



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS
EN LA REPARACIÓN AL DNA POR
RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN CÁNCER DE
OVARIO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EMMANUEL JUÁREZ GONZÁLEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Carlos Guadalupe Pérez Plasencia
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De México
2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*De esta ciencia no escasa
Llena tu tierno corazón; y siga
Las máximas mejores
Tu pecho, oh Joven, si en mi aviso fías;
Porque por largos días
Conserva los olores
El vaso que los tuvo recogidos:
Que yo, vayas despacio, o más violento,
Con mis pasos medidos
No he de ir más deprisa, ni más lento*

Dimidium facti, qui coepit, habet: sapere aude, / incipe

Immanuel Kant-¿Qué es la ilustración”

Índice

1.- Resumen.....	4
2.- Introducción	5
2.1.- Daño al DNA.....	5
2.2.- Vías de reparación del DNA	7
2.3.- Recombinación Homóloga.....	9
2.4.- Vía de la Anemia de Fanconi.....	13
2.5.- Cáncer de ovario	15
2.5.1.- Factores de riesgo del cáncer de ovario	17
2.5.2.- Tratamiento contra el cáncer de ovario	18
2.5.3.- Radioterapia.....	20
2.5.3.- Resistencia a radiación.....	22
2.5.4.- Líneas celulares de cáncer de ovario	¡Error! Marcador no definido.
2.5.5.- Genes más comúnmente mutados en cáncer de ovario	23
3.-Justificación	27
4.-Hipótesis.....	28
5.-Objetivos	28
6.-Materiales y métodos	29
7.-Resultados.....	35
8.-Discusión.....	52
9.- Conclusiones	56
10.- Bibliografía.....	56

1.- Resumen

Desde que se descubrió que el DNA es el responsable de almacenar la información genética en los seres vivos se supo que debían existir mecanismos que mantuvieran esta información íntegra y reparara daños sufridos por los cambios en el ambiente que suceden durante la vida del individuo. Estos daños, de no ser reparados adecuadamente, provocan aberraciones en el DNA y de ser un daño irreparable, muerte celular. El mecanismo de reparación por recombinación homóloga es uno de los mecanismos que se encargan de mantener la integridad de la información genética, reparando el DNA en caso de que haya ruptura de doble cadena. A su vez, la vía de la anemia de Fanconi tiene por función reparar el DNA en caso de entrecruzamientos de cadenas, es un sistema de reparación secundario durante las rupturas de doble cadena.

Varias terapias contra el cáncer, como la radioterapia, se basan en inducir daño a la doble cadena de DNA en la célula cancerígena para evitar que se siga replicando y llevarla a apoptosis, esto hace que la comprensión de cómo reacciona la célula cancerígena al ser tratada con radiaciones de alta energía para inducir daño al DNA sea de utilidad para mejorar y/o ayudar a predecir la respuesta que tendrá el paciente a este tipo de terapias.

El objetivo de este trabajo fue medir la respuesta de doce genes comúnmente mutados en cáncer de ovario y que están involucrados en vías de reparación de ruptura de doble cadena en un modelo de cáncer de ovario utilizando 3 líneas celulares y biopsias de pacientes. Para esto se midieron los cambios en los niveles de expresión de estos por qPCR en líneas de cáncer de ovario antes y después de ser tratadas con radiación UV C, se comprobó que estos cambios se debieran a la radiación al visualizar el daño por medio de un ensayo cometa y se midieron los niveles de expresión de los doce genes en biopsias de pacientes con cáncer de ovario.

Se encontraron diferencias en los niveles de expresión en la mayoría de los genes después del tratamiento y se observó el daño producido por la radiación UV C. Las biopsias de cáncer de ovario mostraron una sobreexpresión en la mayoría de los genes en comparación con las de tejido no tumoral. Se comprobó que el panel de doce genes responde significativamente a daño al DNA.

2.- Introducción

2.1.- Daño al DNA

El DNA es el responsable de almacenar la información genética en todas las células, por lo que su integridad y estabilidad son esenciales para la vida. Sin embargo, el DNA no es inerte, sino que es una molécula química sujeta a los procesos cambiantes de su entorno, y cualquier daño, que de no ser reparado, puede desencadenar mutaciones y el desarrollo de enfermedades (Cline & Hanawalt, 2003; Ozaki, Nakamura, & Shimozato, 2015). El DNA está sujeto a miles de lesiones cada día, la mayoría de estas lesiones son de una sola hebra, las cuales pueden ser modificaciones de una sola base como desaminación espontánea (por ejemplo la conversión de citosina en uracilo), oxidaciones (como la conversión de guanina en 8-oxoguanina), generación de sitios abásicos (posiciones dentro del DNA que carecen de una base) y rupturas de una sola cadena (SSBs, single strand breaks) formadas como intermediarios durante la interrupción de la replicación o por la inhibición de la actividad de la topoisomerasa. Menos frecuentes, pero más peligrosas son los daños a doble cadena como las rupturas de doble cadena (DSBs, double strand breaks), los entrecruzamientos y los aductos de DNA (Cline & Hanawalt, 2003).

Existen tanto factores endógenos como exógenos que ocasionan daño al DNA como el estrés oxidativo y los radicales libres generadas durante el metabolismo y por diversos agentes químicos, la luz ultravioleta (UV) y la radiación ionizante (IR) presentes en la luz del sol, así como diversas sustancias que se pueden unir covalentemente al DNA (Ozaki et al., 2015). El solo proceso de replicación durante la división celular es propenso a errores que pueden ocasionar mutaciones; la tasa de error en la cual la DNA polimerasa adhiere un nucleótido incorrecto durante la replicación del DNA es un factor que puede afectar mucho en la tasa de mutaciones espontaneas en un organismo (Roos, Thomas, & Kaina, 2016).

Si el DNA no es reparado adecuadamente esto ocasiona mutaciones y daños cromosomales que pueden causar transformaciones en la célula y ser transmitidos a las células hijas, generando así una sucesión de células que pueden ser malignas. Para evitar esto no solo se requiere de una muy alta exactitud al momento de la replicación y precisión en la distribución de los cromosomas, sino también la habilidad de reparar daños espontáneos que pueden aparecer en todo el transcurso del ciclo celular. Para asegurar esto, las células han desarrollado distintos mecanismos para monitorear la estructura de los cromosomas y coordinar sistemas de reparación durante la progresión del ciclo celular (Karran, 2000; Mah, El-Osta, & Karagiannis, 2010).

El control genético del ciclo celular como respuesta a alguna anomalía en el DNA se lleva a cabo por medio de varios puntos de control o “checkpoints” que son vías de señalización que controlan la habilidad de la célula a interrumpir el ciclo celular en respuesta al daño al DNA, dando tiempo para su censo y reparación (Zhou & Elledge, 2000). Varias proteínas están encargadas de reconocer modificaciones en el DNA, sin embargo, hay proteínas involucradas en otros procesos celulares que también pueden unirse a estructuras alteradas de DNA e intervenir en el arresto del ciclo celular (Cline &

Hanawalt, 2003; Roos et al., 2016). El reconocimiento del daño por estas proteínas genera la reparación, tolerancia o inactivación (vía apoptosis, quiescencia o senescencia) de los daños no reparables o no tolerables (Shkreta & Chabot, 2015).

El daño a doble cadena (DSB, double strand break) es considerado como la más dañina de todas las lesiones que sufre el DNA. El DSB es inducido por diferentes mecanismos, incluyendo exposición a luz UV, diferentes compuestos que se unen covalentemente ocasionando aductos de DNA, colapso de la horquilla de replicación cuando la maquinaria de replicación encuentra una ruptura en una de las cadenas del DNA y cuando hay una escisión guiada por endonucleasas (Bassing, Swat, & Alt, 2002; Haber, 2000; Karran, 2000). Errores en la reparación de DSBs pueden resultar en translocaciones cromosomales e inestabilidad genómica. Además, las DSBs son potenciadores de arresto al ciclo celular y apoptosis bajo cierta circunstancia, por eso deben ser reparados rápidamente y precisamente (Mah et al., 2010).

2.2.- Vías de reparación del DNA

Los procesos de reparación del DNA existen tanto en células procariotas como en eucariotas, y muchas de las proteínas involucradas han sido altamente conservadas a través de la evolución. Las células han desarrollado varios mecanismos para detectar y reparar todos los tipos de daños que pueda sufrir el DNA. Distintos mecanismos de reparación son usados para reparar los diferentes tipos de lesiones al DNA. El sistema de reparación Missmatch (MMR, Missmatch repair) y el sistema de escisión de bases (BER, base excision repair) actúan sobre lesiones simples, mientras el mecanismo de escisión de nucleótidos (NER, nucleotide excision repair), el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ, non homologous end-joining) y el mecanismo de recombinación homóloga (HR, homologous recombination) se encargan de reparar lesiones complejas

(Miné-Hattab & Rothstein, 2013). La identificación del tipo de lesión y muchos pasos de la reparación dependen de modificaciones post-transduccionales (fosforilaciones, poly(ADP-ribosylaciones) acetilaciones, metilaciones, etc.) para guiar las interacciones entre proteínas involucradas en cada tipo de mecanismo de reparación (Shkreta & Chabot, 2015).

La reparación del DSB puede llevarse a cabo por cuatro mecanismos diferentes. El primero, que ocurre cuando los extremos de DNA de la lesión no pueden ser escindidos por la unión de alguna proteína, es el de unión de extremos no homólogos (NHEJ). En este mecanismo, el DSB es reparado por la escisión y ligación de secuencias independientemente de su homología, requiriendo de muchos factores como Ku70/80, DNA-PKcs y DNA ligasa IV. NHEJ ocurre principalmente la fase G0/G1 y G2 y, a pesar de la mutagénesis que produce, la rapidez con la que lleva a cabo la reparación es importante para proteger la integridad del genoma especialmente evitando translocaciones cromosomales, al menos en la mayoría de los casos (Karran, 2000). En el caso de que el DNA pueda ser escindido dejando una cola de una sola hebra con un extremo 3', puede ser reparado por cualquiera de los otros tres mecanismos: recombinación homóloga (HR), unión de extremos alternativos (alt-EJ, alternative end-joining) y alineación de una sola hebra (SSA, single strand alignment). Tanto el mecanismo de SSA como el de alt-EJ son mutagénicos. En el caso de la reparación por SSA, se basa en secuencias repetidas entremezcladas y, aunque es guiada por homología, una copia de la secuencia repetida y las secuencias que se encuentran entremezcladas entre las repetidas están ausentes en el producto reparado, resultando en una pérdida de información genética. De forma parecida el mecanismo de alt-EJ tiene consecuencias a la integridad genómica por su aparente predilección por homologar secuencias de cromosomas diferentes causando translocaciones cromosómicas y re

arreglos mutagénicos. En cambio, el mecanismo de HR usa la cromátide hermana para reparar el daño y requiere la invasión de la hebra completa lo hace libre de errores (Ceccaldi, Rondinelli, & D'Andrea, 2016) (Fig. 1).

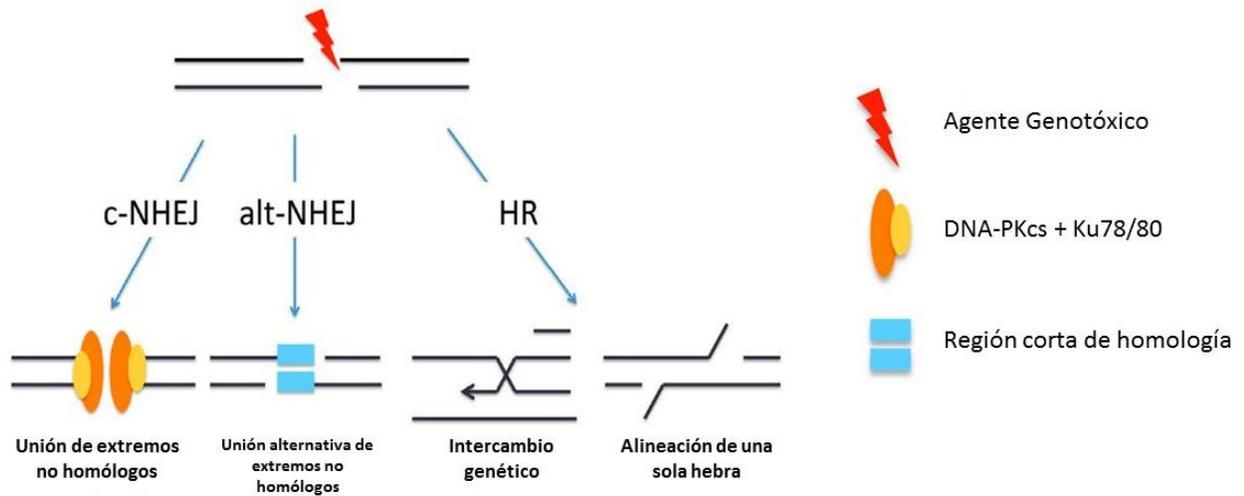


Fig. 1.- Diferentes mecanismos para reparar una DSB en células eucariotas. Los diferentes tipos de reparación entran en juego dependiendo de la naturaleza de la lesión y el estado de la célula. Tomado de (Watts, 2016).

2.3.- Recombinación Homóloga

Durante la fase S y G2 del ciclo celular, el sistema de HR juega un papel importante en la reparación de DSB debido a que la cromátide hermana se encuentra cerca (Ceccaldi, Rondinelli, et al., 2016).

El mecanismo de reparación por HR comienza con la detección de la lesión por parte de proteínas que se encargan de evaluar el DNA, estas pertenecen a la familia de PI3K la cual incluye a ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia Rad-3 related) y DNA-PKcs (Proteínas quinasas dependientes de DNA). Una vez identificado el lugar donde se llevó a cabo el DSB, estas proteínas se encargan de fosforilar la histona H2AX, además de otras proteínas encargadas de reparar el DNA y del arresto del ciclo celular. La histona H2AX fosforilada (γ H2AX) se acumula en el sitio de la lesión y empieza

una cascada de fosforilaciones que ponen en marcha el mecanismo de reparación; una vez terminado el proceso de reparación la histona γ H2AX es degradada (Cline & Hanawalt, 2003).

Una fosforilación cíclica se da entre la histona γ H2AX y ATM, que a su vez fosforila a la proteína CHK2 (Checkpoint 2) la cual activa la proteína BRCA1 para que esta forme un complejo junto con PALB2 y BRCA2 el cual funge como guía para activar el mecanismo de recombinación al localizar a RAD51 y evitar el proceso de reparación por NHEJ además, de que media el arresto del ciclo celular y desencadena apoptosis de ser necesario (Srivastava & Raghavan, 2015).

El proceso de recombinación consta de tres pasos: presinapsis, sinapsis y postsinapsis. Durante el proceso presináptico se reconoce la lesión y se procesa para dejar una cola con el extremo 3' libre, el complejo MRN compuesto por MRE11-RAD50-NBS1, el cual posee actividad 3'-5' exonucleasa, el responsable de generar esta cola. Otras proteínas como DNA2 (helicasa nucleasa 2) y RPA (proteína de replicación A) se posan sobre el DNA y ayudan sobre el proceso (O'Kane, Connor, & Gallinger, 2017a).

Durante la sinapsis, la invasión de la hebra de DNA sucede por la unión del complejo PALB2-BRCA2 a la proteína RAD51 la cual forma filamentos para generar un loop D. RPA que se une a DNA de una sola hebra puede potenciar la invasión de la hebra al desestabilizar la formación de estructuras secundarias, permitiendo así la continua formación de nucleofilamentos de RAD51. La unión de RAD51 al DNA de una sola hebra puede también ser impedida por RPA. Este efecto inhibitorio puede ser superado con ayuda de BRCA2 y otras proteínas accesorias como RAD52, el cual interactúa con RPA separándolo de la hebra y facilitando la unión de RAD51. Otra proteína esencial para la invasión de la hebra es RAD54, el cual es una helicasa con actividad ATPasa dependiente de DNA. Después el filamento de nucleoproteínas de RAD51 reconoce e

invade la secuencia homóloga formando un heteroduplex para empezar la síntesis DNA *de novo* en el sitio de la lesión; la síntesis de DNA y su ligación forman intermediarios de DNA de cuatro cadenas llamados uniones Holliday (Holliday junctions) (O’Kane et al., 2017a).

Las uniones Holliday proporcionan una unión covalente entre dos moléculas de DNA recombinante y su resolución es crucial para una correcta distribución de los cromosomas. Esta resolución puede llevarse a cabo de tres maneras distintas por unas proteínas llamadas resolvasas las cuales muestran un mecanismo similar de acción entre ellas. La primera de ellas es mediante un complejo llamado BTR (BLM-Topoisomerasa-RMI1-RMI2) el cual escinde las uniones horizontalmente dejando así una cadena de DNA intacta evitando el entrecruzamiento. La segunda posible solución consta de realizar escisiones asimétricas en los dos entrecruzamientos por el complejo SLX-MUS (SLX1-SLX4-MUS81-EME1) provocando así un entrecruzamiento entre las dos cadenas. La tercera posible resolución se da por la resolvasa GEN1 la cual realiza escisiones simétricas, sin embargo, se requiere un mayor procesamiento de la ligación (Fig. 2) (Sarbjana & West, 2014).

