



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FOSVITINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON

Elisa Díaz Grijuela

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2019-20

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FOSVITINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON

Elisa Díaz Grijuela

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Cáncer, fosvitina, oxaliplatino, especies reactivas de oxígeno, viabilidad celular, estrés oxidativo

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Daniel Gabriel Pons Miró

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicas y de investigación.

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Índice

Resumen.....	2
<i>Abstract</i>	2
1. Introducción.....	3
1.1. Cáncer de colon: sintomatología, etiología y mutaciones	3
1.2. Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y sistemas antioxidantes	6
1.3. Alteraciones en el metabolismo del hierro asociados al CC y ferroptosis	11
1.4. Mecanismo de acción y resistencia al oxaliplatino	13
1.5. El huevo como fuente de proteínas bioactivas: Fosvitina.	15
2. Objetivos.....	16
3. Materiales y métodos.....	16
3.1. Cultivos celulares y tratamiento	16
3.2. Ensayo de viabilidad celular	16
3.3. Producción de ROS	17
3.4. Estrategia de búsqueda bibliográfica.....	17
3.5. Análisis estadístico.....	18
4. Resultados.....	18
4.1. Tratamiento con fosvitina: producción de ROS y viabilidad celular	18
4.2. Tratamiento con fosvitina y/o oxaliplatino: ¿efecto sinérgico o antagónico?.....	19
4.3. Búsqueda bibliográfica.....	20
5. Discusión	21
6. Conclusión.....	25
7. Bibliografía.....	25

Resumen

El cáncer de colon (CC) es la tercera causa de fallecimiento a nivel mundial. Uno de los factores claves del desarrollo del cáncer es el estrés oxidativo, ocasionado por el desequilibrio entre la formación endógena de radicales libres de oxígeno y la capacidad de eliminación por el sistema antioxidante de las células cancerígenas. Actualmente, la adquisición de resistencia a los fármacos anticancerígenos, como el oxaliplatino (Oxa), ha dado lugar a la búsqueda de nuevos compuestos que potencien la acción de estos fármacos. El huevo es una fuente de péptidos bioactivos, como la fosvitina (Pv) cuyas funciones engloban la actividad antimicrobiana, inmunoreguladora, anticancerígena y antioxidante. La fosvitina es una proteína con un alto contenido en serinas fosforiladas, uno de sus principales papeles es la captación de Fe^{2+} para evitar la reacción de Fenton. En este estudio se ha determinado el efecto de la fosvitina en presencia o ausencia de oxaliplatino sobre la viabilidad celular y la producción de especies reactivas de oxígeno en células de cáncer de colon de tumor metastásico (SW620). Además, se realizó una búsqueda bibliográfica para discutir e intentar explicar los resultados obtenidos. Se observó un incremento significativo de la producción de especies reactivas de oxígeno y una disminución de la viabilidad celular con tratamientos de Pv a 250 nM y 500 nM. La combinación con oxaliplatino produjo un incremento, no significativo, de la actividad citotóxica a 500 nM de fosvitina. Asimismo, la fosvitina podría provocar un efecto positivo en la expresión de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como los complejos NADPH oxidasas y el superóxido dismutasa.

Abstract

Colon cancer (CC) is the third cause of death worldwide. One of the key factors in cancer development is oxidative stress caused by the unbalancing between the endogenous formation of oxygen free radicals and the elimination capacity of the antioxidant system in the carcinogenic cells. Nowadays the increase in resistance of anticarcinogenic drugs, such as oxaliplatin, has triggered the research of new compounds that enhance the action of these drugs. Eggs are a source of bioactive peptides such as phosvitine (Pv) its functions include antimicrobial activity, immunoregulatory, anticarcinogenic and antioxidative activity. Phosvitine is a protein with a high content of phosphorylated serines. One of its main roles is the Fe^{2+} capture to avoid the Fenton reaction. This project has determined the effect of phosvitine in presence or absence of oxaliplatin in cellular viability, the production of reactive oxygen species in colon cancer metastatic tumor cells (SW620). In addition, bibliographic research was conducted to discuss and try to explain results obtained. A significant increase in reactive oxygen species production and a decrease in cellular viability with treatments of phosvitin at 250 nM and 500 nM was observed. The combination with oxaliplatin produced a non significant increase of cytotoxic activity at 500 nM of Pv. Likewise, phosvitin could exert a positive effect on enzymes related to oxidative stress activity such as NADPH oxidase complex and superoxide dismutase.

1. Introducción

1.1. Cáncer de colon: sintomatología, etiología y mutaciones

El cáncer de colon (CC) es el tercer tipo más frecuente en diagnosticar, tanto en hombres como en mujeres y es la tercera causa de fallecimiento entre pacientes con cáncer. Según un informe publicado en 2019 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2018 se detectaron 1 849 518 casos nuevos (Figura 1 A) y hubo 880 792 muertes (Figura 1 B). Entre el 30-67% de los pacientes con CC manifiestan deficiencia funcional del hierro, derivando en una anemia¹.

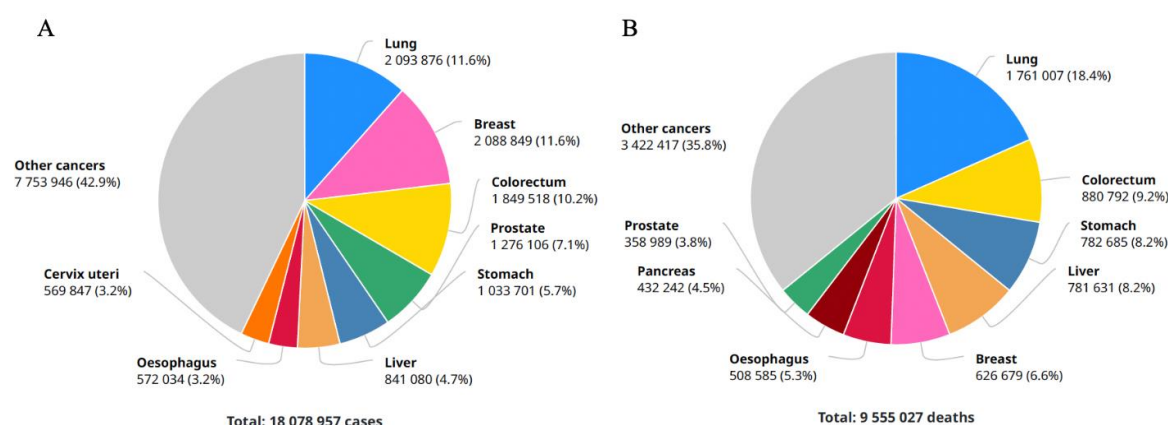


Figura 1. A. Nuevos casos de cáncer diagnosticado, en ambos sexos a cualquier edad en 2018. **B.** Casos de muerte por cáncer, en ambos sexos a cualquier edad en 2018. International Agency of Research of Cancer.

La sintomatología del CC es muy variada, caracterizada por dolor abdominal, diarrea y sangre oculta en heces (SOH). A causa de la pérdida de sangre aparecen nuevos síntomas asociados con la anemia tales como la fatiga, palidez, falta de aliento o pérdida de peso². En algunos casos la sintomatología es tardía, por ende, los métodos de detección, como la detección de SOH, endoscopias y radiología han cobrado gran importancia en los últimos años³. A causa de las medidas de detección, las intervenciones en etapas tempranas del cáncer y la efectividad de los tratamientos (cirugía, radioterapia y quimioterapia) se ha disminuido la tasa de mortalidad a un 50%⁴. Por el contrario, los datos de mortalidad en la base de datos de la OMS prevén en 2035 un aumento del 60% en virtud del crecimiento de población y envejecimiento, además de los efectos secundarios ocasionados por la medicación y la resistencia a la misma^{5,6}.

Los factores de riesgo del CC engloba los factores ambientales y de estilo de vida, tales como el tabaquismo, el consumo de alcohol, una dieta rica en carne roja, la obesidad y la inactividad física, así como los genéticos y hereditarios⁷. Dichos factores promueven la adquisición de los *hallmarks* del cáncer en las células del epitelio del colon. Los *hallmarks* abarcan una serie de capacidades biológicas

necesarias para el desarrollo de la tumorigénesis: evasión de supresores del crecimiento, autosuficiencia en la señalización proliferativa, evasión de la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, activación de la capacidad invasiva y metastásica.

La superficie luminal del colon consiste en una monocapa de células epiteliales dispuestas en pliegues, formando protuberancias llamadas criptas. El colon está compuesto por cuatro líneas celulares: enterocitos, células calciformes, células enteroendocrinas y células de Paneth⁸. El epitelio de las células presenta en la cripta, un grupo de células madre intestinales (ISC) con una tasa de renovación elevada y metabólicamente muy activas, incrementando la probabilidad de mutación durante la replicación del ADN⁹. La evolución de las células epiteliales normales a adenocarcinoma es un proceso multifactorial y de múltiples etapas que implica toda una progresión de cambios epigenéticos y genéticos histológicos, iniciados en ISC¹⁰ (Figura 2).

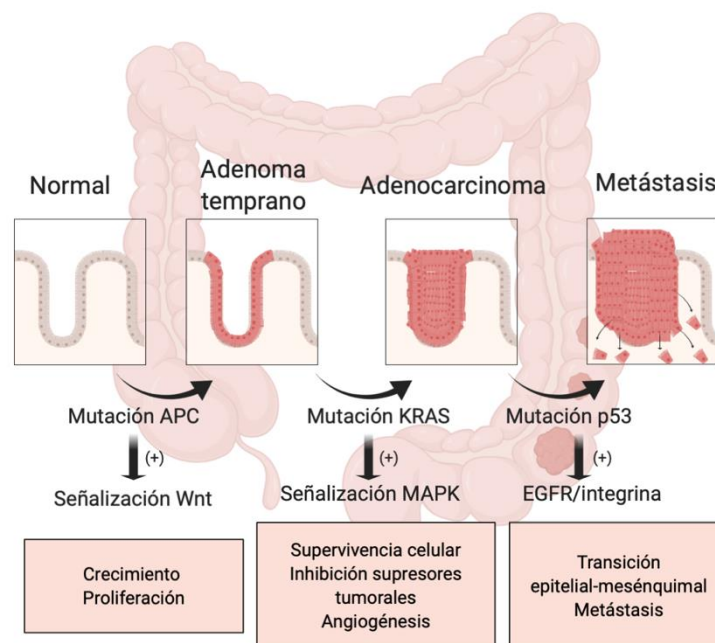


Figura 2. Evolución de las células epiteliales de colon a células de cáncer de colon metastásico. Imagen creada con Biorender.com

El CC es causado por mutaciones dirigidas a oncogenes, genes supresores de tumores y genes relacionados con mecanismos de reparación de ADN¹¹. Dependiendo del origen de la mutación, el CC se puede clasificar en esporádicos (70-75%) o heredados (25-30%)^{11,12}. Las mutaciones puntuales se asocian al cáncer esporádico, siendo las más frecuentes en la poliposis adenomatosa del colon (APC), un gen supresor de tumores, el cual desencadena la formación de adenomas no malignos (pólipos). Normalmente viene seguida de otras mutaciones, como en KRAS y TP53¹¹. La predisposición genética al CC de tipo hereditario está asociado a mutaciones en la línea germinal, concretamente en los genes

de reparación de errores en el ADN (MMR) como: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 (Síndrome de Lynch) y en APC^{10,13}.

