

# Selenoenzima tipo I yodotironina desyodasa: un nuevo supresor de tumores en el cáncer de ovario

Adi Alfandari<sup>1,2,3</sup>, Dothan Moscovich<sup>1,2,3</sup>, Avivit Weisz<sup>4</sup>, Aviva Katzav<sup>4</sup>, Déborah Kidrón<sup>3,4</sup>, Mario Beiner<sup>3,5</sup>, Dana Josephy<sup>5</sup>, Trabajos de aulas<sup>5</sup>, Yael Hants<sup>5</sup>, Yogurt Yael<sup>6</sup>, Omer Weitzner<sup>6</sup>, Martín Ellis<sup>1,3</sup>, Galaad Itchaki<sup>1,3</sup> Osnat Ashur-Fabian<sup>1,2,3</sup> 

1 Laboratorio de Oncología Traslacional, Instituto de Hematología, Centro Médico Meir, Kfar Saba, Israel

2 Departamento de Genética Molecular Humana y Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Tel Aviv, Israel 3

Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud, Universidad de Tel Aviv, Israel

4 Departamento de Patología, Centro Médico Meir, Kfar Saba, Israel

5 División de Oncología Ginecológica, Centro Médico Meir, Kfar Saba, Israel

6 Departamento de Obstetricia y Ginecología, Centro Médico Meir, Kfar Saba, Israel

## Palabras clave

desyodasa; expresión; silenciamiento de genes; cáncer de ovarios; proliferación

## Correspondencia

O. Ashur-Fabian, Laboratorio de Oncología Traslacional, Centro Médico Meir, Kfar-Saba 44821, Israel

Tel: +972 9 7472178 Fax: +972 9

7600073 Correo electrónico:

[osnataf@tauex.tau.ac.il](mailto:osnataf@tauex.tau.ac.il)

(Recibido el 27 de agosto de 2023, revisado el 26 de diciembre de 2023, aceptado el 5 de febrero de 2024)

doi:10.1002/1878-0261.13612

La selenoenzima tipo I yodotironina desyodasa (DIO1) cataliza la eliminación de átomos de yodo de las hormonas tiroideas. Aunque se informa que la acción de DIO1 está alterada en varias neoplasias malignas, no se han realizado trabajos en el carcinoma de ovario seroso de alto grado (HGSOC), el cáncer ginecológico más letal. Nosotros estudiamos DIO1 expresión en pacientes con HGSOC [datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y tejidos tumorales], líneas celulares humanas (ES-2 y Kuramochi), células normales de ovario de hámster chino (CHO-K1) y células normales de las trompas de Falopio humanas (FT282 y FT109). Para estudiar su papel funcional, DIO1 se sobreexpresó, se inhibió [por propiltiouracilo (PTU)] o se derribó (KD), y se realizaron análisis de recuento celular, proliferación, apoptosis, viabilidad celular y proteómica. Se observaron niveles más bajos de DIO1 en HGSOC en comparación con las células y tejidos normales. Los análisis de TCGA confirmaron que la baja DIO1 La expresión de ARNm se correlacionó con una peor supervivencia y resistencia al tratamiento en los pacientes. Silenciar o inhibir la enzima condujo a una mayor proliferación del cáncer de ovario, mientras que después se demostró un efecto opuesto. DIO1 expresión ectópica. Análisis proteómico en DIO1-Las células KD revelaron cambios globales en las proteínas que facilitan el metabolismo y la progresión del tumor. En conclusión, la expresión de DIO1 y la progresión del cáncer de ovario están inversamente correlacionadas, destacando el papel supresor de tumores de esta enzima y su uso potencial como biomarcador en esta enfermedad.

## Abreviaturas

AKAP, miembros de la familia de proteínas de anclaje de A-quinasa; CHO-K1, células de ovario de hámster chino; COA6, factor 6 de ensamblaje de citocromo c oxidasa; DIO1, yodotironina desyodasa tipo I; DIO2, yodotironina desyodasa de tipo II; DIO3, yodotironina desyodasa tipo III; ECL, quimioluminiscencia mejorada; FC, citometría de flujo; FFPE, fijado con formalina e incluido en parafina; FT: trompa de Falopio; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; H&E, hematoxilina y eosina; HGSOC: carcinoma de ovario seroso de alto grado; HK1, hexoquinasa 1; HRP, peroxidasa de rábano picante; IHC, inmunohistoquímica; KD, derribado; MFI: intensidad media de fluorescencia; PANTERA, Análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas; PDHA1, subunidad alfa 1 de piruvato deshidrogenasa E1; pERK, ERK fosforilada; PKM2, piruvato quinasa 2 (PKM2); PRIM1, polipéptido 1 de ADN primasa; PTU, propiltiouracilo; SC, por vía subcutánea; SEC, selenocisteína; STIC, trompa serosa en el lugar carcinoma; TCGA, Atlas del genoma del cáncer; TH, hormona tiroidea; TR, receptores tiroideos; TRXR1, tiorredoxina reductasa 1; WB, transferencias Western.

## 1. Introducción

El cáncer de ovario epitelial es una neoplasia maligna ginecológica que, aunque es aproximadamente una décima parte más común que el cáncer de mama, se asocia con una tasa de mortalidad desproporcionadamente alta. Si bien la tasa de curación en mujeres con la enfermedad localizada exclusivamente en el ovario en el momento del diagnóstico es alta[1,2], la mayoría de los pacientes son diagnosticados después de que la enfermedad ha hecho metástasis. En estas etapas avanzadas, a pesar de las mejoras en las herramientas diagnósticas y terapéuticas, la tasa de supervivencia a 5 años sigue siendo inferior al 50%. El carcinoma seroso de ovario de alto grado (HGSOC) es el tumor en estadio avanzado más común. El dogma actual postula que HGSOC se origina, en la mayoría de los casos, de tubáricas serosas en el lugar carcinoma (STIC) en el epitelio de las trompas de Falopio de los pacientes, en el que las mutaciones del gen p53 ocurren temprano en la carcinogénesis[3,4]. . . .

Los tejidos tumorales de rápido crecimiento dependen de las enzimas desyodasas, que pertenecen a la familia de las selenoproteínas.[5]. . . . El núcleo catalítico de estas enzimas contiene el oligoelemento esencial selenio (Se), en forma del aminoácido número 21, la selenocisteína (Sec).[6]. . . . Todas las desyodasas son enzimas reguladoras de la hormona tiroidea (TH) mediante la desyodación de los átomos de yodo del anillo interno o externo en la estructura hormonal.[7-10]. . . . La familia consta de tres miembros, yodotironina desyodasa de tipo I (DIO1) y tipo II (DIO2), que inician la acción de la TH al convertir la T4 en la hormona biológicamente activa triyodotironina (T3), y yodotironina desyodasa de tipo III (DIO3), que convierte la T4. y T3 en metabolitos inactivos. DIO1 también puede, bajo ciertas condiciones, desactivar los metabolitos de TH (5-desyodación). DIO1 y DIO3 son proteínas ancladas a la membrana, mientras que DIO2 reside en el retículo endoplásmico. En conjunto, la familia DIO afina la biodisponibilidad intracelular de T3 en función de las demandas funcionales y específicas del tejido.

La T3 regula una amplia gama de procesos celulares a través de sus receptores tiroideos nucleares (TR) y desempeña un papel vital en el desarrollo, la diferenciación de tejidos y el mantenimiento del equilibrio metabólico celular.[11]. . . . Este delicado y dinámico equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular sugiere un posible papel de las enzimas desyodasas en la tumorigénesis mediante la regulación de los niveles intracelulares de T3. Estudios anteriores han sugerido que la expresión de DIO1 está desregulada en varios tumores.[11-13]; sin embargo, ninguno ha analizado exhaustivamente esta proteína única en HGSOC. En este estudio, hemos identificado un patrón de expresión único de DIO1 en células y tejidos de cáncer de ovario y hemos proporcionado evidencia, mediante varios métodos complementarios, que sugieren que esta enzima tiene actividades supresoras de tumores.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Reactivos y productos químicos.

El propiltiouracilo (PTU) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La lista de anticuerpos se presenta en la tabla.T1. . . .

### 2.2. Líneas celulares

Las células HGSOC humanas ES-2 (CVCL\_3509) se adquirieron de la ATCC. Sanador (CVCL\_1345) y normal inmortalizado trompas de Falopio tubo células (FT282/CVCL\_A4AX y FT109) fueron proporcionados por los Dres. Ruth Perets (Centro Médico Rambam, Haifa, Israel). Las células normales de ovario de hámster chino (CHO-K1) fueron un amable regalo del Prof. Philippe Cl-ezardin (Universidad de Lyon, Lyon, Francia). Las células CHO-K1 y HGSOC se cultivaron en medio RPMI1640 completo, suplementado con un 10% de FBS inactivado por calor y un 1% de antibióticos de penicilina-estreptomina. Los FT se cultivaron en medio DMEM F-12 (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel). En los últimos 3 años se realizaron perfiles de mutaciones/STR para la autenticación celular y se examinaron periódicamente los micoplasmas.

### 2.3. Derribo de DIO1

Se realizaron transfecciones estables con shRNA para DIO1 (sc-77146-SH, Santa Cruz Technologies, Dallas, TX, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el reactivo de transfección de plásmido shRNA (sc-108061, Santa Cruz Technologies). El plásmido GFP se usó como control positivo (SC-108083, Santa Cruz Technologies), y el plásmido shRNA simulado no específico (revuelto) se usó como control negativo (SC-108060, Santa Cruz Technologies). Después de las transfecciones y la selección con puomicina, se aislaron clones DIO1-KD ES-2 estables. La inhibición exitosa de DIO1 se confirmó a nivel de ARN (PCR en tiempo real) y niveles de proteína (Western blot).

### 2.4. Sobreexpresión transitoria de DIO1

Las transfecciones transitorias con el plásmido de expresión DIO1 se realizaron utilizando el reactivo de transfección Mirus TransIT-X2 (Mirus Bio Technologies), Madison, WI, EE. UU.). Se utilizó un vector pcDNA3 vacío como control negativo. La sobreexpresión transitoria de DIO1 fue validada mediante transferencia Western.

## 2.5. Extracción de ARN, ADNc y transcripción inversa.

El ARN se extrajo utilizando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y eluyó en 40  $\mu$ l Agua libre de RNasa. La concentración y la pureza del ARN se midieron utilizando NanoDrop<sup>™</sup> Espectrofotómetro 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). El ARN (200 ng) se transcribió de forma inversa utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones.

## 2.6. PCR en tiempo real

El ARN se transcribió de forma inversa y el ADNc se analizó utilizando el sistema SYBR Green/7500 Fast (Applied Biosystems). Se diseñaron cebadores para DIO1 (software Primer-Express) en diferentes exones para minimizar la contaminación del ADN. Cebador directo DIO1- CACTGCCTGAGAGCTCTACAT. Cebador DIO1- contrarrestar CCAGAACAGCACGAAGCTCTC. cebador directo: b-actina CCTGGCACCCAGACAAT. Cebador inverso: GCCGATCCACAGGAGTACT. El método del ciclo de umbral comparativo (2-2).DDCT, después de la normalización a actina, se utilizó para cuantificaciones relativas.