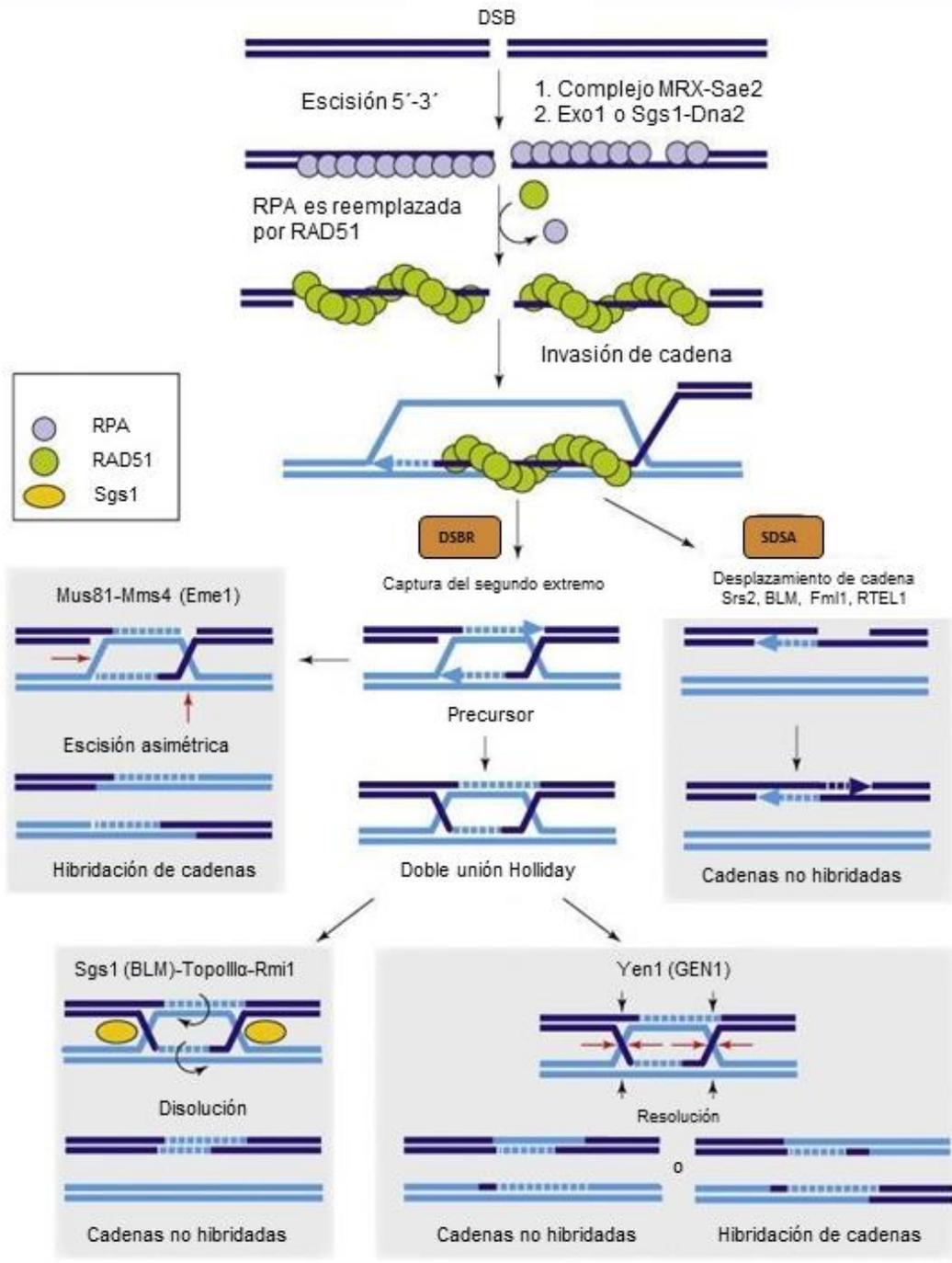


Fig. 2. Mecanismo de reparación por recombinación homóloga y sus posibles resoluciones. Dependiendo de la resolvasa que efectúe la escisión de las uniones Holliday habrá o no una hibridación en las cadenas. Tomado de (Mimitou & Symington, 2009)

2.4.- Vía de la Anemia de Fanconi

La vía de la anemia de Fanconi es un mecanismo que ayuda a reparar los entrecruzamientos generados en el DNA. Se compone de 19 genes (desde FANCA hasta FANCT). Las mutaciones germinales en cualquier de estos genes causa anemia de Fanconi la cual aumenta la probabilidad de desarrollar falla en la medula ósea y cáncer. Se han encontrado mutaciones monoalélicas en genes de la anemia de Fanconi en cáncer de mama y ovario. La reparación del DNA por la esta vía requiere de varias proteínas que también se encuentran involucradas en la recombinación homóloga. Actúa mayormente durante la fase S (Ceccaldi, Sarangi, & D'Andrea, 2016).

La primera fase de la vía es el reconocimiento de la lesión por FANCM la cual es una proteína de unión al DNA con motivos de helicasa que se une al entrecruzamiento de manera dependiente de su fosforilación por ATR. Una vez unida a la cromatina, FANCM funciona como punto de referencia para el complejo nuclear de la anemia de Fanconi, el cual está compuesto por 14 proteínas (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FANCT, FAAP100, MHF1, MHF2, FAAP20 y FAAP24) (Kim, Ko, Choi, Hu, & Hasty, 2011). El complejo nuclear de la anemia de Fanconi se agrupa en el sitio de la lesión durante la fase S y G2 del ciclo celular. FANCM-FAAP24, ATR y BRCA1 son requeridas para esta función. El complejo nuclear de la anemia de Fanconi funciona como una ubiquitin ligasa para FAND2 y FANCI. FANCD2 y FANCI forman un heterodimero conocido como FAND2-I. La activación de FAND2 y FANCI requiere de al menos dos modificaciones pos-traduccionales. La primera es la fosforilación del heterodimero, la cual es activada por la formación del complejo nuclear. FANCD2 y FANCI son después monoubiquitinadas de manera interdependiente. Esta monoubiquitinación es catalizada por el complejo nuclear a través de la subunidad ubiquitin ligasa FANCL y FANCT (Ceccaldi, Sarangi, et al., 2016; Che, Zhang, Nepal, Han, & Fei, 2018).

Después del reconocimiento de la lesión y de la activación de FANCD2-I por ubiquitinación, esta última controla la escisión para liberar el entrecruzamiento de una de las dos hebras de DNA, en un proceso conocido como desenganche (Knipscheer et al., 2009). FANCD2 recluta la proteína nucleasa FANCP, que a su vez recluta más endonucleasas específicas de estructura en el sitio de la lesión. Otra nucleasa específica de estructura, FAN1, ha sido implicada en el proceso de reparación. FAN1 interactúa con FANCD2-I para localizar la lesión, orientar el DNA y desenrollar el extremo 5' de la cadena de DNA para promover su escisión, además de escindir el DNA adyacente a la lesión (Ceccaldi, Sarangi, et al., 2016; Nepal, Che, Zhang, Ma, & Fei, 2017).

Una vez que una de las hebras de DNA ha sido desenganchada del entrecruzamiento, una polimerasa de baja fidelidad genera un parche de DNA incorporando nucleótidos a la hebra opuesta de donde se generó el entrecruzamiento (proceso conocido como inserción) extendiendo así la hebra naciente (proceso conocido como extensión) bajo el peligro de generar mutaciones en el genoma. El proceso de inserción es el responsable de que las mutaciones observadas en los sitios donde se reparan entrecruzamientos del DNA, sin embargo, la polimerasa que sintetiza el proceso de extensión tiene un 97% de fidelidad. Una vez que la inserción se ha llevado a cabo, la extensión es posible por el complejo de polimerasas compuesto por REV1 y REV3-REV7, dejando así una hebra dúplex intacta la cual es usada como templado para la reparación por recombinación homóloga de la hebra dúplex rota (Ceccaldi, Sarangi, et al., 2016; Che et al., 2018).

Al final de que la vía de la anemia de Fanconi termina el resultado es una ruptura de doble cadena en el DNA, la cual debe ser reparada por recombinación homóloga para completar la reparación del DNA. Las proteínas de la anemia de Fanconi requeridas para la

recombinación homóloga son independientes del complejo nuclear o de FANCD2-I. BRCA1 y PALB2 se asocian con RAD51 para iniciar el proceso de recombinación en el lugar de la lesión. El parólogo de RAD51, RAD51C (también conocido como FANCO) se requiere para eficientizar el proceso (Ceccaldi, Sarangi, et al., 2016; Nepal et al., 2017).

Después de la invasión y la reparación de la cadena dañada por recombinación homóloga, la resolución y la ligación da por resultado una doble cadena de DNA intacta, completando así la vía de la anemia de Fanconi (Fig 3) (Ceccaldi, Sarangi, et al., 2016).

En el proceso de daño por radiación, en donde no se encuentran entrecruzamientos de doble cadena si no solamente la ruptura de la misma, el complejo nuclear de la anemia de Fanconi puede tener la función de mantener la estabilidad de la doble cadena y ayudar al reclutamiento de RPA para que se lleve a cabo la recombinación homóloga (Renaud & Rosselli, 2013).

c

Fig. 3. Vía de la anemia de Fanconi. A) Etapa de identificación y escisión por parte de los genes propios de la vía, B) Inicio de la reparación involucrando a genes de la vía de recombinación homóloga. Tomado de (Kee, Kim, D'Andrea, & D'Andrea, 2009)

2.5.- Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es el séptimo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en la mujer (Todua, Gagua, Maglakelidze, & Maglakelidze, 2015; World Cancer Research Fund/ American Institute of Cancer Research (WCRF/AICR), 2018) registrándose aproximadamente 295,000 nuevos en 2018 (Bray et al., 2018). Este cáncer tiene un alto índice de mortalidad siendo el más mortal entre las neoplasias ginecológicas y la octava causa de muerte relacionada a cáncer más común en mujeres a nivel mundial (Bray et al., 2018; Todua et al., 2015) (Fig. 4).

La mayoría de los casos de cáncer de ovario ocurren espontáneamente, entre el 5 y el 10 por ciento de los casos se desarrollan debido a predisposición genética (World Cancer Research Fund/ American Institute of Cancer Research (WCRF/AICR), 2018).

La combinación de cirugía citorreductora seguida por quimioterapia de primera línea basada en sales platinadas y un taxano han contribuido a un incremento en la supervivencia de las pacientes, así como la aparición de nuevos medicamentos para enfermedad recurrente. Actualmente la supervivencia a 5 años para los estadios clínicos III y IV se ha incrementado de un 15% histórico hasta casi un 30% (Asadollahi, Hyde, & Zhong, 2010; Swisher et al., 2009).

El cáncer de ovario puede dividirse en diferentes subtipos histológicos los cuales tienen diferentes factores de riesgo, orígenes celulares, composición celular, características clínicas y tratamientos. Estos subtipos histológicos incluyen los de tipo epitelial los cuales representan alrededor del 90% de todos los casos de cáncer de ovario y que incluye carcinoma seroso, endometroide, de células claras y mucinoso. De estos subtipos, el carcinoma seroso de alto grado (HGSC) es el más comúnmente diagnosticado (Matulonis et al., 2016; Todua et al., 2015).

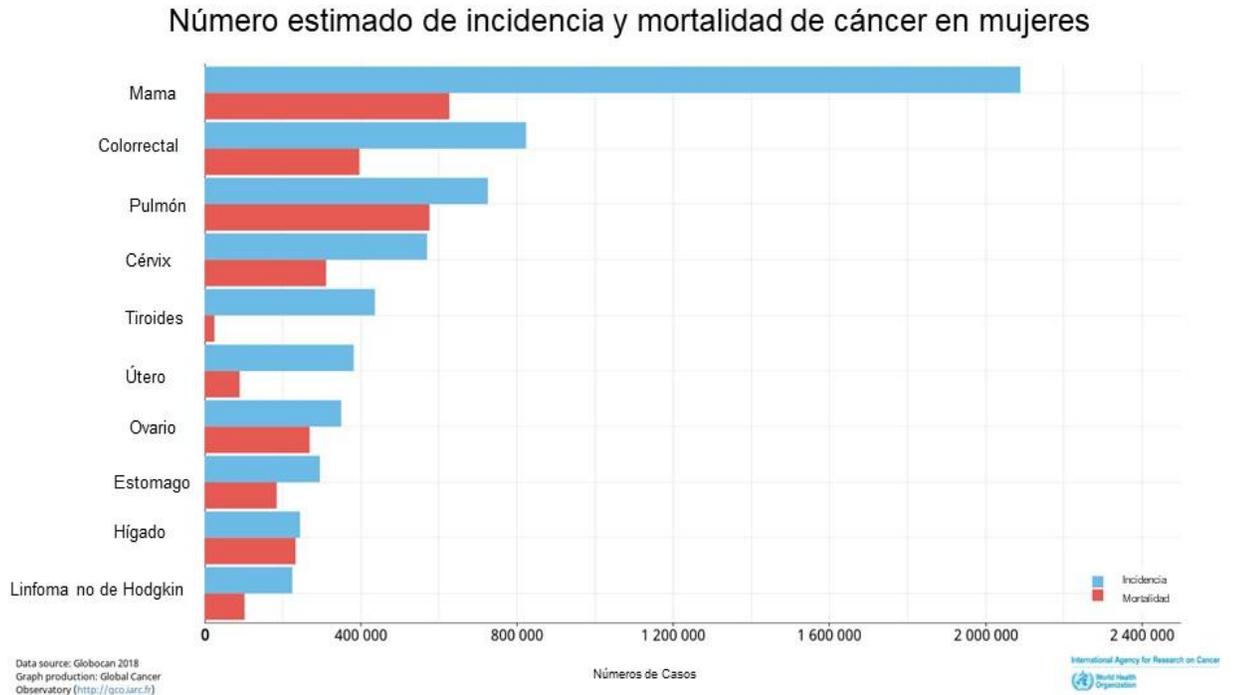


Fig. 4. Número total estimado de casos de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres de todas las edades en todo el mundo. Se muestran los 10 tipos de cánceres con mayor incidencia en la mujer (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2018).

2.5.1.- Factores de riesgo del cáncer de ovario

Varios factores pueden incrementar el riesgo de padecer cáncer de ovario, incluyendo factores genéticos, edad, terapias o desordenes hormonales (anticonceptivos), infertilidad y nuliparidad (Matulonis et al., 2016).

El riesgo de cáncer de ovario se ve afectado por el número de ciclos menstruales, esto debido a que, después de varios ciclos de ovulación, el epitelio del ovario pasa por repetidos procesos de ruptura y reparación. Las células epiteliales son estimuladas a proliferar, lo que incrementa la probabilidad de que haya mutaciones espontaneas. Alternativamente, después de la ovulación, estas células pueden infiltrarse dentro del

tejido conectivo que rodea al ovario, lo cual puede llevar a la formación de quistes. Si esto sucede, las células epiteliales se encuentran expuestas a un microambiente pro inflamatorio, el cual puede incrementar la tasa de daño al DNA e incrementar el riesgo de cáncer (World Cancer Research Fund/ American Institute of Cancer Research (WCRF/AICR), 2018).

La nuliparidad incrementa el riesgo, y puede ser vista como causa, de cáncer de ovario, así también existe evidencia de que, al igual que el cáncer de mama, la menarquia temprana y la menopausia tardía incrementan el riesgo de cáncer de ovario.

Una gran cantidad de defectos genéticos han sido relacionados con el riesgo de sufrir cáncer de ovario. Mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2 son de las más importantes presentándose en el 17% de los casos (Zhang et al., 2011). Mutaciones en BRCA2 están asociadas a un mejor pronóstico en comparación con las mutaciones de BRCA1, probablemente porque BRCA2 ayuda a mejorar la sensibilidad a platinos (Matulonis et al., 2016).

Además de BRCA1 y BRCA2, otras mutaciones en genes involucrados en reparación al DNA pueden incrementar el riesgo de padecer cáncer de ovario, incluyendo genes que son parte de la vía de la anemia de Fanconi como RAD51C, RAD51D, FANCD1, BARD1 y PALB2. Mutaciones hereditarias en otros genes involucrados en la reparación por recombinación homóloga como CHK2, MRE11A, RAD50, ATM y TP53, pueden también incrementar el riesgo de padecer cáncer de ovario (Matulonis et al., 2016).

2.5.2.- Tratamiento contra el cáncer de ovario

El principal objetivo del tratamiento contra el cáncer de ovario es controlar el cáncer y los síntomas lo antes posible. La cirugía es el principal tratamiento contra el cáncer de ovario en la mayoría de los pacientes, esta tiene por objetivo eliminar todo tumor visible

realizando una citorreducción de la mayor masa tumoral residual por debajo del límite de 1 cm. La cirugía citorreductora (debulking) consiste en reducir la masa residual del tumor para que la quimioterapia administrada posteriormente pueda ser más eficaz (DiSaia, Creasman, Mannel, McMeekin, & Mutch, 2018). La extensión de la cirugía es determinada por el estadio de del cáncer y las características del paciente; por ejemplo, en mujeres con un cáncer muy avanzado se extraen ambos ovarios, pero mujeres en estadios más tempranos y jóvenes que quieran preservar su fertilidad solo se les extrae un ovario; En mujeres con estadios más avanzados, la cirugía puede incluir una histerectomía completa (Matulonis et al., 2016; Zhang et al., 2011)

La cirugía va acompañada de una quimioterapia adyuvante a base de platinos y taxanos, esto dependiendo del tipo y estadio del cáncer. La quimioterapia es un tratamiento que usa fármacos para detener el crecimiento de las células cancerígenas, ya sea matándolas o evitando que se dividan (NCI, 2018a). Los complejos platinados son agentes anticancerígenos muy efectivos usados rutinariamente en la clínica y casi 50% de todas las quimioterapias incluyen platinos (Wexselblatt, Yavin, & Gibson, 2012; Wheate, Walker, Craig, & Oun, 2010). El principal complejo platinado usado en la quimioterapia contra el cáncer de ovario es el carboplatino, el cual es menos tóxico que otras sales platinadas lo que permite que se administre a dosis más altas. (Wexselblatt et al., 2012).

El carboplatino, al igual que la mayoría de las sales platinadas, entra a las células por medio de tres posibles mecanismos: difusión pasiva, proteínas transportadoras de cobre (CTR1) y/o transportadores de cationes (Puckett, Ernst, & Barton, 2010). Una vez dentro de la célula, el núcleo de platino se une a la posición N7 de la guanina, y menos frecuentemente a la adenina, por medio de la formación de un enlace covalente coordinado con el par solitario del átomo de nitrógeno. El anillo se cierra a través de la formación de un segundo enlace con otra cadena de DNA causando un entrecruzamiento

de cadenas, doblando el DNA (entre 30 y 60° sobre el surco mayor) y desenrollan la doble hélice. Esta distorsión en el DNA impide la replicación y la transcripción, lo que conlleva a apoptosis de no ser reparada (Wheate et al., 2010).