Los mecanismos patogénicos que derivan a un tumor en el colon son la inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsatélites (MSI) y el fenotipo de metilación de las islas CpG (CIMP)¹¹. La vía CIN representa el 65-75% de los casos de CC esporádico, que implica la variación del número o estructura del cromosoma, se caracteriza por la pérdida de heterocigosis (carencia de un gen)¹⁴. Las mutaciones más frecuentes en CIN son APC, KRAS, SMAD4 y p53. Las vías de señalización afectadas son la vía canónica Wnt y MAPK/ERK. La segunda vía genética principal en CC es MSI, característica del Síndrome de Lynch, que se trata de secuencias de ADN repetitivas de tamaño variable que no se localizan en el ADN de la línea germinal pertinente, como resultado de un sistema deficiente de MMR¹⁵. La vía CIMP representa el 20-30% de los casos de CC, representativo de la vía neoplásica alternativa o serrada, caracterizándose por la hipermetilación de los promotores de oncogenes en islas CpG, lo que implica el silenciamiento genético y la falta de expresión de proteínas KRAS, BRAF y CXCL12^{10,14}.

La inactivación del gen supresor tumoral APC es responsable de la formación y desarrollo de las criptas displásicas¹⁶. La APC es una proteína multidominio que presenta diversos sitios de unión para proteínas de microtúbulos, componentes de la vía Wnt/ β -catenina y axina, reguladores del citoesqueleto y uniones para el factor de intercambio de guanina-nucleótido Rac¹⁷.

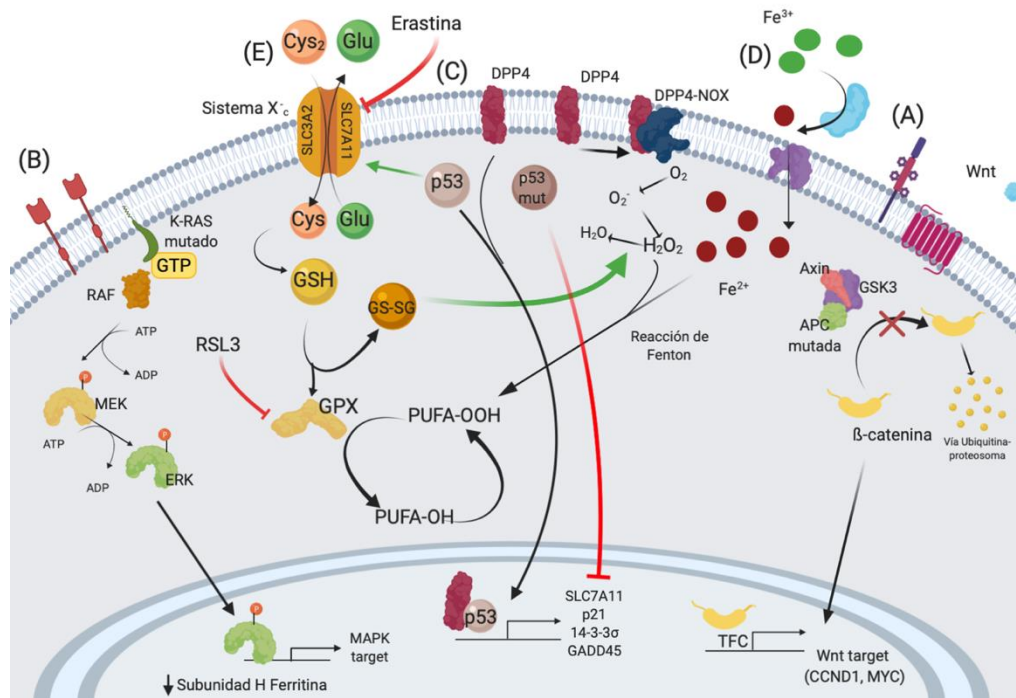


Figura 3. (A) Vía Wnt/ β -catenina con APC mutado. (B) Vía de señalización MAPK activada de forma constante por la mutación K-RAS. (C) Actuación de p53 salvaje y mutada respecto a la producción de ROS y regulación de DPP4. (D) Metabolismo del hierro en células de cáncer de colon. (E) Sistema antipuerto cisteína-glutamato (X_c⁻). Imagen creada con Biorender.com

En condiciones fisiológicas, la APC regula negativamente por 3 vías diferentes la señalización de Wnt a través de la degradación proteosómica de la β -catenina¹⁸. Los niveles de β -catenina se pueden reducir por medio de la fosforilación catalizada por Axin, secuestro por APC evitando la unión con factores de transcripción del factor de células T (TCF) y la activación transcripcional o por la interacción del complejo APC/ β -catenina con la proteína 1 de unión C-terminal (CtBP1), antagonizando la acción transcripcional de TCF¹⁷. Por ende, se induce la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, se estabiliza la β -catenina y se acumula en el núcleo, forzándose un estado continuo de autorenovación que dará paso a un crecimiento benigno del epitelio del colon, denominado adenoma^{9,19} (Figura 3 A).

KRAS es una proteína de unión a GTP/ GDP anclada a la membrana que participa en la transducción de señales intracelulares y es principalmente responsable de la activación de la señalización de EGFR²⁰. La señalización de KRAS se compone de una cascada de RAF-MEK-ERK. La incidencia de mutaciones en KRAS es elevada (45%), produce un deterioro de la actividad intrínseca de la GTPasa de KRAS y evitan que las GAP promuevan la hidrólisis de GTP por KRAS, por lo que la proteína mutada se acumula en su forma activa unida a GTP²⁰ (Figura 3 B). La forma de KRAS mutado puede coordinar una serie de cambios metabólicos en la célula, favoreciendo así el crecimiento y supervivencia de las células cancerígenas, como el aumento de la captación de la glucosa derivado del incremento de la expresión de GLUT1 y alteraciones en el metabolismo de la glutamina a través de la biosíntesis de asparagina²¹.

Las mutaciones en el gen supresor de tumores TP53 intervienen en la transformación maligna de los adenomas. Estas mutaciones presentan una incidencia de aproximadamente un 50 % de los casos de cáncer de colon²². En condiciones fisiológicas, p53 protege al genoma y mantiene la estabilidad genómica mediante genes reguladores de la transcripción involucrados en la apoptosis, la detención del ciclo celular, la senescencia o la reparación del ADN²³ (Figura 3 C). La mutación de p53 induce un microambiente pro-tumorigénico inflamatorio y el proceso de transición epitelial-mesenquimal, mediante la activación de EGFR/integrina, promoviendo consigo la metástasis inducida por TGF- β y Wnt^{16,24} (Figura 2).

1.2. Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y sistemas antioxidantes

El conjunto de factores ambientales como del estilo de vida desencadena todo tipo de cambios en la célula, como el desequilibrio energético ocasionado por la sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuyendo a la oxidación de proteínas, lípidos y al daño oxidativo en el ADN²⁵. El efecto que ejerce el estrés oxidativo en la carcinogénesis es directamente proporcional al tipo de ROS y su reactividad celular²⁶. Este estado de estrés causa daño a las células, induce a mutaciones genéticas, respuesta inflamatoria y está involucrado en la carcinogénesis al influir en la transducción de señales intracelulares y los factores de transcripción de forma directa o indirecta²⁷.

Las especies reactivas de oxígeno o radicales libres derivados de oxígeno son moléculas que presentan uno o más electrones no apareados en orbitales atómicos, lo que confiere a la molécula cierta reactividad²⁸. En condiciones fisiológicas, son producto del metabolismo aerobio de las células por reacciones de transporte de electrones en los complejos OXPHOS en las mitocondrias, reacciones catalizadas con metales, por neutrófilos y macrófagos durante la inflamación²⁹.

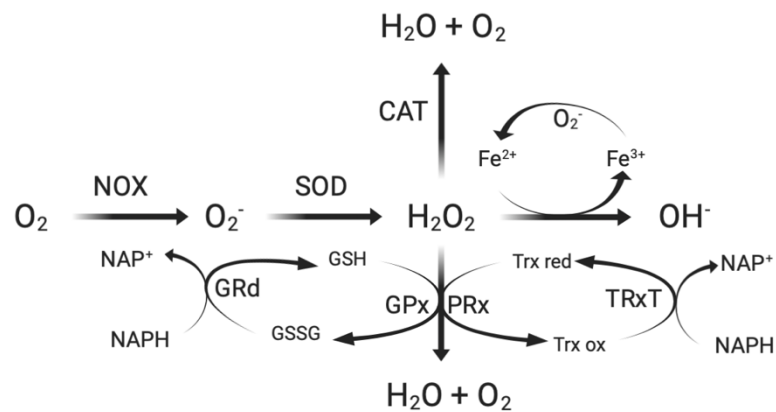


Figura 4. Fuentes de especies de oxígeno reactivo celular y mecanismo de defensa antioxidante. Imagen creada con Biorender.com

Las ROS se producirán como consecuencia de la reducción parcial del oxígeno (Figura 4). Entre los radicales libres se incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales de hidroxilo (OH^-) y las peroxinitritas ($ONOO^-$)²⁵. La adición de un electrón al oxígeno, ocasionado por procesos metabólicos catalizados por los complejos NADPH oxidasas (NOX) o bien por irradiación física, genera el anión superóxido (O_2^-), calificado como ROS primario^{29,30}.

El anión superóxido interacciona con otras moléculas, por su carácter radiactivo, para generar ROS secundarias, catalizado por reacciones enzimáticas o bien catalizadas con metales²⁹. La reducción adicional de O_2^- de forma espontánea por su inestabilidad en soluciones acuosas (dismutación), en especial a pH bajos, o catalizada por enzimas superóxido dismutasas (SOD) genera H_2O_2 ²⁹.

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre como tal, es una molécula mucho más estable con una capacidad de oxidación más débil, aunque es capaz de atravesar las biomembranas. En presencia de niveles elevados de metales de transición (hierro) y de H_2O_2 son capaces de generar una radical más tóxico y reactivo, el radical hidroxilo (OH^-), a través de la reacción de Fenton^{30,31}.

Frente a niveles elevados de ROS se produce la oxidación de proteínas, alterando su estructura y funcionalidad, como la inhibición de actividades enzimáticas y de unión, variación de la absorción por las células o inactivación de enzimas reparadoras de ADN³².

Los residuos más susceptibles a oxidación, mediado por un metal redox (Fe^{2+}) son His, Pro, Trp, Cys y Tyr. El ion ferroso se une a sitios de unión a metales de alta y baja afinidad en la proteína, principalmente en los aminoácidos mencionados. El complejo reacciona con H_2O_2 a través de la reacción de Fenton²⁹. Las reacciones con radicales hidroxilo conducen a la extracción de un átomo de hidrógeno del esqueleto del polipéptido para formar un radical centrado en el carbono, permitiendo reaccionar con el dióxigeno para formar radicales peroxilo en condiciones aeróbicas²⁹.