## 2.7. Citometría de flujo (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania)

Niveles de DIO1: las células se recogieron y se marcaron con anticuerpos conjugados fluorescentemente (1)  $\mu$ g/ml/29 10<sup>5</sup> células detalladas en la Tabla T1. . . . Recuentos absolutos de células: las células se recogieron en PBS y se contaron. Ciclo celular: las células se recogieron, se fijaron con etanol frío al 70%, se centrifugaron y se tiñeron con ADN yoduro de propidio (PI; 50 mg/ml)  $\times$  1/ARNasa A (10 mg/ml  $\times$  1; Sigma-Aldrich), y analizado. Muerte celular: las células se incubaron con Anexina V (FITC conjugada)  $\times$  5  $\mu$ l PI y analizado por FACS (Anexina+/PI-, apoptosis temprana; Anexina+/PI+, apoptosis/necrosis tardía).

## 2.8. Reactivo de viabilidad celular PrestoBlue

Se añadió PrestoBlue (A13261; Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) al sobrenadante de células (10)  $\mu$ l por pocillo y se incubó a 37°C durante 30 min y leer usando un lector de microELISA a 595 nm.

## 2.9. Ensayo de proliferación celular CyQuant

Se añadió CyQuant (C35011; Invitrogen) a las células  $\mu$ l por pocillo y se incubó a 37°C durante 60 min y leer usando un lector de microELISA a 535 nm.

## 2.10. transferencia Western

Los lisados de células completas se separaron utilizando un tampón de lisis que contenía beta-glicerofosfato, sacarosa, EDTA, EGTA, metavanadato de sodio, difosfato de sodio decahidratado y Triton, en geles de poliacrilamida al 12,5%, se transfirieron a PVDF y se analizaron mediante transferencias Western utilizando los anticuerpos DIO1. mencionado anteriormente . . . . La visualización se realizó como se describió anteriormente. [14] utilizando anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:10 000) seguido de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (kit ECL; Millipore, Merck, Darmstadt, Alemania). Se midieron las densidades ópticas integradas de las bandas (lector de imágenes Las3000), MULTI-INDICADOR software v3.0 y normalizado a la carga de proteínas.

## 2.11. proteómica

Para el proteoma total, las proteínas se sometieron a proteólisis y se digirieron con tripsina como se describió anteriormente. [14] . . . . Los péptidos tripticos se desalinizaron utilizando puntas C18, se secaron y se resuspendieron en ácido fórmico al 0,1%. Los péptidos se analizaron mediante cromatografía capilar de fase inversa acoplada a espectrometría de masas en tándem en línea (uLC-MS/MS). Los péptidos identificados se filtraron con alta confianza, rango superior, precisión de masa y un mínimo de dos péptidos. Los péptidos de alta confianza han superado el umbral de tasa de descubrimiento falso (FDR) del 1 % (falsos positivos estimados en una lista de péptidos). La semicuantificación se realizó calculando el área del pico de cada péptido. Las queratinas fueron filtradas ya que podrían ser una contaminación proveniente del polvo, el cabello y la piel. El análisis de enriquecimiento de proteínas y la clasificación según funciones moleculares, localizaciones celulares y clases se realizaron utilizando el Análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas (2010). PANTERA) herramienta [15]. . . . La red de interacción proteína-proteína se generó utilizando CADAENAV. 10,5 con configuración predeterminada (puntuación de interacción mínima requerida: confianza media 0,4); [dieciséis] . . . . Se utilizó la herramienta de visualización biónica (BionicVis) para generar proteomas que muestran la composición cuantitativa de los proteomas codificada por colores. [17]. . . .

## 2.12. Inmunohistoquímica (IHC)

Se cortaron secciones de cuatro micrones de bloques de tejido archivados fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPE) en el Departamento de Patología del Centro Médico Meir. Los tejidos se recolectaron entre enero de 2018 y febrero de 2019 mediante consentimiento informado por escrito, de conformidad con la aprobación de la Junta de Revisión Institucional del Centro Médico Meir (#0305-16-MMC), de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Diagnóstico HGSOE (grado

3-4) fue confirmado por un patólogo certificado basándose en las características clínicas y patológicas. Las tinciones IHC para DIO1, DIO3, p53, p16, pax8 y Ki67 se llevaron a cabo como se describió anteriormente.[14] utilizando los anticuerpos detallados en la Tabla T1, en una tinción automática Window Benchmark XT (Window, Tucson, Arizona, EE. UU.). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio equipado con una cámara Olympus modelo BX41 para portaobjetos IHC y modelo IX71 para cultivos celulares (Olympus, Tokio, Japón). El análisis se realizó con el software de imágenes CellSens Entry Olympus.

### 2.13. datos TCGA

El análisis de la expresión de DIO1 se realizó utilizando el trazador Kaplan-Meier.[18] y las herramientas ROC Plotter

[19]. . . .

### 2.14. Modelo de xenoinjerto HGSOc

Ratones desnudos atímicos hembra de nueve semanas de edad (norte =3, Envigo, Ness-Ziona, Israel) se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos y se alojaron en condiciones controladas (temperatura: 20–24.°C; humedad: 60–70%). Los ratones fueron alojados en una jaula en condiciones convencionales y alimentados con comida y agua ad libitum y se dejó aclimatar durante 1 semana antes de su uso según los protocolos del estudio. A los ratones se les inyectaron por vía subcutánea células ES-2 de control codificadas (1.9106 celdas cada una) en el flanco derecho. Veintiocho días después, se recogieron los tumores para preparaciones FFPE y se evaluaron para determinar la tinción de la proteína DIO1. El estudio se subcontrató (Almog Diagnostic LTD, Shoham, Israel) tras la aprobación del Comité Institucional de Cuidado de Animales (IACUC# 59-08-2018).

### 2.15. análisis estadístico

Los experimentos se realizaron al menos tres veces separadas por triplicado y se analizaron para determinar su significancia. ( $P < 0,000$ ).0.05) con Student's no emparejado prueba, prueba de Mann-Whitney o por ANOVA para comparaciones múltiples.

## 3. Resultados

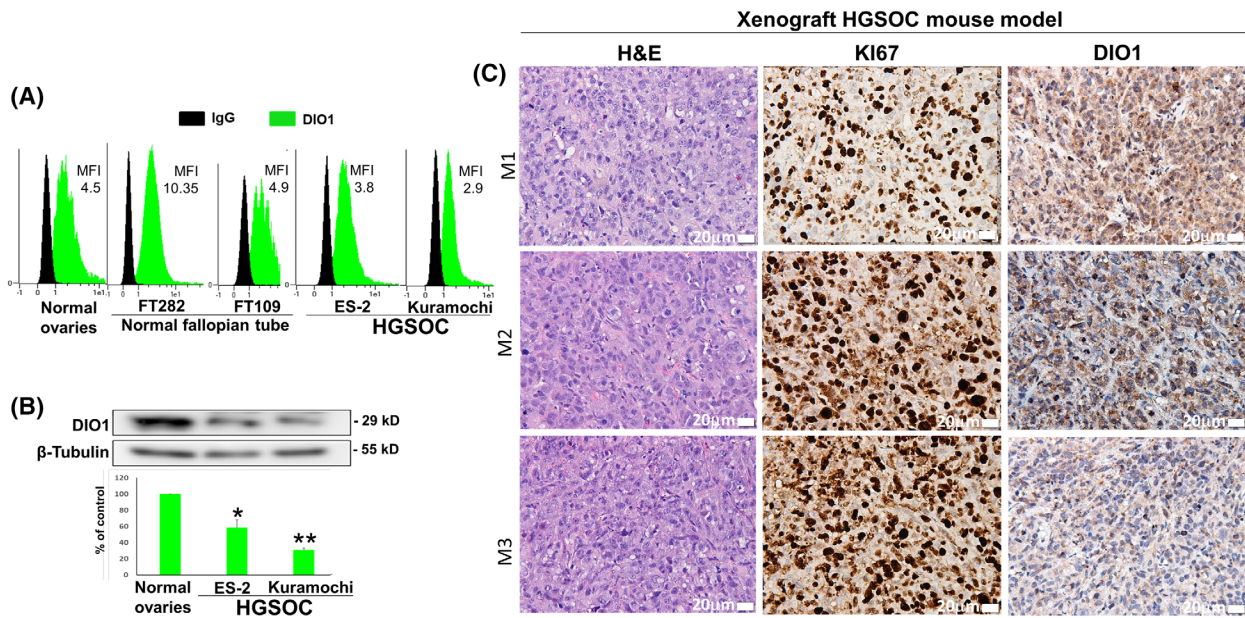
3.1. La expresión de DIO1 es menor en las células HGSOc en comparación con las células normales

Los niveles basales de DIO1 se analizaron en células HGSOc (ES-2 y Kuramochi).

se correlacionan con el perfil genómico de pacientes con cáncer de ovario[20,21]. . . . La expresión se comparó con la de células de ovario inmortalizadas normales (CHO-K1) y células de las trompas de Falopio (FT282 y FT109). El análisis de citometría de flujo (FC), utilizando el anticuerpo DIO1 marcado con AF-647, indicó que las células de cáncer de ovario expresaban niveles más bajos de proteína DIO1 en comparación con los modelos de células normales (Fig. 1).1A). La intensidad de fluorescencia media calculada (MFI) en relación con el control de isotipo (IgG) fue de 4,3 para CHO-K1, 10,35 para FT282, 4,9 para FT109 y 3,39 y 2,78 para ES-2 y Kuramochi, respectivamente. De manera similar, los niveles de proteína DIO1 mediante transferencias Western (WB) fueron más bajos en las células HGSOc (Fig. 2).1B). La especificidad del anticuerpo DIO1 se confirmó mediante varios enfoques (Fig. 2).T1). A continuación, queríamos evaluar si la expresión de DIO1 en las células HGSOc permanecería baja cuando se inocularan en ratones o podría verse afectada por el microambiente en vivo. Con ese fin, 9106 se inocularon células ES-2 por vía subcutánea (SC) en el flanco de ratones hembra desnudos (norte =3). De acuerdo con los datos de FC y WB, observamos al final del estudio (día 28) una tinción limitada con DIO1 IHC en los tumores extirpados (Fig. 1C). El control de isotipo se presenta en las Figs. S2A. . . .

3.2. DIO1 se correlaciona positivamente con una mejor supervivencia y se expresa diferencialmente en tumores HGSOc

Exploramos el valor pronóstico de DIO1 utilizando la base de datos Cancer Genome Atlas (TCGA) y la herramienta Kaplan-Meier Plotter. Resultados (Fig. 2A) indican que la alta expresión de ARN DIO1 se correlaciona con una mejor probabilidad de supervivencia general en pacientes con HGSOc (índice de riesgo, HR = 0,84.000). pag =0,011). Esta asociación fue altamente significativa tanto en los pacientes sometidos a tratamiento óptimo (HR = 0,74; pag =0,0049) o cirugía subóptima (HR = 0,63,000). pag =5.7e-05). De manera similar, en pacientes con HGSOc tratados con el estándar de atención de primera línea, carboplatino y taxol (Fig. 2B), la alta expresión de DIO1 se correlacionó con una supervivencia prolongada (HR = 0,8.000). pag =0,036) y más después de una cirugía citorrreductora óptima (HR = 0,59.000). pag =0,00032). Los análisis de la expresión de DIO1 en pacientes del subtipo seroso con cirugía citorrreductora óptima, después de completar la terapia, se realizaron utilizando la herramienta ROCplot (Fig. 2).2C), muestran además que los pacientes con respuesta patológica completa (respondedores) tenían una expresión de DIO1 significativamente mayor en comparación con los pacientes con enfermedad residual (no respondedores). Estos resultados sugieren un beneficio para los pacientes con HGSOc con alta expresión de DIO1 y apuntan hacia el papel de esta enzima como posible supresor de tumores en esta enfermedad.



