reactivas de oxígeno generadas por las IONPs, se empleó una tinción con dihidrorodamina 123 (DHR; Invitrogen), un colorante fluorogénico que es capaz de detectar estas ROS, ya que, después de su captación celular, el DHR se oxida por las ROS en un compuesto fluorescente denominado rodamina 123.

Para realizar este ensayo, se sembraron previamente las células en una placa de 24 pocillos con cubreobjetos previamente colocados y esterilizados con luz UV. Después de incubar las células 24h se realizaron los tratamientos de trabajo a diferentes tiempos ($t=24h$, $t=48h$ y $t=72h$). Una vez terminados los tiempos, se sacaron los cubreobjetos y se colocaron el Parafilm para teñirlos con 100 μ l de una dilución 1:500 en DMEM de la sonda durante 30 minutos en el incubador a 37°C, posteriormente se realizó un lavado con PBS y se fijaron los cubres con PFA 4% durante 10-15 minutos y, por último, se tiñeron los núcleos con DAPI (1:200 en PBS; Sigma-Merck 32670) 5-10 minutos haciendo lavados con PBS entre cada uno de los pasos. Una vez realizadas las tinciones, se realizó un último lavado con PBS para montar las preparaciones en portaobjetos con Fluoromont-G (*Southern Biotec*). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal *Stellaris 5* (*Leica Microsystems*) con un objetivo de aceite de inmersión 63x y un factor de zoom de 4x.

Con el fin de realizar un análisis cuantitativo del estrés oxidativo, se realizó otro ensayo utilizando citometría de flujo. Tanto la siembra como el tratamiento se realizaron de la misma manera que para el ensayo de microscopía, aunque esta vez no se usaron cubreobjetos para sembrar las células. Se tiñeron con DHR 1:20.000 durante 30 min en el incubador y posteriormente se recuperaron las células pasándolas a tubos Eppendorf para centrifugarlas a 1300 rpm durante 5 min. Se resuspendió el pellet en 300 μ l de PBS staining y 3 μ l de PI. En este caso, para DHR se utilizó el canal FL1 (510-540 nm) y para el PI de nuevo FL3 (605-635 nm), y se analizaron los datos con FlowJo.

3.4.2. Análisis de la peroxidación de lípidos con Bodipy

La peroxidación de lípidos se detectó mediante Bodipy 581/591 C11 (*Cell Signaling Technology*®) que es un colorante fluorescente que se localiza en las membranas y se utiliza para medir la peroxidación lipídica en células vivas. Esta sonda de alta sensibilidad presenta un cambio en la emisión fluorescente tras la oxidación de la porción butadienólica poliinsaturada

de su análogo de ácido graso en células vivas. Cuando esto ocurre, los picos de emisión de fluorescencia cambian de rojo (~590nm) a verde (~510nm).

En primer lugar, se sembraron diferentes números de células en una placa Ibidi® de 8 pocillos μ -slide según el tiempo de tratamiento y se dejaron crecer durante 24h. Para continuar, se les aplicó el tratamiento en las concentraciones de trabajo y se trataron durante los tiempos establecidos. Para finalizar, se tiñeron las células con una dilución 4 μ M en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) durante 30 min en el incubador y, pasado este tiempo, se tiñeron los núcleos con Hoechst (1:200 en HBSS) durante 10 minutos realizando lavados entre y después de las tinciones con HBSS. Por último, una vez finalizadas las tinciones, se añadieron 200 μ l de medio para tomar las imágenes con el microscopio confocal *Stellaris 8* (*Leica Microsystems*) con un objetivo de agua 63x y una cámara incubadora debido a que se trata de un ensayo con células vivas. La intensidad de fluorescencia roja y verde de la sonda BODIPY se cuantificó mediante el uso del *software* de análisis ImageJ.

3.5. Determinación de muerte celular

Con el fin de cuantificar la muerte celular provocada por las IONPs y diferenciarla de la apoptosis, se emplearon dos técnicas, la citometría de flujo para medir la inducción de muerte mediante la tinción con PI y Western Blot para poder observar si la muerte causada por las IONPs no activa la caspasa-3, que es específica de apoptosis.

3.5.1. Análisis de inducción de muerte celular mediante PI

Para este ensayo, se utilizaron placas de 12 pocillos en los que se sembraron las células y se dejaron crecer durante 24h y posteriormente se trataron en los tiempos correspondientes a las concentraciones de trabajo.

Se recuperó el medio en un tubo Eppendorf de 2mL ya que se cuantificaron también las células que pudiesen estar muertas en este, además de tripsinizar con 200 μ l las células adheridas a los pocillos, añadiendo una vez que estuvieron levantadas 700 μ l de medio y pasando este contenido al Eppendorf utilizado anteriormente.

Las células se centrifugaron durante 5 min a 1300 rpm y se retiró el sobrenadante para resuspender las células en 300 μ l de PBS staining i y se pasó este volumen a tubos de citometría, donde se añadieron 3 μ l de yoduro de propidio (PI); la fluorescencia de cada condición fue analizada por un citómetro FC500 utilizando el canal FL3 (605-635 nm) para el PI. Para cada

condición se adquirieron un total de 10000 células y se analizaron los resultados con el software de análisis de datos FlowJo.

3.5.2. Presencia de caspasa 3 total o cortada

Como uno de los objetivos es saber si la muerte celular causada por el tratamiento es la ferroptosis, se llevó a cabo un Western Blot para poder diferenciarla de la apoptosis marcando la caspasa-3 que se sintetiza como un proenzima inactiva (en su forma de proteína completa) y solo se activa tras un corte a nivel de un residuo de aspartato efectuado por otras caspasas efectoras, desencadenando la fragmentación del DNA, la degradación de proteínas estructurales y la formación de cuerpos apoptóticos, siendo un marcador fiable de la apoptosis.

Primero, se trataron las células y pasadas 24 h se centrifugaron y resuspendieron en buffer de lisis para incubarlas en hielo durante 1 h. Para eliminar los restos celulares, se realizó una centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min y se recogió el sobrenadante.

Con el fin de determinar la cantidad de proteína de cada muestra, se realizó un ensayo BSA para establecer una curva patrón de referencia. Una vez conocida la concentración, se añadieron 40 µg de proteína de cada muestra a una mezcla de buffer de carga 4X y agua, y se desnaturalizaron las proteínas calentando las muestras 5 min a 90°C en un termobloque antes de cargarlas en el gel. En un gel de acrilamida 10% se cargaron 15 µl de cada muestra por pocillo y se dejó correr a un amperaje constante de 25mA durante aproximadamente 1 h, posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa a 250mA durante 1 h.

Por último, se bloquearon las uniones inespecíficas con leche TBS-T 10%, se incubó con los anticuerpos primarios (*Cleaved-Caspase-3* #9661 y *Caspase-3* #9662; Cell Signaling Technology) en leche TBS-T 1% o/n a 4°C y al día siguiente con el anticuerpo secundario (Goat Anti-Rabbit Inmunoglobulins/HRP; Dako) 1 h a RT, se realizaron múltiples lavados con TBS, TBS-T y se reveló la membrana con ECL (SuperSignal™ West Femto, 34096, ThermoFisher). Como control de carga se utilizó un anticuerpo primario para β -Actina (*β -Actin* A5441; Sigma-Aldrich).

3.6. Esferoides

Dado que uno de los objetivos de este trabajo es analizar si las nanopartículas afectan a la capacidad de migración y adhesión de las células tumorales, se consideró que un modelo esferoideal es el más adecuado para representar las primeras fases del proceso metastático, ya

que permiten evaluar de manera más fiel que un cultivo en monocapa, la capacidad de las células para reorganizarse, diseminarse y adaptarse al entorno.

Para la generación de los esferoides se utilizó la técnica de *hanging-drop* utilizando placas de 40 mm de diámetro con PBS 1X en el fondo actuando como cámara húmeda. Se sembraron gotas de 20 µl con 1000 células por cada una en el caso de U87MG y 2500 en MDA-MB-231. Los esferoides se cultivaron en un incubador con las condiciones mencionadas anteriormente durante 96h.

3.6.1. Ensayo de adhesión celular con IONPs

Tras el tiempo de incubación, se recuperaron los esferoides realizando previamente un corte en la punta de una micropipeta para evitar daños mecánicos en los esferoides durante su manipulación, en primera instancia, se añadió cuidadosamente 1 mL de DMEM sin tratar o tratado a la tapa donde se encontraban las gotas, permitiendo así que los esferoides descendieran suavemente hacia el borde, sin embargo, finalmente se decidió recuperarlos de manera individual para minimizar la disgregación de estos. Se transfirieron a diferentes placas en función del ensayo a realizar:

- Placas de 100 mm sin tratamiento de adhesión para tratar los esferoides durante 24h a una concentración de 125 µg/mL. Estos esferoides, tras el tratamiento, se transfirieron a otra placa específica para células adherentes con medio para observar los efectos de las nanopartículas internalizadas.
- Placas de 48 pocillos, en la que se establecieron 10 esferoides control y 10 tratados a la concentración de trabajo mencionada para observar los efectos inmediatos de las IONPs sobre los esferoides además del efecto que puedan tener al estar estas en suspensión.

Ambas condiciones fueron fotografiadas o/n cada 30 minutos con un microscopio de epifluorescencia DMI6000B (*Leica Microsystems*). Las fotografías de MDA-MB-231 fueron analizadas con el *software* ImageJ midiendo como cambia el área del esferoide a diferentes tiempos: 0h, 1h, 3h, 6h y 12h y las de U87MG mediante el *software* Aivia (*Leica Microsystems*) calculando la trayectoria realizada por estos.