La oxidación proteica catalizada por iones de hierro (II) implica la escisión oxidativa, pérdida de residuos de histidina e introducción de grupos carbonilos. Un ejemplo de la actuación de ROS, es la oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH) en residuos de Cys para formar enlaces disulfuro o residuos de Met afectando la hidrólisis y la carbonilación de proteínas³³. Los cambios producidos por el estado redox del tiol/disulfuro conduce a un aumento de la fosforilación de tirosina en múltiples proteínas, por ejemplo, las tirosinas fosfatasas inhibitoras del receptor EGF, inactivándola³³. Como consecuencia, el receptor EGF en presencia de elevados niveles de H_2O_2 , presenta una desfosforilación posterior a la activación por ligando muy retardada³⁰, dando lugar a la inactivación de proteínas proapoptóticas y la regulación positiva de genes antiapoptóticos²⁶.

Lo mismo sucede con PTEN, la fosfatasa inhibitora de la vía de señalización PI3K se inactiva en presencia del incremento de H_2O_2 a través de la oxidación y formación de enlaces disulfuro, facilitando la entrada del ciclo celular, metástasis, motilidad, supervivencia y crecimiento celular³⁴. La inactivación de PTEN es reversible a través de PRx, como ya se ha mencionado, pero se ha reportado que uno de los subgrupos de la familia PRx (PrxIII) sufren hiperoxidación en un residuo de Cys catalítico, resultado de la inactivación de la función peroxidasa, incrementándose el estrés oxidativo³⁵.

El radical hidroxilo reacciona con los constituyentes del ADN, causando roturas monocatenarias, sitios básicos, aductos intra-ADN, enlaces cruzados de ADN-proteínas y daños a las bases nitrogenadas de ADN heterocíclico, impulsando la carcinogénesis³⁶. La oxidación de nucleótidos les otorga un carácter mutagénico además de imposibilitar el emparejamiento idóneo³². El principal producto de la oxidación de la guanosina es 8-oxo-dG. Muchas formas de daño del ADN, como el 8-oxo-dG inducen un bloqueo en la replicación, dando lugar a la propagación de la mutación³⁶. Asimismo, la C y G se vuelven susceptibles a la metilación en las secuencias de CpG, conduciendo a la inhibición de la unión de metiltransferasa de ADN a los residuos de citosina adyacente, provocando una inestabilidad cromosómica³².

Los ROS, principalmente el radical hidroxilo, son capaces de oxidar los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales intervienen en la constitución de la membrana celular, reduciendo la capacidad de mantener un gradiente equilibrado de concentración, aumentando la permeabilidad e induciendo un estado inflamatorio de la membrana^{29,32}. El proceso general de peroxidación lipídica consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

En el inicio de la peroxidación lipídica se forman radicales lipídicos (L·) como productos primarios, a través de la reacción con radicales hidroxilo y metales de transición como el hierro, por la abducción de un radical H⁺ ³⁷. En la propagación, se agrega O₂ al radical lipídico para generar un radical lipoperoxilo (LOO·) y un hidroperóxido lipídico (LOOH), que a su vez generan nuevos radicales peroxilos y alcoxilos (LO·) reiniciando el ciclo de peroxidación lipídica³⁸. Una vez formados los radicales peroxilos, pueden reorganizarse mediante una reacción de ciclación y dar compuestos más solubles como pirrol, ácidos hidroxioctadenoicos y aldehídos, principalmente malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonenal HNE^{29,38}. MDA es un compuesto mutagénico, causa inserciones, deleciones y sustituciones de pares de bases, particularmente en GC. Por otro lado, HNE induce niveles bajos de transversiones G → T y transiciones G → T, que además de presentar efectos genotóxicos, produce fragmentación del ADN y el intercambio de cromátida hermana³⁷.

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción de ROS y su eliminación por mecanismos protectores, conocidos como antioxidantes²⁶. Los antioxidantes enzimáticos consisten en los sistemas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y peroxirredoxina (PRx).

Las enzimas SOD se pueden clasificar según su localización en Cu/Zn-SOD (citósólica y extracelular) y Mn-SOD (mitocondrial). Son los principales sistemas defensivos contra los niveles elevados de O₂⁻, catalizando la síntesis de H₂O₂ por medio de la reducción y la reoxidación de metales de transición como el cobre o el magnesio³⁹.

Frente al incremento de la concentración de H₂O₂ actúan otras las enzimas antioxidantes como GPx, CAT y PRx, convirtiendo el H₂O₂ en agua⁴⁰. GPx es una enzima antioxidante intracelular responsable de eliminar los radicales reactivos del oxígeno a través de la oxidación del glutatión reducido (GSH) a disulfuro de glutatión (GSSG), que posteriormente será reducido por la glutatión reductasa (GR) regresando al estado inicial, utilizando NADPH como donador de electrones⁴¹. Reacciona de forma efectiva con lípidos e hidroperóxido, catalizando la reducción de ROOH y H₂O₂ usando GSH. La sobreexpresión de GPx-1 suprime la ROS intracelular que atenúa la activación del receptor del factor de crecimiento mediado por el estrés oxidativo⁴².

PRx contiene residuos de cisteína que permite, a partir de la formación de disulfuro intermolecular, la reducción de H_2O_2 a H_2O ⁴³. PRx es una enzima con una elevada tasa de expresión y amplia distribución (citósol, mitocondria, retículo endoplasmático y peroxisoma). Tras la reducción del H_2O_2 , los TRx oxidados se reducen por la acción de las tiorredoxina reductasa (TRx) y el equivalente reductor, el NADPH⁴⁰. PRx previene la tumorigénesis impulsada por Akt y luego induce la muerte celular a través de la protección de la actividad de fosfatasa lipídica y homólogo de tensina (PTEN) de la inactivación inducida por oxidación⁴³.

CAT cataliza la descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno, manteniendo unos niveles óptimos del peróxido de hidrógeno esencial para algunas vías de señalización, pero su actividad enzimática se ve deteriorada por una elevada presencia del radical superóxido⁴⁴. CAT se encuentra implicada en los procesos de mutagénesis e inflamación, asociada a unas condiciones de estrés oxidativo, así como a la supresión de la apoptosis⁴⁵.

La actividad y la producción de las enzimas antioxidantes y sus respectivos cofactores reductores se encuentran reguladas por varias enzimas y factores de transcripción claves, tales como las sirtuinas y Nrf2⁴⁰. Las sirtuinas (Sirt1-7) son una familia de desacetilasas de histonas NAD-dependientes, participan en la proliferación, la diferenciación celular, el metabolismo y la respuesta al estrés mediante la desacetilación de histonas (HDAC), acetilación y desacetilación de proteínas⁴⁶.

Se destacan dos isoformas de sirtuinas: Sirt-2, modula los genes y mecanismos clave del estrés oxidativo por medio de su actividad HDAC a través de la acetilación y desacetilación de residuos de lisina de las histonas del nucleosoma, permitiendo o inhibiendo la transcripción de determinados genes, modulando el estado redox celular⁴⁶, tales como Nrf2; Sirt-3 (mitocondrial), protege las células de ROS por medio de la desacetilación activadora de dos de sus dianas clave, MnSOD e isocitrato deshidrogenasa (IDH). Ésta última diana es clave para la obtención de NADPH, y por consiguiente, la regeneración del glutatión (sistema antioxidante)⁴⁷, a través de la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato⁴⁸.

Nrf2 es un factor nuclear regulador de la expresión de una gran gama de genes dependientes de elementos de respuesta antioxidante (ARE)⁴⁰. Los niveles celulares de Nrf2 se controlan de forma post-traduccional y presentan una vida media corta, ya que su destino es la degradación proteasómica a través de su interacción con Keap1 y un complejo de ubiquitina ligasa⁴⁰. A niveles elevados de H_2O_2 , los residuos de cisteína de Keap1 sensibles al estrés oxidativo pueden sufrir oxidación, además de la fosforilación de algunos residuos de serina de Nrf2, evitando la asociación del complejo Nrf2-Keap1 y por consiguiente su degradación. Nrf2 una vez estabilizado⁴⁹, se transloca al núcleo para inducir la

expresión de antioxidantes como GPx, PRx y CAT, así como de enzimas involucradas en la síntesis y consumo de GSH^{40,49}.

1.3. Alteraciones en el metabolismo del hierro asociados al CC y ferroptosis

El hierro es un metal activo redox esencial en el metabolismo ya sea presente en grupos hemo, conjugado con el azufre o bien asociado a proteínas. Participa en el transporte de oxígeno, el metabolismo energético, en el transporte de electrones, en la regulación de los niveles de H₂O₂ y en la regulación del crecimiento y diferenciación celular^{50,51}.

El hierro permite la función de varias enzimas vitales, tales como las mitocondriales involucradas en complejos respiratorios (citocromo), en la síntesis del ADN y ciclo celular, y en las enzimas desintoxicantes (peroxidasa y catalasa) entre otras^{52,53}. El descontrol del metabolismo del hierro es potencialmente tóxico, principalmente en la descomposición catalítica del H₂O₂ (reacción de Fenton), causando daños a nivel lipídico, proteico y ADN⁵⁰.

En condiciones fisiológicas (Figura 5 A), el hierro de la dieta (Fe³⁺) es absorbido en la membrana apical de los enterocitos, principalmente en el duodeno y parte en el yeyuno, por la proteína de membrana DMT1 (transportador metálico divalente)⁵¹. Previa a la captación, el hierro es reducido a Fe²⁺ por el citocromo b duodenal, ya que Fe³⁺ presenta una baja solubilidad a pH neutros⁵³. Dentro de los enterocitos, el metal ferroso tiene dos destinos posibles: almacenamiento en la proteína ferritina o exportarse al plasma a través de la ferroportina. El Fe²⁺ se exporta a través de la membrana basolateral del enterocito por la ferroportina. Tras la salida del ion ferroso, es oxidado a ion férrico por la hefestina y se une a la transferrina plasmática⁵⁴. El complejo Fe³⁺ - transferrina se absorbe en las células mediante la unión con el receptor de transferrina (TRF1) en la superficie celular⁵⁴.

En pacientes con CC, la regulación del hierro y la homeostasis en los enterocitos se encuentran alteradas, dando como resultado un suministro insuficiente de hierro al resto de las células⁵² (Figura 5 B). Referente al almacenamiento del hierro, es controlado principalmente por dos ARNm, proteína reguladora de hierro 1 y 2 (IRP1, IRP2) se unen a IRE (elemento sensible al hierro) regulando la expresión de la ferritina. En cáncer, se estimula la expresión de IRP2 y se inhibe la traducción de la subunidad pesada de la proteína ferritina (H). La ferritina H almacena la forma soluble y no tóxica (Fe³⁺), por lo que su represión resulta de una mayor disponibilidad del hierro intracelular para reaccionar con H₂O₂^{55,56}. En relación a las proteínas de transporte del hierro, se ha determinado un aumento de la expresión del citocromo b duodenal, DMT1 y TRF1 y un bloqueo en la exportación del hierro, debido a una disminución en la expresión de la hefestina y ferroportina, además de la degradación de la última por la hepcidina⁵⁶.