Muchos cánceres en estadios tempranos no son tratados con quimioterapia post-cirugía, sin embargo, muchos adyuvantes de primera línea han probado ser capaces de mejorar el pronóstico de pacientes diagnosticados con cáncer de ovario en estadios avanzados (Armstrong et al., 2006). Se ha demostrado que al combinar diferentes tratamientos se puede optimizar la quimioterapia adyuvante, incluyendo combinaciones de agentes a base de platino, taxanos (paclitaxel y doxotaxel), agentes antiangiogénicos (bevacizumab, nintedanib, trebananib and pazopanib) y otras drogas (pegylated, doxorubicina y gencitabina) (O’Kane, Connor, & Gallinger, 2017b). Una opción de terapia que muestra mejorar el pronóstico de los pacientes con cáncer de ovario en estadios avanzados es el uso de neo adyuvantes (NACT), lo cual consiste en tratar a los pacientes con ciclos de carboplatino y paclitaxel antes de la cirugía (Batra, Nayak, & Dave, 2012).

2.5.3.- Radioterapia

La radioterapia es uno de los tratamientos más comunes contra el cáncer, se basa en utilizar partículas u ondas de alta energía para matar células cancerígenas. La radiación actúa sobre el DNA de la célula causando rupturas que evitan que la célula se divida y causando su muerte (NCI, 2018b). Es la terapia citotóxica más efectiva contra tumores sólidos siendo utilizada para tratar más del 50% de los casos de cáncer y teniendo una efectividad del 40%. En la mayoría de los casos la radioterapia es altamente localizada y se centra en regiones de tejido donde se sabe (o se sospecha) que hay células cancerígenas (Barker, Paget, Khan, & Harrington, 2015; Harrington et al., 2011; Schae & McBride, 2015).

En la radioterapia se utiliza radiación ionizante (IR) la cual, debido a su alta energía, es capaz de liberar electrones de átomos y moléculas generando iones que pueden romper enlaces covalentes. La IR afecta directamente el DNA afectando su estructura y provocando principalmente rupturas de doble cadena. Otros efectos que genera la IR es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) la cual a su vez genera daños al DNA de una sola cadena (SSB) (Borrego-Soto, Ortiz-López, & Rojas-Martínez, 2015).

Células quiescentes o con baja velocidad de división como las del sistema nervioso son menos susceptibles a la radioterapia, mientras que las células con alta tasa proliferativa como las de la médula ósea son más sensibles a la IR. Las dosis de IR para radioterapia se miden en unidades gray (Gy), una medida de la cantidad de radiación absorbida por Kg de tejido (Joules/Kg). Se ha visto daño en el DNA en paciente con cáncer de mama a partir de entre 4 y 6 Gy mientras que en cáncer de pulmón de células no pequeñas las dosis van desde 60 hasta 70 Gy. En estudios *in vitro* se ha visto daño en células de melanoma al ser tratadas con 20 J y en células de cáncer de mama la dosis media de radiación va desde los 50 a los 200 J (Baker, Dahele, Lagerwaard, & Senan, 2016; Borrego-Soto et al., 2015; Espinha, Osaki, Tosoni Costa, & Forti, 2016; Sarkar, Rajput, Kumar Tripathi, & Mandal, 2013).

La radioterapia no forma parte del tratamiento de primera línea para el cáncer de ovario en la mayoría de los países. Sin embargo, puede ser útil en el tratamiento de áreas donde el cáncer se ha propagado. Tanto la radioterapia como la quimioterapia usan distintos métodos para llegar al mismo resultado, la generación de DSB en el DNA (NCI, 2018b, 2018c).

2.5.4.- Resistencia a Radiación

Mutaciones secundarias en los genes asociados a reparación por recombinación homóloga en cáncer pueden crear resistencia a quimio y radioterapia. Estas mutaciones

secundarias o reversiones genéticas pueden regenerar el marco abierto de lectura y resultar en la sobreexpresión de sus proteínas en cáncer. Esto significa que la eficiencia de la quimioterapia en cáncer está totalmente condicionado al defecto de la vía de recombinación homóloga (Srivastava & Raghavan, 2015).

Se ha reportado que RAD51 está sobreexpresado en cáncer de ovario. Una tasa de reparación más alta al daño inducido por agentes alquilantes genera resistencia a la apoptosis, además de disminuir la eficacia de otros agentes que inducen DSBs como la radiación. Una subexpresión de proteínas clave en el proceso de recombinación homóloga mejora la respuesta a agentes como la mitomicina C y el cisplatino (Evers, Helleday, & Jonkers, 2010).

2.5.3.- Líneas celulares de cáncer de ovario

Líneas células derivadas de pacientes con cáncer de ovario son modelos usados en el laboratorio para el estudio de la biología del cáncer y probar la eficacia de agentes anticancerígenos. Estas líneas celulares, aunque no representan exactamente la naturaleza del tumor, sirven para observar una relación causa-efecto entre un estímulo y un cambio medible en la célula (Gillet, Varma, & Gottesman, 2013; Wilding & Bodmer, 2014). Se han desarrollado distintas líneas celulares de cáncer de ovario para estudiar esta enfermedad *in vitro*, cada una con diferentes características que ayudan a comprender mejor la respuesta de distintos tipos de tumores. Las líneas epiteliales de adenocarcinoma CAO-3 y OVCAR-3 así como la línea de fibroblasto de carcinoma de células claras ES-2 fueron usadas en este trabajo debido a que muestran diferente respuesta a daño al DNA entre ellas. La línea OVCAR-3 esta reportada como con resistencia clínicamente relevante a tratamiento contra el cáncer y la línea ES-2 presenta

resistencia moderada a agentes anticancerígenos mientras que en la línea CAOV-3 no se ha reportado ningún tipo de resistencia (ATCC, 2018).

2.5.5.- Genes más comúnmente mutados en cáncer de ovario

A nivel molecular, el cáncer de ovario es muy heterogéneo, siendo caracterizado por mutaciones en genes asociados a la reparación al DNA. Además de BRCA1 y BRCA2 que se encuentran mutados en el 17% de los cánceres epiteliales, muchos otros genes presentan niveles de expresión aberrantes debido a la inestabilidad genética y a la pérdida de heterogocidad (Bast, Hennessy, & Mills, 2009).

Estas aberraciones genómicas podrían servir como marcador que permita detectar y tratar el cáncer de ovario en etapas tempranas ya que solo 20% de las pacientes son diagnosticadas en etapa I. Debido a su prevalencia es necesario una estrategia para su detección temprana, los parámetros a utilizar deben ser altamente sensibles para estadios tempranos y altamente específicos para alcanzar un valor predictivo alto (Bast et al., 2009; Das & Bast, 2008).

Se han desarrollado métodos moleculares para predecir y mejorar la sobrevida en pacientes con cáncer de mama y cérvix, pero hasta hoy en día no se ha desarrollado un perfil efectivo para el cáncer de ovario (Das & Bast, 2008).

De los genes más comúnmente desregulados en cáncer de ovario y que pudieran servir para desarrollar un perfil son:

ARID1A: Componente del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF con actividad helicasa y ATPasa, se ha identificado como un supresor de tumores mutado en el 50% de los casos de cáncer de ovario epitelial de células claras. Controla la progresión del ciclo celular al haber daño al DNA. ARID1A es reclutado cuando hay daño al DNA de doble

cadena por su interacción con ATR. A nivel molecular, ARID1A facilita el procesamiento del daño de doble cadena y ayuda a mantener la cascada de señalización activa. La deficiencia de ARID1A sensibiliza a las células cancerígenas a inhibidores de PARP *in vitro* e *in vivo* proporcionando un potencial blanco terapéutico (Shen et al., 2015).

ATM: Serin/treonin quinasa que funge como punto de control en la señalización de daño a doble cadena, apoptosis y estrés genotóxico como radiación ionizante actuando como sensor de daño al DNA. Inicia la reparación al DNA por recombinación homóloga fosforilando a la histona H2AX. También regula el ciclo y puede ser un supresor de tumores; fosforila a CHK2, p53, FANCD2, NFkB, BRCA1 y RAD9 (Lima et al., 2016).

CHK2: Serin/Treonin quinasa necesaria para el arresto del ciclo celular, activación de la reparación al DNA y apoptosis en presencia de daño a doble cadena. Inhibe la acción de ciclinas, impidiendo así el paso de la fase G2 a la fase M del ciclo celular. Regula la vía de reparación por recombinación homóloga al fosforilar a BRCA1 y BRCA2, potenciando su asociación con RAD51. También estimula la transcripción de genes involucrados en la recombinación homóloga como BRCA2 a través de la fosforilación y activación del factor de transcripción FOXM1. Regula la apoptosis al fosforilar a p53, MDM4 y PML. Su ausencia puede causar inestabilidad cromosomal observada en varios tipos de cáncer (Magni et al., 2014).

FANCA: Proteína involucrada en el arresto del ciclo celular, en la reparación de entrecruzamiento del DNA y en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal. Mutado en el 60% de los casos de anemia de Fanconi. Componente del complejo nuclear de la anemia de Fanconi que se encarga de escindir la lesión de DNA y ubiquitinar FANCD2, con afinidad por el DNA y se encuentra en el núcleo durante la replicación. Puede funcionar independientemente del complejo nuclear y participar directamente en la escisión del DNA (Benitez et al., 2014)

FANCB: Proteína involucrada en la reparación del DNA y en la hematopoyesis, componente del complejo nuclear de la anemia de Fanconi y necesaria para la ubiquitinación de FANCD2. Mutaciones en este gen causan inestabilidad genética y síndrome de VACTERL con hidrocefalia (Du et al., 2015).

FANCC: Proteína involucrada en la reparación del DNA y en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal. Involucrada en la activación de STAT1; se encuentra deletado en cáncer de riñón, mutado en cáncer de páncreas y subexpresado en cáncer de cabeza y cuello. Es un gen clave en la regulación de la vía Hedgehog y es un supresor de tumores inhibiendo la transición de la fase G1/S y G2/M del ciclo celular (Sinha et al., 2008).

FANCD2: Involucrado en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal. Interviene en la reparación de daños a doble cadena del DNA por recombinación homóloga, participa en el arresto del ciclo celular entre la fase S y G2 por daño al DNA y previene la ruptura y la disgregación de la cromatina al final de la división celular, particularmente después durante el estrés replicativo. Promueve la activación de BRCA2 y PALB2 durante la reparación del DNA. Al ser monoubiquitinada por el complejo nuclear de la anemia de Fanconi promueve, junto con FANCI, el reclutamiento de nucleasas para escindir el DNA cuando hay entrecruzamientos en el DNA (Barroso et al., 2009; Hays et al., 2008; Howlett, Taniguchi, Durkin, D'Andrea, & Glover, 2005; Montes de Oca et al., 2005).

PALB2: Juega in papel fundamental en el proceso de reparación por recombinación homóloga y en la vía de la anemia de Fanconi al reclutar a BRCA2 y RAD51 al sitio del daño. Estimula la invasión de hebras por parte de RAD51, estabiliza el filamento de nucleoproteínas y ayuda a RAD51 a superar el efecto represivo de RPA. Funge como unión entre BRCA1 y BRCA2, la cual es fundamental en el proceso de recombinación homóloga, estabiliza y localiza a BRCA2 ayudando a su actividad como supresor de

tumores. Se encuentra mutado en cáncer de mama, de páncreas y de ovario (Buisson & Masson, 2012; Foo et al., 2017; Park et al., 2014).

PARP1: Involucrado en la remodelación y reparación del DNA mediante la poli(ADP-ribosil)ación de un número limitado de proteínas aceptores que controlan la arquitectura de la cromatina y el metabolismo del DNA. Esta modificación aparece después de que el DNA es dañado y parece ser un paso obligado en la detección y la vía de señalización para la reparación del DNA. Promueve el reclutamiento rápido y específico de BRCA1 al sitio de daño. Se encuentra frecuentemente sobreexpresado en cáncer y ayuda al desarrollo de resistencia a agentes genotóxicos con lo que se puede inducir la letalidad sintética bloqueando su actividad. Además de su importancia en la reparación del DNA, la importancia de PARP1 como regulador transcripcional está bien establecida actuando como remodelador de cromatina permitiendo la unión entre el DNA y la RNA polimerasa (Ko & Ren, 2012).

RAD50: Componente del complejo MRN el cual desempeña un papel central en la reparación y la recombinación del DNA, el mantenimiento de la integridad de los telómeros y la meiosis. Se une a los extremos del DNA y mantiene los dos extremos cerca uno del otro, lo cual facilita la búsqueda de secuencias homólogas en el DNA y puede estimular la actividad de ligasas y restringir la actividad de nucleasas. Tiene actividad ATPasa y adenilato quinasa, aunque su principal papel es el de ATPasa (de Jager et al., 2001; Lafrance-Vanasse, Williams, & Tainer, 2015; Lee & Paull, 2004; Zhu, Küster, Mann, Petrini, & Lange, 2000).

RAD51: Recombinasa encargada de promover la invasión de la hebra a recombinar durante la recombinación homóloga. Se une al DNA de una y doble hebra y muestra actividad ATPasa dependiente de DNA. Cataliza el reconocimiento de secuencias homólogas para formar la unión entre la ruptura del DNA y el templado para la reparación.

Se une al DNA de una sola hebra de manera dependiente de ATP y forma filamentos de nucleoproteínas los cuales son esenciales para la recombinación. Involucrado en la regulación del DNA mitocondrial bajo condiciones de estrés oxidativo y permite que la replicación pueda volver a empezar después de que esta se detuvo por haber encontrado daño en el DNA. Promueve la supervivencia celular y mutaciones germinales en este gen conllevan muerte del embrión (Ameziane et al., 2015; Bhattacharya et al., 2017; Inano et al., 2017; Wang et al., 2015).

STK11: Serin/Treonin quinasa que desarrolla un papel importante en varios procesos celulares como metabolismo, polaridad celular, apoptosis y reparación del DNA. Actúa como regulador de AMPK y por lo tanto regula procesos como la inhibición de la vía de señalización que promueve el crecimiento y la proliferación celular cuando los niveles de energía son bajos, la homeostasis de glucosa en el hígado, activación de la autofagia cuando le faltan nutrientes a la célula y respuesta al daño en el DNA. Envuelto en la respuesta a daño en el DNA por su interacción con p53. En células endoteliales, inhibe la vía de señalización de PI3K/Akt lo cual induce a la apoptosis. Regula la respuesta a daño al DNA por radiación UV mediante la fosforilación y posterior degradación del inhibidor de la ciclina dependiente de quinasa A1 lo cual es esencial para la reparación del DNA (Esteve-Puig et al., 2014).

3.-Justificación

La radioterapia a pacientes con cáncer se enfoca en causar daño de doble cadena al DNA para evitar el crecimiento de la célula tumoral. La vía de reparación del DNA por recombinación homóloga es la encargada de reparar las lesiones de doble cadena

evitando que la célula entre en apoptosis, por lo que es importante realizar estudios sobre la expresión de genes clave en esta vía de reparación.

En este trabajo se utiliza como modelo de estudio líneas celulares de cáncer de ovario para observar la respuesta de doce genes clave en la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga.

4.-Hipótesis

Existe una relación entre los niveles de expresión de los 12 genes analizados y la respuesta celular a radiación UV C, lo que permite utilizar estos genes como factores para pronosticar la respuesta a radioterapia en cáncer de ovario.

5.-Objetivos

Objetivo General

- Identificar los niveles de expresión de doce genes asociados a reparación al DNA por recombinación homóloga en cáncer de ovario

Objetivos particulares

- Medir los niveles de expresión basales de los doce genes asociados a reparación al DNA por recombinación homóloga en líneas celulares de cáncer de ovario
- Comparar el cambio de expresión en los doce genes asociados a reparación al DNA por recombinación homóloga en líneas celulares de cáncer de ovario después de ser irradiadas con luz UV C
- Determinar el daño al DNA en líneas celulares de cáncer de ovario después de ser irradiadas con luz UV C

- Comparar los niveles de expresión los doce genes asociados a reparación al DNA por recombinación homóloga en pacientes de cáncer de ovario en pacientes sin cáncer

6.-Materiales y métodos

Líneas celulares

Para comparar los niveles de expresión de los genes a evaluar se utilizaron las líneas celulares de cáncer de ovario ES-2, CAOV-3 y OVCAR-3 las cuales fueron sembradas en cajas Petri de 100 x 20 mm con medio McCoy's 5 a (CorningTM), DMEM y RPMI (GIBCO, Invitrogen) respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB bioWEST) inactivado y mantenidas en una incubadora (In-Vitro Cell, NU-8600 Series) con 5% CO₂ y una temperatura de 37°C. Como control se utilizó una línea no tumoral de riñón de embrión humano HEK293T sembrada en medio DMEM F12 (GIBCO, Invitrogen) y mantenidas en las mismas condiciones.

Tratamiento con luz UV C

Se sembraron 300,000 células en una caja Petri de 60 x 15mm con 3 ml de medio suplementado, se dejaron crecer por 48 horas hasta alcanzar un crecimiento exponencial y se radiaron con 20 Joules de luz UV C (254 nm WL) con un CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, Analytik Jena). El nivel de expresión del RNA mensajero de los genes se midió 30 y 60 minutos después del tratamiento, esto debido a que, en trabajos anteriores, en estos tiempos se ha visto marcadores de daño en estas células y bajo estas condiciones.

Muestras de pacientes con cáncer de ovario

Los estudios genómicos de expresión fueron realizados en el Laboratorio de Genómica de nuestra Institución a cargo del Dr. Carlos Pérez Plasencia y colaboradores. Los procedimientos clínicos se llevaron a cabo en la Clínica de Tumores Ginecológicos del INCan. Se midieron los niveles de expresión en 26 biopsias de pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer de ovario epitelial, mayores de 18 años y que no hayan recibido tratamiento.

Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos para medir los niveles de mensajeros se realizó en la plataforma BLAST del National Center of Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se validó haciendo una PCR in silico en UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) y en Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) para comprobar la identidad y el tamaño de los amplicones.