3.7. Ensayo de migración celular

Otro de los objetivos era examinar la capacidad de migración de las células después del tratamiento con DMSA-IONPs, para ello se utilizaron Transwell® 6,5 mm con 8 µm de tamaño de poro (Corning®) utilizando FBS en diferentes concentraciones como quimioatrayente. En

primer lugar, se sembraron las células en una placa p6 y se trataron a una concentración de 125 µg/mL durante 24 h. Posterior a esto, se recuperaron las células, se resuspendieron en 1 mL de DMEM sin FBS y se sembraron 50.000 células en la parte superior del Transwell en un volumen total de 100 µl añadiendo en el fondo de la placa 600 µl de medio, estableciendo como control negativo de migración una concentración de 0,2% de FBS y como control positivo 10% de FBS. Se dejaron migrar en el incubador durante 6 h para luego fijarlas en PFA 4% 15 min y por último teñirlas con DAPI 1:500 15 min para luego observarlas al microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000B. Se sacaron diferentes fotos de la parte inferior del inserto de Transwell y se cuantificaron las células migradas mediante ImageJ.

3.8. Análisis estadístico

Los datos que se muestran a continuación se corresponden a media \pm desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos. Se ha aplicado la prueba t-Student, y un ANOVA de uno o dos factores, además de comparaciones múltiples de contraste con una prueba Dunnett, para estudiar la diferencia entre los datos del tratamiento y los grupos control y una prueba Šidák realizar comparaciones entre grupos. El nivel de significación empleado fue $\alpha=0,05$ y los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$ (*) o $p < 0,01$ (**) y altamente significativos cuando $p < 0,001$ (***) o $p < 0,0001$ (****). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el *software* Prism 9.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de DMSA-IONPs

Para confirmar las propiedades morfológicas y de dispersión de las nanopartículas utilizadas, se realizó un análisis mediante TEM, DLS e ICP-OES. En la Figura 1 se resume la comparación del tamaño del núcleo de las nanopartículas determinado por TEM (Figura 1a) y su tamaño hidrodinámico una vez recubiertas con DMSA medido mediante DLS (Figura 1b).

Las IONPs muestran un núcleo esférico con un tamaño de entre 10 y 12 nm, mientras que el análisis hidrodinámico revela un tamaño de 28 nm, este aumento se debe al recubrimiento de DMSA y a la capa de hidratación que se forma en disolución. Por otro lado, la concentración total de hierro en la suspensión se determinó por ICP-OES, se obtuvo un valor de 15,06 mg/L (Figura 1b). Este valor se empleó como referencia para las diluciones utilizadas en los ensayos de tratamiento de los cultivos celulares (125, 250 y 500 µg/mL).

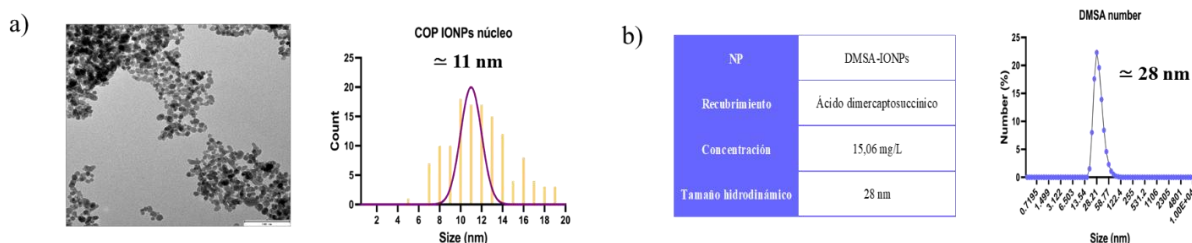


Figura 1: Caracterización de IONPs. a) Fotografía TEM de una muestra de las IONPs e histograma de la distribución de tamaños del núcleo. b) Tabla resumen de las características de las IONPs utilizadas en este trabajo y gráfico de distribución del tamaño hidrodinámico.

4.2. Internalización de las IONPs en las líneas celulares

Con el fin de determinar si la dosis de trabajo afecta a la internalización de las DMSA-IONPs, se realizó un tratamiento durante 24 h y se cuantificó la cantidad de hierro intracelular por ICP-OES.

Como se observa en la Figura 2, en la línea MDA-MB-231 (izquierda), la captación no varió con la dosis, mientras que en U87MG (derecha) hubo una mayor internalización, especialmente a 125 $\mu\text{g/mL}$, alcanzando hasta 43 pg de hierro por célula, comparado con los menos de 19 pg de hierro por célula en MDA-MB-231; esto podría relacionarse con el elevado tráfico endolisosomal que presenta U87MG.

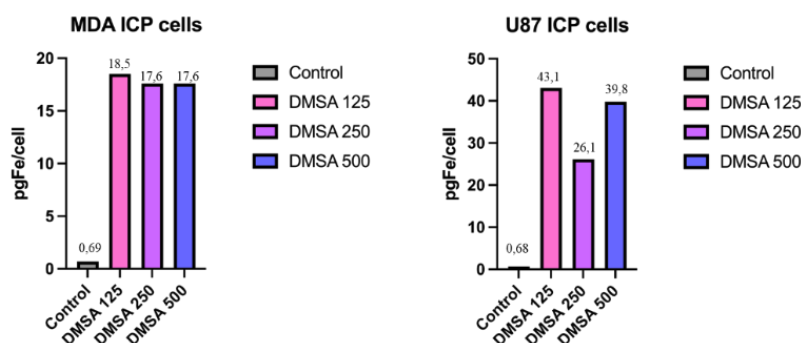


Figura 2: Gráfico de barras del contenido intracelular de hierro (pgFe/cell) medido por ICP-OES tras 24 h de tratamiento a diferentes concentraciones de DMSA-IONPs en MDA-MB-231 (izquierda) y U87MG (derecha).

4.3. Efecto sobre el estrés oxidativo

Se evaluó si la producción de ROS intracelular aumentaba con el incremento de la dosis de DMSA-IONPs y con el tiempo de tratamiento (24, 48 y 72 h) utilizando la sonda DHR, una sonda no fluorescente que se oxida en presencia de ROS generando entonces fluorescencia en el interior celular. Este ensayo se realizó tanto de forma cualitativa por microscopia confocal como cuantitativa por citometría de flujo para visualizar más claramente los datos.

En primer lugar, en MDA-MB-231 se observó que en todas las condiciones los niveles de ROS aumentaban significativamente respecto al control (Figura 3), que presenta unos niveles de ROS basales (muy poca fluorescencia marcada en rojo). Tras 24h de tratamiento (Figura 3a), la dosis intermedia (250 $\mu\text{g/mL}$) y alta (500 $\mu\text{g/mL}$) producen unos niveles de ROS muy altos respecto al control con una diferencia significativa de $p < 0,01$, por otro lado, la dosis baja (125 $\mu\text{g/mL}$) también muestra una diferencia significativa con el control, aunque menor que las otras dosis. A 48 (Figura 3b) y 72 h (Figura 3c), los niveles de ROS se mantienen más o menos iguales en todas las dosis de trabajo con un $p < 0,01$, exceptuando la condición de dosis intermedia a 72 h en la que la significancia disminuye ligeramente.

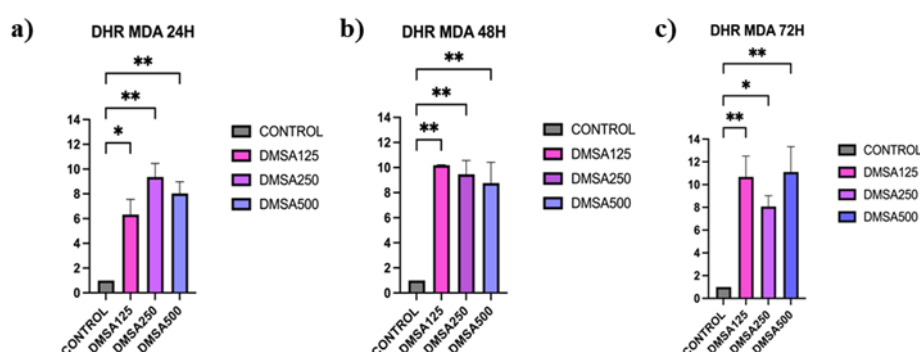


Figura 3: Análisis del estrés oxidativo con DHR en MDA-MB-231, los gráficos corresponden a el análisis por citometría de flujo donde los datos están relativizados al control a) Gráfico de barras a 24 h. b) Gráfico de barras a 48 h. c) Gráfico de barras a 72 h.

En segundo lugar, U87MG presenta unos niveles de ROS también significativos en todas las condiciones respecto al control, sin embargo, en esta línea celular, se observa un aumento de estos niveles en función de la dosis (dosis dependiente). A 24 h, los niveles de ROS se duplican respecto al control en la dosis baja y aumentan progresivamente respecto a este a la dosis intermedia y alta; a 48 h los niveles en las dosis intermedia y alta aumentan respecto a los de 24 h llegando a ser hasta 4 veces los niveles del control en la dosis alta. Por último, a 72 h se observa un descenso general en los niveles de ROS en todas las dosis (125 - ns; 250 - $p < 0,05$; 500 - $p < 0,01$).