La hepcidina es una proteína que se activa frente a procesos inflamatorios y niveles elevados de Fe^{2+} , cuya función consiste en promover la internalización del metal, inhibiendo su liberación de los enterocitos hacia la circulación por medio de la degradación de la ferroportina y unión al Fe, manteniendo su homeostasis ⁵⁶. Respecto a la absorción del hierro en las células, se observa un incremento en la sobreexpresión de TRF1 (unión al receptor de transferrina 1) y metaloreductasas, encargadas de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} ⁵³. La sobreexpresión de TFR1 influye positivamente en el crecimiento de las células y en la tasa de tumorigénesis mediada por c-myc, mientras que su inhibición supone la detención de G1 y la disminución de la proliferación celular⁵⁴.

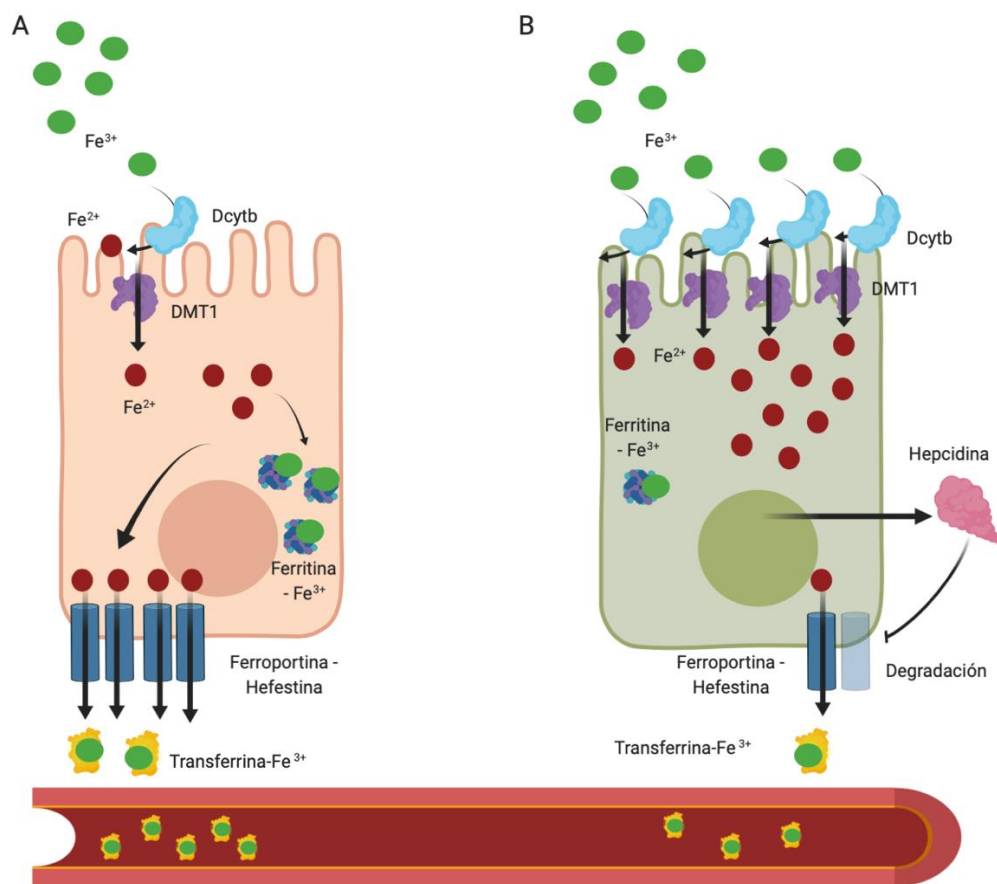


Figura 5. Metabolismo del hierro en células epiteliales de colon normales (A) y cancerígenas (B). Imagen creada con Biorender.com

La ferroptosis es una forma de muerte celular regulada alternativa a la apoptosis, necrosis y autofagia, que implica la producción de ROS dependiente de hierro y caracterizada por cambios citológicos, incluyendo mitocondrias disminuidas con la membrana externa rota y la membrana mitocondrial condensada⁵⁷⁻⁵⁹.

La ferroptosis se activa a causa de la acumulación de ácidos grasos oxidados⁵⁷. Este proceso de muerte regular está inducida por la erastina y RSL3, que inhiben la importación de cistina (antipuerto

cisteína-glutamato), produciendo el agotamiento de glutatión e inactivación de la glutatión peroxidasa 4 (GPx4)^{57,60}. La disfunción en el metabolismo de la cisteína conduce a la reducción de los niveles de GSH, el cual sirve como sustrato reductor para la GPx4, produciendo su inactivación. La GPx4 es una selenoproteína, convierte los hidroperóxidos lipídicos potencialmente tóxicos en alcoholes lipídicos no tóxicos, por lo que su inactivación mediada por la erastina resulta de una elevada peroxidación lipídica que causa la muerte celular (Figura 3 E)⁶¹.

Los factores que regulan negativamente la ferroptosis son aquellos que producen la disminución de hierro tóxico intracelular, ferroportina, ferritina y ROS. En células de CC, las mutaciones en KRAS y TP53 influyen en dicha regulación. La activación constitutiva de la vía de señalización MAPK, a causa de las mutaciones de KRAS, induce un incremento de ROS y suprime la expresión de la subunidad H de la ferritina, disminuyendo el almacenaje de hierro⁶² (Figura 3 B).

Por otro lado, la regulación de p53 en células de CC es inusual en comparación con otros cánceres, y depende de su estado, salvaje o mutado. Se ha reportado que p53 de tipo salvaje proporciona cierta resistencia a la ferroptosis a las células al bloquear la actividad de la dipeptidil-peptidasa-4 (DPP4) de manera independiente a la transcripción⁶³⁻⁶⁵. DPP4 es una peptidasa dimérica unida a la membrana, puede escindir y degradar biológicamente diversos péptidos bioactivos⁶⁴ (Figura 3 C)..

La expresión de DPP4 se encuentra asociada con la agresividad tumoral, relacionada con un peor diagnóstico en pacientes con CC. P53 salvaje facilita la acumulación nuclear de DPP4 formando el complejo DPP4-p53, activando la transcripción de genes para la detención del ciclo celular, la inducción de la apoptosis en respuesta al estrés y SLC7A11, entre otros, lo que resulta de la represión de la ferroptosis (Figura 3 E). Por otro lado, las mutaciones o silenciamiento de p53, facilitan la peroxidación lipídica dependiente de DPP4, por medio del complejo DPP4-NOX, evitando su aglutinación en el núcleo^{63,64}. Como resultado la expresión de SLC7A11 disminuyó, bloqueando el sistema X_c⁻⁶³⁻⁶⁵. En conclusión, el estado de la expresión de p53 y DPP4 determina la actividad anticancerígena⁶³.

1.4. Mecanismo de acción y resistencia al oxaliplatino

El oxaliplatino (Oxa) es un compuesto de diaminociclohexano platino y es uno de los medicamentos clave en la quimioterapia del CC de estadio 3 que se suele combinar con otros fármacos como fluoropirimidina 5-fluorouracilo (5-FU), administrado por vía intravenosa⁶⁶. Los transportadores de entrada y salida del cobre (CTR1) tienen un papel importante en la acumulación del Oxa en el interior celular⁶⁶ (Figura 6). Oxa actúa dentro de la célula formando aductos covalentes a partir de la unión del platino y dos guaninas adyacentes o guanina y adenina de regiones de ADN ricas en GC⁶⁷.

Los aductos interrumpen la replicación de ADN, transcripción de ARNm, la detención del ciclo celular, desencadenan reacciones inmunológicas (producción de interferón γ por las células T) y promueven la apoptosis^{67,68}. Además, es capaz de formar aductos en el ADN mitocondrial, afectando a la síntesis proteica y dando como resultado la disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial⁶⁹. Las alteraciones en los complejos OXPHOS incrementan los niveles de ROS, favoreciendo la activación de la apoptosis por la vía intrínseca.

El aumento de la resistencia al Oxa puede ser debida a: alteraciones en el destino intracelular del fármaco por una reducción de la funcionalidad de los receptores CRT1, causado por el secuestro de cobre por parte de los receptores ATPasas (ATP7A/B), bloqueando la entrada de Oxa y facilitando su salida; por cambios estructurales o espaciales, ocasionado por el incremento de la desintoxicación por glutatión y metalotioneína^{70,71}; un sistema eficiente de MMR y/o mutaciones en p53 que ocasionan una disminución de la muerte celular por apoptosis (Figura 6).

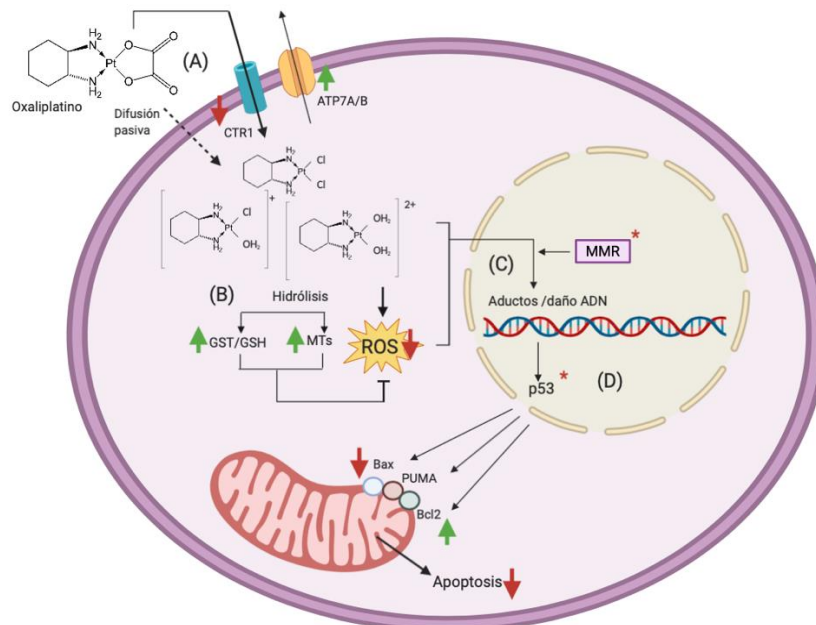


Figura 6. Resumen de los mecanismos de resistencia asociados a la oxaliplatino. Imagen creada con Biorender.com. Modificado *Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance*. Las flechas y las flechas acabadas en línea significan activación e inhibición respectivamente. Las flechas de color verde y rojo significan que se ve aumentada y disminuida, respectivamente, en situación de resistencia⁶⁰.

Varios estudios han determinado que el cisplatino, análogo del Oxa, induce tanto la apoptosis como la ferroptosis⁷². Los compuestos basados en platino tienen una elevada afinidad por biomoléculas ricas en tiol, tal como GSH⁷². Dentro del citoplasma, la mayor parte del cisplatino intracelular se encuentra conjugado con GSH, formando el complejo Pt-GS^{72,73}. El agotamiento de GSH y la inactivación de GPx presentan un papel importante en el incremento de ROS, factor clave para iniciar la ferroptosis⁷³.