Los oligonucleótidos fueron diseñados para que midieran entre 20 y 22pb y el producto de la PCR fuera no mayor a 200pb y que la secuencia de unión estuviera en medio de una secuencia de unión exón-exón, esto último para hacerlos específicos al RNA mensajero.

Las secuencias usadas se muestran en la tabla 6.1

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos obtenidos por el software BLAST

Mensajero	Tamaño (pb)	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicon
-----------	-------------	-----------	----	---------------------

PALB2 F	24	AGGAGAAGGAAAAGTTAAAGGAGA	60	
PALB2 R	20	CGGTGAGAGATCCTGCTGAG	60	161pb
RAD51 F	20	AGACCGAGCCCTAAGGAGAG	60	
RAD51R	21	TCTGCATTGCCATTAGCTCCA	60	124pb
RAD50 F	20	TGCTTGTTGAACAGGGTCGT	60	
RAD50 R	20	TCACTGAATGGTCCACGCTC	60	131pb
FANCA F	20	GAAGAGGCCTTCCTGCATGT	60	
FANCA R	19	GGTTGCCCTGACCCTTGAG	60	127pb
FANCB F	20	CCGCTGCGTTGAGTTTCATA	60	
FANCB R	21	TCTGGGACAATAGGCATCACA	60	104pb
FANCC F	20	AAGCCAATACGAGGCAAAGC	60	
FANCC R	21	GTCGGCACACATTAAATCGGG	60	123pb
FANCD2 F	20	CGACGGCTTCTCGGAAGTAA	60	
FANCD2 R	20	GGAGGCATCTTCTGTCAGGC	60	109pb
CHK2 F	15	GGGCTCACGCGGTCG	60	
CHK2 R	20	TGCTGGTAGAGGAGCTGGAT	60	150pb
ARIDA1 F	20	AACCCAGACTCGGGGATGTA	60	
ARIDA R	20	GGCCGCTTGTAATTCTGCTG	60	178pb
ATM F	20	CCAATTCCCTCCACCTGCAT	60	
ATM R	22	AGAACACACATTGGATAGTGGT	60	119pb
PARP F	20	GCCCTAAAGGCTCAGAACGA	60	
PARP R	20	CAGAAGGCACTTGCTGCTTG	60	115pb

Extracción de RNA

Se llevó a cabo la extracción de RNA utilizando el método de TRIzol (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se resuspendió en 30 µl de

agua milliQ (Millipore). La cuantificación del RNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) a una absorbancia de 260 nm. La integridad del mismo se analizó mediante un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

RT-qPCR

Para medir los niveles de expresión de los RNA mensajeros de los genes a evaluar se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, en la cual se retro transcribe el RNA en cDNA y este es amplificado al tiempo que es cuantificado. Para esto primeramente se utiliza una retrotranscriptasa (MultiscribeTM Reverse Transcriptase) que transcribe cDNA utilizando RNA como molde y desoxi nucleótidos trifosfato (dNTPs) como sustrato bajo las condiciones mostradas en la tabla 6.2

Tabla 2. Condiciones de temperatura para la retrotranscripción del RNA en cDNA.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
25	10
37	120
85	10
4	∞

Una vez teniendo el cDNA este se utilizó para estandarizar los condiciones de amplificación por medio de PCR punto final (e.p. PCR) utilizando un PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosciences) bajo las condiciones de la tabla 6.3.

Tabla 3. Condiciones de temperatura para la PCR punto final.

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
95	3 minutos	1
95	30 segundos	40
60	30 segundos	
72	30 segundos	
72	5 minutos	1
4	∞	1

Una vez estandarizadas las condiciones se procedió a realizar la qPCR utilizando el cDNA como template, una Taq DNA polimerasa la cual funciona a altas temperaturas, los oligonucleótidos correspondientes a cada gen que funcionan como primers para la polimerasa y dNTPs como sustrato. Además, tiene un fluoróforo (SYBRTM Green) que se intercala al DNA y que, al ser excitado, emite luz la cual es captada por el termociclador (LigthCycler® 480 II, Roche). La qPCR se llevó a cabo bajo las condiciones de la tabla 6.4.

Tabla 4. Condiciones de temperatura para la PCR punto final.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre incubación	95 °C	10 minutos	x1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	x 40
Alineación	60 °C	30 segundos	
Amplificación	72 °C	30 segundos	
Enfriamiento	4 °C	∞	x1

Para normalizar la expresión del RNA mensajero se utilizó GAPDH como gen endógeno ya que este gen casi no varía su nivel de expresión en las células a pesar de que las condiciones externas sean cambiantes. Se calculó la expresión relativa de los genes usando el método de Litvak en el 2001 utilizando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

Ensayo cometa

Para observar el daño que provoca directamente la luz UV C se realizó un ensayo de electroforesis de una sola célula también llamado ensayo cometa (debido al patrón de migración que muestra el DNA) (Glei, Schneider, & Schlörmann, 2016). El ensayo cometa consiste en tres pasos: la fijación en agarosa de bajo punto de fusión, la lisis y la electroforesis.

Para fijar las células se tienen que embeber en un tipo de agarosa con bajo punto de fusión y dejándola gelificar sobre una cama de agarosa estándar en un portaobjeto; la agarosa forma una matriz que impide que las células se muevan pero que permite que soluciones penetren y afecten a las células.

Una vez en el portaobjeto, las células fueron sumergidas en un buffer para de lisis el cual contiene sales, un detergente no cargado (Triton o sarcosinato) y proteínasa K. Debido a

que la proteínasa K funciona mejor a altas temperaturas la lisis se lleva a cabo a 50° C durante 24 horas.

Después de lisadas, las células fueron lavadas y sumergida en TBE para la electroforesis. La electroforesis se lleva a cabo a 20 Voltios V durante 30 minutos en una cámara de electroforesis, luego se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml para poder ser visualizadas en el microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 350 nm. Una vez obtenidas las imágenes de los cometas se analizaron calculando el momentum de las colas multiplicando al largo de la cola por el porcentaje de DNA en el programa CometScore (Tri Tek Corp, Sumerduck, VA). Se analizaron 50 o más cometas por condición.

Análisis estadístico

El análisis de los datos de los ensayos cometas se realizó en Excel 2010 (Microsoft). El análisis del nivel de expresión de los genes seleccionados se realizó con ayuda del software Prism 6 (GraphPad). Los datos obtenidos de la qPCR fueron analizados utilizando la prueba de T para muestras no paramétricas con un valor de $p \leq 0.01$ (prueba de Mann-Whitney).

7.-Resultados

Primeramente, mediante qPCR, se evaluó el nivel de expresión de doce de los genes involucrados en el proceso de reparación por recombinación homóloga más comúnmente mutados en cáncer de ovario en las líneas ES-2, Caov-3 y Ovar-3 y se comparó con una la línea no tumoral de embrión HEK293T. Para esto primero se sintetizó DNA

complementario a partir del RNA mensajero extraído de las líneas celulares y posteriormente, por medio de PCR punto final se estandarizaron las condiciones de amplificación de los genes ARID1A, ATM, CHK2, FANCA, FANCB, FANCC, FAND2, PALB2, PARP1, RAD50, RAD51 y STK11. (Fig. 7.1).

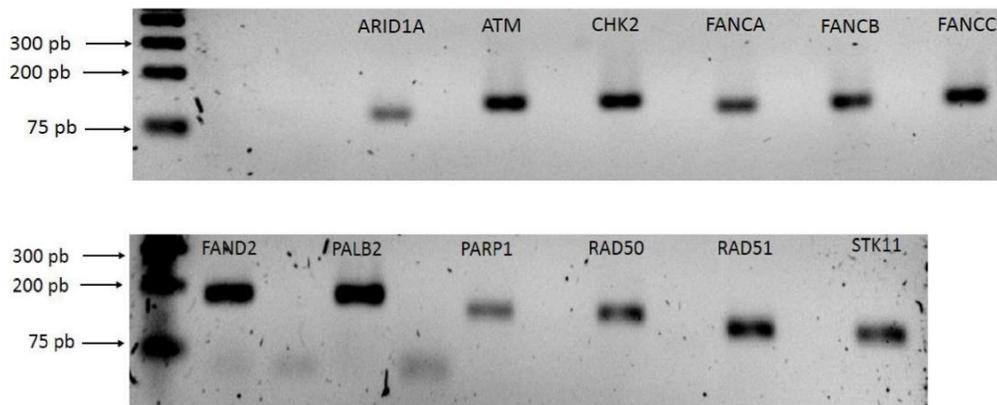
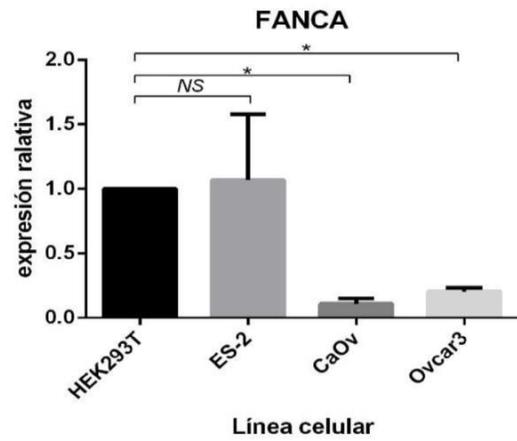
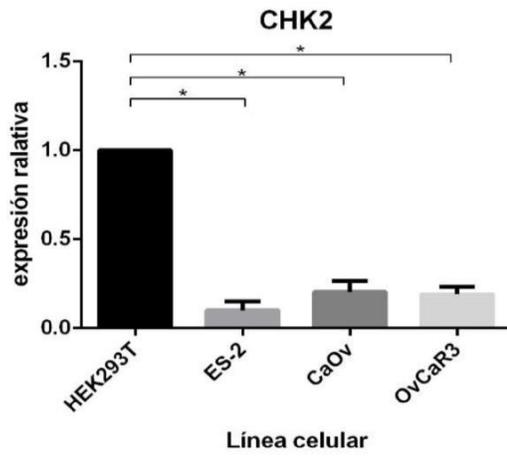
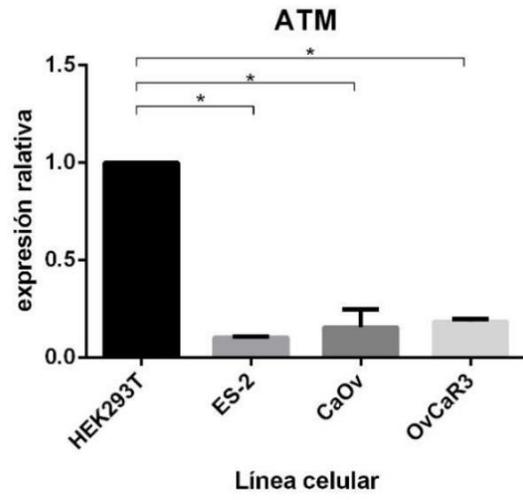
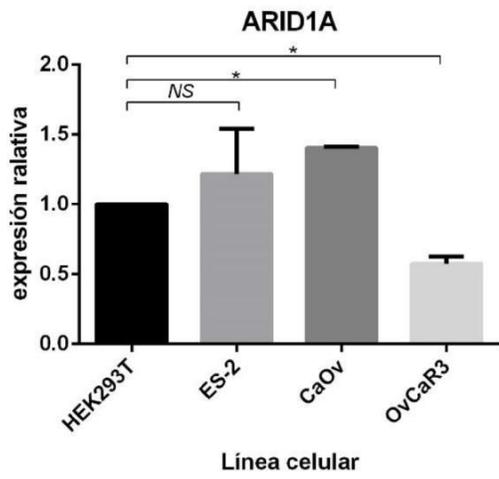
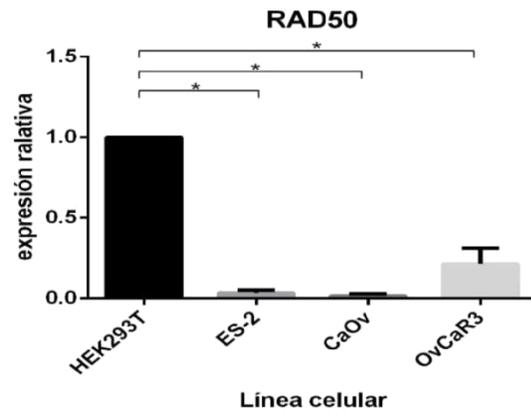
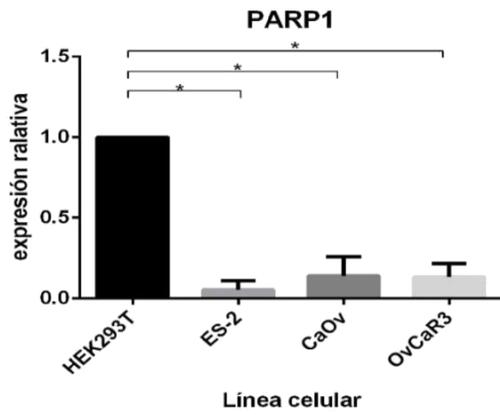
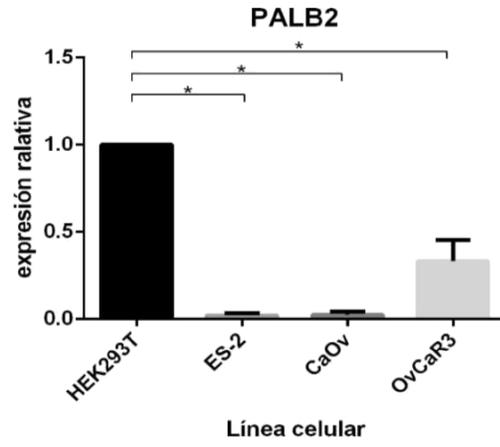
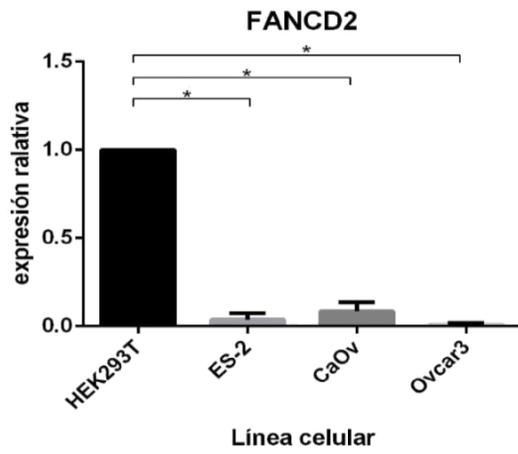
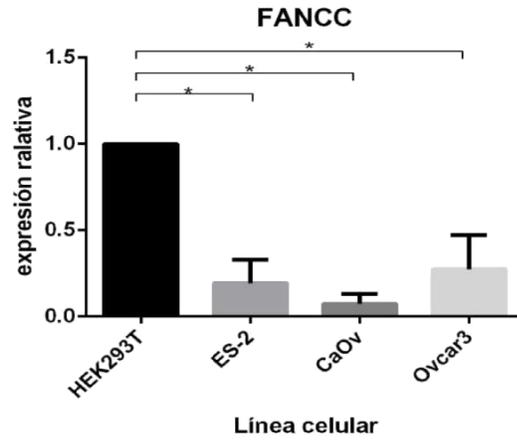
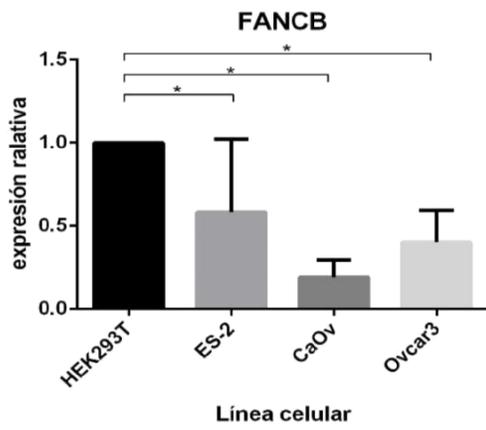


Fig 7.1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR punto final de los doce genes analizados en líneas HEK 273T. En el primer carril de cada gel se observa el marcador de peso molecular, todos los oligonucleótidos fueron diseñados para que sus productos pesaran entre 100 y 150 pb.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación, se midió la expresión relativa de los doce genes por qPCR utilizando GAPDH como gen control endógeno para normalizar la expresión. Se observó una tendencia a la subexpresión de los genes encargados del arresto del ciclo celular, así como los que intervienen en el censo y reparación de daño en las líneas de cáncer de ovario en comparación con la línea no tumoral, lo que sugiere una disminución en la capacidad de mantener la estabilidad genómica por parte de las líneas derivadas de cáncer de ovario (Fig 7.2).