Higo. 1. Niveles bajos de selenoenzima tipo I desyodasa (DIO1) en líneas celulares y xenoinjertos de cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSOc). Se analizaron células CHO-K1 (ovarios normales), FT282, FT109, ES-2 y Kuramochi para determinar DIO1 mediante (A) citometría de flujo y (B) transferencias Western. Se presenta un análisis representativo de tres repeticiones experimentales. b-Se utilizó tubulina para la carga de proteínas. Expresión promedio de la proteína DIO1

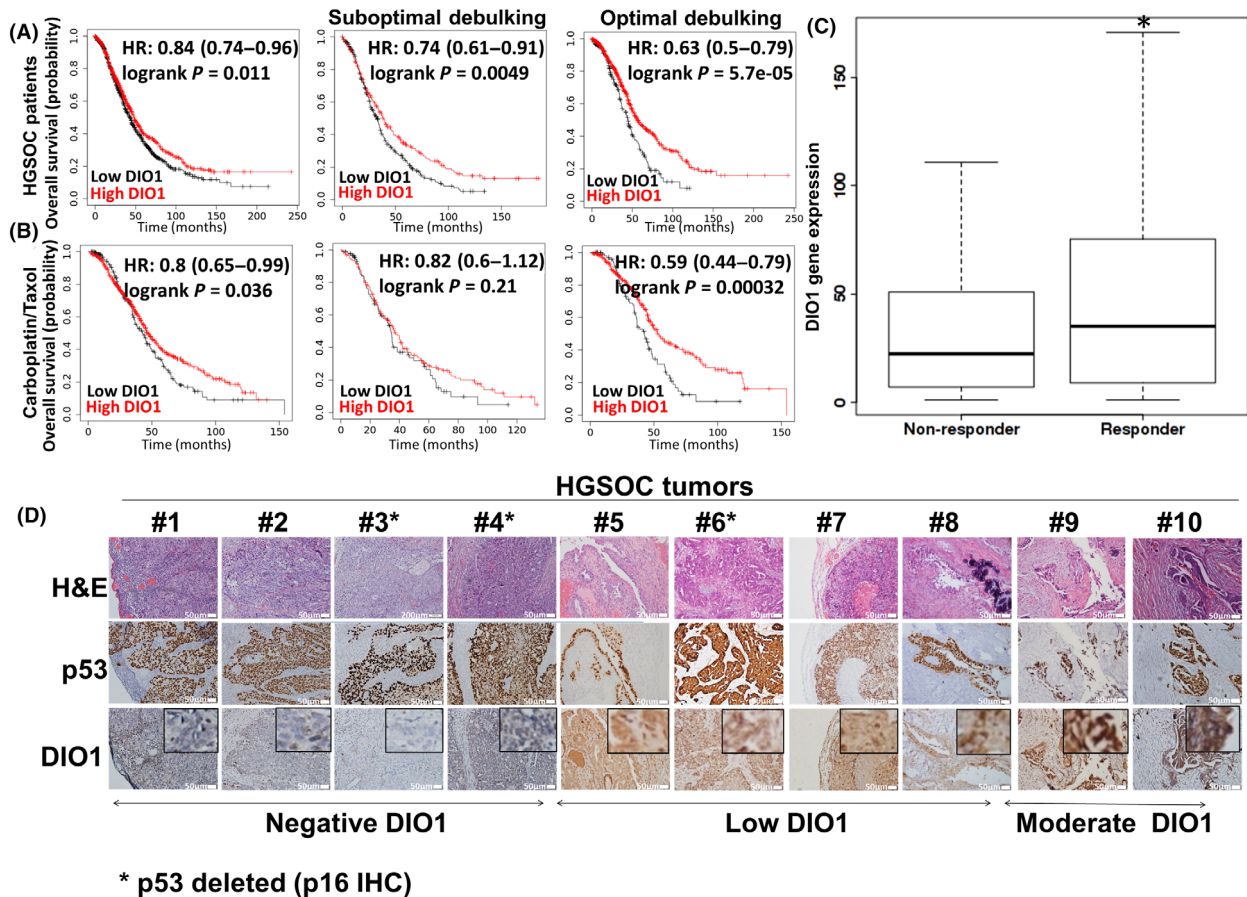
Se presenta SEM. \*PAG <0,05 y \*\*PAG <0,05 por ANOVA para comparaciones múltiples. (C) Tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y inmunohistoquímica (IHC) para DIO1 y KI67 en tumores fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPE) de tres ratones. barra de escala, yometro. El control de isotipo coincidente se presenta en las Figs. S2A. . . . 209objetivo, microscopía Olympus (Olympus, Tokio, Japón).

A continuación, exploramos la expresión de la proteína DIO1 en tejidos de sujetos humanos HGSOc. La edad en el momento del diagnóstico y la supervivencia del paciente se presentan en la tabla T2 . . . . Las secciones de tumores de 10 pacientes se sometieron a análisis IHC utilizando el anticuerpo DIO1. Se utilizaron tinciones con H&E y p53 o p16 para definir las regiones tumorales. Los resultados indican que la expresión de DIO1 varió entre pacientes, con cuatro casos que exhibieron tinción negativa, cuatro tinción baja y dos presentaron expresión moderada en regiones tumorales dispersas (Fig. 2). 2D). El control de isotipo se presenta en las Figs. S2B. . . . Estos resultados sugieren una expresión heterogénea de DIO1 en pacientes con HGSOc. No observamos una correlación entre la expresión de DIO1 y la supervivencia del paciente (pag =0,53), debido al pequeño tamaño del estudio. En particular, la cohorte de estudio mostró una expresión homogéneamente alta de DIO3, la enzima catabolizante de T3 (Fig. 2). T3). Para estudiar el patrón de expresión de DIO1 en tejidos normales, se recogieron ovarios y trompas de Falopio de un total de ocho pacientes no oncológicos (Fig. T4). La edad de los pacientes y el diagnóstico en el momento de la recolección de tejido se presentan en la Tabla T2. . . . Todos los portaobjetos de tejido se tiñeron en paralelo para H&E, p53, KI67 y pax8, un marcador de células secretoras de las trompas de Falopio. Resultados representativos (Fig. 2). 3A) mostraron tinción de fondo de DIO1 en ovarios normales, mientras que en la serosa de las trompas de Falopio normales, fue evidente una alta expresión de DIO1.

Estos resultados apuntan hacia un papel potencial de la enzima DIO1 en la fisiología de las trompas de Falopio. Por último, estábamos interesados en estudiar la expresión de DIO1 en las regiones premalignas de las trompas de Falopio (STIC), considerando el sitio de origen de la enfermedad. Las secciones STIC representativas, después de la tinción con H&E, p53, KI67 y pax8, mostraron una expresión moderada de DIO1 (Fig. 2). 3B). Este patrón siguió siendo el mismo en el tumor primario, así como en el sitio metastásico en el colon del mismo paciente. La expresión limitada de DIO1 a lo largo de la evolución de HGSOc, desde la lesión FT precursora temprana hasta los sitios del tumor primario y metastásico, implica fuertemente que la regulación negativa de la enzima puede facilitar la progresión de la enfermedad.

### 3.3. La expresión de DIO1 contribuye a la supresión de tumores de cáncer de ovario

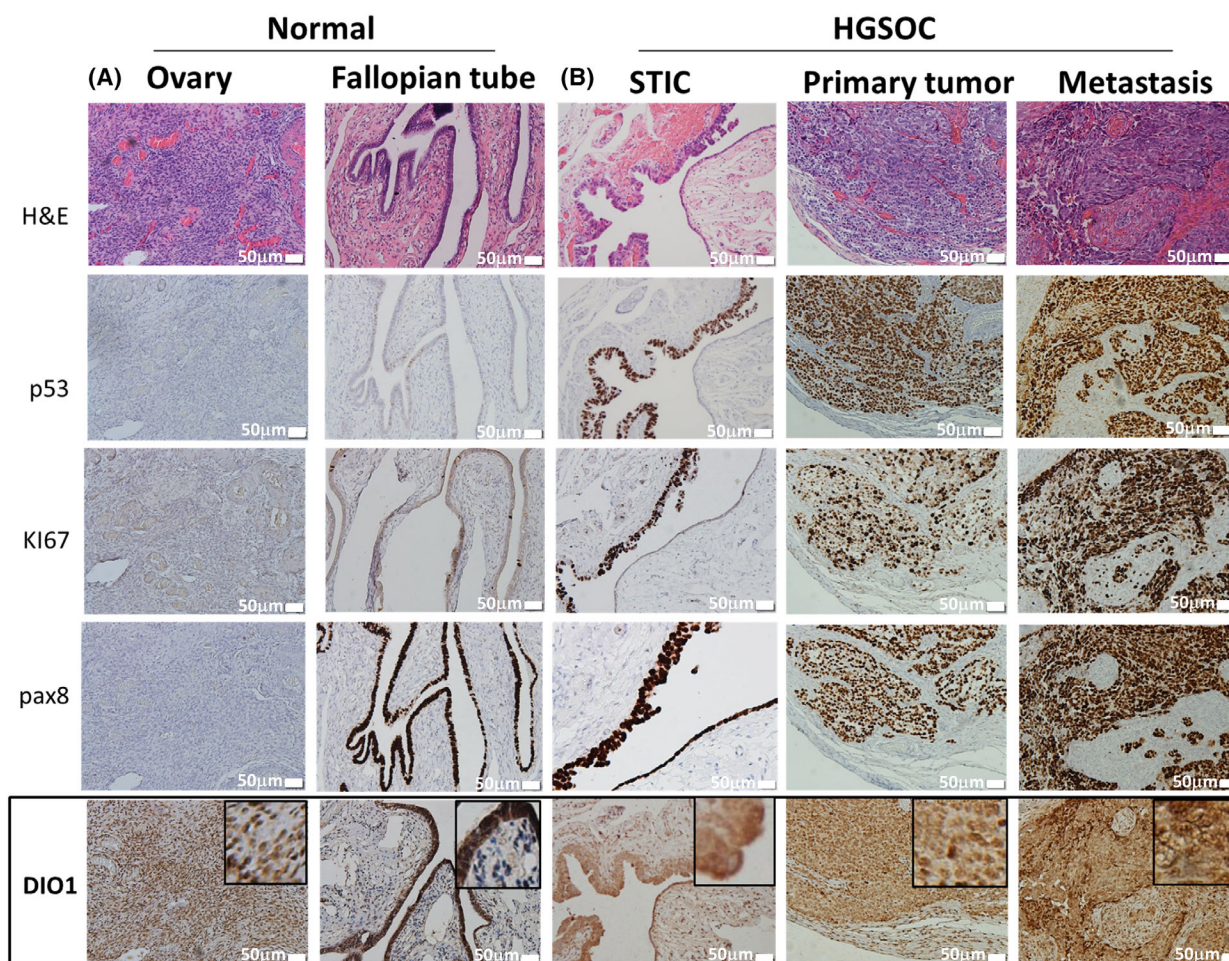
DIO1 disminuyó la expresión en el cáncer de ovario seroso de alto grado, ambos in vitro y en tejidos humanos, junto con indicaciones de que una alta expresión de ARN se correlaciona positivamente con la supervivencia del paciente, nos llevó a plantear la hipótesis de que la enzima puede funcionar como un supresor de tumores. Para validar esta suposición, mejoramos los niveles de proteína DIO1 utilizando un plásmido de expresión DIO1 (DIO1-PCDNA3). Se utilizó una línea celular HGSOc seleccionada (ES-2).