Asimismo, se ha demostrado que la combinación de cisplatino e inductores como la erastina mejoran la sensibilidad de las células a la ferroptosis.

El tratamiento con Oxa induce diversos efectos secundarios como mielotoxicidad y neuropatías periféricas, que ocurre casi en el 90% de los pacientes, caracterizado por disestesias y parestesias de las manos, los pies y la región perioral⁷⁴. Asimismo, la adquisición de quimiorresistencia de los pacientes, tratados durante un periodo prolongado, limita la eficacia terapéutica del Oxa⁶⁷. Por ende, se requiere estudiar nuevos inductores y la combinación con fármacos antitumorales para mejorar la sensibilidad a la apoptosis y/o ferroptosis.

1.5.El huevo como fuente de proteínas bioactivas: Fosvitina.

La demanda y uso de moléculas bioactivas en productos alimenticios ha aumentado en la última década. Entre las moléculas bioactivas encontramos los péptidos, los cuales presentan grandes beneficios para la salud, por ejemplo, actuando como antioxidante natural. Los péptidos bioactivos se han convertido en objetivo de estudio como prometedores agentes terapéuticos⁷⁵. Dichos péptidos presentan diversas funciones, incluyendo antioxidante, anticancerígeno, unión a minerales entre otros. Por ello, las biomoléculas más interesantes son los fosfopéptidos, debido a su estructura y capacidad de unión a metales⁷⁶.

Los huevos son una fuente de sustancias biológicamente activas, compuesto de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales^{76,77}. Los huevos se fraccionan en la cáscara (9,5%), clara de huevo (63%) y yema (27,5%)⁷⁸. La yema presenta propiedades nutricionales y organolépticas, formada por agua (50%), lípidos (31-35%), proteínas (15-17%) e hidratos de carbono (1%). Las proteínas de la yema se distribuyen en el plasma, compuesto por livetina y lipoproteínas de baja densidad, y en los gránulos, constituido por lipovitelina, LDL y fosvitina)⁷⁷.

La fosvitina (Pv) es una fosfoglicoproteína representando el 7-11% de las proteínas⁷⁵. La Pv está compuesto por 217 aminoácidos, de los cuales 123 residuos son serinas y el 90% de estos se encuentran fosforilados^{76,77}. Dependiendo del grado de fosforilación de la proteína, el peso molecular puede oscilar entre 35 a 40 kDa. La mayor parte del hierro en la yema del huevo se encuentra unida a la Pv en relación 1:2 (1 átomo de hierro: 2 grupos fosfato de Pv)⁷⁹.

La disposición de las fosfoserinas en la estructura proteica le confiere un área hidrofílica central rodeada por dos pequeñas áreas hidrofóbicas en N-terminal y C-terminal⁸⁰. El carácter polianiónico de Pv le confiere una elevada capacidad de quelación de metales, cada dos moles de fósforo orgánico de Pv puede unir un mol de hierro. Principalmente se une a la forma férrica, pero la Pv es capaz de

interaccionar con la forma férrica por autooxidación, reduciendo así la disponibilidad de Fe^{2+} e inhibiendo la generación de OH^\cdot a través de la reacción de Fenton^{78,81}.

2. Objetivos

El presente trabajo pretende estudiar el efecto que ejerce la fosvitina y el oxaliplatino sobre la viabilidad celular y el estrés oxidativo en células de cáncer de colon. Además, otro objetivo de este trabajo es efectuar una búsqueda bibliográfica con la finalidad de elucidar un posible efecto sinérgico o antagónico entre ambos compuestos, en función de los posibles cambios en la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y/o muerte celular.

3. Materiales y métodos

3.1. Cultivos celulares y tratamiento

La línea celular de cáncer de colon humano SW620 se adquirió de American Type Culture Collection (ATCC® CCL-227™), a partir de un tumor derivado del sitio metastásico (nódulo linfático) de un hombre caucásico de 51 años. Las células se mantuvieron en medio DMEM con rojo fenol suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina / estreptomicina, e incubadas en condiciones atmosféricas de 5 % de CO_2 y a una temperatura de 37°C. Las células fueron tratadas con fosvitina (CAS 9008-96-2) obtenido de la casa comercial Sigma-Aldrich (P1253), diluido previamente con DMSO a una concentración final de 500 μM (50 mg/1,5 mL), y oxaliplatino (CAS 61825-94-3) de la casa comercial Sigma-Aldrich (O9512). Se realizaron dos grupos experimentales, células tratadas únicamente con Pv a una concentración creciente (1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM) y tratadas con una combinación de oxaliplatino a una concentración constante (5 μM) y Pv (1 nM, 5 nM, 50 nM, 500 nM).

3.2. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada mediante un ensayo fluorimétrico que marca el ADN con Hoechst 33342 (CAS 875756-97-1) de la casa comercial Sigma-Aldrich. Las células fueron sembradas a una densidad de 40 000 células / pocillo en una placa de 96 pocillos especiales para fluorimetría, suplementado con medio DMEM hasta 90 μL . Después de 24h de incubación, para que las células se depositaran y anclaran al fondo del pocillo, se trataron las células con Pv y/o Oxa durante 48 h. Después del tiempo de tratamiento, se eliminó el medio y se lavó cada pocillo con PBS para eliminar los restos de medio. Seguidamente, se incubaron las células con 100 μL de una disolución de Hoechst 33342

diluido con PBS, se incubó durante 5 minutos a 37 °C. Se cuantificó la fluorescencia de los pocillos una longitud de onda de excitación y emisión de 360 nm y 460 nm respectivamente.

3.3. Producción de ROS

La producción de ROS fue determinada, siguiendo el protocolo del fabricante, mediante el kit de ensayo Amplex Red® peróxido de hidrógeno / peroxidasa, formado por Krebs-Ringer Buffer, *Stock Peroxidase* de rábano (HRP) 10 U/mL (Sigma P8250), Stock reactivo Amplex Red 10mM (Invitrogen A1222). Las células fueron sembradas a una densidad de 40 000 células / pocillo en una placa de 96 pocillos para fluorimetría suplementado con medio DMEM hasta 90 µL. Después de 24h de incubación, se trataron las células con fosvitina y/o oxaliplatino en las concentraciones indicadas durante 48h. Tras el tratamiento se realiza un lavado con 100µL de *Krebs-Ringer Buffer (K-R)*. Se realiza previamente una dilución del reactivo Amplex Red 50 µM y HRP (0,1 U/mL) en tampón fosfato K-R, se añade 100 µL de la solución resultante a cada pocillo. La lectura fluorimétrica se registró en los tiempos 0, 15, 30 y 60 min a una longitud de onda de excitación y emisión de 570 nm y 585 nm respectivamente, y los datos obtenidos se obtuvieron por el cálculo de la pendiente por el incremento en la fluorescencia durante ese tiempo. Los valores se normalizaron a través del ensayo por Hoechst 33342.

3.4. Estrategia de búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos *PubMed* para elucidar como la fosvitina, por sí sola o, por el contrario, en combinación con un compuesto derivado del platino, como puede ser el oxaliplatino o cisplatino, puede afectar a la expresión de enzimas antioxidantes. Para la pesquisa se siguieron una serie de restricciones. Se limitó a artículos publicados entre el 2015 y 2020, para asegurar que la información extraída estuviera actualizada, para ello se utilizó el filtro *Publication Date: 5 years*. En aquellas búsquedas donde el resultado fuera menor a 10 artículos, se amplió el rango de tiempo a 2010 o 2000 hasta la actualidad. Asimismo, los términos de búsqueda debían aparecer en el título o *abstract*, empleando el filtro *Title/Abstract*. También se analizaron las referencias de los artículos seleccionados para obtener publicaciones de interés.

Los términos que se insertaron en la pesquisa fueron los especificados en la Tabla 1, junto con el número total de publicaciones disponibles en la base de datos. Para la inclusión final, las publicaciones debían encontrarse entre las 25 más relevantes según el criterio establecido por la base de datos, haberse publicado en los últimos 5 años (2015-actualidad), a excepción de los requisitos mencionados. Se excluyeron aquellos artículos con información contradictoria o que presentaran información similar, prevaleciendo la más reciente, detallada y comprensible.

Tabla 1. Términos de búsqueda y filtros utilizados en *PubMed* y el número de resultados.

Términos de búsqueda	Nº de Publicaciones	Términos de búsqueda	Nº de Publicaciones
<i>Phosvitin AND Cancer</i>	2	<i>Cisplatin AND phosvitin</i>	-
<i>Phosvitin AND Antioxidant enzymes</i>	1	<i>Oxaliplatin AND Colon Cancer AND stress oxidative</i>	15
<i>Phosvitin AND Oxidative stress</i>	5	<i>Oxaliplatin AND Colon Cancer AND antioxidant enzymes</i>	4
<i>Phosvitin AND Antioxidant activity</i>	8	<i>Oxaliplatin AND antioxidant activity</i>	28
<i>Phosvitin AND Phosphopeptides</i>	13	<i>Oxaliplatin AND iron AND cancer</i>	13
<i>Egg Protein AND Cancer</i>	3	<i>Oxaliplatin AND ROS</i>	72
<i>Oxaliplatin AND phosvitin</i>	-		

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el *Software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Los resultados de los experimentos se exponen como la media (\pm SEM) en tanto por ciento, siendo las muestras control el 100%. Para evaluar si las diferencias entre las distintas concentraciones del tratamiento con Pv respecto al control sobre el efecto en la viabilidad celular y la producción de ROS son significativas, se realizó un análisis *t-Student*. Por otro lado, se realizó un ANOVA univariable para el análisis de los resultados de las muestras expuestas a Pv y/u Oxa. Si el tratamiento combinado presenta diferencias significativas con Oxa, se realizó la prueba *t-Student* para evaluar la significancia entre los grupos experimentales. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Tratamiento con fosvitina: producción de ROS y viabilidad celular

La Figura 7 muestra la alteración del estrés oxidativo, representado en la producción de H₂O₂ y el efecto sobre la viabilidad celular después de un tratamiento de 48h con Pv a concentraciones crecientes en células de cáncer de colon SW620 en tanto por ciento con respecto al control. Los resultados indican

que la exposición de Pv a concentraciones de 250 nM (113,1 %) y 500 nM (120,9 %) promueve un incremento significativo de la producción de peróxido de hidrógeno con respecto a las muestras control (p-valor < 0,05 y p-valor < 0,01 respectivamente). Asimismo, el tratamiento con Pv a altas concentraciones promueve de forma significativa una disminución de la viabilidad de las células SW620, siendo el descenso a 250 nM y 500nM de Pv un 13,5 % y 14,3 % respectivamente