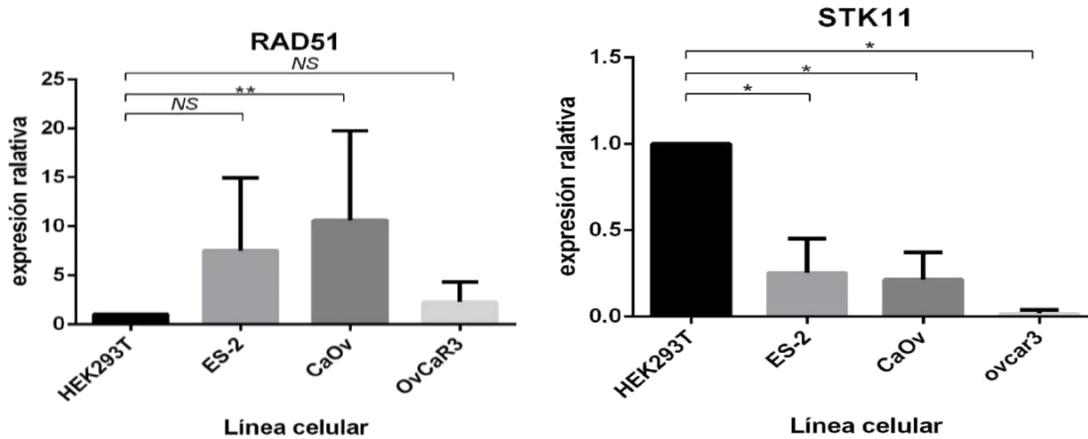


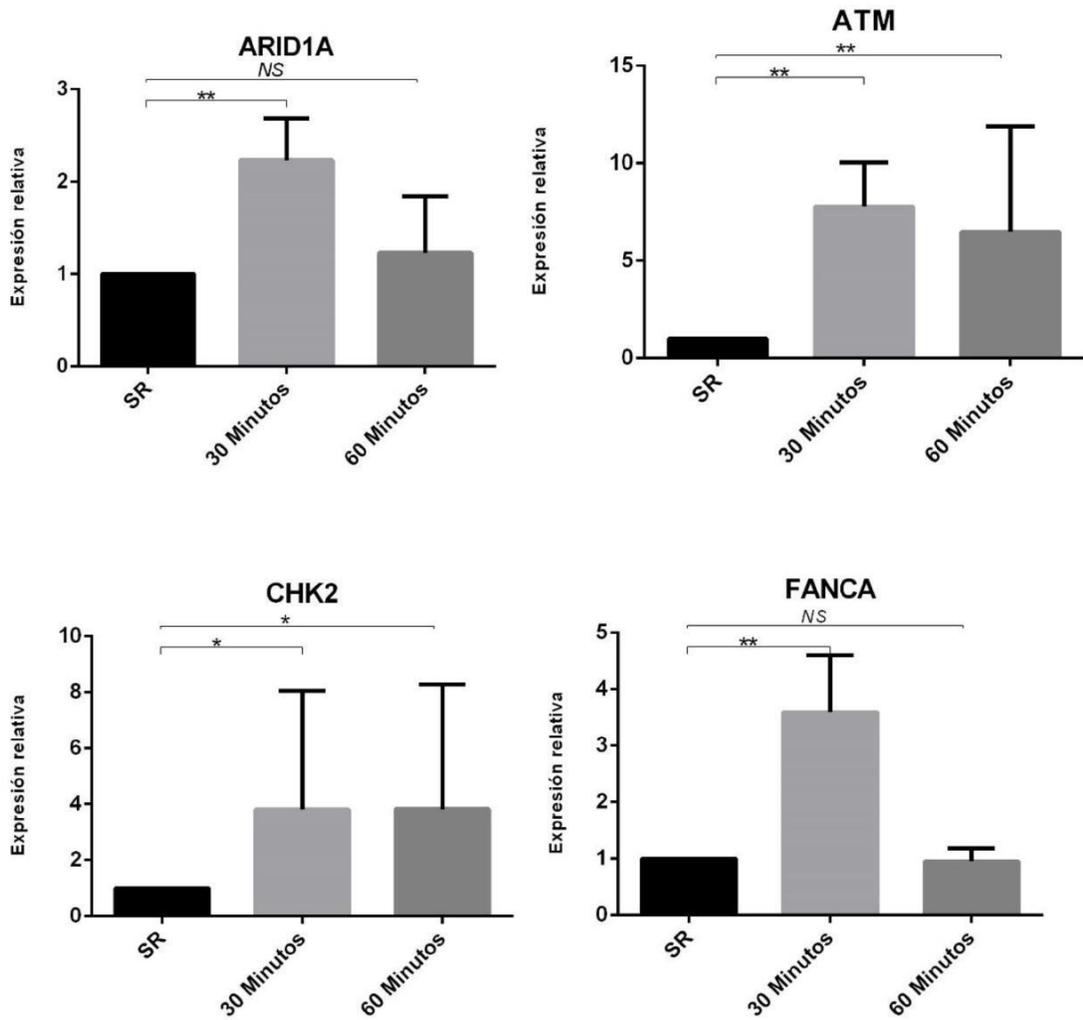
Fig 7.2. Niveles de expresión los genes en líneas de cáncer de ovario en comparación con una línea no tumoral. La mayoría de los genes se encuentran subexpresados en las líneas de cáncer de ovario en comparación con la no tumoral.

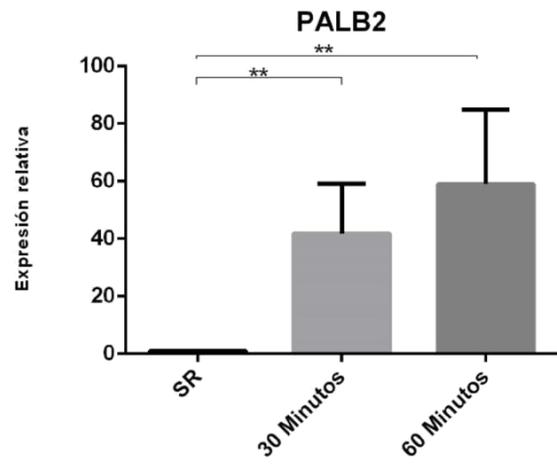
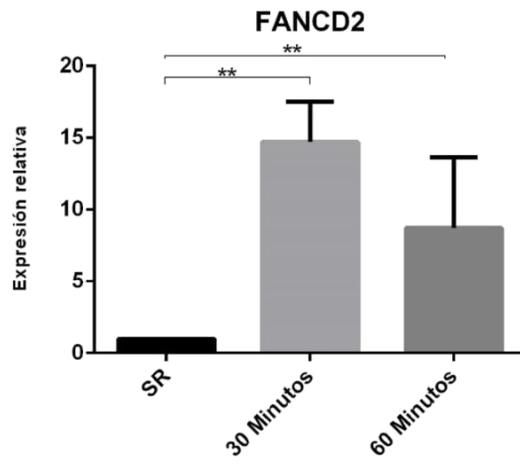
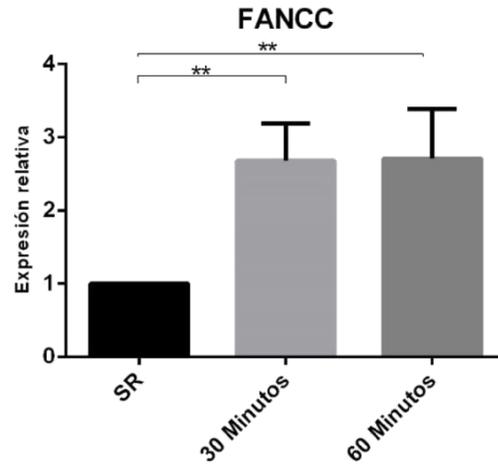
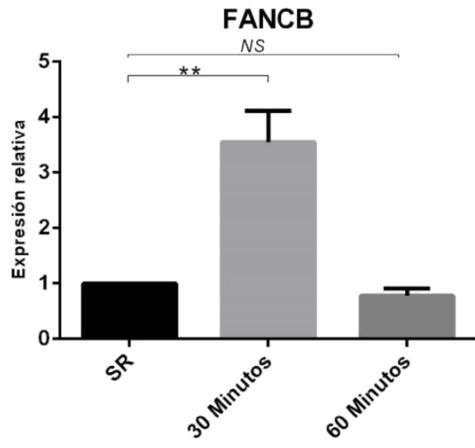
*= $p \leq 0.05$, **= $p \leq 0.01$

Después de observar el perfil de expresión en las líneas celulares se procedió a tratarlas con 20 J de luz UV C para producir ruptura de doble cadena en el DNA y medir el cambio en los niveles de expresión de los genes involucrados en reparación por HR con respecto a los niveles basales (sin radiación). Se encontró una sobreexpresión en los genes encargados del arresto del ciclo celular, así como en aquellos involucrados en apoptosis y mantenimiento de genoma al igual que en los genes encargados propiamente de reparar el daño por HR (Fig. 7.3 y 7.4).

Estas diferencias se vieron aumentadas cuando se analizó la expresión de estos genes 60 minutos después del tratamiento con luz UV C en comparación que cuando se midió 30 minutos después, lo que indica que después de los 30 minutos sigue habiendo respuesta al daño por parte de las células ES-2 y CAOV-3 (Fig 7.3 y 7.4).

En la línea celular Ovar-3 no hubo diferencias al ser irradiadas con 20 Joules así que se aumentó la dosis a 50 Joules para observar la respuesta de esta línea al daño de doble cadena, la respuesta de esta línea fue similar a las otras dos líneas celulares mostrando una sobreexpresión en casi todos los genes (Fig 7.5)





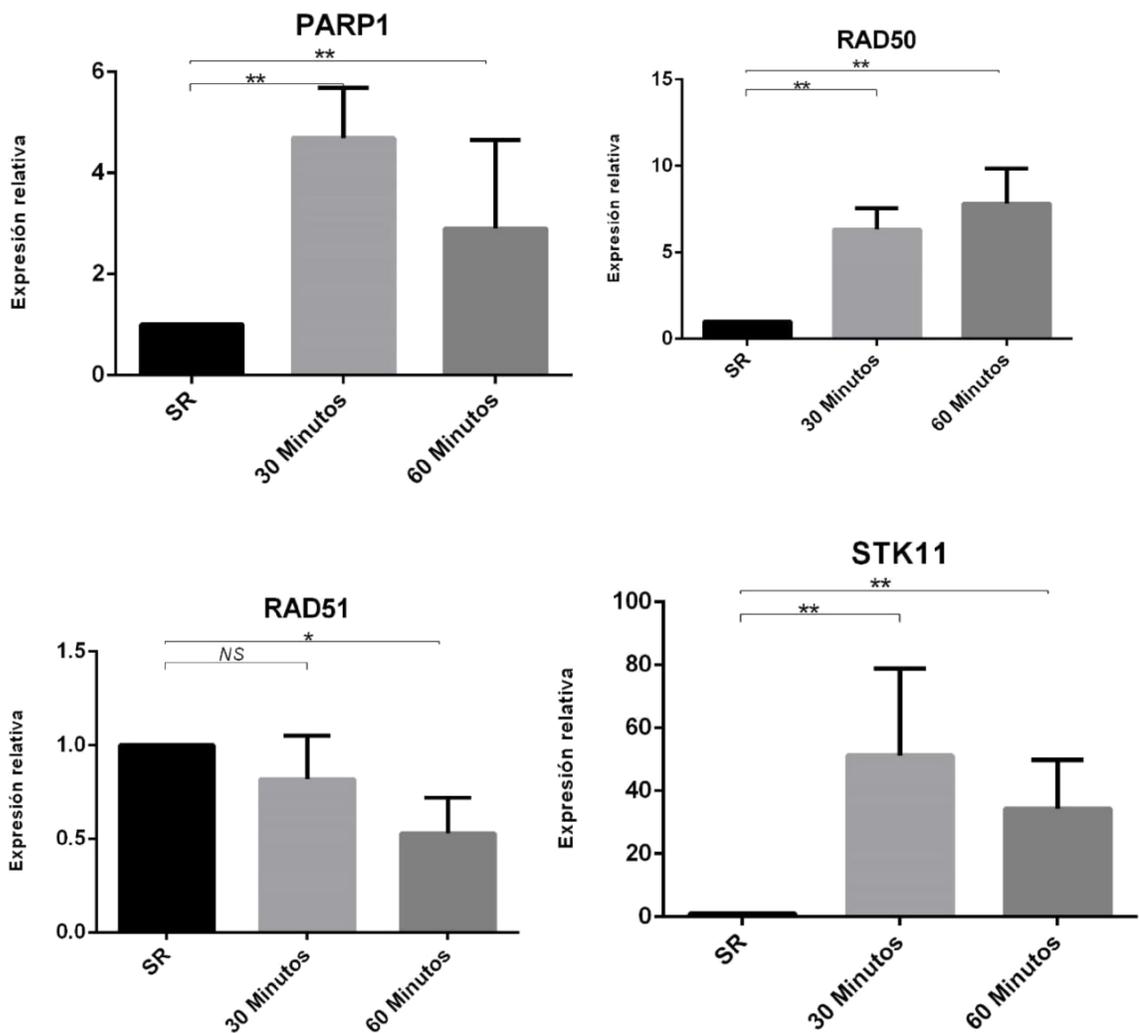
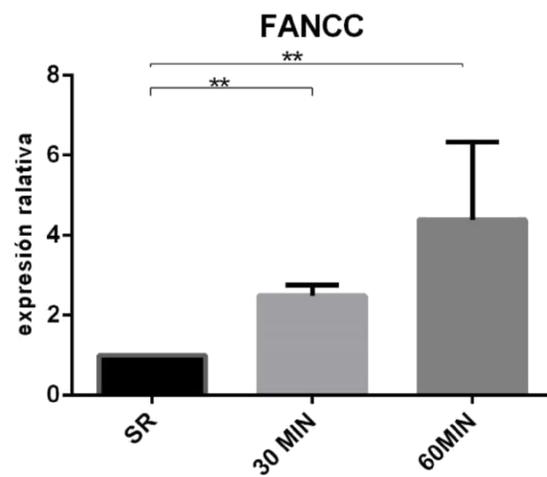
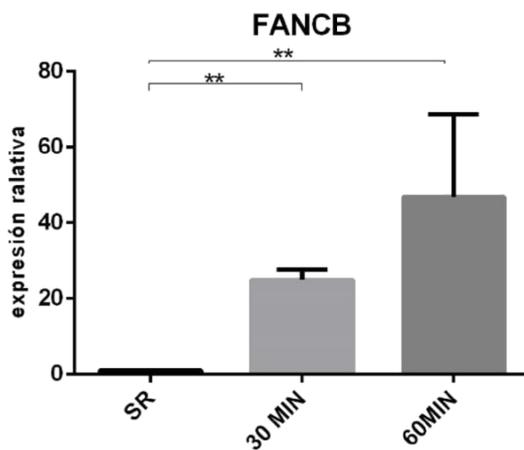
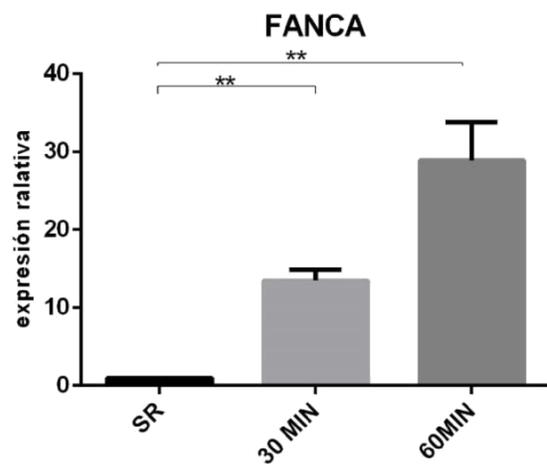
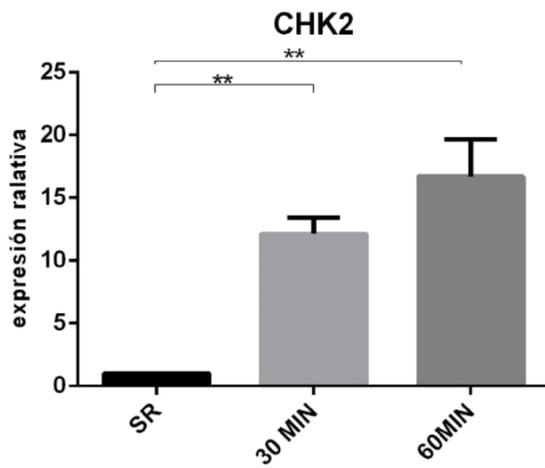
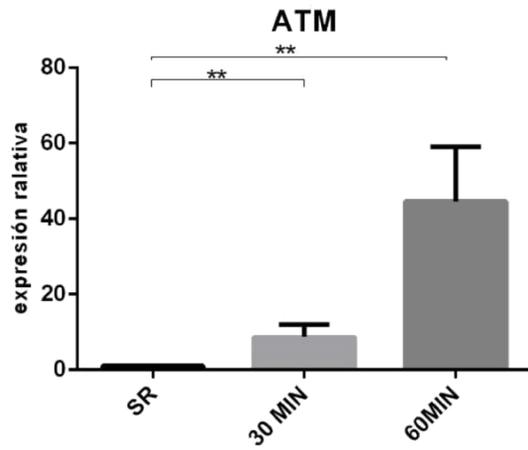
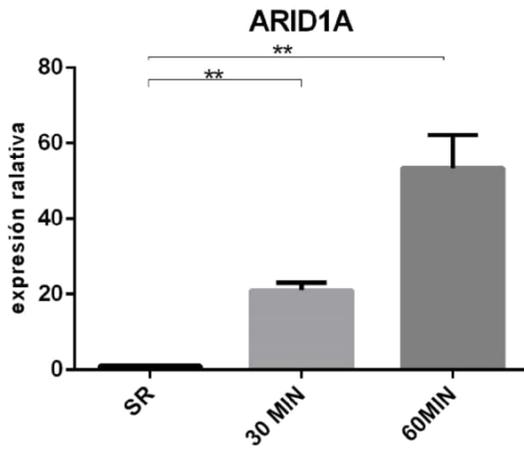


Fig 7.3. Cambio en los niveles de expresión de los genes involucrados en HR en la línea celular ES-2. Hubo un cambio de expresión en la mayoría de los genes como respuesta al daño por UV C pareciendo ser más significativa a los 30 minutos en la mayoría de los genes. $*=p\leq 0.05$, $**=p\leq 0.01$