Higo. 2. La selenoenzima desyodasa tipo I (DIO1) se correlaciona con la supervivencia general en pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSOc). La expresión de DIO1 (alta versus baja) se analizó en (A) pacientes con HGSOc o (B) pacientes tratados con carboplatino/taxol, que se sometieron a una cirugía citorreductora óptima (sin tumor residual) o subóptima. Los datos se recuperaron del Atlas del genoma del cáncer (TCGA) utilizando la herramienta Kaplan-Meier Plotter (<http://kplot.com>). HR, índice de riesgo. (C) Diagramas de caja de la expresión de DIO1 en respondedores frente a controles. no respondedores, después de completar la terapia utilizando el trazador ROC (<https://rocplot.com/custom-data/index>). \*Pvalor < 0,05 según la prueba de Mann-Whitney. (D) Inmunohistoquímica (IHC) DIO1 de secciones fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) de tumores de ovario humano (pacientes 1 a 10). barra de escala, yometro. Se utilizaron tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y p53 para definir las regiones tumorales. Los casos con eliminación de p53 (marcados con un asterisco) se sometieron a tinción con p16. Para cada imagen, se muestra un recuadro ampliado de la expresión DIO1 en la esquina superior derecha. La tinción de fondo negativa también se confirmó utilizando un anticuerpo de control de isotipo coincidente (Fig. 1).52B). 109objetivo, microscopía Olympus (Olympus, Tokio, Japón).

Se transfectaron transitoriamente con el vector de expresión DIO1 o un vector vacío y se analizaron 3 días después de la transfección mediante varios métodos. Primero, se confirmó una inducción del 40% en los niveles de proteína DIO1 (Fig. 1).4A). Esta sobreexpresión de DIO1 resultó en una menor densidad celular (Fig. 2).4B) y una reducción del 35% en el recuento celular absoluto (Fig. 2).4C), en comparación con las células transfectadas de control. Paralelamente, la expresión ectópica de DIO1 condujo a una muerte celular apoptótica significativa, como lo muestra un histograma de anexina-PI de citometría de flujo representativo (Fig. 2).4D). La cuantificación de las poblaciones celulares muestra una reducción promedio del 20% en la supervivencia celular y una inducción del 65% en la muerte celular apoptótica (Fig. 2).4E). Estos resultados colectivos establecieron que DIO1 funciona para suprimir el crecimiento de células HGSOc.

Tras la observación de que la sobreexpresión de DIO1 conduce a una reducción en la proliferación celular HGSOc, estábamos interesados en estudiar si silenciar DIO1 daría como resultado un efecto opuesto. Generamos células ES-2 de eliminación de DIO1 (DIO1-KD) utilizando el plásmido de shRNA DIO1. El shRNA revuelto sirvió como control negativo. Utilizando la selección de puomicina, hemos generado células DIO1-KD ES-2 estables con una reducción del 80% (PAG < 0,005) en los niveles de ARNm de DIO1 (Fig. 2).5A). Se observó una densidad celular significativamente mayor en las células DIO1-KD en comparación con las células transfectadas con el control codificado (Fig. 2).5B). Aislamos dos clones DIO1-KD en los que se mostró una disminución significativa en los niveles de proteína DIO1 (Fig.5C)

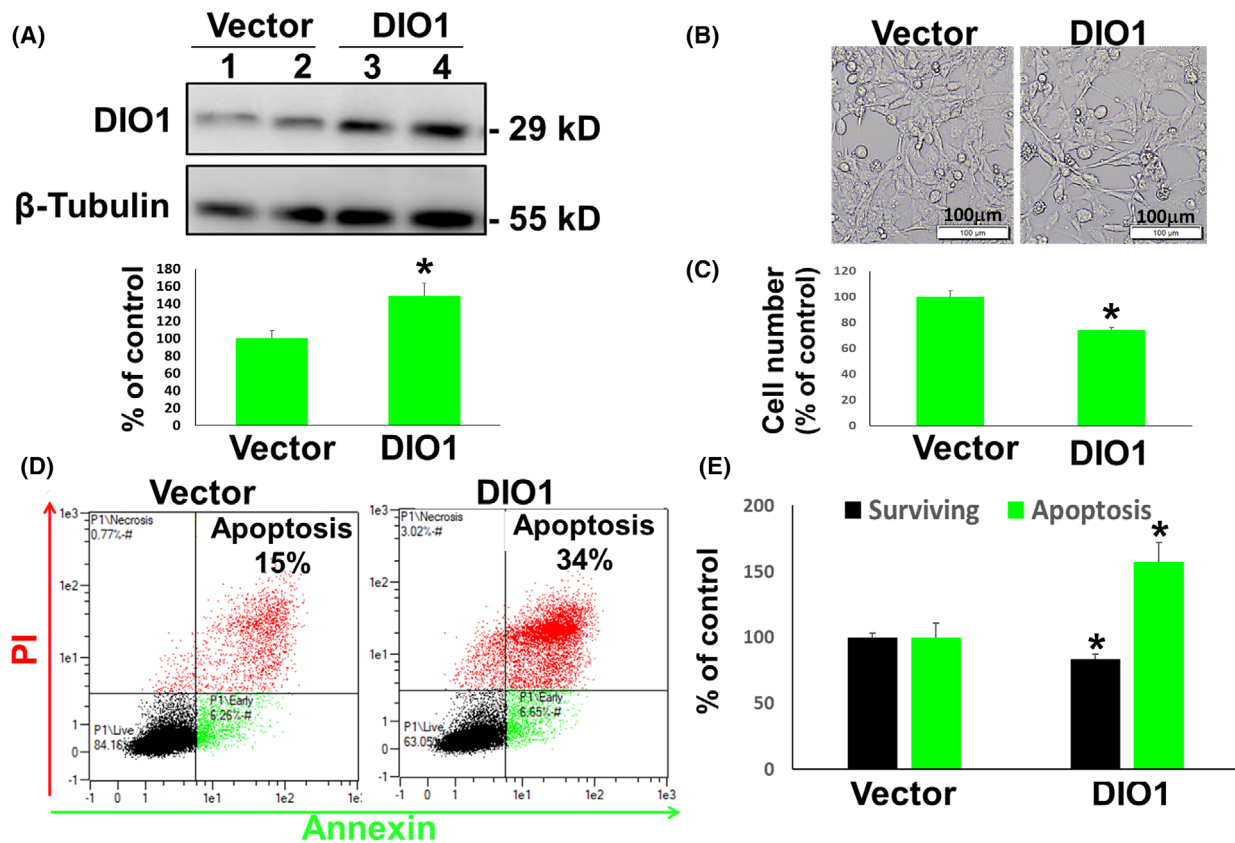


Higo. 3. Expresión de selenoenzima desyodasa tipo I (DIO1) en ovarios normales, trompas de Falopio y durante la evolución del cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSOC). Análisis de hematoxilina y eosina (H&E) e inmunohistoquímica (IHC) de p53, KI67, PAX8 y DIO1 en tejidos representativos fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPE) de (A) ovario y trompas de Falopio normales y (B) trompas serosas, en el lugar carcinoma (STIC), metástasis primaria y de colon de un paciente HGSOC representativo (paciente n.º 7). barra de escala, yómetro. 109objetivo, microscopía Olympus (Olympus, Tokio, Japón).

y documentó un aumento comparable en el número de células (Fig. 2).5D). La proliferación inducida estuvo acompañada por un aumento significativo en la quinasa relacionada con mitógenos, ERK fosforilada (pERK) y una reducción en el inhibidor del ciclo celular p21 (Fig. 2).5E). Paralelamente, se indujeron proteínas clave de la glucólisis, incluida la hexoquinasa 1 (HK1), la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la piruvato quinasa 2 (PKM2). Por otro lado, observamos una reducción en la subunidad alfa 1 de la piruvato deshidrogenasa E1 (PDHA1), la enzima gate-keeper que vincula la glucólisis con el ciclo del ácido cítrico, así como en el ATP5A, que forma parte de la enzima mitocondrial de fosforilación oxidativa. complejo (ATP5) que proporciona energía celular a través de la síntesis de ATP. Estos cambios metabólicos están relacionados con el fomento de la proliferación de células cancerosas a través de actividades aeróbicas.

glucólisis (efecto Warburg).[22]. . . Paralelamente, la regulación negativa de TRIP11, una proteína regulada por T3 que depende de esta hormona para su interacción con el receptor nuclear de la hormona tiroidea, proporcionó evidencia indirecta de que el silenciamiento de DIO1 obstaculizaba los niveles endógenos de T3.

Para comprender mejor los efectos globales de la expresión de DIO1 y el fenotipo celular en el cáncer de ovario después del silenciamiento de DIO1, realizamos un análisis proteómico. Con ese fin, se extrajeron proteínas de las células control y DIO1-KD ES-2 y se analizaron por duplicado mediante cromatografía capilar de fase reversa acoplada en línea a espectrometría de masas en tándem (uLC-MS/MS). De la lista completa de proteínas expresadas diferencialmente en las células DIO1-KD, establecimos un umbral de cambio de 1,25 veces con respecto a las células transfectadas de control. Este



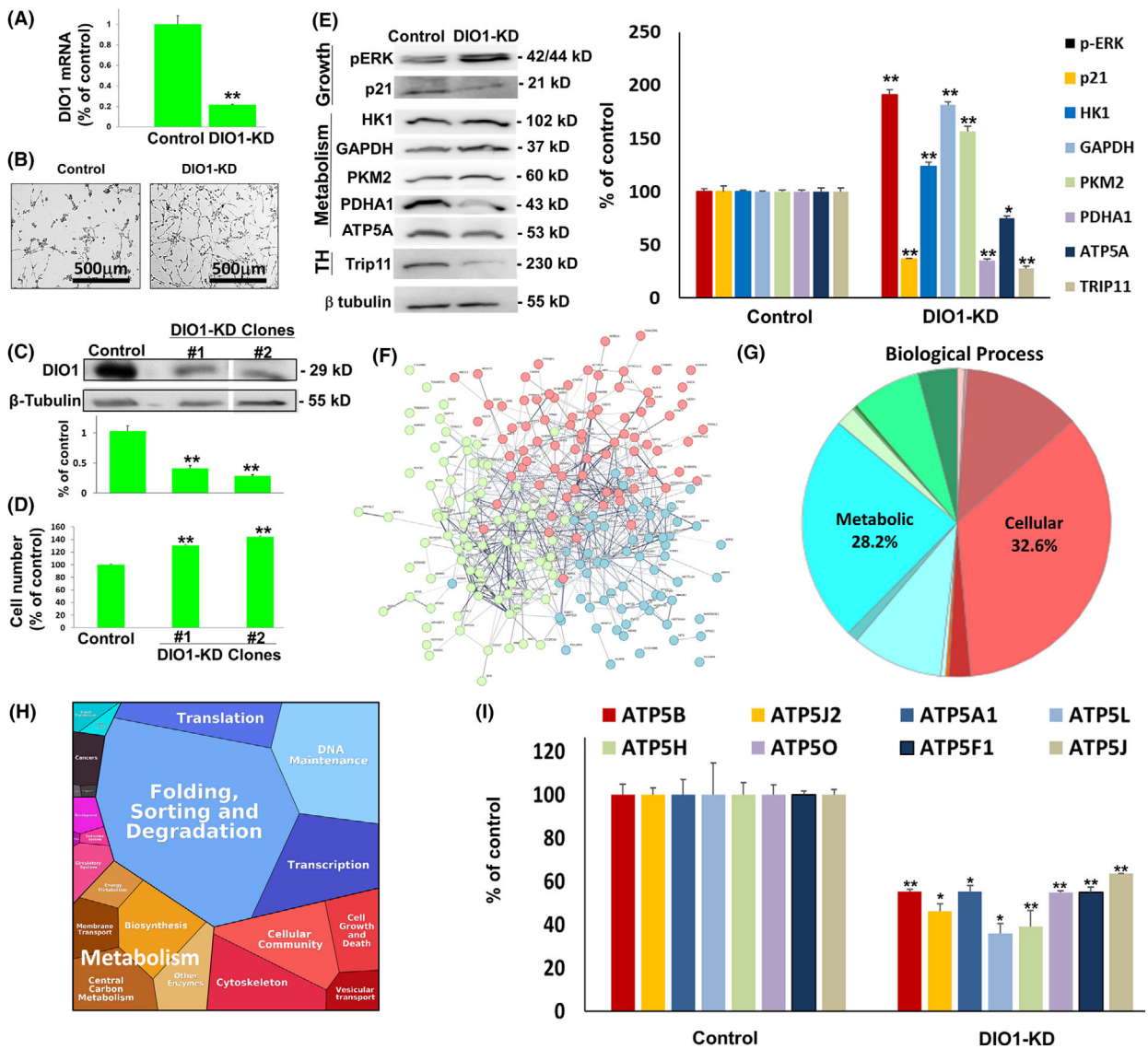
Higo. 4. La sobreexpresión de selenoenzima tipo I desyodasa (DIO1) inhibe la proliferación del cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSO). Las células ES-2 transfectadas transitoriamente con vectores de expresión PCDNA3 o DIO1-PCDNA3 vacíos se analizaron después de 3 días para (A) los niveles de proteína DIO1 en duplicados del control y los vectores de expresión DIO1 se muestran mediante transferencia Western (WB). b-Se utilizó tubulina para la carga de proteínas. El SEM de expresión promedio de la proteína DIO1 se muestra en el panel inferior. (B) Microscopía óptica (imágenes X10, barra de escala, 100,  $\mu$ m). Imágenes de microscopía de Olympus, utilizando el software de imágenes Cell<sup>^</sup>A. (C) Recuentos absolutos de células, FC. (D) Histogramas de anexina-PI, FC. (E) Cuantificación de la población de células supervivientes (Anexina-/PI-) y población de células apoptóticas (Anexina+/PI+). Los resultados (SEM promedio) se repitieron dos veces, por triplicado.