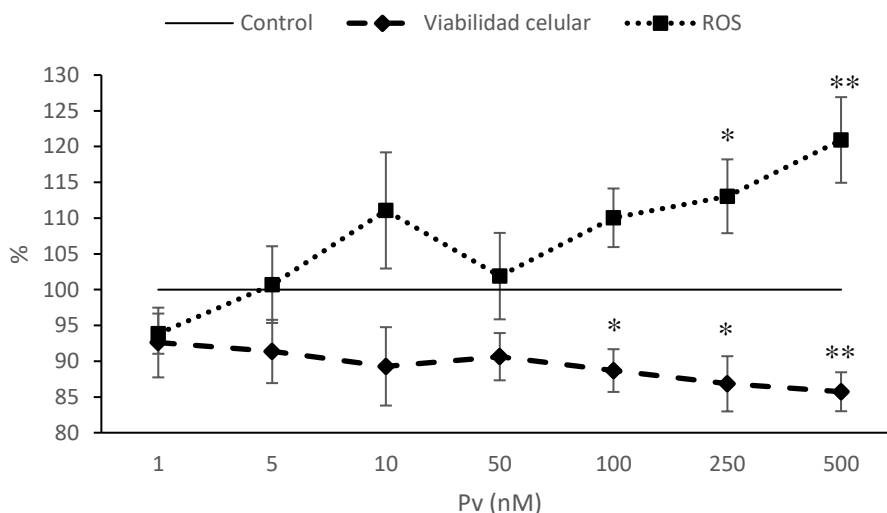


Figura 7. Efecto sobre la viabilidad celular y la producción de ROS en células de cáncer de colon SW620 tratadas con fosvitina (Pv). Los valores se expresan como medias \pm SEM y normalizada como porcentaje del valor de las muestras DMSO control. Análisis estadístico *t-Student*: *p-valor < 0,05, **p-valor < 0,01; *** p-valor < 0,001.

4.2. Tratamiento con fosvitina y/o oxaliplatino: ¿efecto sinérgico o antagónico?

La Figura 8 A muestra una disminución significativa de la viabilidad celular de SW620 ante una exposición de ambos compuestos produciendo un descenso de las células SW620 viables de 14,3 % y 34,3 % con Pv y oxaliplatino, respectivamente. El tratamiento combinado de los compuestos produjo una reducción significativa de las células viables de 38,9 % (ANOVA $p < 0,05$). Asimismo, Figura 8 B expone un incremento significativo de la producción de ROS (H_2O_2) frente un tratamiento de 48h con Pv y Oxa, siendo el aumento de 20,9 % y 58,0 % respectivamente. La combinación de ambos dio lugar a un aumento significativo de 72,6 % en la producción de ROS, exhibiendo un efecto sinérgico.

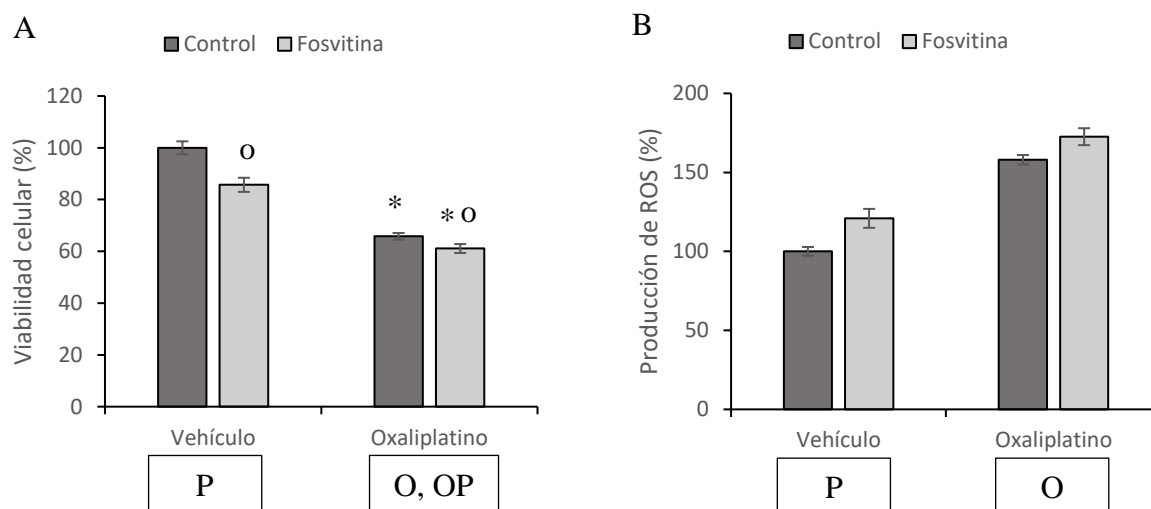


Figura 8. Efecto de la fosvitina y tratamiento citotóxico con oxaliplatino sobre la viabilidad celular (A) y la producción de ROS (B). Las células de cáncer de colon SW620 fueron tratadas con 0,1 % DMSO, 500 nM de Pv y 5 μ M de Oxa durante 48h. Los valores se expresan como medias \pm SEM y normalizada como porcentaje del valor de las muestras DMSO control. Análisis estadístico ANOVA univariado (p-valor < 0,05), donde P es efecto de la fosvitina, O efecto del oxaliplatino y OP el efecto combinado de fosvitina y oxaliplatino. Como resultado del efecto combinado se realizó un *t-Student* (p-valor < 0,05): ° diferencia entre DMSO control y tratamiento con Pv significativo; * diferencia entre DMSO control y tratamiento con Oxa significativo; ** diferencia significativa entre el tratamiento con Oxa y el tratamiento combinado.

4.3. Búsqueda bibliográfica

A partir de la búsqueda bibliográfica de las palabras clave *phosvitin* y *oxaliplatin* se obtuvieron un total de 11299 resultados. Tras la adición de palabras detalladas en la Tabla 1 y la filtración por año de publicación se obtuvieron 164 artículos, muchos de los cuales no se tuvieron en consideración, dado que trataban de los métodos de extracción y/o purificación o bien de otros tipos de muestra como alimentos, bacterias u otros tipos de enfermedades y no estaban relacionados directamente con este estudio. Tras la lectura de los *abstracts* se excluyeron 115 artículos. En pos de la lectura, se añadieron 7 artículos que fueron encontrados en las referencias de otros artículos seleccionados. Finalmente se utilizaron 13 artículos (Figura 9).

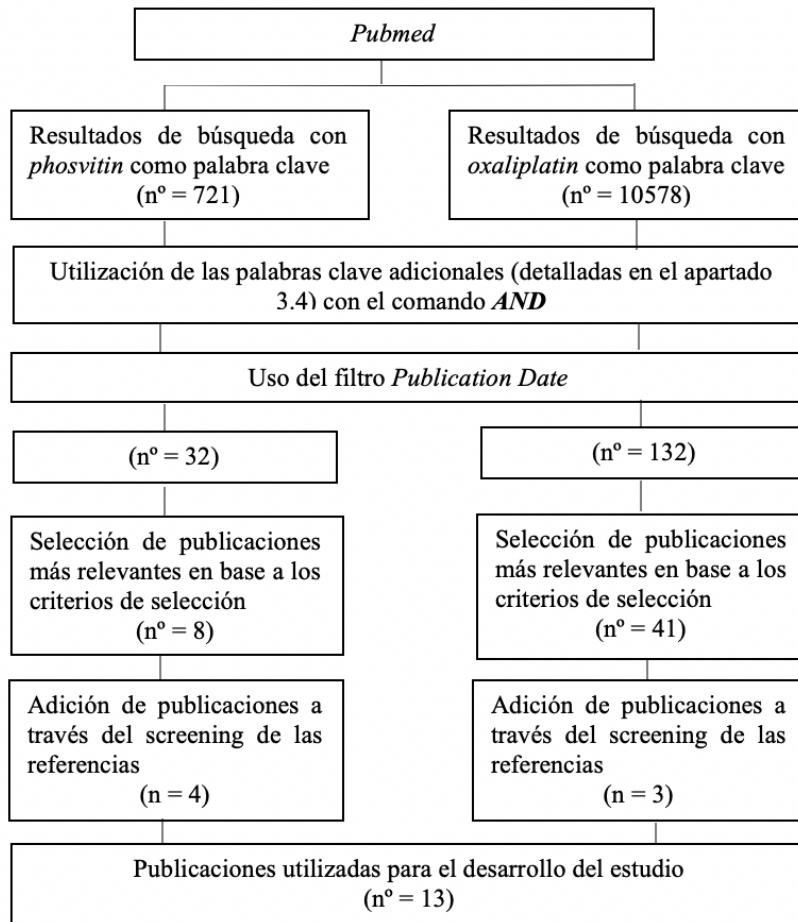


Figura 9. Proceso de selección de artículos

5. Discusión

En este estudio se han evaluado los efectos de la fosvitina (Pv), una proteína especialmente abundante en la yema del huevo, sobre la viabilidad celular y el estrés oxidativo en células de cáncer de colon metastásico (línea celular SW620). Los resultados que se han obtenido después de un tratamiento de 48 h revelan una reducción significativa de la viabilidad celular en las células SW620, ante una exposición con una concentración superior a 100 nM de Pv, presentando un mayor impacto en la actividad citotóxica a una concentración de Pv de 500 nM. El incremento de la muerte celular está acompañado por un aumento en la producción de H₂O₂ al tratar a las células SW620 a niveles de Pv superiores a 5 nM. Sin embargo, el crecimiento de los niveles de ROS solo es significativo a concentraciones mayores de 100 nM. Al evaluar el efecto de la Pv frente un tratamiento anticancerígeno con oxaliplatino, se observa una disminución significativa de la viabilidad celular, produciendo un efecto sinérgico en la actividad citotóxica. Sin embargo, el aumento de la muerte celular no se vio acompañada por un aumento significativo en la producción de ROS.

El huevo es una fuente alimentaria altamente nutritiva, que contiene proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. En las últimas décadas han sido cuantiosos estudios los que han demostrado toda una serie de funciones en las proteínas del huevo, tales como, actividad anticancerígena, inmunoreguladora, antimicrobiana y antioxidante entre otras⁸². Sin embargo, hay exiguos estudios sobre el efecto de estas proteínas en células cancerígenas y sobre su participación en el sistema antioxidante. La Pv presenta una estructura rica en serinas, mayoritariamente fosforiladas, proporcionando la propiedad de quelación de iones metálicos como el Fe^{2+} ^{76,77}. Este carácter le otorga a la Pv propiedades antioxidantes, evitando la generación de radicales hidroxilos catalizados por la reacción de Fenton, por ende, incrementa los niveles de H_2O_2 ⁷⁹.

Algunos estudios han evaluado la actividad citotóxica de Pv en varias líneas de células de cáncer, determinando la concentración necesaria para inhibir el 50 % de la viabilidad celular⁷⁶. Entre las líneas celulares se incluyen melanoma, mama, cuello uterino, estómago, pulmón, hígado y laringe, requiriendo una concentración relativamente elevada (140 μM - 350 μM) dependiendo de la línea celular de Pv disuelta en agua destilada desionizada⁷⁶. Estos resultados indicarían que la Pv por si misma presenta actividad citotóxica. La diferencia de concentraciones utilizadas con respecto a este estudio puede ser debido por el uso de distintos disolventes y su respectivo grado de solubilidad. Con la finalidad de mantener disuelta y congelada la proteína, en este estudio se diluye la Pv con DMSO, ideal para mantener su estructura.