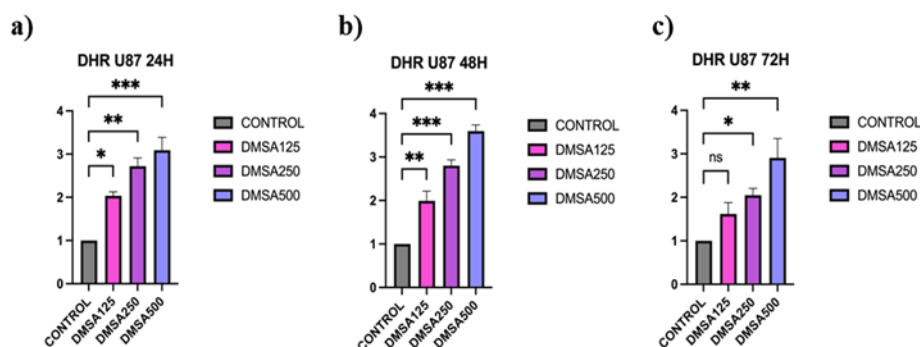


Figura 3: Análisis del estrés oxidativo con DHR en U87MG, los gráficos corresponden a el análisis por citometría de flujo donde los datos están relativizados al control. a) Gráfico de barras a 24 h. b) Gráfico de barras a 48 h. c) Gráfico de barras a 72 h.

El análisis cualitativo de la inducción de ROS muestra diferencias entre ambos tipos celulares. La fluorescencia de DHR se distribuye por el citoplasma en forma de gránulos más grandes en MDA-MB-231 (Anexo 2) y pequeños y abundantes en U87MG (Anexo 3), compatible con la acumulación de ROS en estructuras como los lisosomas. Además, por lo general en dosis más altas y en tiempos más largos, la tinción de DHR se distribuye homogéneamente por todo el citoplasma lo que podría indicar que hay un exceso de ROS tan alto que ya no solo se acumula en lisosomas, sino que hay más estructuras celulares comprometidas por la oxidación. En conclusión, tanto la falta de diferencias en MDA-MB-231 respecto al tiempo y la concentración como la bajada de niveles de ROS en U87MG podrían corresponderse con una adaptación por parte de las células tamponando las ROS o a la inducción de muerte celular debido a un estrés oxidativo muy elevado.

4.4. Inducción de muerte celular

Se realizó un ensayo de citometría de flujo para estudiar si las dosis y los tiempos de trabajo podrían estar induciendo muerte celular en ambas líneas celulares, utilizando PI que no permea en células vivas. Además, se quiso evaluar si el tipo de muerte es por apoptosis o ferroptosis, por lo que se complementó este ensayo con la medición de peroxidación de lípidos, proceso característico de ferroptosis, y con un Western Blot para cuantificar la activación de caspasa 3, una proteína clave en la cascada de señalización apoptótica y marcador útil para detectar este tipo de muerte.

En MDA-MB-231, se observó una disminución de la viabilidad celular significativa desde las primeras 24 h, con una reducción marcada a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$, y mayor a 500 $\mu\text{g/mL}$ lo que sugiere que esta línea presenta una alta sensibilidad al tratamiento especialmente a dosis altas

(Figura 4a). A las 48 h, no se evidenció un incremento de la muerte celular respecto al tratamiento a 24 h, solo a dosis alta es significativa respecto al control, incluso se observa una ligera recuperación de la viabilidad en la dosis intermedia (Figura 4b); no obstante, a las 72 h la citotoxicidad volvió a intensificarse, con una reducción significativa en todas las dosis de trabajo (125 – $p<0,01$; 250 y 500 – $p<0,0001$), confirmando un efecto dependiente de la dosis y el tiempo a largo plazo (Figura 4c).

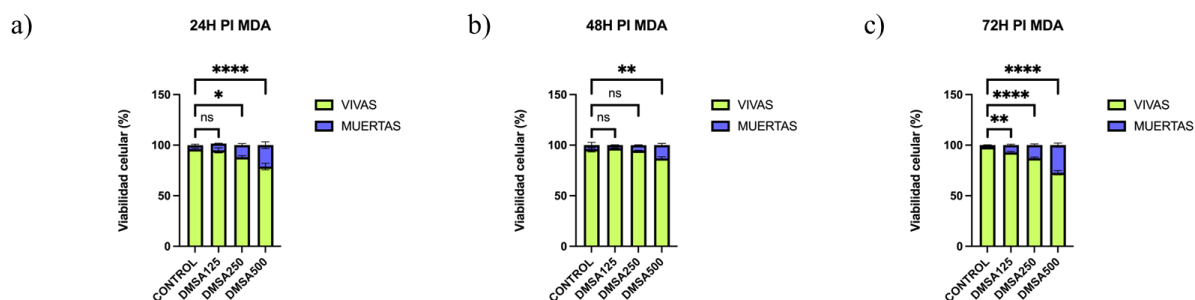


Figura 4: Viabilidad celular en MDA-MB-231 tras el tratamiento con DMSA-IONPs evaluado mediante citometría de flujo con PI. a) Tratamiento a 24 h. b) Tratamiento a 48 h. c) Tratamiento a 72 h.

Por otro lado, en U87MG, la viabilidad se mantuvo relativamente alta a 24 (Figura 5a) y 48 h (Figura 5b), con una disminución significativa únicamente a dosis alta (24 h - $p<0,0001$; 48 h – $p<0,001$). A las 72 h, la reducción fue más evidente a concentraciones medias (y altas, lo que podría indicar un mayor efecto a largo plazo del tratamiento (Figura 5c).

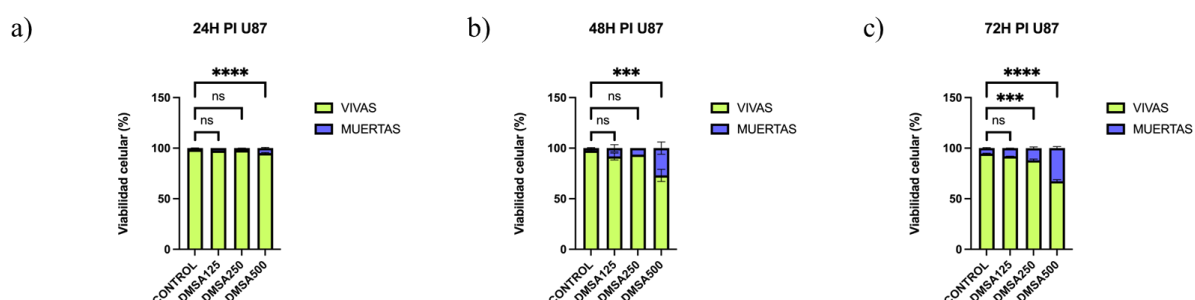


Figura 5: Viabilidad celular en U87MG tras el tratamiento con DMSA-IONPs evaluado mediante citometría de flujo con yoduro de propidio (PI). a) Tratamiento a 24 h. b) Tratamiento a 48 h. c) Tratamiento a 72 h.

Una vez confirmado que el tratamiento genera muerte en las células, se quiso comprobar si esta era apoptosis o ferroptosis, un nuevo tipo de muerte inducida por hierro que podría ser útil para mejorar la resistencia a terapias que inducen apoptosis en las células tumorales. Para ello, se realizaron los ensayos complementarios mencionados anteriormente.

4.4.1. Análisis de peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos es una de las principales consecuencias del estrés oxidativo y constituye una señal clave en la activación de ferroptosis. Para evaluar si el tratamiento provocaba peroxidación lipídica en MDA-MB-231 y U87MG, se utilizó la sonda Bodipy 581/591 C11 que tras la oxidación de su segmento poliinsaturado provoca un desplazamiento en la emisión fluorescente de rojo a verde. Tras la incubación de las células con las dosis y tiempos de trabajo, se analizó si la fluorescencia verde (peroxidación) incrementaba por microscopía confocal y se midió la intensidad de esta con ImageJ.

La línea MDA-MB-231 tratada con DMSA-IONPs (Anexo 4) mostró un aumento significativo de la peroxidación lipídica, especialmente evidente a 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ tras 24 y 48 h. En las primeras 24 h, a dosis baja el aumento fue significativo ($p < 0,01$) siendo mayor todavía a intermedia y alta ($p < 0,0001$). A las 48 h, se observa casi el mismo patrón (125 – $p < 0,01$; 250 – $p < 0,0001$; 500 – $p < 0,01$). Sin embargo, a las 72 h únicamente 125 $\mu\text{g/mL}$ mostró un aumento significativo ($p < 0,0001$); esto coincide de cierta manera con los resultados obtenidos en los ensayos con DHR y de viabilidad celular con PI, pudiendo indicar que las células que sobreviven terminan adaptándose al estrés oxidativo.

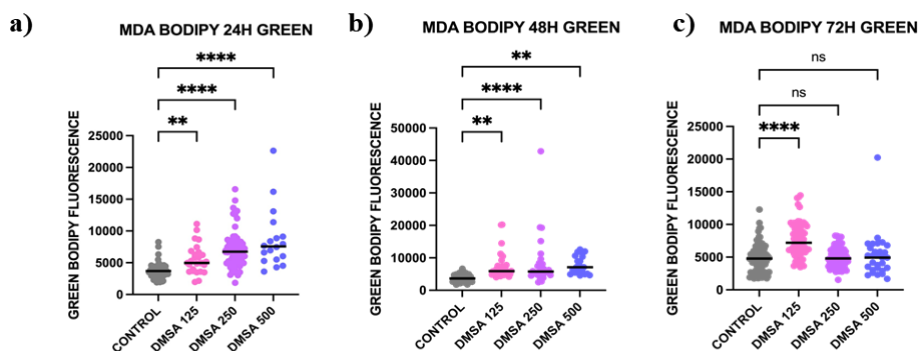


Figura 6: Análisis de la peroxidación lipídica en MDA-MB-231, los gráficos corresponden a el análisis de la fluorescencia verde con a) Diagrama de dispersión a 24 h. b) Diagrama de dispersión a 48 h. c) Diagrama de dispersión a 72 h.