\* $P < 0.05$  usando el desparejamiento de Student prueba.

resultó en un total de 101 proteínas reguladas positivamente y 123 proteínas reguladas negativamente (Tabla 1). Red de interacción, generada mediante el *CADENA* herramienta (Fig. 5F), indicó un enriquecimiento  $PAG$ -valor  $< 1.0 \times 10^{-16}$ , lo que sugiere que las proteínas están conectadas biológicamente, como grupo. Análisis funcional utilizando *PANTERA* reveló que la reducción de la expresión de DIO1 afectaba a las proteínas implicadas en los procesos biológicos centrales (Fig. 2). 5G). Las principales vías afectadas estuvieron relacionadas con procesos celulares (32,6%), así como con procesos metabólicos (28,2%). De acuerdo con el *PANTERA* resultados, la herramienta de visualización biónica (*BionicVis*) (Fig. 5H) confirmó la alteración en una variedad de procesos biológicos, incluido el metabolismo. Dentro de esta función biológica específica, un grupo de ocho proteínas del complejo mitocondrial ATP5, incluido el ATP5A, fue confirmado mediante Western blot (Fig. 5E), se redujeron significativamente entre un 36% y un 61% después del silenciamiento de DIO1 (Fig. 2). 5yo). Esto, junto con una reducción del 31% en

Otra proteína ATP sintasa mitocondrial, USMG5, así como una erradicación completa del factor de ensamblaje 6 de la citocromo c oxidasa (COA6), que codifica un factor de ensamblaje para el complejo mitocondrial IV, sugieren un papel directo de DIO1 en la producción de energía mitocondrial. Además, observamos una regulación positiva del agotamiento de DIO1 en una serie de proteínas involucradas principalmente en la proliferación de células cancerosas. Estos incluyeron dos miembros de la familia de proteínas de anclaje de la A-quinasa (AKAP8 y AKAP12), el polipéptido 1 de la ADN primasa (PRIM1) y dos proteínas Cullin 4 (CUL4A y CUL4B), que se regularon positivamente después de DIO1-KD. Otro fundamento mecanicista para la inducción de la proliferación celular tras el silenciamiento de DIO1 es el aumento del 27% en otro miembro de la familia de las selenoproteínas, la tiorredoxina reductasa 1 (TrxR1, codificada en humanos por el gen TXNRD1). Esta proteína es una enzima clave para la protección contra el estrés oxidativo y también se informó que promueve el cáncer.





Higo. 5.El silenciamiento de la selenoenzima tipo I desyodasa (DIO1) induce la proliferación y altera la expresión de proteínas en el cáncer de ovario. Análisis del nivel de DIO1 en células ES-2 de control (KD) versus control para (A) transcripción de ARNm (RQ-PCR). (B) Microscopía óptica de 910 nm. Las células control y DIO1-KD se incubaron en placas de 24 pocillos durante 96 h (20). 910 imágenes de microscopía de Olympus, utilizando el software de imágenes Cell^A. Se analizaron clones aislados de células DIO1-KD versus células de control para determinar el nivel de proteína (C) DIO1 mediante transferencia Western. (D) Número de células, mediante citometría de flujo. (E) Niveles de pERK, p21, HK1, GAPDH, PKM2, PDHA1, ATP5A y Trip11 mediante transferencia Western. Se utilizó tubulina para la carga de proteínas. (F) Análisis proteómico de proteínas expresadas diferencialmente en cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSO) DIO1-KD. La red de interacción, dividida en tres grupos, utilizando Cytoscape 3.8.2 (https://cytoscape.org), con configuración predeterminada (puntuación de interacción mínima requerida: confianza media 0,4). (G) Gráfico circular usando PANTHER (http://pantherdb.org). Se muestran los procesos celulares y metabólicos. (H) Proteomapas utilizando la herramienta de visualización biónica (BionicsVis). (I) Análisis de expresión proteómica de una colección de subunidades del complejo ATP5 sintasa en células control y DIO1-KD. Los resultados (SEM promedio) se muestran como % del control. Los resultados se repitieron dos veces por triplicado. \*PAG <0,05.

\*\*\*PAG <0,005 por estudiante no emparejado prueba.

progresión en varios tipos de tumores, incluido HGSO [23]. . . . Estos cambios globales en las expresiones de proteínas tras el silenciamiento de DIO1 proporcionan una explicación mecanicista para el fenotipo proliferativo en las células de cáncer de ovario. Para un conjunto selecto de proteínas, incluidas CUL4 y TrxR1, el

Los resultados de la proteómica se validaron mediante transferencias Western (Fig. 2). T5.

Por último, queríamos establecer, mediante un enfoque adicional, que la inhibición de DIO1 contribuye a la progresión del tumor. Para ello utilizamos propiltiouracilo.

Tabla 1. Proteínas alteradas en el cáncer de ovario DIO1-KD.

Proteínas reguladas a la baja			Proteínas reguladas al alza		
Nombre	% de control	PDvalor	Nombre	% de control	PDvalor
COA6	- 100	0.000031	AKAP8	Único	0.000042
STX6	- 100	0.000158	PRIM1	Único	0.000102
FDFT1	- 100	0.000184	MRPS25	Único	0.000330
BCKDHB	- 100	0.000360	ZNF22	Único	0.000593
SUZ1	- 100	0.000660	CUL4A	Único	0.000650
OGFOD3	- 100	0.000769	HMG3	950	0.000693
ESTAT5B	- 100	0.000885	DAB2	126	0.000944
METTL14	- 100	0.000964	ACOX1	106	0.000995
ASAH1	- 100	0.001083	AKAP1	98	0.001009
PISTA3	- 100	0.001181	UACA	93	0.001039
GSTZ1	- 100	0.001208	GOSR2	89	0.001257
DLGAP4	- 100	0.001261	UBE2A	82	0.001343
RRAGC	- 100	0.001283	AGREGAR1	76	0.002215
PIH1D1	- 100	0.001298	CISD1	74	0.002891
MTIF2	- 100	0.001324	SERPINB2	72	0.002920
RIPK1	- 100	0.001525	GOPC	66	0.003091
RBBP9	- 100	0.001666	PRIM2	66	0.042453
EDC3	- 100	0.001981	ANO1	sesenta y cinco	0.003442
NTPCR	- 100	0.002060	ARHGAP2		0.003640
LDLR	- 100	0.002133	DYNLT1	61	0.003703
GNE	- 100	0.002177	LMNA	61	0.004057
CCDC88B	- 100	0.002201	CBX5	60	0.004707
DNM1	- 94	0.002215	ICE2	59	0.004853
MOCOS	- 86	0.002455	ACO1	58	0.005437
UBXN7	- 84	0.002720	MTMR2	57	0.005442
SCAMP1	- 76	0.003167	AASS	57	0.005709
LAMC1	- 68	0.003196	DPYSL3	57	0.005722
TMEM167A	- 64	0.003271	ELOVL5	56	0.005865
ATP5H	- 61	0.003347	PGM3	56	0.006833
FABP5	- 60	0.003497	CERDOS	53	0.006955
FKBP1A	- 59	0.004066	EIF1AX	52	0.007210
SALMÓN AHUMADO	- 58	0.004087	MSH6	51	0.007260
CHID1	- 58	0.004218	NUCB1	51	0.007364
CTSZ	- 56	0.004297	AGPS	51	0.007609
ITPA	- 56	0.004517	POLDIP3	49	0.007722
LRRC20	- 55	0.005037	PFDN1	48	0.008037
ATP5J2	- 54	0.005082	SLBP	47	0.008877
TGM2	- 54	0.005382	CLASP1	47	0.009058
RCN1	- 54	0.006116	TOP2B	46	0.009387
ADNP	- 52	0.006228	PQBP1	46	0.010255
CNDP2	- 51	0.006574	UBA1	45	0.010351
FAM162A	- 51	0.006691	FHOD1	44	0.010584
AIP	- 51	0.006781	PSMD10	44	0.010593
LMAN1	- 51	0.006873	PDCD6IP	43	0.010665
THOC1	- 50	0.006915	ETHE1	43	0.010929
C11orf68	- 49	0.007027	LOXL2	43	0.011197
POFUT1	- 48	0.007239	AARSD1	43	0.011728
RIOX2	- 48	0.007354	BZW1	43	0.011833
AMOTL2	- 48	0.007402	STAG2	43	0.011852
CSRP1	- 48	0.007955	HSPA1B	42	0.011914
WDR6	- 47	0.008191	AGFG1	42	0.012025
UNA PISCINA	- 47	0.008298	HSPA13	42	0.012112
NIT2	- 47	0.008337	CD99	41	0.012835

Tabla 1. (Continuado).