En varios estudios se ha demostrado como fosfopéptidos derivados de Pv (PPP), afectan a la expresión de toda una serie de genes involucrados en el metabolismo oxidativo y en la producción de ROS⁸³. PPP-1, PPP-2, PPP-3 son los principales fosfopéptidos extraídos por HPLC, presentan de menor a mayor contenido en serinas y grados de fosforilación 0 %, 7,2 % y 18,9 % respectivamente⁸⁴. En los estudios seleccionados según el criterio del apartado 3.3, determinan el impacto que ejerce en la expresión de las enzimas antioxidantes en células de adenocarcinoma de colon (Caco-2), ante un tratamiento con PPP-3 en condiciones sin o con estrés oxidativo inducido por H_2O_2 ^{83,85}.

Denise Young et al. analizan la expresión de 32 genes en células Caco-2 expuestas a PPP3 en ausencia o presencia H_2O_2 ⁸³. Se observa una regulación al alza de la expresión de 21 de los 32 genes en las células tratadas únicamente con PPP3 y 18 frente una exposición de PPP3 con H_2O_2 , respecto a las células control⁸³. El tratamiento con PPP3 en ausencia o presencia de H_2O_2 fomenta de forma significativa la expresión de genes que participan en la desintoxicación de H_2O_2 , PRx1/3 y GPx4 y los genes NOX y SOD que conducen la formación de H_2O_2 , a partir de generar y reducir O_2^- respectivamente⁸³ (Figura 10). Todos estos genes, exceptuando PRx1/3, presentan una mayor expresión frente a tratamientos con PPP3 sin estrés oxidativo inducido. La magnitud del cambio es mayor en los genes NOX y SOD2 por lo que es posible que el H_2O_2 que se está generando no pueda ser detoxificado

por los demás antioxidantes, lo que explicaría la subida en los niveles de producción de H_2O_2 en respuesta al tratamiento con Pv. El siguiente paso consistiría en analizar la producción de anión superóxido y de radicales hidroxilos en respuesta a la exposición con Pv.

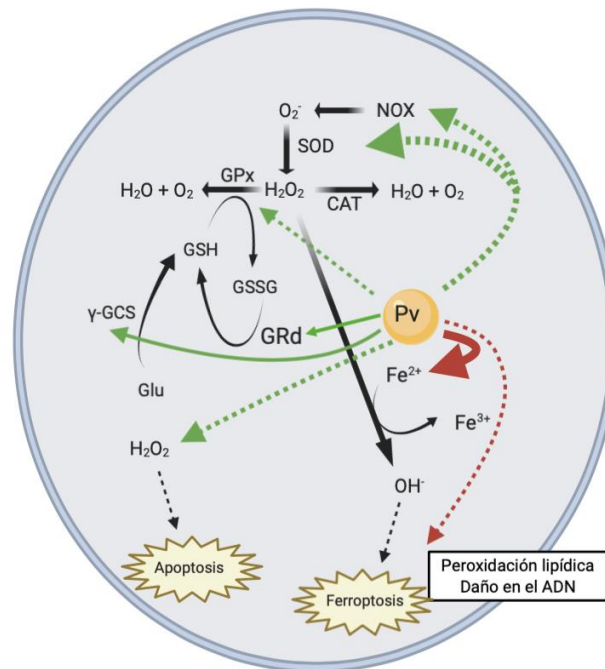


Figura 10. Hipótesis sobre el mecanismo de acción de la fosvitina (Pv)⁸⁵. Modificado de *Oligophosphopeptides Derived from Egg Yolk Phosvitin Up-regulate γ -Glutamylcysteine Synthetase and Antioxidant Enzymes against Oxidative Stress in Caco-2 Cells*. Imagen creada con Biorender.com. Las flechas verdes y rojas representan el efecto positivo o negativo de la Pv respectivamente, el grosor hace alusión a la magnitud del efecto. La continuidad y discontinuidad hacen referencia al efecto en la actividad enzimática o interacción directa y sobre la expresión de los genes o el efecto indirecto sobre los procesos, respectivamente.

En el estudio de Shigeru Katayana et al. determinan el efecto que ejercen los PPP a la actividad enzimática de glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST) y los niveles del glutatión reducido (GSH) en células de cáncer de colon Caco-2 en presencia o no de un tratamiento prooxidante de H_2O_2 ⁸⁵. En cuanto a la GR, se produjo un aumento significativo de su actividad enzimática frente al tratamiento con PPP3 en presencia de H_2O_2 ⁸⁵.

Asimismo, realizan un estudio más exhaustivo sobre los efectos que los PPP ejercían sobre el GSH⁸⁵. En primer lugar, determinan la variación en su contenido intracelular. Los resultados exhibieron un incremento significativo en los niveles de GSH en las células expuestas a PPP-3 en presencia y ausencia de H_2O_2 . Por esta razón, el impacto de PPP es independiente al estrés oxidativo⁸⁵. En segundo lugar y a raíz de estos resultados, se lanza la hipótesis de que los PPP influyan en la biosíntesis de GSH⁸⁵. Las células Caco-2 tratadas con PPP-3 presentan un aumento en la expresión del mensajero γ -GCS-HS, en

ausencia y presencia de H_2O_2 , siendo significativo en condiciones de estrés oxidativo⁸⁵. Además, la actividad de γ -GCS se elevó significativamente en células Caco-2 expuestas a PPP-3 con H_2O_2 ⁸⁵.

Además de la evaluación de los efectos propios de la Pv, se comprueba el efecto sobre la eficacia de tratamientos antitumorales como el oxaliplatino (Oxa). Dicho fármaco está ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer de colon⁶⁶. Su función principal es la formación de aductos de ADN, interrumpiendo la replicación de ADN, transcripción de ARNm y la detención de ciclos celulares, entre otras funciones^{67,68}. Como efecto secundario, Oxa induce un aumento de los niveles de ROS favoreciendo la toxicidad y la muerte celular^{67,74}.

Con el objetivo de intentar relacionar los efectos citotóxicos de la Pv debidos a su posible sinergia con el Oxa, realizamos una búsqueda bibliográfica sobre estudios relacionados con un tipo de muerte celular independiente a la apoptosis, necrosis y la autofagia, regulada por ROS y Fe, la ferroptosis^{76,77}. Otras diferencias bioquímicas con respecto a la apoptosis, además del factor inductor del hierro y de peróxidos lipídicos, la ferroptosis no se ve influenciada por la activación de las caspasas ni por sus inhibidores⁸⁶. Jipeng Go et al. determinan que la muerte inducida por cisplatino, derivado del Oxa, en células de cáncer de pulmón y de colon es resultado de la combinación de apoptosis y ferroptosis⁷². Al combinar el cisplatino con un inhibidor de la ferroptosis, la ferrostatina-1 (Fer-1), se inhibe la peroxidación lipídica inducida por el ion ferroso a través de la interacción con el metal, disminuyendo la actividad citotóxica⁷².

La acción de quelantes como la Pv agotan los niveles intracelulares de hierro, por lo que son considerados inhibidores de la ferroptosis⁸⁶. Paradójicamente, contribuyen a la generación de ROS, principalmente H_2O_2 al inhibir la reacción de Fenton⁷⁹. Varios estudios declaran que la acción de diversos quelantes induce estrés oxidativo, produciendo efectos anticancerígenos a través de múltiples mecanismos, tales como la regulación positiva de los genes supresores tumorales TP53 y PTEN activando la mitofagia, el arresto del ciclo celular y favoreciendo la cascada de caspasas que inducirán la apoptosis⁸⁶. El mecanismo de acción de la Pv y la magnitud de su influencia en estas dos vías de muerte celular es aún una incógnita. Hipotéticamente, se podría deducir que presenta una mayor influencia en la apoptosis que no en la ferroptosis, de acuerdo con los resultados obtenidos al disminuir la viabilidad celular de forma sinérgica con el Oxa.

El impacto de la exposición de Pv en células de cáncer de colon sobre la expresión y actividad del sistema antioxidante y como podría afectar frente un tratamiento anticancerígeno es aún desconocido y presenta cierta controversia. La Pv potencia el aumento de los niveles de H_2O_2 al evitar la formación de iones hidroxilo a la interacción con los iones ferrosos e inhibir la reacción de Fenton y al favorecer la expresión de genes como NOX y SOD2^{79,83}. Por esta razón, se sugiere que la Pv podría ejercer un efecto

prooxidante al promover un estado de estrés oxidativo inducido por el aumento de H₂O₂. Al combinar los dos compuestos que por efectos secundarios incrementan la producción de H₂O₂, disminuye la viabilidad celular de forma sinérgica. Sin embargo, ante un estrés oxidativo inducido, se ve incrementada la expresión de genes antioxidantes como GPx4 y PRx1/3 ante la exposición de fosfopéptidos de Pv ⁸³. Estos resultados podrían relacionarse con que el incremento de concentración de H₂O₂ frente al tratamiento combinado no fuese significativo. De forma hipotética, la Pv podría presentar una función protectora frente a un cierto nivel de estrés oxidativo, favoreciendo el sistema antioxidante endógeno, protegiendo a la célula de los efectos tóxicos que genera el Oxa. Aunque más estudios son necesarios para intentar esclarecer el papel de esta proteína en el estrés oxidativo y en la proliferación celular.

6. Conclusión

El auge de los estudios con proteínas naturales ha puesto de manifiesto su papel como posibles potenciadores de tratamientos anticancerígenos. En este estudio, se ha demostrado que las células de cáncer de colon SW620 expuestas a la proteína de la yema de huevo, Pv, produce una disminución significativa de la viabilidad celular, acompañada por un incremento de los niveles de H₂O₂. Además, potencia la actividad citotóxica del Oxa, exponiendo un efecto sinérgico en el tratamiento combinado. En diferentes estudios se ha observado como el tratamiento con fosfopéptidos de la proteína ejerce un factor prooxidante al promover la expresión de genes como NOX y SOD2, incrementando los niveles de H₂O₂. Sin embargo, frente a un estado de estrés oxidativo favorece el sistema antioxidante endógeno al propiciar la expresión de genes como GPx4 o PRx1/3. La escasez de estudios sobre el efecto de la Pv es la causa de que su mecanismo de acción todavía no haya sido elucidado del todo y que exista cierta controversia. Por ello, es de gran interés evaluar los efectos en la viabilidad celular y el sistema antioxidante, y su relación con el cáncer de colon.