En el caso de U87MG (Anexo 5), los efectos fueron diferentes en cuanto a la dinámica dosis-respuesta. A las 24 y 48 h solo la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ indujo un aumento significativo de peroxidación lipídica ($p < 0,0001$). A las 72 h, el efecto se extendió también a dosis medias, tanto a 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ presentaron un nivel de peroxidación muy significativo ($p < 0,0001$). Esto también concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en el ensayo de muerte, donde solo se detecta muerte a concentraciones altas en todos los tiempos e intermedias a 72 h,

por otro lado, en comparación con los resultados de DHR, es decir, de estrés, a pesar de que el estrés era elevado, esto no parece haber afectado a la peroxidación y a la muerte, lo que podría significar que U87MG es más resistente al estrés oxidativo que MDA-MB-231.

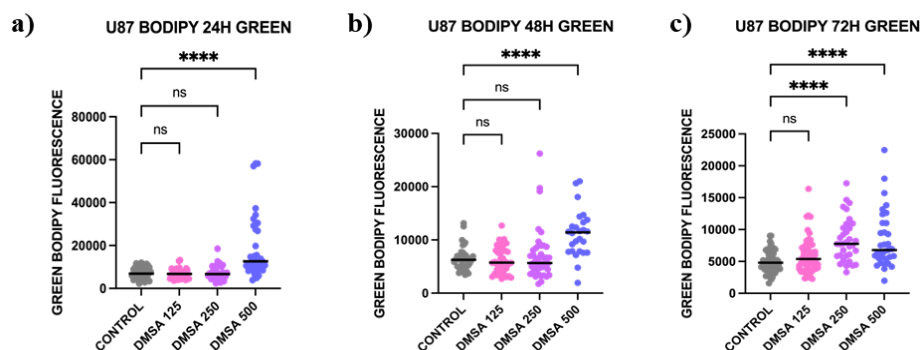


Figura 7: Análisis de la peroxidación lipídica en U87MG, los gráficos corresponden a el análisis de la fluorescencia verde con ImageJ. a) Diagrama de dispersión a 24 h. b) Diagrama de dispersión a 48 h. c) Diagrama de dispersión a 72 h.

4.4.2. Presencia de caspasa 3 cortada y total

Con el objetivo de determinar si la muerte celular inducida por DMSA-IONPs, estaba mediada por apoptosis, se analizó la expresión de caspasa-3, que como se comentó anteriormente, es un marcador específico y ampliamente utilizado de apoptosis, además, estudios demuestran que la ferroptosis es una ruta independiente de la cascada de caspasas. Para ello, se trataron ambas líneas celulares durante 24 h con las dosis de trabajo.

Tal como se muestra en la Figura 8a, en MDA-MB-231 la expresión de caspasa-3 total se muestra uniforme en todas las condiciones, indicando que esta línea celular expresa la proteína y que los niveles basales de expresión no se ven afectados por el tratamiento. En la condición de control negativo, la banda de caspasa-3 total se ve más tenue debido a que hay una gran cantidad de proteína en el carril del control positivo y se expuso la membrana solo 2 segundos debido a la saturación de la imagen, sin embargo, se puede comprobar que existe proteína con la banda de expresión de β -actina. Por otro lado, la ausencia de caspasa-3 cortada en las condiciones tratadas sugiere que las células no están activando la vía apoptótica clásica en respuesta a las nanopartículas.

En U87MG (Figura 8b), la expresión de caspasa-3 total también es uniforme en todos los carriles indicando la presencia de la proenzima en esta línea celular. A 125 y 250 µg/mL no se detectó muerte celular mediante citometría, sin embargo, a 500 µg/mL la viabilidad celular se

vio comprometida en las primeras 24 h y en este ensayo no se observa una banda para esta condición en caspasa-3 cortada, lo que podría sugerir que la muerte no ocurre por apoptosis.

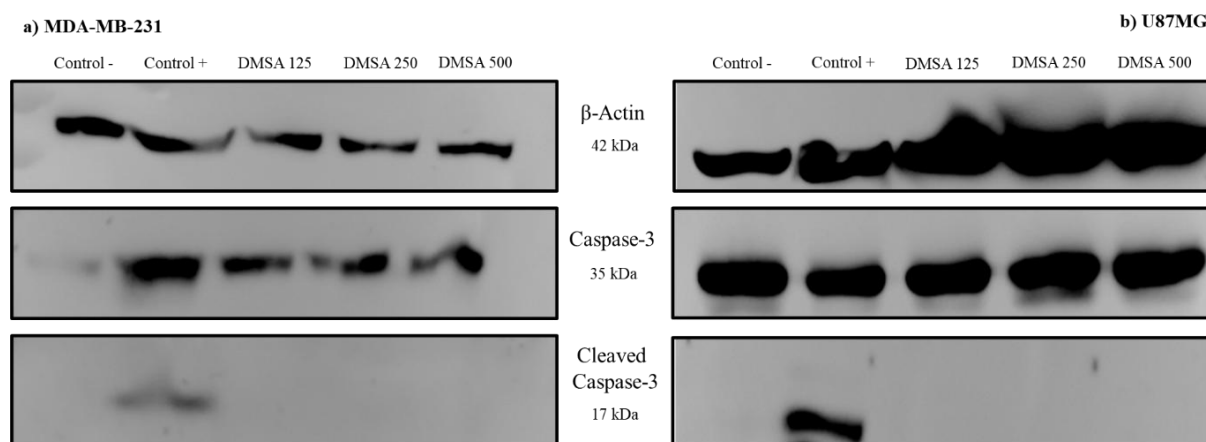


Figura 8: Western Blot en MDA-MB-231 (a) y U87MG (b) tratadas con DMSA-IONPs durante 24 h a 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$. Se muestran las bandas correspondientes a β -actina (arriba), caspasa-3 total (centro) y caspasa-3 cortada (abajo). Se incluye un control negativo y uno positivo de apoptosis, para el que se aplicó una concentración de estaurosporina 1 μM o/n.

Estos resultados, en combinación con los obtenidos de peroxidación de lípidos sugieren que, en MDA-MB-231 se produce una muerte celular mediada por ferroptosis en las primeras 24 h, ya que la viabilidad celular está comprometida, existe presencia de peroxidación lipídica significativa y dosis-dependiente y no se observa activación de caspasa-3 cortada. Por otro lado, en U87MG dado que la viabilidad celular se ve comprometida y la peroxidación lipídica es elevada a dosis alta, junto con la ausencia de caspasa-3 cortada en esta condición, se podría afirmar que en esta línea celular la dosis de 500 $\mu\text{g/mL}$ en las primeras 24 h producen muerte por ferroptosis.

4.5. Análisis de la capacidad migratoria y de adhesión

Finalmente, con el objetivo de evaluar el impacto de las DMSA-IONPs sobre propiedades clave asociadas al comportamiento metastático, se realizaron ensayos de migración y adhesión celular tratando ambas líneas con una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ y posteriormente se sometieron a los ensayos específicos para analizar los posibles efectos sobre la capacidad de las células de migrar y adherirse.

4.5.1. Migración celular

Para estudiar el efecto de las DMSA-IONPs sobre la capacidad migratoria de las dos líneas celulares, se realizó un ensayo de migración tipo Transwell. Como quimioatrayente se utilizó DMEM con 10% de FBS y como control negativo de migración con un 0,2%.

En ambas líneas celulares, se observó un aumento en la migración en las condiciones tratadas respecto al grupo control con 10% de FBS (MDA-MB-231 – $p < 0,0001$; U87MG – $p < 0,05$). No obstante, en la línea MDA-MB-231 (Figura 9a), se evidencia un comportamiento inesperado en los controles, ya que el grupo con 0,2% de FBS, lo cual podría deberse a algún error en el ensayo y sugiere la necesidad de repetir el experimento para confirmar los resultados. En contraste, en la línea U87MG (Figura 9b), los controles negativos y positivos se comportaron según lo esperado, mostrando una mayor migración en presencia de 10% de FBS. Estos resultados, a pesar de que se tendría que repetir el ensayo para confirmarlo, podrían indicar que este tratamiento puede inducir una mayor motilidad en ambas líneas celulares.

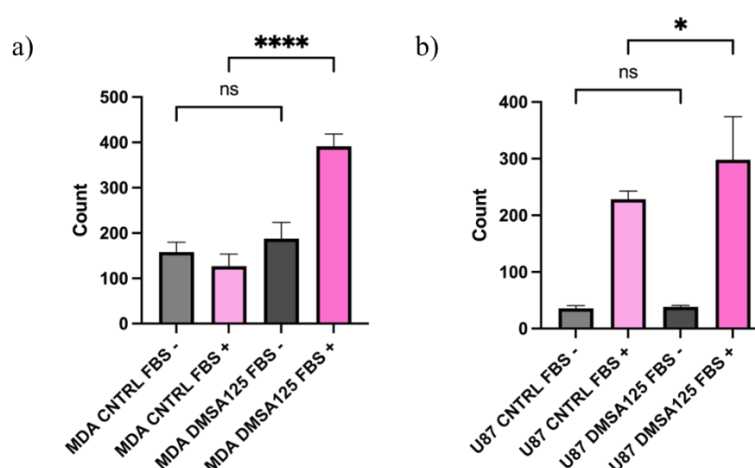


Figura 9: Ensayo de migración celular con Transwell, el control FBS – representa una concentración de 0,2% de FBS y el control FBS+ un 10% de este utilizado como quimioatrayente. Las células se dejaron migrar durante 6 horas. a) Ensayo con MDA-MB-231. b) Ensayo con U87MG.

4.5.2. Adhesión celular en modelos tridimensionales

Para estudiar el efecto de las DMSA-IONPs sobre la adhesión celular, se generaron modelos esféricos tridimensionales en ambas líneas celulares y se llevaron a cabo dos variantes experimentales, en la primera se colocaron directamente los esféricos en un medio que contenía una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ de DMSA-IONPs para estudiar su efecto en suspensión y la segunda en la que fueron tratados durante 24 h a esta misma dosis, tras lo cual se transfirieron a un medio libre de DMSA-IONPs para evaluar el efecto tras la internalización

de estas. En ambas, se monitorizaron a lo largo del tiempo mediante captura de imágenes durante 12 h.