Proteínas reguladas a la baja			Proteínas reguladas al alza		
Nombre	% de control	PDvalor	Nombre	% de control	PDvalor
ENFERMERO	- 47	0.008576	PPFIBP1	40	0.012847
ARFIP2	- 46	0.008808	DYNC1LI1	40	0.013569
ATP5O	- 45	0.009201	HLA-A	40	0.013595
ATP5F1	- 45	0.009316	HLA-A	39	0.013606
ATP5B	- 45	0.009324	TUB	38	0.014768
ATP5A1	- 45	0.009649	MPDU1	38	0.014788
cerdo	- 43	0.010474	CLIP1	38	0.014789
ATOX1;	- 43	0.010475	TXN	38	0.015024
ATO					
VENDAVAL	- 42	0.010545	PSMB6	37	0.015139
PAPSS1	- 40	0.010929	LSM8	36	0.015280
GOLIM4	- 40	0.011239	CTSC	36	0.015357
HYOU1	- 40	0.011286	CUL4B	35	0.015417
DTD1	- 39	0.011323	MARCKSL1		0.016278
ARIH2	- 39	0.011366	PPP2R5D	34	0.016300
MGST3	- 39	0.011594	PURO	34	0.016447
COX17	- 38	0.011651	PPAN	34	0.016551
PKM	- 38	0.012138	TRIM25	34	0.016683
RHOG	- 38	0.012264	HIST1H1A	33	0.016791
RNH1	- 37	0.012474	LPCAT1	33	0.016827
GALNT2	- 37	0.012780	RBM42	33	0.016865
ATP5J	- 36	0.012797	COPS7A	32	0.017127
P4HA1	- 36	0.012917	THUMPD3	32	0.017623
MANF	- 36	0.013198	FAX	31	0.017971
CDV3	- 35	0.013344	RAB8A	31	0.018013
CTSD	- 35	0.013619	SH3KBP1	31	0.018493
SCD	- 35	0.013735	SLC25A6	31	0.018630
USP14	- 34	0.013782	S100A16	31	0.018693
NAT10	- 34	0.014353	VCL	31	0.019432
SND1	- 33	0.016384	NT5DC1	30	0.019575
HCLS1	- 33	0.017317	CYCS	29	0.019621
FLCN	- 33	0.017450	STAM2	29	0.019901
FEI2A	- 33	0.017467	GGCX	29	0.019941
APMAP	- 32	0.017614	ASMTL	29	0.020037
NUDCD1	- 32	0.017701	MTHFD1L	29	0.020651
CALAR	- 32	0.018336	MTCH1	29	0.021190
TPD52L2	- 32	0.018509	ARHGFE1	28	0.021572
GBE1	- 31	0.018861	MOB1A	28	0.021700
CCDC58	- 31	0.018963	FLNA	28	0.021894
POLR2H	- 31	0.019988	CAV1	27	0.021992
USMG5	- 31	0.020401	TRIR	27	0.022062
GMPS	- 31	0.021020	TXNRD1	27	0.022239
SEC61B	- 31	0.021450	COPS6	27	0.022396
TOR1AIP2	- 31	0.021526	UGDH	26	0.022490
SH3BGRL	- 30	0.021768	NF2	25	0.022618
CPNE1	- 30	0.022055	horario de verano	25	0.022622
ACTL6A	- 29	0.022140	ACTR3	25	0.022761
PLOD2	- 29	0.022349	9 DE SEPTIEMBRE	25	0.022860
VPS4B	- 29	0.022534	ILKAP	25	0.024563
PAK2	- 29	0.022698			
PSMD2	- 29	0.022717			
FAM49B	- 28	0.022824			
DCUN1D1	- 28	0.023256			

Tabla 1. (Continuado).

Proteínas reguladas a la baja			Proteínas reguladas al alza		
Nombre	% de control	PDvalor	Nombre	% de control	PDvalor
PAC3IN3	- 28	0.023318			
CORO1B	- 28	0.024100			
PODXL	- 28	0.024443			
PTPN23	- 27	0.024503			
HSP90B1	- 27	0.024606			
KTI1	- 27	0.024705			
LMAN2	- 27	0.024823			
GSTP1	- 27	0.025042			
MAGED2	- 26	0.025469			
IARS2	- 26	0.025625			
RRAS2	- 25	0.026020			
TOMM70	- 25	0.026092			
CSTF1	- 25	0.026103			
RAB7A	- 25	0.026460			
ARL6IP5	- 25	0.026560			
PPP1R14B	- 25	0.027171			
ACBD3	- 25	0.027590			
FKBP2	- 25	0.027901			

Única/proteína identificada exclusivamente en las células DIO1-KD.

(PTU), un inhibidor selectivo no competitivo de DIO1 bien establecido [24]. . . . Las células HGSOc, ES-2, se sembraron (1000 células/96 pocillos) y se trataron con concentraciones crecientes de PTU (10-250).yOMETRO, y analizado después de 4 días mediante una variedad de métodos complementarios. Los resultados de la microscopía mostraron un aumento en la densidad celular después de los tratamientos con PTU (Fig. 2).6A). Estos resultados fueron confirmados por un aumento significativo de 2,5 a 3 veces en la proliferación celular (Fig. 2).6B), acompañado de un aumento menor en la viabilidad celular, que alcanzó significación estadística sólo en yOMETROPTU (Fig.6C). Para establecer que el efecto de PTU sobre la proliferación celular estaba mediado por DIO1, combinamos los dos enfoques de inhibición de DIO1, el uso del inhibidor selectivo (PTU) con el silenciamiento de DIO1 (DIO1-KD). Tratamos células de control y ES-2 DIO1-KD con PTU (10).yOMETRO durante 96 h. Para comparación se utilizaron células de ovario normales (CHO-K1) y las células ES-2 parentales, ambas expresando la proteína DIO1 endógena. Cifra6D representa que en las células ES-2 transfectadas con shRNA de control, la adición de PTU indujo una densidad celular, comparable a los resultados obtenidos en las células ES-2 parentales y las células de ovario normales. Sin embargo, en las células DIO1-KD se evitó el efecto del PTU. Bajo las mismas configuraciones experimentales, se mostraron resultados comparables para la proliferación celular (Fig. 2).6E) y viabilidad celular (Fig. 2).6F). En conjunto, nuestros datos establecieron que la inhibición de DIO1 condujo a la inducción de la proliferación en células HGSOc, lo que sugiere que esta enzima funciona como una proteína antiproliferativa en estas células.

Este efecto está mediado directamente por DIO1, ya que PTU no mostró ningún efecto en ausencia de esta enzima.

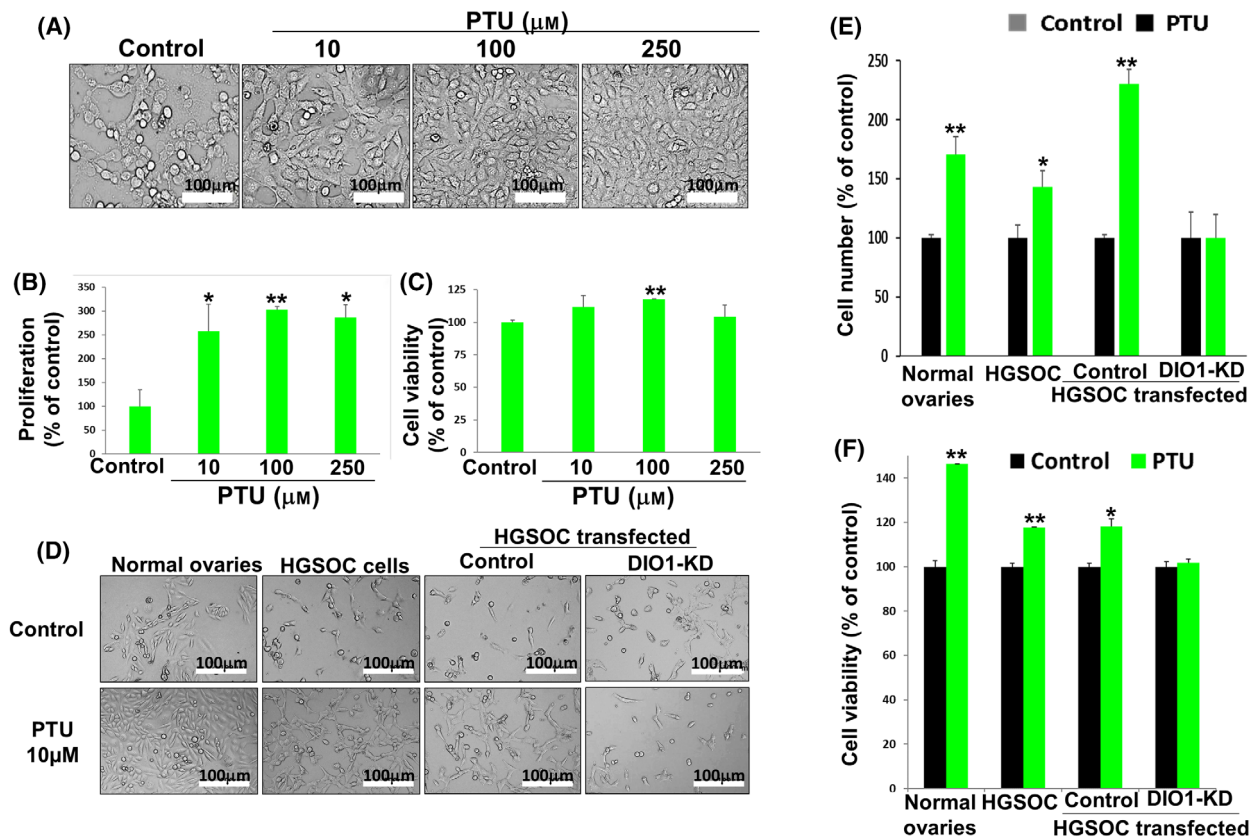
## 4. Discusión

En este trabajo, hemos establecido que la expresión de DIO1 está atenuada en células HGSOc en comparación con las células epiteliales normales. La expresión de la proteína DIO1 en tumores HGSOc humanos varió de negativa a moderada, lo que sugiere heterogeneidad entre los pacientes. Además, hemos demostrado que la expresión de DIO1 se mantiene a un nivel relativamente bajo, no solo en los sitios del tumor primario y metastásico sino también en las regiones de las trompas de Falopio premalignas. Estos resultados sugieren fuertemente que la expresión restringida de DIO1 puede ser un evento temprano en la evolución de HGSOc. Nuestra observación de que la expresión de DIO1 está alterada está respaldada por informes previos en diferentes tipos de cáncer, con una expresión reducida similar en el carcinoma papilar de tiroides.[25-29], adenoma de tiroides[30], cáncer de pulmón [31], cáncer de hígado[32,33]y carcinoma de células renales de células claras[34-38]. . . . Esta evidencia colectiva propone que la reducción de DIO1 en el cáncer puede ser un fenotipo común, lo que implica un papel mecanicista.

Para comprender mejor la posible función de DIO1 en HGSOc, diseñamos experimentos en los que se sobreexpresaba DIO1. Nuestros estudios indicaron que la inducción de DIO1 en células de cáncer de ovario atenúa la proliferación y el crecimiento tumoral. Estos resultados son comparables a los estudios realizados en carcinoma de células renales. [37,38]en el que, de manera similar a nuestros experimentos, se documentó la regulación negativa de la proliferación después de la expresión ectópica de DIO1. Se sugirió que estos resultados inhibidores de tumores en modelos de cáncer renal estaban mediados por la desyodación de T4 y la producción de T3, un potente regulador de la diferenciación celular.

Después de observar que DIO1 actúa para atenuar la proliferación de células de cáncer de ovario, junto con su expresión disminuida en HGSOc en comparación con las células normales, examinamos el resultado de reducir esta proteína mediante inhibición catalítica directa o silenciando la enzima DIO1. Nuestros resultados indican que ambos enfoques condujeron a la proliferación celular. Estos resultados están respaldados aún más por el análisis de datos de TCGA, que indicó que los pacientes con HGSOc con una baja expresión de ARNm de DIO1 exhibieron una supervivencia más corta en comparación con los pacientes con niveles altos de DIO1. Cabe señalar que, debido a la pequeña cohorte del estudio, no pudimos presentar una correlación similar a nivel de proteínas.