7. Bibliografía

1. Wilson, M. J. *et al.* Long-term prognostic value of preoperative anemia in patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Surgical Oncology* **26**, 96-104 (2017).
2. Schneider, C., Bodmer, M., Jick, S. S. & Meier, C. R. Colorectal cancer and markers of anemia. *Eur. J. Cancer Prev.* **27**, 530-538 (2018).
3. Day, L. W. & Velayos, F. Colorectal cancer screening and surveillance in the elderly: Updates and controversies. *Gut and Liver* **9**, 143-151 (2015).
4. Thanikachalam, K. & Khan, G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* **11**, 164 (2019).
5. Araghi, M. *et al.* Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *Int. J. Cancer* **144**, 2992-3000 (2019).
6. Lin, S., Li, Y., Zamyatnin, A. A., Werner, J. & Bazhin, A. V. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *J. Cell. Physiol.* **233**, 5119-5132 (2018).
7. Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. *Anticancer Res.* **37**,

- (2017).
8. Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T. & Itinteang, T. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J. Clin. Pathol.* **71**, 110-116 (2018).
 9. Tauriello, D. V. F., Calon, A., Lonardo, E. & Batlle, E. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Molecular Oncology* **11**, 97-119 (2017).
 10. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15065 (2015).
 11. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E. & Yoldi, M. J. R. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, (2017).
 12. Zamani, M., Hosseini, S. V. & Mokarram, P. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects. *Biomarkers* **23**, 105-114 (2018).
 13. Valle, L. *et al.* Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Molecular Aspects of Medicine* (2019). doi:10.1016/j.mam.2019.03.001
 14. Fischer, J. *et al.* Clinical implications of the genetics of sporadic colorectal cancer. *ANZ J. Surg.* **89**, 1224-1229 (2019).
 15. Jafar Nouri, N. S. B. S. ; E. S. Microsatellite instability in colorectal cancer. (2019).
 16. Testa, U., Pelosi, E. & Castelli, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Med. Sci.* **6**, 31 (2018).
 17. Aoki, K. & Taketo, M. M. Adenomatous polyposis coli (APC): A multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science* **120**, 3327-3335 (2007).
 18. Phelps, R. A. *et al.* A Two-Step Model for Colon Adenoma Initiation and Progression Caused by APC Loss. *Cell* **137**, 623-634 (2009).
 19. Hashimoto, K. *et al.* Cellular context-dependent consequences of Apc mutations on gene regulation and cellular behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 758-763 (2017).
 20. Tan, C. & Du, X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **18**, 5171-5180 (2012).
 21. Kawada, K., Toda, K. & Sakai, Y. Targeting metabolic reprogramming in KRAS-driven cancers. *International Journal of Clinical Oncology* **22**, 651-659 (2017).
 22. Grady, W. M. & Pritchard, C. C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol. Pathol.* **42**, 124-139 (2014).
 23. Schwitalla, S. *et al.* Loss of p53 in Enterocytes Generates an Inflammatory Microenvironment Enabling Invasion and Lymph Node Metastasis of Carcinogen-Induced Colorectal Tumors. *Cancer Cell* **23**, 93-106 (2013).
 24. Nakayama, M. & Oshima, M. Mutant p53 in colon cancer. *Journal of Molecular Cell Biology* **11**, 267-276 (2019).
 25. Sreevalsan, S. & Safe, S. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **9**, 350-357 (2013).
 26. Katakwar, P., Metgud, R., Naik, S. & Mittal, R. Oxidative stress marker in oral cancer: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* **12**, 438-446 (2016).
 27. Mandal, P. Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **390**, 557-565 (2017).
 28. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44-84 (2007).
 29. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* (2006). doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
 30. Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* **19**, 1807-1819 (2007).
 31. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* (2005). doi:10.2174/0929867053764635
 32. Perše, M. Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? *Biomed Res. Int.* **2013**, 725710 (2013).
 33. Wang, Z. *et al.* Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, (2016).

34. Leslie, N. R. *et al.* Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J.* **22**, 5501-5510 (2003).
35. Kil, I. S. *et al.* Feedback Control of Adrenal Steroidogenesis via H₂O₂-Dependent, Reversible Inactivation of Peroxiredoxin III in Mitochondria. *Mol. Cell* **46**, 584-594 (2012).
36. Kauppila, J. H. K. & Stewart, J. B. Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1847**, 1354-1361 (2015).
37. Yin, H., Xu, L. & Porter, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* **111**, 5944-5972 (2011).
38. Gentile, F. *et al.* DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genet.* **4**, 103-137 (2017).
39. He, L. *et al.* Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry* **44**, 532-553 (2017).
40. Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends in Molecular Medicine* **23**, 411-429 (2017).
41. Kuyumcu, F. & Aycan, A. Evaluation of oxidative stress levels and antioxidant enzyme activities in burst fractures. *Med. Sci. Monit.* **24**, 225-234 (2018).
42. Idelchik, M. del P. S., Begley, U., Begley, T. J. & Melendez, J. A. Mitochondrial ROS control of cancer. *Seminars in Cancer Biology* **47**, 57-66 (2017).
43. Ding, C., Fan, X. & Wu, G. Peroxiredoxin 1 – an antioxidant enzyme in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **21**, 193-202 (2017).
44. Gil, D. *et al.* Antioxidant activity of SOD and catalase conjugated with nanocrystalline ceria. *Bioengineering* **4**, (2017).
45. Nandi, A., Yan, L.-J., Jana, C. K. & Das, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, (2019).
46. Singh, C. K. *et al.* The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxidants and Redox Signaling* **28**, 643-661 (2018).
47. Torrens-Mas, M., Roca, P., Sastre-Serra, J. & Margalida Torrens-Mas, C. Importancia de la sirtuina 3 en el estrés oxidativo y el cáncer Role of sirtuin 3 in oxidative stress and cancer. *Med. Balear* **32**, 47-52 (2017).
48. Torrens-Mas, M., Oliver, J., Roca, P. & Sastre-Serra, J. SIRT3: Oncogene and tumor suppressor in cancer. *Cancers* **9**, 1-10 (2017).
49. Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K. & McCord, J. M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med.* **32**, 234-246 (2011).
50. Jomova, K. & Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* (2011). doi:10.1016/j.tox.2011.03.001
51. Toyokuni, S. Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci.* **100**, 9-16 (2009).
52. Ludwig, H. *et al.* Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wiener Klinische Wochenschrift* **127**, 907-919 (2015).
53. Torti, S. V & Torti, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 342-55 (2013).
54. Xue, X. & Shah, Y. M. Intestinal iron homeostasis and colon tumorigenesis. *Nutrients* **5**, 2333-2351 (2013).
55. Alkhateeb, A. A. & Connor, J. R. The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **1836**, 245-254 (2013).
56. Padmanabhan, H., Brookes, M. J. & Iqbal, T. Iron and colorectal cancer: Evidence from in vitro and animal studies. *Nutr. Rev.* **73**, 308-317 (2015).
57. Stockwell, B. R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* **171**, 273-285 (2017).
58. Mou, Y. *et al.* Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer. *Journal of Hematology and Oncology* **12**, (2019).
59. Lu, B. *et al.* The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Front. Pharmacol.* **8**, (2018).
60. Toyokuni, S., Ito, F., Yamashita, K., Okazaki, Y. & Akatsuka, S. Iron and thiol redox signaling

- in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **108**, 610-626 (2017).
61. Xie, Y. *et al.* Ferroptosis: Process and function. *Cell Death and Differentiation* **23**, 369-379 (2016).
 62. Cao, J. Y. & Dixon, S. J. Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 2195-2209 (2016).
 63. Xie, Y. *et al.* The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. *Cell Rep.* **20**, 1692-1704 (2017).
 64. Zhang, W., Gai, C., Ding, D., Wang, F. & Li, W. Targeted p53 on small-molecules-induced ferroptosis in cancers. *Frontiers in Oncology* **8**, (2018).
 65. Song, Y., Yang, H., Lin, R., Jiang, K. & Wang, B. M. The role of ferroptosis in digestive system cancer. *Oncology Letters* **18**, 2159-2164 (2019).
 66. Martinez-Balibrea, E. *et al.* Tumor-related molecular mechanisms of oxaliplatin resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* **14**, 1767-1776 (2015).
 67. Huang, H. *et al.* Inhibition of PGE 2 /EP4 receptor signaling enhances oxaliplatin efficacy in resistant colon cancer cells through modulation of oxidative stress. *Sci. Rep.* **9**, 1-11 (2019).
 68. Toscano, F. *et al.* P53 Dependent and Independent Sensitivity To Oxaliplatin of Colon Cancer Cells. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 392-406 (2007).
 69. Kim, E. K. *et al.* Redox-mediated mechanism of chemoresistance in cancer cells. *Antioxidants* **8**, (2019).
 70. Kopetz, S. *et al.* Synergistic activity of the Src family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res.* **69**, 3842-3849 (2009).
 71. Alcindor, T. & Beauger, N. Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol.* **18**, 18-25 (2011).
 72. Guo, J. *et al.* Ferroptosis: A novel anti-tumor action for cisplatin. *Cancer Res. Treat.* **50**, 445-460 (2018).
 73. Su, Y. *et al.* Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs. *Cancer Letters* (2020). doi:10.1016/j.canlet.2020.02.015
 74. Starobova, H. & Vetter, I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **10**, (2017).
 75. Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N. & Schrezenmeir, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.* **47**, 171-182 (2008).
 76. Moon, S. H. *et al.* Cytotoxic and antigenotoxic activities of phosvitin from egg yolk. *Poult. Sci.* **93**, 2103-2107 (2014).
 77. Chang, C., Lahti, T., Tanaka, T. & Nickerson, M. T. Egg proteins: fractionation, bioactive peptides and allergenicity. *J. Sci. Food Agric.* **98**, 5547-5558 (2018).
 78. Nimalaratne, C. & Wu, J. Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity: A Review. *Nutrients* **7**, 8274 (2015).
 79. ISHIKAWA, S., YANO, Y., ARIHARA, K. & ITOH, M. Egg Yolk Phosvitin Inhibits Hydroxyl Radical Formation from the Fenton Reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1324-1331 (2004).
 80. Anton, M., Castellani, O. & Guérin-Dubiard, C. Phosvitin. en *Bioactive Egg Compounds* 17-24 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-37885-3_4
 81. Jung, S., Nam, K. C., Ahn, D. U., Kim, H. J. & Jo, C. Effect of phosvitin on lipid and protein oxidation in ground beef treated with high hydrostatic pressure. *Meat Sci.* **95**, 8-13 (2013).
 82. Lee, H. J. & Paik, H.-D. Anticancer and Immunomodulatory Activity of Egg Proteins and Peptides: A Review. (2019). doi:10.3382/ps/pez381
 83. Young, D., Nau, F., Pasco, M. & Mine, Y. Identification of hen egg yolk-derived phosvitin phosphopeptides and their effects on gene expression profiling against oxidative stress-induced caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 9207-9218 (2011).
 84. Katayama, S., Xu, X., Fan, M. Z. & Mine, Y. Antioxidative stress activity of oligophosphopeptides derived from hen egg yolk phosvitin in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* (2006). doi:10.1021/jf052280d
 85. Katayama, S., Ishikawa, S., Fan, M. Z. & Mine, Y. Oligophosphopeptides Derived from Egg Yolk Phosvitin Up-regulate γ -Glutamylcysteine Synthetase and Antioxidant Enzymes against

- Oxidative Stress in Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2829-2835 (2007).
86. Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K. & Tsuji, Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 274-286 (2016).