En el caso de MDA-MB-231, se midió el área de expansión a 0, 1, 3, 6 y 12 h y los valores se normalizaron respecto al tamaño inicial de cada esferoide con el fin de evitar sesgos derivados de diferencias iniciales de tamaño. Los resultados obtenidos en ambas variantes experimentales (Figura 10) muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los esferoides control y los tratados en ninguno de los puntos temporales analizados.

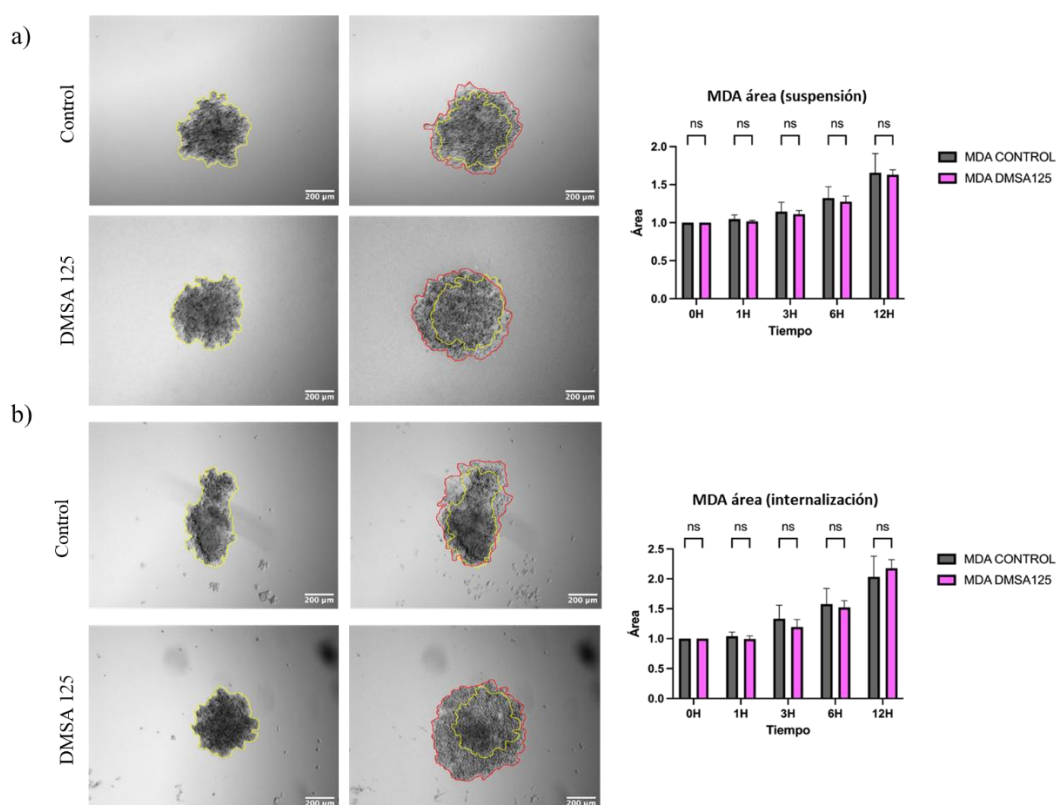


Figura 10: Análisis de la adhesión de esferoides de MDA-MB-231 en condiciones 3D. Las gráficas muestran la comparación del área relativa de los esferoides en el tiempo (0, 1, 3, 6 y 12 h) entre células tratadas con DMSA-IONPs (125 µg/mL). a) Imágenes representativas y datos de los esferoides de la condición con las nanopartículas en suspensión, las imágenes muestran el área inicial (amarillo) y el área final tras 12 h (rojo); b) Imágenes representativas y datos de los esferoides previamente tratados durante 24 h, las imágenes muestran el área inicial (amarillo) y el área final tras 12 h (rojo).

En U87MG, los esferoides no llegaron a adherirse claramente al sustrato en ninguna de las condiciones. No obstante, se observó visualmente una diferencia en el desplazamiento de estos a lo largo del tiempo; por tanto, se analizó cuantitativamente el recorrido y velocidad mediante el software Aivia basado en inteligencia artificial. En la condición con nanopartículas en

suspensión (Figura 11a), los esféroides control mostraron un mayor desplazamiento y velocidades medias más altas en comparación con los tratados ($p < 0,01$) indicando que las DMSA-IONPs pueden reducir la movilidad general de los modelos tridimensionales en estas condiciones. Tras el tratamiento de 24 h (Figura 11b), no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, lo que sugiere que en este caso las DMSA-IONPs no tendrían ningún efecto aparente.

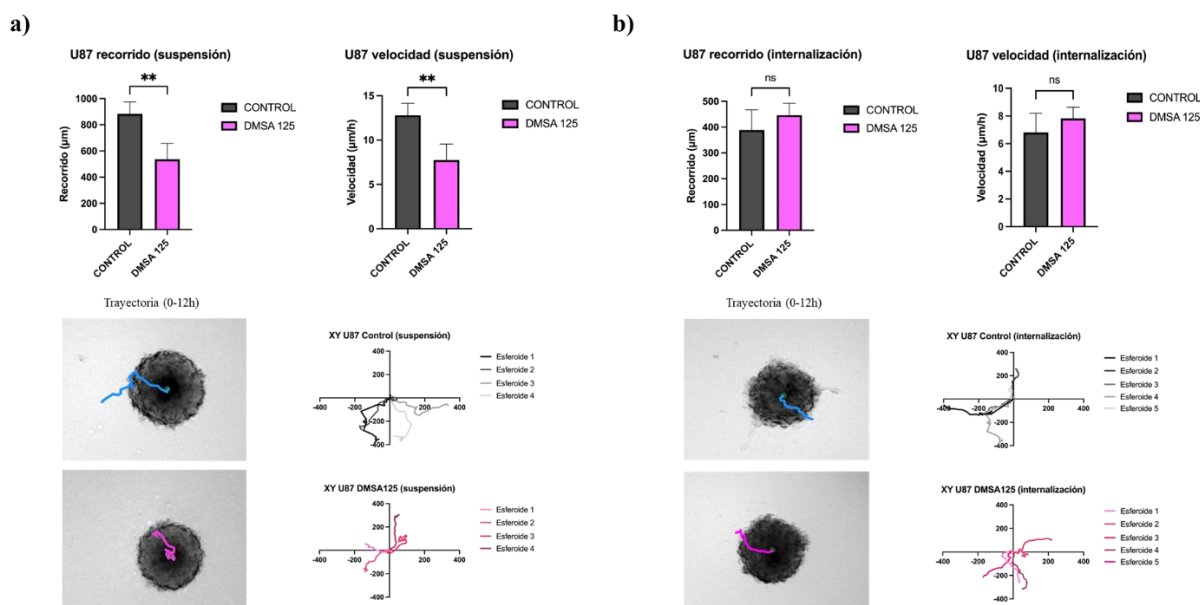


Figura 11: Análisis de la movilidad de esféroides U87MG en condiciones 3D mediante seguimiento de trayectoria durante 12 h. a) Esféroides incubados con DMSA-IONPs en suspensión. Las gráficas superiores muestran la comparación entre esféroides control y tratados en cuanto al recorrido total (izquierda) y velocidad media (derecha). Debajo se incluyen imágenes representativas de la trayectoria individual de un esferoide control (arriba; azul) y tratado (abajo; rosa), junto con gráficos que muestran las trayectorias de todos los esféroides analizados. b) Esféroides pretratados con DMSA-IONPs durante 24 h antes del ensayo. Se presentan las mismas que en el apartado anterior; variables: recorrido total (izquierda) y velocidad media (derecha) así como las trayectorias individuales correspondientes.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo, se han estudiado los posibles efectos antitumorales de las DMSA-IONPs en dos modelos celulares tumorales, se ha observado que estas IONPs inducen estrés oxidativo y una reducción de la viabilidad celular. Los datos obtenidos, apuntan a que esta citotoxicidad podría estar mediada por mecanismos compatibles con la ferroptosis. En cuanto a funciones relacionadas con la progresión tumoral, como la migración y la adhesión celular, los resultados no fueron concluyentes en la mayoría de los casos, sin embargo, en el modelo U87MG si se

observaron ciertos efectos en los esferoides tratados, lo que sugiere un posible impacto funcional que debe ser investigado con mayor profundidad.

En primer lugar, la caracterización fisicoquímica de las DMSA-IONPs realizada mediante TEM, DLS e ICP-OES fue fundamental para confirmar sus propiedades. El núcleo de óxido de hierro mostró un tamaño promedio de 10-12 nm (Figura 1a), lo que indica que se encuentran en un rango ideal para su correcta internalización^{13,45,46} y un tamaño hidrodinámico de aproximadamente 28 nm tras el recubrimiento con DMSA (Figura 1b) debido a la capa de hidratación. Además, la superficie recubierta con DMSA mejora la biocompatibilidad de las IONPs, y favorece su internalización en las células tumorales, reduciendo su toxicidad inespecífica⁴⁷.