Los mecanismos moleculares responsables del fenotipo promotor del tumor después del silenciamiento de DIO1 se dilucidaron mediante cambios en las vías de señalización que regulan la proliferación celular, incluida una elevación significativa en



Higo. 6. La inhibición de la selenoenzima tipo I desyodasa (DIO1) promueve el crecimiento de células de cáncer de ovario. Se sembraron células ES-2 (1000 células/96 pocillos), se trataron con PTU en concentraciones crecientes y se analizaron después de 96 h para (A) densidad celular mediante microscopía óptica (910 imágenes, barra de escala, yometro). Imágenes de microscopía de Olympus, utilizando el software de imágenes Cell<sup>^</sup>A. (B) Proliferación celular (CyQUANT, ELISA). (C) Viabilidad celular (PrestoBlue, ELISA). A continuación, se trataron células de ovario normales (CHO-K1), células HGSOC (ES-2) y células ES-2 revueltas y DIO1-KD conyometroEl propiltiouracilo (PTU) se analizó mediante microscopía óptica (D). 910 imágenes, barra de escala, yometro). Imágenes de microscopía de Olympus, utilizando el software de imágenes Cell<sup>^</sup>A. (E) Recuentos absolutos de células (citometría de flujo). (F) Viabilidad celular (PrestoBlue, ELISA). Los resultados (SEM promedio) se repitieron dos veces por triplicado. \*PAG <0,05. \*\*PAG <0,005 usando ANOVA.

pERK y su reducción en el inhibidor del ciclo celular p21. De acuerdo con la proliferación inducida, hubo un aumento en dos miembros de la familia AKAP.[39,40] y dos proteínas CUL4[41,42], se informó que promueve la progresión de varios tumores, incluido el de ovario. Además, PRIM1 estaba completamente ausente en nuestras células transfectadas de control y estaba regulado positivamente después de DIO1-KD. Esta proteína se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de ovario altamente agresivas[43] y está directamente involucrado con la proliferación celular en los cánceres de mama y colon. [44,45]. . . Curiosamente, se demostró que PRIM1, en un modelo de desarrollo cerebral, es un gen reprimido que responde a la hormona tiroidea.[46], lo que proporciona una indicación indirecta de niveles agotados de T3 después del silenciamiento de DIO1.

La reducción de DIO1 provocó un aumento de HK1, GAPDH y PKM2, lo que indica un cambio metabólico hacia la glucólisis, también conocido como efecto Warburg. [22]. . . De manera similar, TrxR1, una enzima que es esencial

Para la homeostasis redox y es un importante regulador de la glucólisis.[47], fue inducido tras el silenciamiento de DIO1. TrxR1 se sobreexpresa en una variedad de tipos de cáncer y se considera un objetivo terapéutico en el cáncer de ovario.[23]. . . En particular, al igual que DIO1, TrxR1 también es miembro de la familia de las selenoproteínas. Paralelamente, se atenuó un grupo de ocho subunidades de ATP5. Tal regulación negativa indica una atenuación en la actividad de la cadena de electrones mitocondrial, lo que resulta en una reducción de la fosforilación oxidativa.[48] y se relacionó con la progresión tumoral en varios tumores[49-53]. . . Se documentó una reducción similar en PDHA1, un componente crítico del complejo de piruvato deshidrogenasa y un paso limitante de la velocidad en la transformación del piruvato en acetil-CoA y la entrada en el ciclo del TCA para producir ATP mediante fosforilación oxidativa. En el cáncer, PDHA1 se considera un factor central que regula el cambio metabólico de la fosforilación oxidativa a la glucólisis aeróbica.

Se ha demostrado que la inhibición de PDHA1 disminuye el OXPPOS mitocondrial y promueve la glucólisis aeróbica tumoral en las células tumorales, mientras que se informó un efecto opuesto con la sobreexpresión de PDHA1.[54,55] . . . Estos cambios metabólicos colectivos observados en nuestras células DIO1-KD se correlacionan con una mayor proliferación y resaltan que la ausencia de la enzima DIO1 produce un entorno que atenúa la fosforilación oxidativa e intensifica el efecto Warburg.

La hormona tiroidea T3, biológicamente activa, es un factor de transcripción y un importante regulador endocrino de la tasa metabólica, con un profundo impacto en la producción de ATP mitocondrial.[56]. . . De hecho, se informó que varias de las subunidades de ATP5 que se redujeron en nuestro estudio estaban directamente reguladas positivamente por T3 en los contextos oncológicos y no oncológicos.[57–59]. . . Otro gen objetivo de T3 que pertenece al miembro de la familia ATP5 y que se redujo en nuestro estudio actual es el USMG5, una ATP sintasa mitocondrial.[60]. . . Por último, tanto TRIP11[61]y PKM2[62]También se sabe que están regulados por T3. Estos resultados sugieren que los cambios observados en las células agotadas en DIO1 pueden deberse a una reducción de la T3 intracelular. El apoyo a esta idea proviene del trabajo de nuestro grupo sobre otro miembro de la familia de la desyodasa, la DIO3, que cataboliza la T3. La reducción de DIO3 resultó en una regulación positiva del mismo conjunto de proteínas ATP5[14], paralelo a la inhibición de la proliferación[14,63]. . . Además, DIO3-KD provocó una reducción de pERK y PKM2 y una elevación de TRIP11. El hecho de que el silenciamiento de DIO1 y DIO3 condujera a resultados opuestos tanto en la proliferación celular como en el mismo conjunto de proteínas, algunas de las cuales dirigen genes objetivo de T3, sugiere que estos efectos pueden estar mediados por la regulación diferencial de los niveles intracelulares de hormona tiroidea. Sin embargo, esta suposición debería corroborarse mediante experimentos adicionales.

## 5. Conclusiones

En resumen, demostramos la primera indicación en el cáncer de ovario de que DIO1 es un factor antitumoral en el proceso cancerígeno, lo que sugiere que la reducción de su expresión, observada consistentemente en varias líneas celulares HGSOc y tejidos humanos, puede promover la tumorigénesis en esta agresiva enfermedad.

## Agradecimientos

El trabajo de Adi Alfandari se realizó en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener una maestría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Tel Aviv, Israel. Esta investigación fue financiada parcialmente por la subvención de Investigación Dotan, Centro de Investigación de Biología del Cáncer (CBRC), Universidad de Tel-Aviv, Israel.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Contribuciones de autor

AA y DM realizaron los experimentos basados en células. AW, AK y DK ayudaron en los ensayos y análisis de IHC. MB, DJ, AUA, YH, YY y OW recogieron los tejidos de los pacientes. ME y GI revisaron y analizaron el manuscrito. OA-F diseñó, analizó e interpretó los datos experimentales y escribió el manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito.

## Accesibilidad de datos

Los conjuntos de datos proteómicos completos estarán disponibles a través del autor correspondiente previa solicitud razonable.

## Referencias

- 1 Happy S, Gourley C, Vergot YO, Tú SOY. Epitelial cáncer de ovarios. *La Lanceta*.2019;393:1240–53.
- 2 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cáncer Estadísticas, CA Cáncer J Clin.2021;71:7–33.
- 3 Bowtell DD. La génesis y evolución del alto grado. Cáncer de ovario seroso. *Cáncer Nat Rev*.2010;10:803–8. <https://doi.org/10.1038/nrc2946>
- 4 Perets R, Drapkin R. Es totalmente tubular. . . . Montando el nueva ola de investigación sobre el cáncer de ovario. *Res. Cáncer*. 2016;76:10–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1382>
- 5 Luongo C, Dentice M, Salvatore D. Deyodinasas y su intrincado papel en la homeostasis de la hormona tiroidea. *Nat Rev Endocrinol*.2019;15:479–88. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0218-2>
- 6 Steegborn C, Schweizer U. Estructura y mecanismo de Yodotironina desyodasas: lo que sabemos, lo que no sabemos y lo que sería bueno saber. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.2020;128:375–8.
- 7 Bianco AC, Kim BW. Desyodasas: implicaciones de la Control local de la acción de la hormona tiroidea. *J Clin invertir*. 2006;116:2571–9.
- 8 Cicatiello AG, DiGirolamo D, Dentice M. Metabólico Efectos de la regulación intracelular de la hormona tiroidea: viejos actores, nuevos conceptos. *Endocrinol frontal*. 2018;9: 474.
- 9 Goemann IM, Marczyk VR, Romitti M, Wajner SM, Maia AL. Conceptos y desafíos actuales para desentrañar el papel de las yodotironina desyodasas en las neoplasias humanas. *Cáncer endocrrelacionado*.2018;25:R625–45.
- 10 van der Spek AH, Fliers E, Boelen A. El clásico Vías del metabolismo de la hormona tiroidea. *Endocrinol de células mol*.2017;458:29–38.