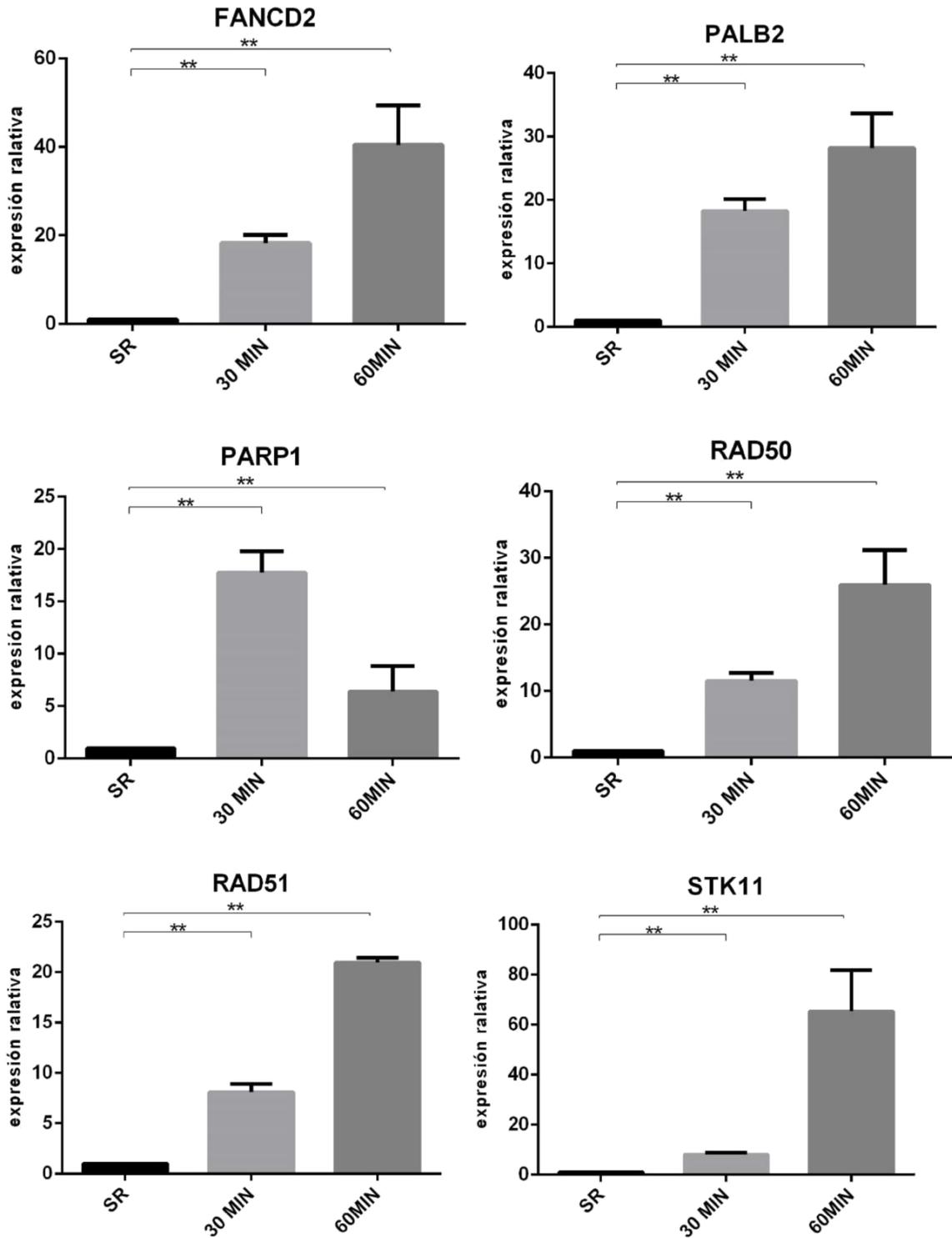
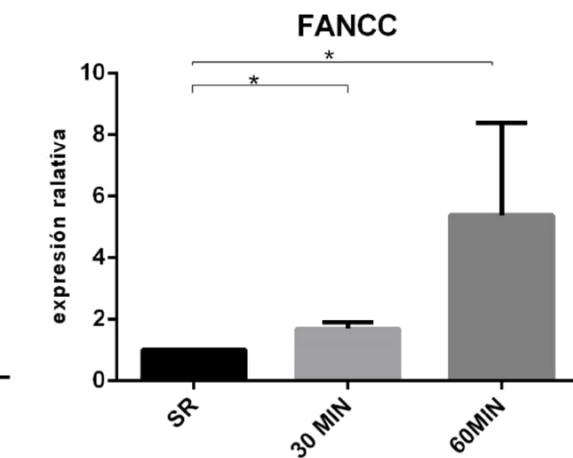
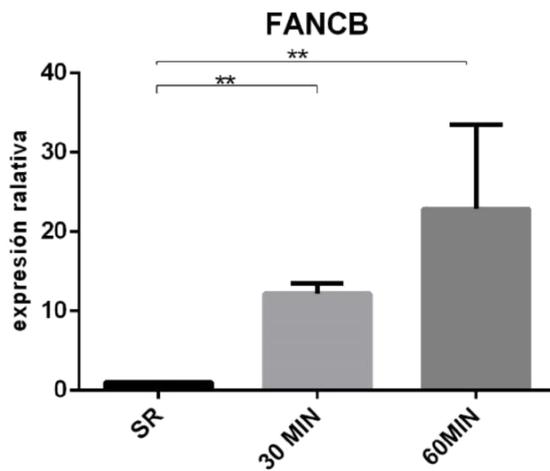
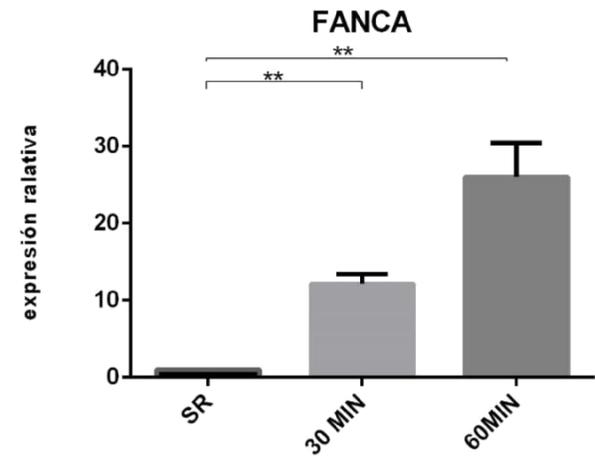
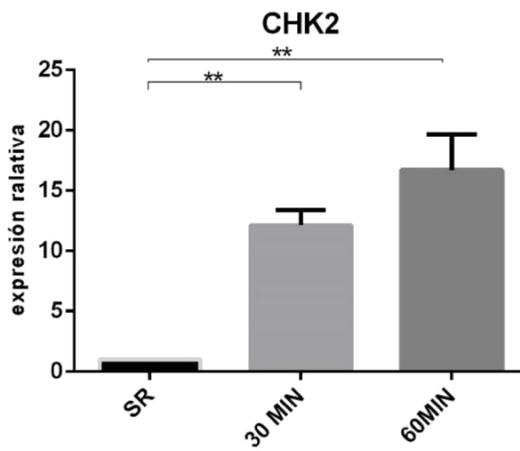
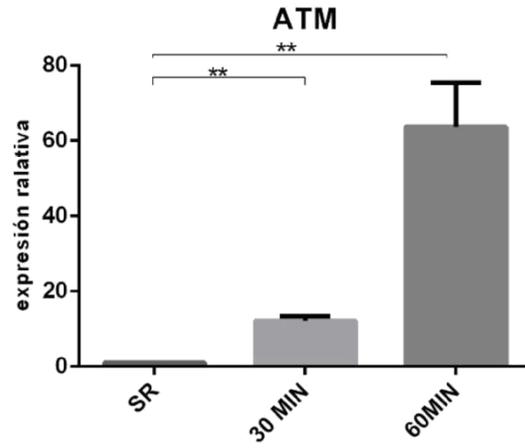
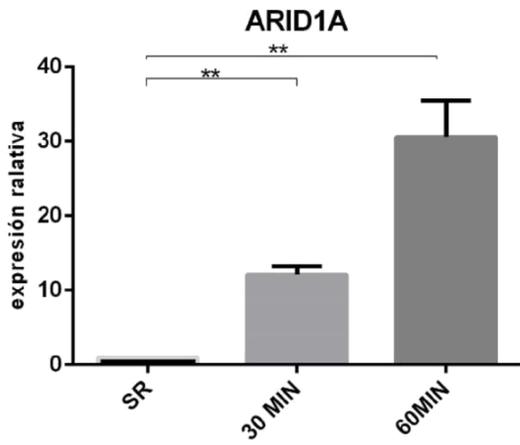


Fig 7.4. Cambio en los niveles de expresión de los genes involucrados en HR en la línea celular CAOV-3. Hubo un cambio de expresión en la mayoría de los genes como

respuesta al daño por UV C pareciendo ser más significativa a los 60 minutos en la mayoría de los genes. $*=p\leq 0.05$, $**=p\leq 0.01$



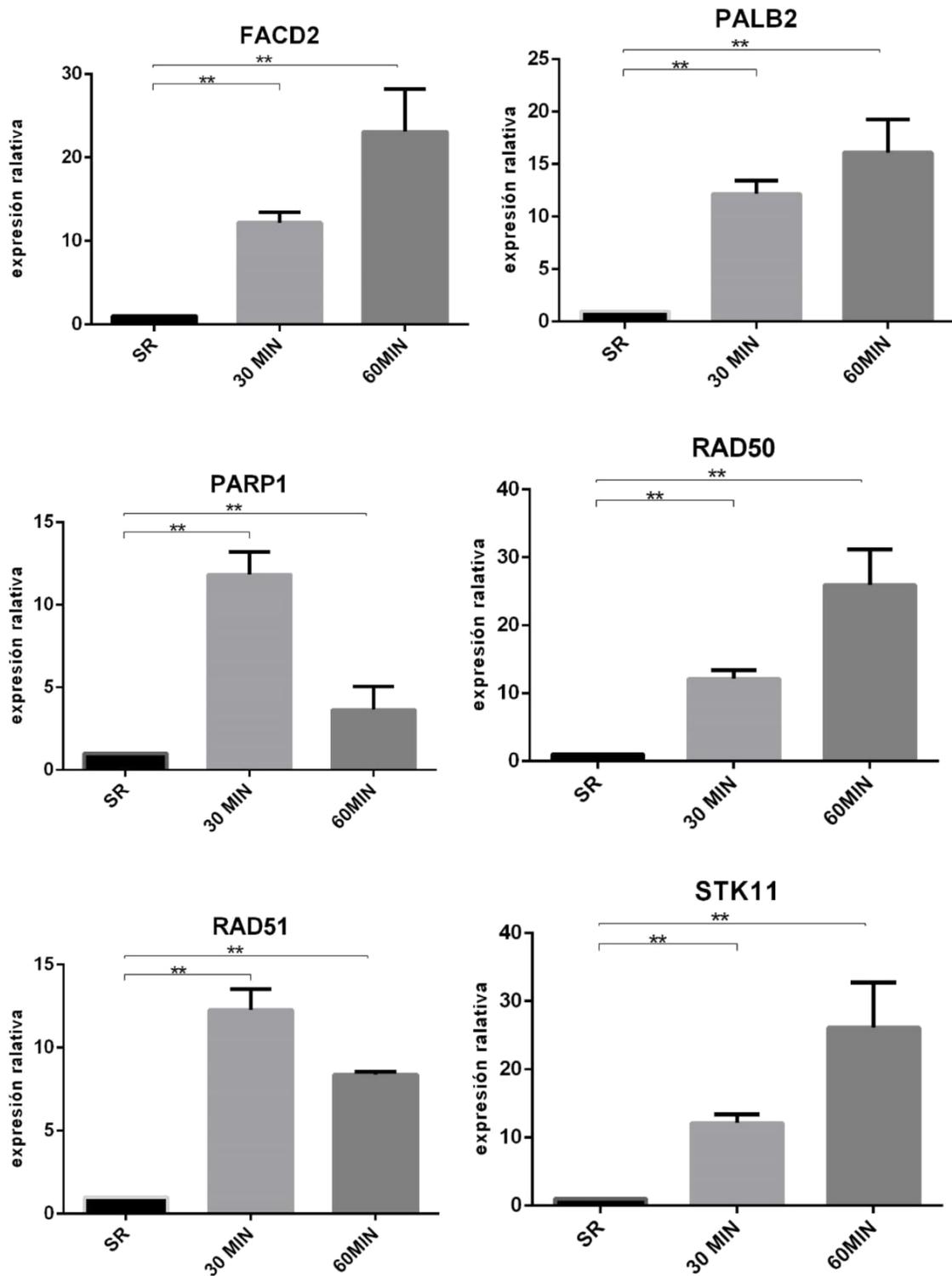
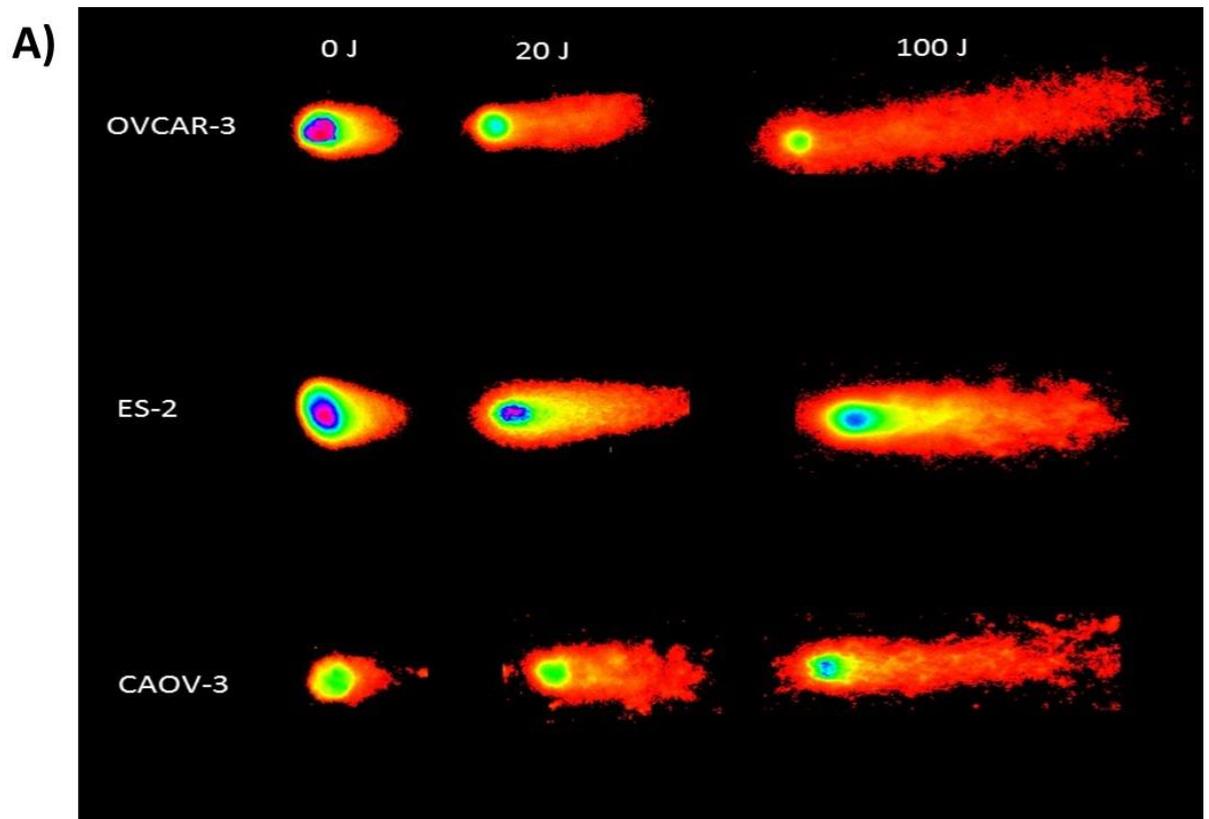


Fig 7.5. Cambio en los niveles de expresión de los genes involucrados en HR en la línea celular OVCAR-3. Hubo un cambio de expresión en la mayoría de los genes como

respuesta al daño CAUSADO POR 50J de UV C después de que a los 20 J no hubiera ninguno. $*=p\leq 0.05$, $**=p\leq 0.01$

Para comprobar que el aumento en la expresión de estos genes se debía a un daño al DNA producido por la luz UV C, se procedió a realizar un ensayo cometa para observar el daño directamente. Se midió el momentum de las colas usando el programa CometScore (Tri Tek Corp, Sumerduck, VA). Se observó un mayor daño en las líneas tratadas con 20 Joules en comparación con las líneas no radiadas. Se radió las células con 100 Joules como control positivo de daño (Fig 7.6).