Uno de los principales hallazgos fue el incremento significativo en los niveles intracelulares de ROS tras el tratamiento con DMSA-IONPs tanto en MDA-MB-231 como en U87MG. En ambas líneas celulares, los resultados obtenidos con la sonda DHR confirman la producción de ROS, pero de distinta forma; mientras que MDA-MB-231 mostró un aumento temprano sin grandes variaciones posteriores, U87MG exhibió un incremento progresivo, especialmente evidente a dosis altas con una disminución de estos niveles a las 72 h. Esta diferencia podría deberse a mecanismos adaptativos como la activación de vías metabólicas que permiten a ciertas células neutralizar parte del daño oxidativo^{16,17}, debido a los niveles basales de ROS de cada línea celular, ya que como se puede ver en las imágenes de los controles, MDA-MB-231 presenta unos niveles iniciales de ROS inferiores a U87MG lo que le conferiría a esta última una mayor resistencia de partida. Es importante destacar, que, aunque la línea celular U87MG presenta una internalización mayor de las DMSA-IONPs (Figura 2) respecto a la línea MDA-MB-231, es esta última la que presenta una mayor producción de ROS intracelular (Figura 3 y Figura 4), indicando posibles diferencias en dinámicas de internalización y tráfico intracelular de IONPs.

El efecto citotóxico de las DMSA-IONPs se evidenció en los ensayos de viabilidad celular, observación que coincide con la bibliografía consultada donde subrayan que niveles elevados de ROS en células tumorales pueden inducir daño y muerte celular cuando se sobrepasa el límite de la actividad antioxidante de las células para responder ante el estrés oxidativo^{7,17,18}. MDA-MB-231 resultó ser más sensible al tratamiento con DMSA-IONPs que U87MG, esta sensibilidad diferencial podría estar relacionada con la distinta capacidad de cada línea celular para gestionar el estrés oxidativo, además del elevado tráfico vesicular de U87MG, por el cual

podría estar exocitando las DMSA-IONPs antes de su degradación, evitando así un daño más acentuado⁴⁸.

En cuanto al mecanismo de muerte celular, los resultados de este trabajo sugieren una muerte mediada por ferroptosis, que, como se ha descrito anteriormente, se caracteriza por una peroxidación lipídica letal por la acumulación de ROS en presencia de hierro³². El ensayo realizado con la sonda Bodipy, dio como resultado un aumento significativo de la peroxidación lipídica especialmente en la línea MDA-MB-231 dentro de las primeras 24 h. En el caso de U87MG, también se observó un incremento de la peroxidación lipídica a la dosis de 500 µg/mL dentro de estas 24 h de tratamiento. Además, en ambas líneas celulares, el ensayo de Western Blot, en el que no se detectó una activación de caspasa-3, lo que permitiría descartar la apoptosis como mecanismo principal de muerte en estas condiciones experimentales, considerando que la ferroptosis ocurre de manera independiente a la vía de las caspasas³²⁻³⁴. En conjunto, estos resultados y los de viabilidad celular, sugieren que, a dosis intermedias y altas en MDA-MB-231 y solo a dosis altas en U87MG, la muerte celular inducida por DMSA-IONPs podría estar mediada principalmente por ferroptosis.

Actualmente, estos resultados están siendo ampliados mediante ensayos adicionales llevados a cabo por Neus Daviu con el objetivo de confirmar que el mecanismo de muerte observado corresponde efectivamente a ferroptosis. Estos ensayos incluyen protocolos para la detección de daño lisosomal, cuantificación de glutatión intracelular (GSH) y la evaluación de genes clave implicados en esta vía. Esto permitirá caracterizar de manera más precisa las alteraciones celulares inducidas por DMSA-IONPs y contribuirán a validar si la muerte observada responde a un perfil ferroptótico, tal y como han sugerido investigaciones previas en modelos similares.

Por otro lado, otro de los aspectos evaluados fue la capacidad migratoria y de adhesión celular, procesos fundamentales implicados en la metástasis^{38,39}. En el ensayo de migración tipo Transwell, se observó un incremento en la migración de ambas líneas tras el tratamiento. Estos resultados en MDA-MB-231, deben ser interpretados con cautela debido a inconsistencias en los controles, reflejando la necesidad de repetir el ensayo por posibles errores en su realización. En U87MG, estos mayores niveles de migración podrían explicarse de acuerdo con la bibliografía, reflejando que niveles moderados de ROS, como es el caso a dosis de 125 µg/mL durante 24 h en esta línea, podrían activar rutas de señalización que favorezcan la migración celular^{7,16}. Por tanto, aunque se esperaba un efecto anti-migratorio, no puede descartarse que,

en condiciones subletales, como es esta dosis, las ROS actúen como mediadores de señalización pro-migratoria.

Respecto a los modelos tridimensionales permitieron estudiar en mayor profundidad la adhesión y movilidad celular en condiciones que simulan mejor un modelo tumoral. En MDA-MB-MB-231, las DMSA-IONPs no mostraron un efecto significativo sobre la expansión del área de los esferoides, lo que sugiere que la dosis utilizada (125 $\mu\text{g/mL}$) no afecta significativamente a la adhesión; cabe recalcar que esta línea es de cáncer de mama triple negativo, por lo que posee un fenotipo altamente adherido y metastático, lo que puede relacionarse también con estos resultados.

Sin embargo, en U87MG, ni los esferoides control, ni los tratados con nanopartículas se adherían a la placa, pero sí que se observaron diferencias visualmente respecto al movimiento, por lo que se decidió realizar un análisis del recorrido y la velocidad de estos. Este análisis reveló una reducción significativa de la velocidad y la distancia recorrida por los esferoides tratados con DMSA-IONPs en suspensión. Este efecto podría estar relacionado con la interacción indirecta de las NPs con la superficie del esferoide afectando a la dinámica colectiva de la migración celular. Algunos estudios han demostrado que la presencia de nanopartículas poliméricas alrededor de agregados celular puede limitar su expansión al incrementar la cohesión celular y reducir su capacidad de deformación y propagación ⁴⁹. Asimismo, trabajos recientes del grupo, han evidenciado que las DMSA-IONPs al inducir estrés oxidativo, alteran la disposición mitocondrial y reprograman el metabolismo celular, lo que puede tener un impacto directo sobre la reorganización del citoesqueleto y la energía disponible para la motilidad ¹³. Adicionalmente, otros estudios previos del grupo indicaron que el tratamiento con IONPs de diferentes recubrimientos podría modificar el número de invadosomas, estructuras involucradas en la migración e invasión celular, en células tumorales ⁵⁰ y en macrófagos ²⁸, influenciando la migración celular de dichos tipos celulares. En este sentido, la reducción observada en la migración de los esferoides de U87MG podrían reflejar tanto efectos físicos sobre el agregado de células como alteraciones bioenergéticas internas, aunque se requerirían análisis adicionales para determinar realmente los factores determinantes.

En conjunto, los datos respaldan el efecto antitumoral de las DMSA-IONPs, especialmente en su capacidad para inducir ferroptosis en células tumorales resistentes a apoptosis. Es importante destacar que estos efectos son altamente contexto-dependientes, variando según la línea celular, la dosis y el tiempo de exposición. Esto refuerza la necesidad de estudios adicionales que

evalúen su eficacia en modelos in vivo, así como combinaciones con otras terapias convencionales que podrían beneficiarse de un entorno tumoral más susceptible al daño oxidativo^{19,20,34}.

Además de los hallazgos científicos, es importante enmarcar este trabajo en el contexto de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de Naciones Unidas. En particular, este trabajo de fin de máster contribuye al ODS 3: Salud y bienestar, al explorar las estrategias innovadoras que podrían mejorar el tratamiento del cáncer, una de las principales causas de mortalidad global. El uso de nanomedicina para inducir ferroptosis representa una alternativa potencialmente eficaz para abordar la resistencia a terapias convencionales promoviendo una mejor atención sanitaria. Asimismo, este estudio está alineado con ODS 9: Industria, innovación e infraestructura, al promover la investigación en tecnologías biomédicas avanzadas basadas en nanopartículas, fomentando la inversión en ciencia y desarrollo como vía para generar soluciones terapéuticas.

6. CONCLUSIONES

- El tratamiento con DMSA-IONPs induce un aumento significativo de ROS en ambas líneas celulares, con respuestas diferentes en función del tipo celular. En MDA-MB-231 se obtiene una respuesta rápida y sostenida, con pocas variaciones a lo largo del tiempo, mientras que en U87MG la acumulación de ROS depende de la concentración de nanopartículas y tiende a disminuir en tiempos prolongados.
- La viabilidad celular disminuye de forma dosis y tiempo dependiente en MDA-MB-231, por el contrario, en U87MG este efecto solo es evidente a concentraciones muy altas y, en menor medida, a dosis intermedias tras tiempos prolongados de exposición.
- Los resultados obtenidos no muestran evidencia de activación de apoptosis, y en combinación con los datos de peroxidación lipídica, apuntan a que la muerte celular inducida por las DMSA-IONPs podría estar mediada por ferroptosis.
- El tratamiento no mostró un efecto claro sobre la adhesión en MDA-MB-231; sin embargo, en U87MG se observó una reducción en la trayectoria y velocidad de desplazamiento de los esferoides con las NPs en suspensión, lo que sugiere una posible afectación a la capacidad de movimiento en esta línea celular.
- No se han conseguido resultados concluyentes en el ensayo de migración con MDA-MB-231 debido al comportamiento anormal de los controles. En el caso de U87MG, se observó un aparente aumento de la migración tras el tratamiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ¿Qué es el cáncer? [Internet]. [cited 2025 May 21]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
2. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services [Internet]. [cited 2025 May 21]. Available from: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
3. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
5. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan 1;12(1):31–46.
6. Navarro C, Ortega Á, Santeliz R, Garrido B, Chacín M, Galban N, et al. Metabolic Reprogramming in Cancer Cells: Emerging Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Pharmaceutics*. 2022 Jun 19;14(6):1303.
7. Aggarwal V, Tuli H, Varol A, Thakral F, Yerer M, Sak K, et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*. 2019 Nov 13;9(11):735.
8. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016 May 6;2(5).
9. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211–8.
10. Fukushi A, Kim HD, Chang YC, Kim CH. Revisited Metabolic Control and Reprogramming Cancers by Means of the Warburg Effect in Tumor Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 2;23(17):10037.
11. Grüning NM, Du D, Keller MA, Luisi BF, Ralser M. Inhibition of triosephosphate isomerase by phosphoenolpyruvate in the feedback-regulation of glycolysis. *Open Biol*. 2014 Mar;4(3):130232.