- 11 Goemann IM, Romitti M, Meyer ELS, Wajner SM, Maia AL. Papel de las hormonas tiroideas en el proceso neoplásico: una visión general. *Cáncer endocrrelacionado*.2017;24: R367–85.
- 12 Nappi A, De Stefano MA, Dentice M, Salvatore D. Desyodasas y cáncer. *Endocrinología*.2021;162: bqab0
- 13 Piekielec-Witkowska A, Nauman A. Yodotironina Desyodasas y cáncer. *J Endocrinol invertir*. 2011;34:716–28.
- 14 Moskovich D, Alfandari A, Finkelshtein Y, Weisz A, Katzav A, Kidron D, et al. DIO3, la enzima inactivadora de la hormona tiroidea, promueve la tumorigénesis y la reprogramación metabólica en el cáncer de ovario seroso de alto grado. *Cáncer Lett*.2021;501:224–33.
- 15 Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, et al. PANTHER versión 11: datos de anotación ampliados de ontología genética y vías de Reactome, y mejoras en las herramientas de análisis de datos. *Ácidos nucleicos res*. 2016;45:D183–9.
- 16 Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, 2005. Simonovic M, et al. La base de datos STRING en 2017: redes de asociación proteína-proteína con control de calidad, ampliamente accesibles. *Ácidos nucleicos res*.2016;45: D362–8.
- 17 Liebermeister W, Noor E, Flamholz A, Davidi D., Bernhardt J, Milo R. Explicación visual de la inversión de proteínas en las funciones celulares. *Proc Natl Acad Sci EE.UU*. A.2014;111:8488–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314810111>
- 18 Gyorffy B, L-anczky A, Sz-all-asi Z. Implementación de una herramienta en línea para la validación de todo el genoma de biomarcadores asociados a la supervivencia en cáncer de ovario utilizando datos de microarrays de 1287 pacientes. *Cáncer endocrrelacionado*.2012;19:197–208. 19 Fekete JT, Gyorffy B. ROCplot.org: Validación Biomarcadores predictivos de quimioterapia/terapia hormonal/terapia anti-HER2 utilizando datos transcriptómicos de 3.104 pacientes con cáncer de mama. *Int J Cáncer*. 2019; 145:3140–51.
- 20 Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, Hoogstraat M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, et al. Panel de líneas celulares de cáncer de ovario (OCCP): importancia clínica de los subtipos morfológicos in vitro. *Más uno*.2014;9: e103988. 21 Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluación de líneas celulares como modelos tumorales mediante comparación de perfiles genómicos. *Comuna Nacional*.2013;4:2126.
- 22 VanderHeiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Comprender el efecto Warburg: los requisitos metabólicos de la proliferación celular. *Ciencia*. 2009; 324:1029–33.
- 23 Raninga PV, He Y, Datta KK, Lu X, Maheshwari UR, Venkat P, et al. La inhibición combinada de tiorredoxina reductasa y glutaminasa ejerce una actividad antitumoral sinérgica en ovarios serosos de alto grado con MYC carcinoma. *Mol Ther*.2023;31:729–43. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.12.011>
- 24 Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Yodotironina tipo I la deydasa es una enzima que contiene selenocisteína. *Naturaleza*.1991;349:438–40. <https://doi.org/10.1038/349438a0>
- 25 Ambroziak M, Pachucki J, Stachlewska-Nasfeter E, 25. Nauman J, Nauman A. Expresión alterada de la yodotironina desyodasa tipo 1 y tipo 2, así como de los genes del factor de transcripción titf1/nkx2-1 y pax-8 en el cáncer papilar de tiroides. *Tiroides*.2005;15:1137–46. 26 Ángela De Stephen M, Porcelli T, Schlumberger M, Salvatore D. Desyodasas en la tumorigénesis de tiroides. *Cáncer endocrrelacionado*.2023;30:e230015. <https://doi.org/10.1530/erc-23-0015>
- 27 Arnaldi L, Borra R, Maciel R, Cerutti J. Gene Los perfiles de expresión revelaron que DCN, DIO1 y DIO2 están subexpresados en tumores de tiroides benignos y malignos. *Tiroides*.2005;15:210–21.
- 28 de Souza Meyer EL, Dora JM, Wagner MS, Maia AL. La disminución de la expresión de yodotironina desyodasa tipo 1 puede ser un evento temprano y discreto en la desdiferenciación de las células tiroideas hacia el carcinoma papilar. *Endocrinol Clin (Oxf)*.2005;62:672–8.
- 29 Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, et al. La expresión genética en el carcinoma papilar de tiroides revela perfiles muy consistentes. *Proc Natl Acad Sci EE.UU*. A.2001;98:15044–9. 30 Brtko J, Bobalova J, Podoba J, Schmutzler C, Ko ěhrle J. Receptores de hormona tiroidea y yodotironina tipo I 50 -Actividad desyodasa de adenomas tóxicos de tiroides humana y nódulos fríos benignos. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002;110:166–70.
- 31 Wawrzynska L, Sakowicz A, Rudzinski P, Langfort R., Kurzyna M. La conversión de tiroxina en triyodotironina en el pulmón: comparación de la actividad de la yodotironina 5'deyodasa tipo I en el cáncer de pulmón con los tejidos pulmonares periféricos. *Monaldi arco pecho dis*. 2003;59:140–5.
- 32 Ridruejo E, Rosemary Caimi G, Miret N, Obrego - n MJ, Randi A, Deza Z, et al. TGF-b1 media la proliferación celular y el desarrollo de la hepatocarcinogénesis al regular negativamente la expresión de la desyodasa 1. *Medicina (B Aires)*.2021;81:346–58.
- 33 Sabatino L, Iervasi G, Ferrazzi P, Francesconi D., Chopra IJ. Un estudio de yodotironina.0- Actividades de la monodesyodasa en tejidos normales y patológicos del hombre y su comparación con las actividades en tejidos de rata. *Ciencias de la vida*.2000;68:191–202. 34 Maestro A, tú - jcicka A, Piekieko-Witkowska A, Bogusawska J, Popawski P, Tan - esquí Z, et al. Las regiones no traducidas del ARNm del receptor beta 1 de la hormona tiroidea están alteradas en el carcinoma de células renales de células claras humanos. *Biochim Biophys Acta*.2010;1802: 995-1005.

- 35 Pachucki J, Ambroziak M, Tanski Z, Luczak J, Nauman J, Nauman A. Tipo IoLa actividad de la yodotironina desyodasa y el ARNm están notablemente reducidos en el carcinoma renal de células claras. *J Endocrinol invertir.* 2001;24: 253–61.
- 36 Piekielko-Witkowska A, Maestro A, Wojcicka A, Boguslawska J, Brozda I, Tanski Z, et al. Expresión alterada de variantes de empalme de yodotironina desyodasa tipo 1 en cáncer renal humano. *Tiroides.* 2009;19:1105–13.
- 37 Poplawski P, Rybicka B, Boguslawska J, Rodzik K, Visser TJ, Nauman A, et al. La inducción de la expresión de yodotironina desyodasa tipo 1 inhibe la proliferación y migración de células cancerosas renales. *Endocrinol de células mol.* 2017;442:58–67.
- 38 Poplawski P, Wi-sniowski JR, Rijntjes E, Richards K, Rybicka B, El €hrle J, et al. Restauración de tipo La expresión de yodotironina desyodasa en células de cáncer renal regula negativamente las oncoproteínas y afecta las vías metabólicas clave, así como el sistema antioxidante. *Más uno.* 2017;12:e0190179.
- 39 McKenzie AJ, Campbell SL, Howe AK. Proteína quinasa Se requiere actividad y anclaje para la migración e invasión de células de cáncer de ovario. *Más uno.* 2011;6:e26552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026552>
- 40 Reggi E, Diviani D. El papel del anclaje de la A-quinasa proteínas en el desarrollo del cáncer. *Señal celular.* 2017;40:143–55. <https://doi.org/10.1016/j.cellscience.2017.09.011>
- 41 Duan PJ, Zhao JH, Xie LL. Cul4B promueve la progresión del cáncer de ovario mediante la regulación positiva la expresión de CDK2 y CyclinD1. *J Res. Ovárica.* 2020;13: 76. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00677-w>
- 42 Hu X, Meng Y, Xu L, Qiu L, Wei M, Su D, et al. Cul4 La ubiquitina ligasa E3 regula la resistencia a los medicamentos contra el cáncer de ovario al atacar la proteína antiapoptótica BIRC3. *Enfermedad por muerte celular.* 2019;10:104. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1200-y>
- 43 Du F, Li Y, Zhang W, Kale SP, McFerrin H, Davenport I, et al. Las líneas celulares de cáncer de ovario altamente y moderadamente agresivas exhiben una expresión genética diferencial. *Biol tumoral.* 2016;37:11147–62. 44 Job A, Schmitt LM, von Wenserski L, Lankat-. Buttgerit B, Gress TM, Buchholz M, et al. La inactivación de la función PRIM1 sensibiliza las células cancerosas a los inhibidores de ATR y CHK1. *Neoplasma.* 2018;20:1135–43.
- 45 Lee WH, Chen LC, Lee CJ, Huang CC, Ho YS, Yang PS, et al. El polipéptido 1 de la ADN primasa (PRIM1) participa en la formación de cáncer de mama inducido por estrógenos mediante la activación del punto de control del ciclo celular G2/M. *Int J Cáncer.* 2018;144:615–30.
- 46 Huggins P, Johnson C, Schoergendorfer A, Putta S., Bathke A, Stromberg A, et al. Identificación de la capacidad de respuesta de la hormona tiroidea expresada diferencialmente. Genes del cerebro del ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2012;155:128–35.
- 47 Karunanithi S, Liu R, Hou Y, González G, Oldford N, 2005. Roe AJ, et al. La tioredoxina reductasa es un importante regulador del metabolismo en las células leucémicas. *Oncogén.* 2021;40:5236–46. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01924-0>
- 48 Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ. ATP sintasa mitocondrial: arquitectura, función y patología. *J Heredó Metab Dis.* 2012;35:211–25. 49 bru €ggemann M, Gromes A, Poss M, Schmidt D, Kuper N, Tolkach Y, et al. Análisis sistemático de la expresión de las subunidades de la ATP sintasa mitocondrial (complejo V) en el carcinoma de células renales de células claras. *Transl Oncol.* 2017;10:661–8.
- 50 Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS, et al. Regulación negativa de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial en células de cáncer de colon humano con resistencia inducida al 5-fluorouracilo. *Res. Cáncer.* 2005;sesenta y cinco:3162–70.
- 51 Song KH, Kim JH, Lee YH, Bae HC, Lee HJ, Woo SR, et al. La reprogramación mitocondrial a través de la pérdida de ATP5H promueve la resistencia a la terapia multimodal contra el cáncer. *J Clin invertir.* 2018;128:4098–114.
- 52 Sotgia F, Lisantí MP. Biomarcadores mitocondriales predecir la progresión tumoral y la mala supervivencia general en los cánceres gástricos: diagnóstico complementario para la medicina personalizada. *Oncoobjetivo.* 2017;8:67117–28.
- 53 Zhu H, Chen L, Zhou W, Huang Z, Hu J, Dai S, et al. La sobreexpresión del gen ATP5J se correlaciona con la migración celular y la sensibilidad al 5-fluorouracilo en el cáncer colorrectal. *Más uno.* 2013;8:e76846.
- 54 Dupuy F, Tabari-es S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, et al. La reprogramación metabólica dependiente de PDK1 dicta el potencial metastásico en el cáncer de mama. *Metabolismo celular.* 2015;22:577–89. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.007>
- 55 Sun J, Li J, Guo Z, Sun L, John C, Zhou Y, et al. Sobreexpresión de piruvato deshidrogenasa E1aLa subunidad inhibe el efecto Warburg e induce la apoptosis celular a través de una vía mediada por mitocondrias. *carcinoma hepatocelular.* *Res. Oncol.* 2019;27:407–14. <https://doi.org/10.3727/096504018x15180451872087> [ PubMed ] 56 Harper ME, Seifert EL. Efectos de la hormona tiroidea sobre energética mitocondrial. *Tiroides.* 2008;18:145–56.
- 57 Ashkar FA, Revay T, Rho N, Madan P, Dufort I, Robert C, y otros. Las hormonas tiroideas alteran el transcriptoma de blastocistos bovinos producidos in vitro. *El cigoto.* 2016;24:266–76.
- 58 Chatonnet F, Flamingo F, Morte B. Un temporal Compendio de genes diana de la hormona tiroidea en el cerebro. *Biochim Biophys Acta.* 2015;122–9.
- 59 Rosen MD, Chan IH, Privalsky ML. tiroides mutante Receptores hormonales (TR) aislados de distintos tipos de cáncer.

tipos que muestran distintas especificidades de genes diana: un repertorio regulador único asociado con dos carcinomas renales de células claras. *Mol Endocrinol*.2011;25:1311–25. 60 Gil-Ib-an  
~ez P, Bernal J, Morte B. Regulación de la expresión génica de la hormona tiroidea en células cerebrocorticales primarias: papel de los subtipos de receptores de la hormona tiroidea e interacciones con el ácido retinoico y los glucocorticoides. *Más uno*.2014;9:e91692.

61 Bianco AC, Dumitrescu A, Gereben B, Ribeiro MO, 1999; Fonseca TL, Fernandes GW, et al. Paradigmas de control dinámico de la señalización de la hormona tiroidea. *Rev. Endocr*.2019;40:1000–47. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00275>

62 Cheng S, Leonard J, Davis P. Aspectos moleculares de Acciones de la hormona tiroidea. *Rev. Endocr*.2010;31:139–70.

63 Moskovich D, Finkelshtein Y, Alfandari A, Rosemary A, Lifschytz T, Weisz A, et al. Apuntar eficazmente a la enzima DIO3 utilizando inhibidores de primera clase

suprime el crecimiento tumoral: un nuevo paradigma en el tratamiento del cáncer de ovario. *Oncogén*.2021;40:1–10.

## Información de soporte

Puede encontrar información de respaldo adicional en línea en la sección Información de respaldo al final del artículo.

Higo. T1Especificidad del anticuerpo DIO1.

Higo. T2Tinción IHC de control de isotipo representativo.

Higo. T3Expresión de DIO3 en tumores de la cohorte de estudio.

Higo. T4Expresión de DIO1 en ovarios y trompas de Falopio normales.

Higo. T5Validación de resultados de proteómica seleccionados mediante Western blot.

Tabla S1.Lista de anticuerpos. Tabla S2.

Datos de la cohorte del estudio.