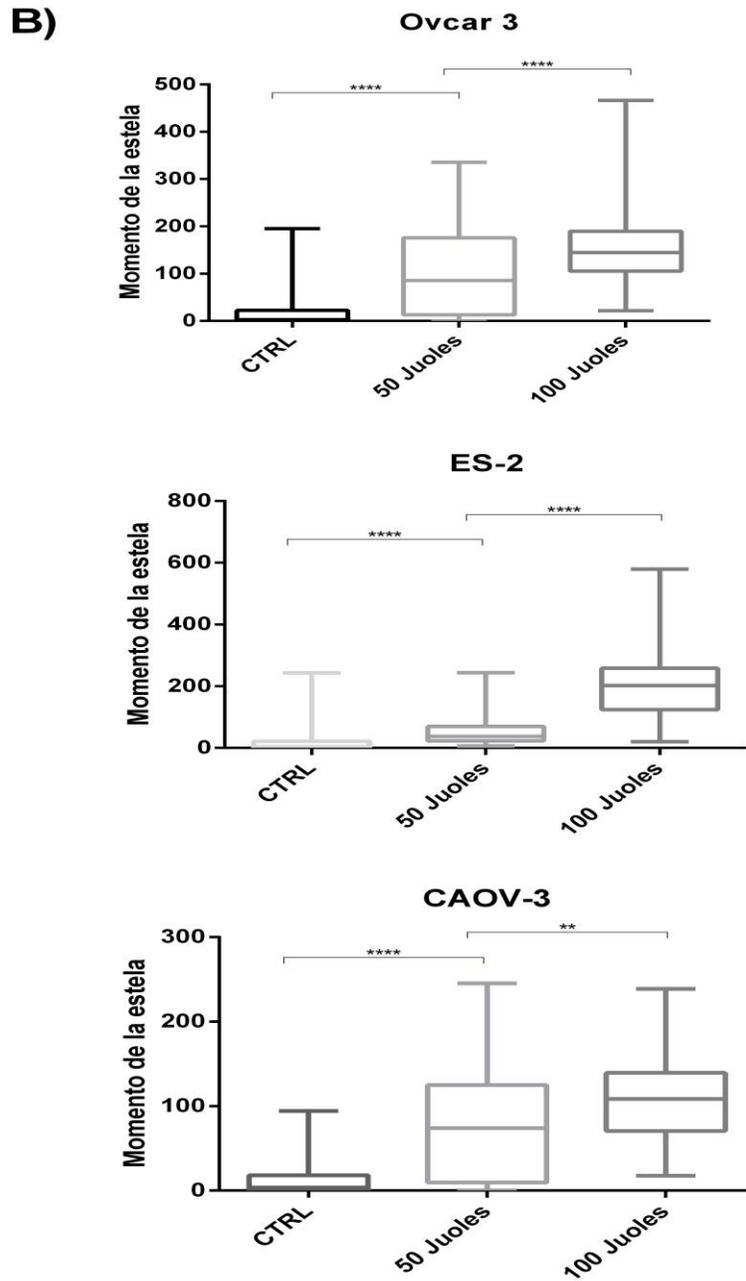
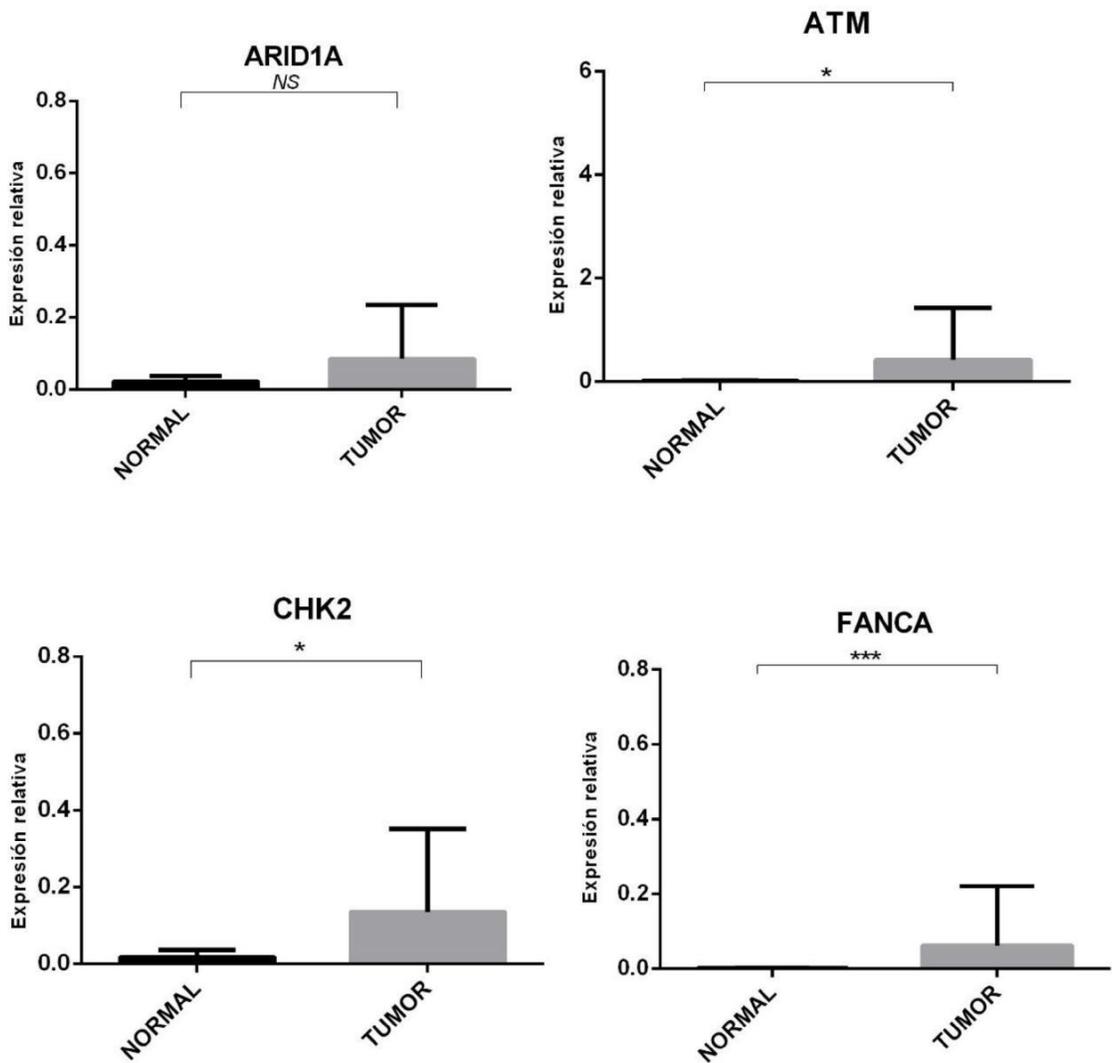
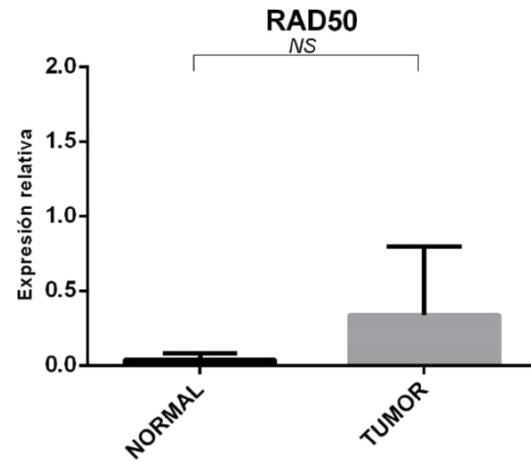
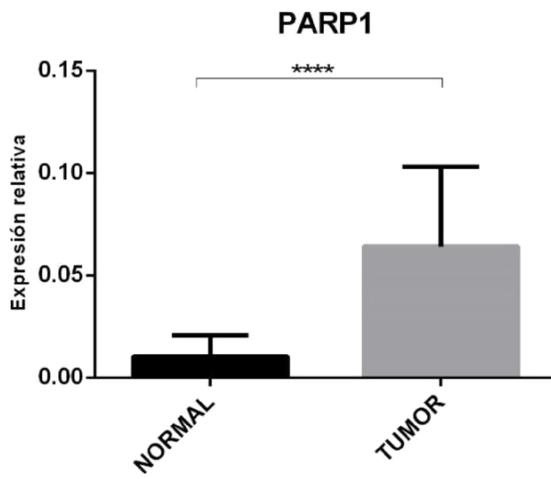
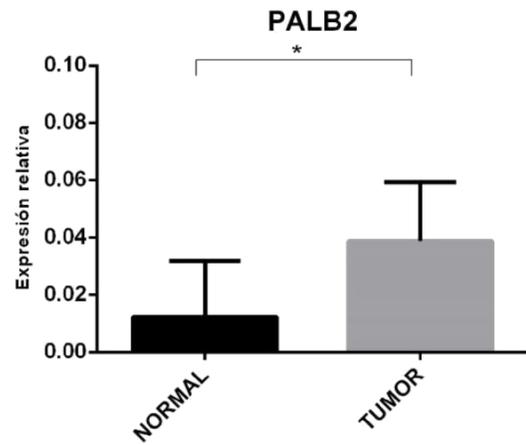
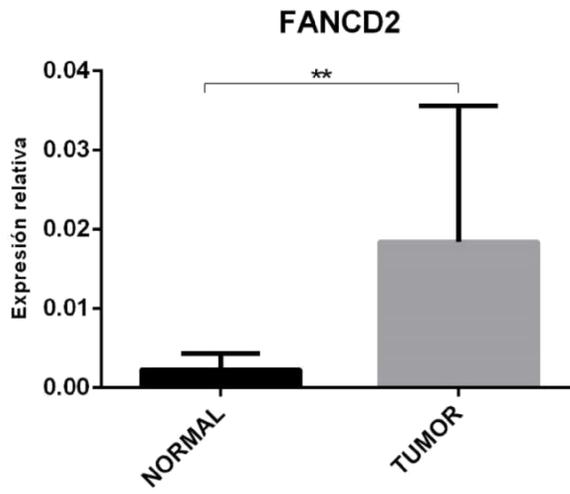
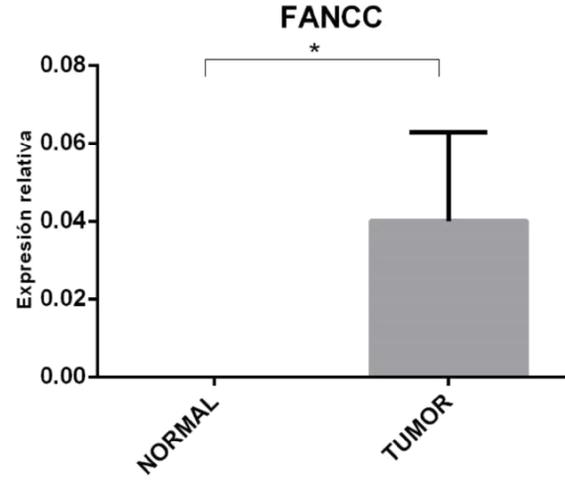
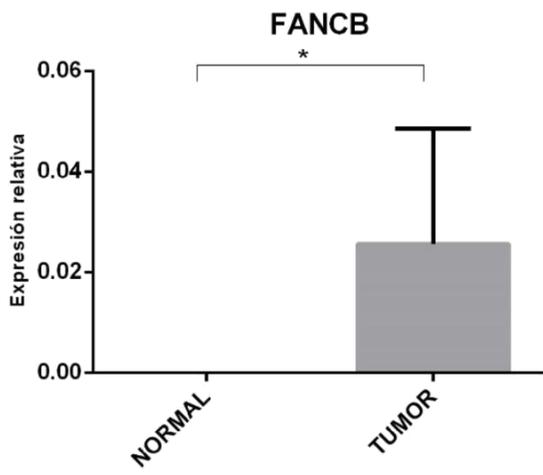


Fig 7.6. Medición de daño al DNA producido por el tratamiento con radiación UV C en las tres líneas celulares de cáncer de ovario. Se observa una cola mayor en los cometas tratados con 20 y cien Joules que en los cometas de las células no radiadas. A) Imagen de los cometas teñidos con bromuro de etidio por microscopia de fluorescencia,

B) Box plot del momento de la cola de los cometas (cantidad de DNA por longitud de la cola). **= $p \leq 0.01$, ****= $p \leq 0.0001$

Una vez teniendo los niveles de expresión de los genes estudiados y su papel en la respuesta contra el daño se dispuso a medir los niveles de expresión de los mismos en biopsias de pacientes con cáncer de ovario epitelial. Al igual que las líneas celulares se observó que en los pacientes con cáncer de ovario había una sobreexpresión en la mayoría de los genes en comparación con las muestras no tumorales (Fig 7.7). Estos pacientes no se han encontrado bajo tratamiento y presentan una sobreexpresión en casi todos los genes.





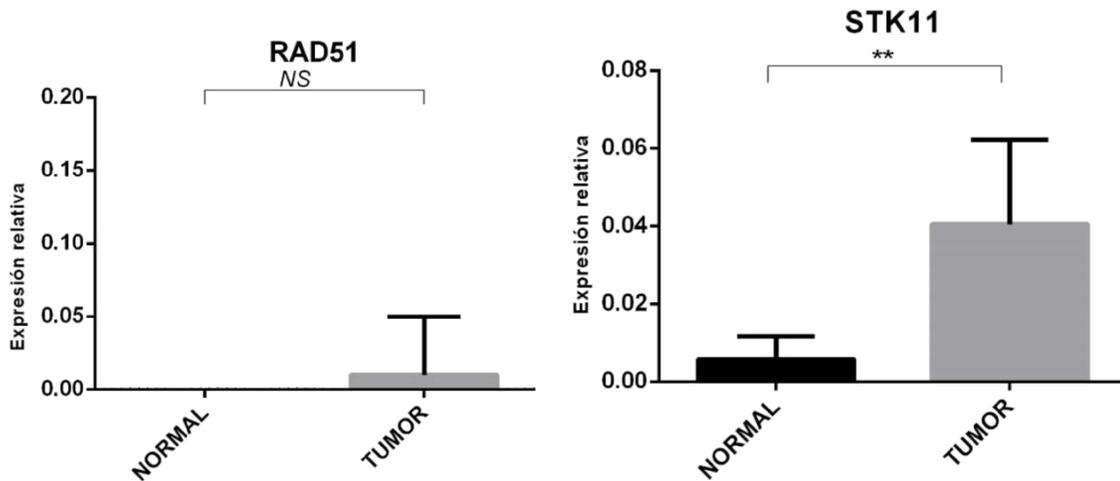


Fig 7.7. Cambio en los niveles de expresión de los genes involucrados en HR biopsias de pacientes con cáncer de ovario. Hay una sobreexpresión en las muestras tumorales de casi todos los genes. No se encontró expresión alguna de RAD51 en ninguna muestra normal. Biopsias de tejido normal n=5, biopsias de tejido tumoral n=26.

*= $p \leq 0.05$, **= $p \leq 0.01$, ****= $p \leq 0.001$

8.-Discusión

Se evaluaron los niveles de expresión de doce genes involucrados a la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga en tres líneas celulares de cáncer de ovario diferentes antes y después de ser radiadas con luz UV C, y se observó que estos genes responden al daño a doble cadena. También se compararon los niveles de expresión de estos genes en biopsias de pacientes con cáncer de ovario contra biopsias de tejido sano.

Los resultados mostraron que en las líneas células de cáncer de ovario los genes están subexpresados en comparación con la línea no tumoral, esto corresponde con la inestabilidad genómica relacionada con el inicio y la progresión del cáncer de ovario, así

como con lo relativamente común que son sus mutaciones en este tipo de cáncer (Bell et al., 2011; Riaz et al., 2017).

Es importante destacar que de estas mutaciones depende no solo el inicio de la carcinogénesis, sino también la respuesta a la terapia. Mutaciones secundarias en estos genes pueden alterar su expresión y dar clonas resistentes a la radio y quimioterapia debido a que evaden la apoptosis subexpresando genes que se encargan del arresto al ciclo celular y apoptosis como CHK2 y BRCA1 y sobreexpresando genes de reparación y sobrevivencia como RAD51 y STK11 (Matulonis et al., 2016; Mylavarapu, Das, & Roy, 2018). La línea ES-2 no presentó diferencias en los niveles de expresión de ARID1A, esto debido a que la línea celular fue obtenida de un cáncer de células claras en el cual ARID1A está mutado en el 50% de los casos (Berns et al., 2018).

La diferencia entre los niveles de expresión de los genes también se debe a que estos, bajo condiciones donde no hay daño, se expresan diferencialmente a lo largo del ciclo celular. Genes como ATM y STK11 se expresan constantemente para mantener la integridad del genoma y en la homeostasis normal de la célula. Sin embargo, genes como RAD51 se expresan preferentemente en las fases S y G2 del ciclo celular mientras que aquellos involucrados en la anemia de Fanconi se expresan solamente durante la replicación del DNA (Ceccaldi, Sarangi, et al., 2016; Zhao et al., 2017).

Al momento de radiar las células con luz UV C todas presentaron un cambio en la expresión de los genes. Se midió la expresión de los genes a 30 y 60 minutos después de ser radiadas debido a que se ha reportado que a estas horas la histona H2AX fosforilada, un marcador de daño al DNA, se encuentra en su máxima expresión (Mylavarapu et al., 2018). La línea ES-2 fue la única que mostró una mayor expresión en la mayoría de los genes a los 30 minutos y no a los 60 minutos mostrando así la expresión de los genes de recombinación homóloga en estas células alcanza su máximo alrededor de los primeros

30 minutos. Esto se ha comprobado por Wan y colaboradores, que en el 2018 demostraron que el nivel de expresión de genes asociados a la reparación del DNA como BRCA2 y RAD51 en líneas ES-2 desciende más rápido que en otras líneas celulares como CAO-3 y SKOV3 (Wan et al., 2018a).

También se ha demostrado que la línea ES-2 presenta resistencia a agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina y cisplatino, ambos fármacos funcionan alterando la integridad al generar entrecruzamientos en el DNA (Wan et al., 2018b).

En las líneas CAO-3 y OVCAR-3, los mayores niveles de expresión se encontraron a los 60 minutos, demostrando que sigue habiendo respuesta al daño por parte de estas células después de los 30 minutos de haberlas radiado. Sin embargo, fue necesario irradiar a la línea OVCAR-3 con 50 J debido a que a 20 J no mostró diferencias en ninguno de sus genes, esto puede deberse a que esta línea celular presenta resistencia alta a agentes genotóxicos como el carboplatino debido a sus altos niveles de GSH (Caffrey & Frenkel, 1992).

Mientras algunos pacientes no responden a la quimioterapia o desarrollan resistencia, la mayoría responden parcialmente al mismo régimen de tratamiento, la mayoría de los pacientes de cáncer de ovario sufren una reincidencia inclusive después de presentar remisión clínica. Esta reincidencia muestra una sensibilidad similar a aquella que se observa en los pacientes con enfermedad primaria que no presentan respuesta a la terapia y la cual tiene un mecanismo fundamentalmente distinto a aquellos con resistencia intrínseca o adquirida.

Por medio de la técnica del ensayo cometa se demostró el daño a doble cadena provocado por la radiación UV C y, con base en esto, se sugiere que la sobreexpresión en estos genes se debe este daño. El ensayo cometa es una técnica a base de una electroforesis en gel de una sola célula para medir daño al DNA, es versátil y

relativamente fácil y sensible. Aunque no ha relación directa entre la cantidad de daño al DNA producido por la radiación y la importancia del daño ni sus características biológicas (por esto la comparación de diferentes sustancias y diferentes sistemas puede ser muy complicado) el ensayo cometa, aunado a otros experimentos, es capaz de revelar la importancia biológica del daño producido. Aunque fue desarrollado para medir daño a una sola hebra, se puede modificar para medir daño a doble cadena. El daño se midió calculando el radio entre la longitud de la cola del cometa y el radio de la cabeza, para esto se utilizó el software Opencomet (Glei et al., 2016; Olive & Banáth, 2006).

Se observó una sobreexpresión en la mayoría de los genes en las biopsias de cáncer de ovario en comparación con las muestras de tejido sano. Este hecho concuerda con las observaciones realizadas de que, antes de que se dé la carcinogénesis, estas vías de reparación está a la baja, lo que incrementa la insensibilidad cromosomal y la posibilidad de adquirir mutaciones, mientras que, una vez que se da la carcinogénesis, esta vía se ve activa, siendo esta una de la principal causa de que el paciente desarrolle resistencia a quimioterapia y radioterapia (Hoppe, Sundar, Tan, & Jeyasekharan, 2018; Kessous et al., 2018; Menon, Karpinskyj, & Gentry-Maharaj, 2018).