12. de Sá Junior PL, Câmara DAD, Porcacchia AS, Fonseca PMM, Jorge SD, Araldi RP, et al. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017 Jan 16;2017(1).
13. Daviu N, Portilla Y, Gómez de Cedrón M, Ramírez de Molina A, Barber DF. DMSA-coated IONPs trigger oxidative stress, mitochondrial metabolic reprogramming and changes in mitochondrial disposition, hindering cell cycle progression of cancer cells. *Biomaterials*. 2024 Jan;304:122409.
14. Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol*. 2020 Jun;30(6):440–51.
15. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett*. 1995 Dec;82–83:969–74.
16. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. Vol. 38, *Cancer Cell*. Cell Press; 2020. p. 167–97.
17. Wang Y, Qi H, Liu Y, Duan C, Liu X, Xia T, et al. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*. 2021 Mar 4;11(10):4839–57.
18. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, et al. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. Vol. 9, *Biomolecules*. MDPI AG; 2019.
19. Nizami ZN, Aburawi HE, Semlali A, Muhammad K, Iratni R. Oxidative Stress Inducers in Cancer Therapy: Preclinical and Clinical Evidence. Vol. 12, *Antioxidants*. MDPI; 2023.
20. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. Vol. 61, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009. p. 290–302.
21. Tinkle S, McNeil SE, Mühlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz Y (Chezy), et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Apr 27;1313(1):35–56.
22. Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 31;22(1):385.

23. Mulens-Arias V, Rojas JM, Barber DF. The Use of Iron Oxide Nanoparticles to Reprogram Macrophage Responses and the Immunological Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2021 Jun 9;12.
24. Roca AG, Gutiérrez L, Gavilán H, Fortes Brollo ME, Veintemillas-Verdaguer S, Morales M del P. Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019 Jan;138:68–104.
25. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(18):3995–4021.
26. Portilla Y, Fernández-Afonso Y, Pérez-Yagüe S, Mulens-Arias V, Morales MP, Gutiérrez L, et al. Different coatings on magnetic nanoparticles dictate their degradation kinetics in vivo for 15 months after intravenous administration in mice. *J Nanobiotechnology.* 2022 Dec 28;20(1):543.
27. Mejías R, Pérez-Yagüe S, Gutiérrez L, Cabrera LI, Spada R, Acedo P, et al. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(11):2938–52.
28. Mulens-Arias V, Rojas JM, Pérez-Yagüe S, Morales MP, Barber DF. Polyethylenimine-coated SPIONs trigger macrophage activation through TLR-4 signaling and ROS production and modulate podosome dynamics. *Biomaterials.* 2015 Jun;52:494–506.
29. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020 Jul 23;17(7):395–417.
30. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Feb;7(2):99–109.
31. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Apr;22(2):263–8.
32. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell.* 2012 May;149(5):1060–72.

33. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*. 2016 Mar 22;23(3):369–79.
34. Nie Q, Hu Y, Yu X, Li X, Fang X. Induction and application of ferroptosis in cancer therapy. *Cancer Cell Int*. 2022 Jan 7;22(1):12.
35. Geng N, Shi BJ, Li SL, Zhong ZY, Li YC, Xua WL, et al. Knockdown of ferroportin accelerates erastin-induced ferroptosis in neuroblastoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Jun;22(12):3826–36.
36. Wang B, Wang Y, Zhang J, Hu C, Jiang J, Li Y, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Arch Toxicol*. 2023 Jun 2;97(6):1439–51.
37. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 23;113(34):E4966-75.
38. Gerstberger S, Jiang Q, Ganesh K. Metastasis. *Cell*. 2023 Apr;186(8):1564–79.
39. Park M, Kim D, Ko S, Kim A, Mo K, Yoon H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 18;23(12):6806.
40. Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res*. 2017 Dec 8;18(1):54.
41. Pollard TD, Cooper JA. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* (1979). 2009 Nov 27;326(5957):1208–12.
42. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007 May;1773(5):642–52.
43. Madan S, Uttakar B, Chowdhary S, Rikhy R. Mitochondria Lead the Way: Mitochondrial Dynamics and Function in Cellular Movements in Development and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Feb 2;9.

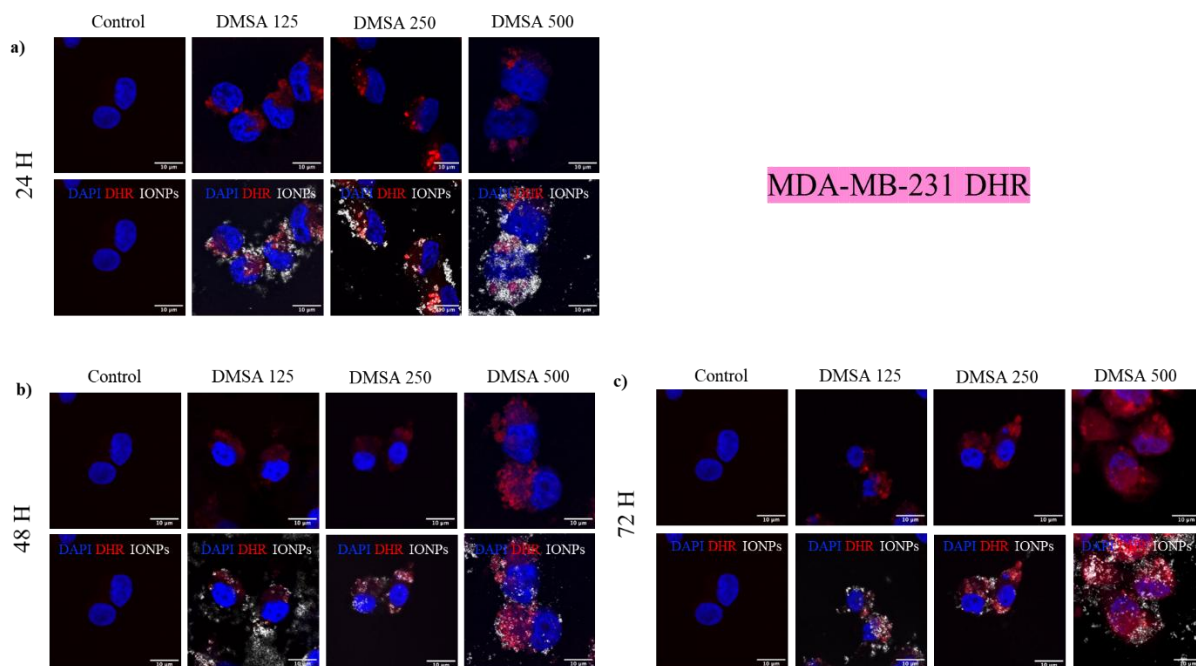
44. Balta E, Kramer J, Samstag Y. Redox Regulation of the Actin Cytoskeleton in Cell Migration and Adhesion: On the Way to a Spatiotemporal View. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jan 28;8.
45. Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release.* 2007 Aug;121(1–2):3–9.
46. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine.* 2008 Oct 25;3(5):703–17.
47. Silva LHA, da Silva JR, Ferreira GA, Silva RC, Lima ECD, Azevedo RB, et al. Labeling mesenchymal cells with DMSA-coated gold and iron oxide nanoparticles: assessment of biocompatibility and potential applications. *J Nanobiotechnology.* 2016 Dec 18;14(1):59.
48. Del Sol-Fernández S, Portilla-Tundidor Y, Gutiérrez L, Odio OF, Reguera E, Barber DF, et al. Flower-like Mn-Doped Magnetic Nanoparticles Functionalized with $\alpha_v\beta_3$ - Integrin-Ligand to Efficiently Induce Intracellular Heat after Alternating Magnetic Field Exposition, Triggering Glioma Cell Death. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019 Jul 31;11(30):26648–63.
49. Beaune G, Nagarajan U, Brochard-Wyart F, Winnik FM. Polymeric Nanoparticles Limit the Collective Migration of Cellular Aggregates. *Langmuir.* 2019 Jun 11;35(23):7396–404.
50. Mulens-Arias V, Rojas JM, Pérez-Yagüe S, Morales M del P, Barber DF. Polyethylenimine-coated SPION exhibits potential intrinsic anti-metastatic properties inhibiting migration and invasion of pancreatic tumor cells. *Journal of Controlled Release.* 2015 Oct;216:78–92.

8. ANEXOS

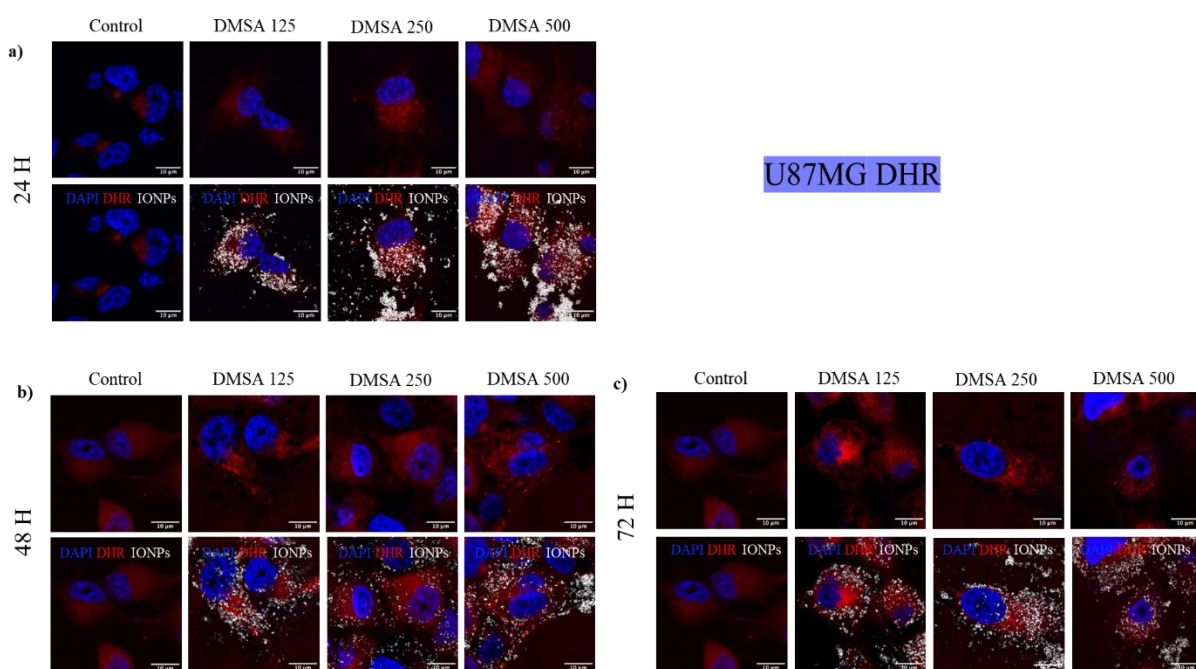
Este Trabajo de Fin de Máster ha sido realizado gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del proyecto “Estudio de los efectos de las nanopartículas de óxido de hierro sobre la funcionalidad, activación y el metabolismo celular para mejorar su eficacia en terapias antitumorales” (METABANTICANANO, PID2023-146212OB-I00) en la Convocatoria 2023 de ayudas a “proyectos de generación de conocimiento” cuyo investigador principal es Domingo F. Barber, en el Centro Nacional de Biotecnología, un Centro de Excelencia Severo Ochoa (CEX2023-001386-S)

LISTA DE ABREVIACIONES	
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHR	Dihidrorodamina
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	del inglés, <i>Dubelcco's modified Eagle's medium</i>
DMSA	Ácido Dimercaptosuccínico
EMT	del inglés, <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ICP-OES	Espectrofotometría por emisión de atómica de plasma
IONPs-DMSA	nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de ácido dimercaptosuccínico
IONPs	del inglés, <i>Iron Oxide NanoParticles</i> o nanopartículas de óxido de hierro
MPK/ERK	del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase</i>
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-Kb	del inglés, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NPs	Nanopartículas
NRF2	del inglés, <i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
O/N	del inglés, <i>Over-Night</i>
PBS	del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI3K/AKT	del inglés, <i>phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B</i>
PPP	del inglés, <i>pentose phosphate pathway</i>
ROS	del inglés, <i>reactive oxygen species</i>
Rpm	revoluciones por minuto
RT	del inglés, <i>Room Temperature</i> o temperatura ambiente
TME	del inglés, <i>Tumoral MicroEnviroment</i> o microambiente tumoral
VEGF	del inglés, <i>vascular endothelial growth factor</i>

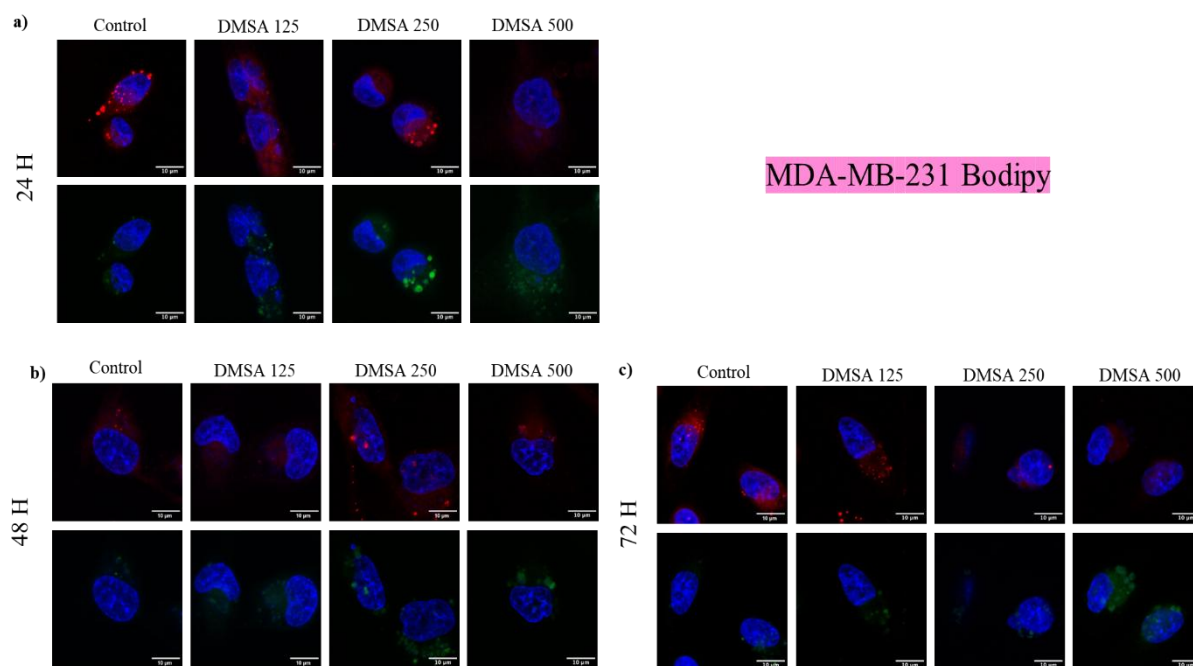
Anexo 1: Lista de abreviaciones utilizadas a lo largo del todo el texto.



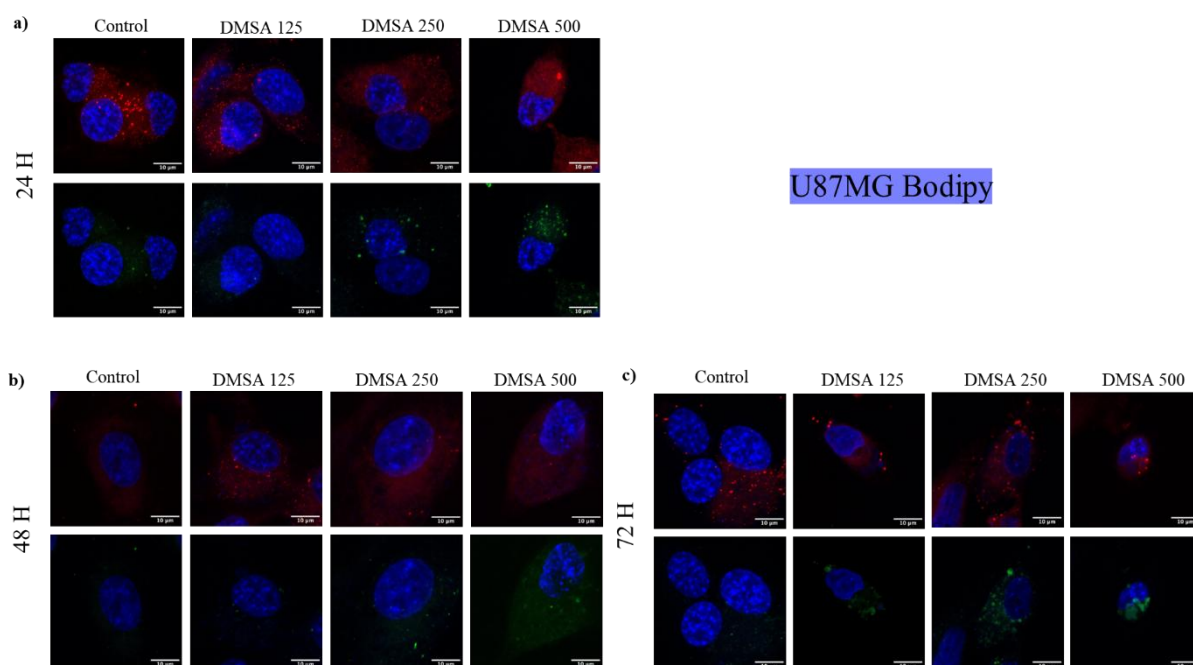
Anexo 2: Análisis cualitativo del estrés oxidativo con DHR. Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de MDA-MB-231 donde se marca el núcleo en azul (DAPI), el estrés oxidativo en rojo (DHR) y las IONPs en blanco observadas por reflexión. a) Imágenes a 24 h. b) Imágenes a 48 h. c) Imágenes a 72 h.



Anexo 3: Análisis cualitativo del estrés oxidativo con DHR. Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de U87MG donde se marca el núcleo en azul (DAPI), el estrés oxidativo en rojo (DHR) y las IONPs en blanco observadas por reflexión. a) Imágenes a 24 h. b) Imágenes a 48 h. c) Imágenes a 72 h.



Anexo 4: Análisis cualitativo de la peroxidación lipídica con Bodipy. Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de MDA-MB-231 donde se marca el núcleo en azul (Hoechst 33342), los lípidos no oxidados en rojo colocadas en el panel superior y los peroxidados en verde situados en el panel inferior (Bodipy). a) Imágenes a 24 h. b) Imágenes a 48 h. c) Imágenes a 72 h.



Anexo 5: Análisis cualitativo de la peroxidación lipídica con Bodipy. Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de U87MG donde se marca el núcleo en azul (Hoechst 33342), los lípidos no oxidados en rojo colocadas en el panel superior y los peroxidados en verde situados en el panel inferior (Bodipy). a) Imágenes a 24 h. b) Imágenes a 48 h. c) Imágenes a 72 h.