No se encontraron diferencias de expresión del gen ARID1A entre las muestras normales y tumorales, esto puede deberse a que ARID1A varía mucho sus niveles de expresión dependiendo de la histología del tumor estando mutado en el 50% de los casos de cáncer de ovario de células claras. Se ha visto que ARID1A se encuentra inactivado en carcinomas diferenciados de ovario y endometrio y que la restauración de su expresión suprime tumores espontáneos de mama en ratones. Sin embargo, ARID1A es el factor epigenético más comúnmente mutado en cáncer y su papel como supresor de tumores está comprobado (Bitler et al., 2017).

9.- Conclusiones

- Se encontró que las líneas celulares de cáncer de ovario tienen subexpresados los genes involucrados en las vías de recombinación homóloga y de anemia de Fanconi, esto con respecto a la línea celular no tumoral
- Se demostró que el aumento en la expresión de los genes involucrados en la vía de anemia de Fanconi y de recombinación homóloga es en respuesta al daño de doble cadena producido por la radiación UV C en las líneas celulares de cáncer de ovario.
- La línea celular OVCAR-3 mostró una baja sensibilidad al daño por la radiación UV C al ser necesario radiarla con 50 J para observar cambios en la activación de las vías.
- Las biopsias de cáncer de ovario mostraron tener sobreexpresados los genes involucrados en ambas vías.

10.- Bibliografía

Ameziane, N., May, P., Haitjema, A., van de Vrugt, H. J., van Rossum-Fikkert, S. E., Ristic, D., ... Dorsman, J. C. (2015). A novel Fanconi anaemia subtype associated with a dominant-negative mutation in RAD51. *Nature Communications*, 6(1), 8829.

<https://doi.org/10.1038/ncomms9829>

Armstrong, D. K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H. Q., Baergen, R., Lele, S., ... Gynecologic Oncology Group. (2006). Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *The New*

England Journal of Medicine, 354(1), 34–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052985>

Asadollahi, R., Hyde, C. A. C., & Zhong, X. Y. (2010). Epigenetics of ovarian cancer: From the lab to the clinic. *Gynecologic Oncology*, 118(1), 81–87.

<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.03.015>

ATCC. (2018). ATCC: The Global Bioresource Center. Retrieved December 5, 2018, from <https://www.atcc.org/>

Baker, S., Dahele, M., Lagerwaard, F. J., & Senan, S. (2016). A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer.

<https://doi.org/10.1186/s13014-016-0693-8>

Barker, H. E., Paget, J. T. E., Khan, A. A., & Harrington, K. J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 409–425. <https://doi.org/10.1038/nrc3958>

Barroso, E., Pita, G., Arias, J. I., Menendez, P., Zamora, P., Blanco, M., ... Ribas, G. (2009). The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features. *Breast Cancer Research and Treatment*, 118(3), 655–660.

<https://doi.org/10.1007/s10549-009-0439-5>

Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, 109 Suppl, S45-55. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983152>

Bast, R. C., Hennessey, B., & Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 415–428.

<https://doi.org/10.1038/nrc2644>

Batra, S., Nayak, H., & Dave, K. S. (2012). Role of Neoadjuvant Chemotherapy (NACT)

Followed by Surgical Cytoreduction in Advanced Epithelial Ovarian Cancer. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 62(5), 541–545. <https://doi.org/10.1007/s13224-011-0106-8>

Bell, D., Berchuck, A., Birrer, M., Chien, J., Cramer, D. W., Dao, F., ... Thomson, E. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nature10166>

Benitez, A., Yuan, F., Nakajima, S., Wei, L., Qian, L., Myers, R., ... Zhang, Y. (2014). Damage-dependent regulation of MUS81-EME1 by Fanconi anemia complementation group A protein. *Nucleic Acids Research*, 42(3), 1671–1683. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt975>

Berns, K., Caumanns, J. J., Hijmans, E. M., Gennissen, A. M. C., Severson, T. M., Evers, B., ... Bernards, R. (2018). ARID1A mutation sensitizes most ovarian clear cell carcinomas to BET inhibitors. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0300-6>

Bhattacharya, S., Srinivasan, K., Abdisalaam, S., Su, F., Raj, P., Dozmorov, I., ... Asaithamby, A. (2017). RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity. *Nucleic Acids Research*, 45(8), 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx126>

Bitler, B. G., Wu, S., Park, P. H., Hai, Y., Aird, K. M., Wang, Y., ... Zhang, R. (2017). ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity. *Nature Cell Biology*, 19(8), 962–973. <https://doi.org/10.1038/ncb3582>

Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150019>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36

cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.

<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Buisson, R., & Masson, J.-Y. (2012). PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, *40*(20), 10312–10323.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks807>

Caffrey, P. B., & Frenkel, G. D. (1992). Selenite cytotoxicity in drug resistant and nonresistant human ovarian tumor cells. *Cancer Research*, *52*(17), 4812–4816. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511444>

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, *26*(1), 52–64.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>

Ceccaldi, R., Sarangi, P., & D'Andrea, A. D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(6), 337–349.

<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.48>

Che, R., Zhang, J., Nepal, M., Han, B., & Fei, P. (2018). Multifaceted Fanconi Anemia Signaling. *Trends in Genetics*, *34*(3), 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.006>

Cline, S. D., & Hanawalt, P. C. (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*(5), 361–373. <https://doi.org/10.1038/nrm1101>

Das, P. M., & Bast, R. C. (2008). Early detection of ovarian cancer. *Biomark Med*, *2*(3), 291–303. <https://doi.org/10.2217/17520363.2.3.291>

de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D. C., Dekker, C., Kanaar, R., & Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular Cell*, *8*(5), 1129–1135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741547>

- DiSaia, P. J., Creasman, W. T., Mannel, R. S., McMeekin, D. S., & Mutch, D. G. (2018). *Oncología Ginecológica Clínica* (9th ed.).
- Du, W., Amarachintha, S., Erden, O., Wilson, A., Meetei, A. R., Andreassen, P. R., ... Pang, Q. (2015). Fancb deficiency impairs hematopoietic stem cell function. *Scientific Reports*, 5(1), 18127. <https://doi.org/10.1038/srep18127>
- Espinha, G., Osaki, J. H., Tosoni Costa, E., & Forti, F. L. (2016). Inhibition of the RhoA GTPase Activity Increases Sensitivity of Melanoma Cells to UV Radiation Effects. <https://doi.org/10.1155/2016/2696952>
- Esteve-Puig, R., Gil, R., González-Sánchez, E., Bech-Serra, J. J., Grueso, J., Hernández-Losa, J., ... Recio, J. Á. (2014). A Mouse Model Uncovers LKB1 as an UVB-Induced DNA Damage Sensor Mediating CDKN1A (p21WAF1/CIP1) Degradation. *PLoS Genetics*, 10(10), e1004721. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004721>
- Evers, B., Helleday, T., & Jonkers, J. (2010). Targeting homologous recombination repair defects in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(8), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.06.001>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Foo, T. K., Tischkowitz, M., Simhadri, S., Boshari, T., Zayed, N., Burke, K. A., ... Xia, B. (2017). Compromised BRCA1–PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene*, 36(29), 4161–4170. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.46>
- Gillet, J.-P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). the Clinical relevance of Cancer Cell Lines. *J Natl Cancer Inst*, 105, 452–458. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>

- Glei, M., Schneider, T., & Schlörmann, W. (2016). Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Archives of Toxicology*, *90*(10), 2315–2336.
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y>
- Haber, J. E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends in Genetics : TIG*, *16*(6), 259–264. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10827453>
- Harrington, K. J., Billingham, L. J., Brunner, T. B., Burnet, N. G., Chan, C. S., Hoskin, P., ... Group, W. (2011). The Christie NHS Foundation Trust, Manchester, UK; and the Christie NHS Foundation Trust. *British Journal of Cancer*, *7*, 628–639.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.240>
- Hays, L. E., Zodrow, D. M., Yates, J. E., Deffebach, M. E., Jacoby, D. B., Olson, S. B., ... Bagby, G. C. (2008). Cigarette smoke induces genetic instability in airway epithelial cells by suppressing FANCD2 expression. *British Journal of Cancer*, *98*(10), 1653–1661.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604362>
- Hoppe, M. M., Sundar, R., Tan, D. S. P., & Jeyasekharan, A. D. (2018). Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy085>
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Durkin, S. G., D'Andrea, A. D., & Glover, T. W. (2005). The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability. *Human Molecular Genetics*, *14*(5), 693–701.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi065>
- Inano, S., Sato, K., Katsuki, Y., Kobayashi, W., Tanaka, H., Nakajima, K., ... Takata, M. (2017). RFD3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. *Molecular Cell*, *66*(5), 622–

634.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.022>

- Karran, P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(2), 144–150. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753787>
- Kee, Y., Kim, J. M., D'Andrea, A. D., & D'Andrea, A. (2009). Regulated degradation of FANCM in the Fanconi anemia pathway during mitosis. *Genes & Development*, 23(5), 555–560. <https://doi.org/10.1101/gad.1761309>
- Kessous, R., Oceau, D., Klein, K., Tonin, P. N., Greenwood, C. M. T., Pelmus, M., ... Gotlieb, W. H. (2018). Distinct homologous recombination gene expression profiles after neoadjuvant chemotherapy associated with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 148(3), 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.01.017>
- Kim, T. M., Ko, J. H., Choi, Y. J., Hu, L., & Hasty, P. (2011). The phenotype of FancB-mutant mouse embryonic stem cells. *Mutation Research*, 712(1–2), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.010>
- Knipscheer, P., Raschle, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T. V., Scharer, O. D., ... Walter, J. C. (2009). The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Science*, 326(5960), 1698–1701. <https://doi.org/10.1126/science.1182372>
- Ko, H. L., & Ren, E. C. (2012). Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules*, 2(4), 524–548. <https://doi.org/10.3390/biom2040524>
- Lafrance-Vanasse, J., Williams, G. J., & Tainer, J. A. (2015). Envisioning the dynamics and flexibility of Mre11-Rad50-Nbs1 complex to decipher its roles in DNA replication and repair.

Progress in Biophysics and Molecular Biology, 117(2–3), 182–193.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.004>

Lee, J.-H., & Paull, T. T. (2004). Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex. *Science*, 304(5667), 93–96.

<https://doi.org/10.1126/science.1091496>

Lima, M., Bouzid, H., Soares, D. G., Selle, F., Morel, C., Galmarini, C. M., ... Escargueil, A. E. (2016). Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair. *Oncotarget*, 7(18), 25885–25901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8292>

Magni, M., Ruscica, V., Buscemi, G., Kim, J.-E., Nachimuthu, B. T., Fontanella, E., ... Zannini, L. (2014). Chk2 and REGγ-dependent DBC1 regulation in DNA damage induced apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 42(21), 13150–13160. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1065>

Mah, L.-J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), 679–686. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>

Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., & Karlan, B. Y. (2016). Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16061.

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>

Menon, U., Karpinskyj, C., & Gentry-Maharaj, A. (2018). Ovarian Cancer Prevention and Screening. *Obstetrics & Gynecology*, 131(5), 909–927.

<https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002580>

Mimitou, E. P., & Symington, L. S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(5), 264–272.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.01.010>

- Miné-Hattab, J., & Rothstein, R. (2013). DNA in motion during double-strand break repair. *Trends in Cell Biology*, 23(11), 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.05.006>
- Montes de Oca, R., Andreassen, P. R., Margossian, S. P., Gregory, R. C., Taniguchi, T., Wang, X., ... D'Andrea, A. D. (2005). Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood*, 105(3), 1003–1009. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3997>
- Mylavarapu, S., Das, A., & Roy, M. (2018). Role of BRCA Mutations in the Modulation of Response to Platinum Therapy. *Frontiers in Oncology*, 8, 16. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00016>
- NCI. (2018a). Definition of chemotherapy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Retrieved October 31, 2018, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/chemotherapy>
- NCI. (2018b). Radiotherapy. Retrieved December 4, 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>
- NCI. (2018c). Treatment for Cancer - National Cancer Institute. Retrieved December 4, 2018, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>
- Nepal, M., Che, R., Zhang, J., Ma, C., & Fei, P. (2017, December). Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends in Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.005>
- O'Kane, G. M., Connor, A. A., & Gallinger, S. (2017a). Characterization, Detection, and Treatment Approaches for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 23(12), 1121–1137. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.10.007>
- O'Kane, G. M., Connor, A. A., & Gallinger, S. (2017b). Characterization, Detection, and Treatment Approaches for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *Trends in*

Molecular Medicine, 23(12), 1121–1137. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.10.007>

Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>

Ozaki, T., Nakamura, M., & Shimozato, O. (2015). Novel Implications of DNA Damage Response in Drug Resistance of Malignant Cancers Obtained from the Functional Interaction between p53 Family and RUNX2. *Biomolecules*, 5(4), 2854–2876. <https://doi.org/10.3390/biom5042854>

Park, J.-Y., Singh, T. R., Nassar, N., Zhang, F., Freund, M., Hanenberg, H., ... Andreassen, P. R. (2014). Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*, 33(40), 4803–4812. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.421>

Puckett, C. A., Ernst, R. J., & Barton, J. K. (2010). Exploring the cellular accumulation of metal complexes. *Dalton Trans.*, 39(5), 1159–1170. <https://doi.org/10.1039/B922209J>

Renaud, E., & Rosselli, F. (2013). FANC Pathway Promotes UV-Induced Stalled Replication Forks Recovery by Acting Both Upstream and Downstream Polg and Rev1. *PLoS ONE*, 8(1), 53693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053693>

Riaz, N., Blecua, P., Lim, R. S., Shen, R., Higginson, D. S., Weinhold, N., ... Reis-Filho, J. S. (2017). Pan-cancer analysis of bi-allelic alterations in homologous recombination DNA repair genes. *Nature Communications*, 8(1), 857. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00921-w>

Roos, W. P., Thomas, A. D., & Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 20–33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>

- Sarbajna, S., & West, S. C. (2014). Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(9), 409–419.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.07.003>
- Sarkar, S., Rajput, S., Kumar Tripathi, A., & Mandal, M. (2013). *Targeted therapy against EGFR and VEGFR using ZD6474 enhances the therapeutic potential of UV-B phototherapy in breast cancer cells. Molecular Cancer* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-122>
- Schaue, D., & McBride, W. H. (2015). Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(9), 527–540.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.120>
- Shen, J., Peng, Y., Wei, L., Zhang, W., Yang, L., Lan, L., ... Peng, G. (2015). ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Discovery*, 5(7), 752–767. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0849>
- Shkreta, L., & Chabot, B. (2015). The RNA Splicing Response to DNA Damage. *Biomolecules*, 5(4), 2935–2977. <https://doi.org/10.3390/biom5042935>
- Sinha, S., Singh, R. K., Alam, N., Roy, A., Roychoudhury, S., & Panda, C. K. (2008). Alterations in candidate genes PHF2, FANCC, PTCH1 and XPA at chromosomal 9q22.3 region: pathological significance in early- and late-onset breast carcinoma. *Molecular Cancer*, 7(1), 84. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-84>
- Srivastava, M., & Raghavan, S. C. (2015). DNA Double-Strand Break Repair Inhibitors as Cancer Therapeutics. *Chemistry & Biology*, 22(1), 17–29.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.11.013>
- Swisher, E. M., Gonzalez, R. M., Taniguchi, T., Garcia, R. L., Walsh, T., Goff, B. A., & Welch, P. (2009). Methylation and protein expression of DNA repair genes: association with

- chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas. *Molecular Cancer*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-48>
- Todua, F., Gagua, R., Maglakelidze, M., & Maglakelidze, D. (2015). Cancer incidence and mortality - Major patterns in GLOBOCAN 2012, worldwide and Georgia. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, 9(1), 168–173. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Wan, B., Dai, L., Wang, L., Zhang, Y., Huang, H., Qian, G., & Yu, T. (2018a). Knockdown of BRCA2 enhances cisplatin and cisplatin-induced autophagy in ovarian cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 25(1), 69–82. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0261>
- Wan, B., Dai, L., Wang, L., Zhang, Y., Huang, H., Qian, G., & Yu, T. (2018b). Knockdown of BRCA2 enhances cisplatin and cisplatin-induced autophagy in ovarian cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 25(1), 69–82. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0261>
- Wang, A. T., Kim, T., Wagner, J. E., Conti, B. A., Lach, F. P., Huang, A. L., ... Smogorzewska, A. (2015). A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Molecular Cell*, 59(3), 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.009>
- Watts, F. (2016). Repair of DNA Double-Strand Breaks in Heterochromatin. *Biomolecules*, 6(4), 47. <https://doi.org/10.3390/biom6040047>
- Wexselblatt, E., Yavin, E., & Gibson, D. (2012). Cellular interactions of platinum drugs. *Inorganica Chimica Acta*, 393, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.07.013>
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 39(35), 8113–8127. <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>
- Wilding, J. L., & Bodmer, W. F. (2014). Cancer cell lines for drug discovery and development.

Cancer Research, 74(9), 2377–2384. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2971>

- World Cancer Research Fund/ American Institute of Cancer Research (WCRF/AICR). (2018). Diet , nutrition , physical activity and breast cancer. *Continuous Update Project*. Retrieved from <http://www.aicr.org/continuous-update-project/reports/breast-cancer-report-2017.pdf>
- Zhang, S., Royer, R., Li, S., McLaughlin, J. R., Rosen, B., Risch, H. A., ... Narod, S. A. (2011). Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 121(2), 353–357. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.01.020>
- Zhao, X., Wei, C., Li, J., Xing, P., Li, J., Zheng, S., & Chen, X. (2017). Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49(8), 655–668. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx055>
- Zhou, B. B., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433–439. <https://doi.org/10.1038/35044005>
- Zhu, X.-D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J. H. J., & Lange, T. de. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genetics*, 25(3), 347–352. <https://doi.org/10.1038/77139>