

Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Biotecnología

Análisis del efecto de un tratamiento combinado con APR-246 y carboplatino sobre la viabilidad de líneas de cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario seroso de alto grado a través de la vía Aurora quinasa-p53



TRABAJO FINAL DE MÁSTER EN
BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA
(2019-2020)

STEFANY KARINA EGUEZ RIOFRIO

Tutor del proyecto: Dra. Begoña Pineda Merlo.

Cotutor del proyecto: Dr. Alejandro Pérez Fidalgo.

Tutor UPV: María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis tutores la Dra. Begoña Pineda y el Dr. Alejandro Pérez Fidalgo, por permitirme formar parte de este grupo de investigación y transmitirme su pasión por la investigación y la oncología.

Al estudiante predoctoral Juan José Martínez Pretel y amigo que me ha enseñado, apoyado y orientado durante todo este periodo. Gracias por quedarte los viernes hasta tarde solo por acompañarme y reservarme siempre un sitio en la campana.

Al equipo del laboratorio de Fisiología y la Unidad de Cáncer de Mama de la Universidad de Valencia que me abrieron las puertas y me recibieron como una más del equipo.

A todos mis compañeros de máster con los que compartí esta experiencia con tantas subidas y bajadas de emociones.

A mis amigos que desde la distancia me han dado ánimos para continuar adelante con este proyecto.

A Jude por su ayuda y comprensión en todo momento, y por siempre hacerme sonreír cuando más lo necesitaba.

A mi madre y a mi hermana por su apoyo incondicional en cada uno de mis proyectos y por aportarme la fuerza para resolver cualquier problema.

Sin vosotros no lo habría conseguido.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. MECANISMO DE SUPRESIÓN TUMORAL DE P53.....	9
1.2. AURORA QUINASAS	10
1.2.1. Localización y función de las Aurora Quinasas	10
1.2.2. Las Aurora quinasas y el cáncer.....	12
1.2.3. Regulación entre AURK y p53.....	12
1.3. APR-246: COMPONENTE ANTICANCERÍGENO.....	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR	17
3.2. SECUENCIACIÓN DEL GEN TP53 EN LÍNEAS CELULARES	17
3.3. FÁRMACOS UTILIZADOS.....	17
3.4. DETERMINACIÓN DEL IC ₅₀ DE APR-246 Y CARBOPLATINO	18
3.4.1. Ensayo de viabilidad celular.....	18
3.4.2. Determinación del IC ₅₀	19
3.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE LOS FÁRMACOS	19
3.6. ANÁLISIS PROTEICO POR WESTERN BLOT.....	20
3.7. ENSAYO DE INMUNOCITOQUÍMICA.....	21
3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	21
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES	23
4.1.1. Líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (CMTN)	23
4.1.2. Líneas celulares de cáncer de ovario seroso de alto grado (COSAG)	24
4.2. DETERMINACIÓN DE IC ₅₀ DE CARBOPLATINO Y APR-246	25
4.3. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE CARBOPLATINO Y APR-246.....	26
4.3.1. Ensayo experimental de la combinación de los fármacos con dosis únicas	26
4.3.2. Ensayo experimental de combinación con la dosis fija de uno de los fármacos. ...	28
4.4. EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS POR RT-qPCR.....	30
4.5. ENSAYO INMUNOCITOQUÍMICO	32
4.6. REGULACIÓN DE AUKA CON CARBOPLATINO Y APR-246.....	33
5. DISCUSIÓN.....	35
6. CONCLUSIONES.....	39
7. BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo general de respuesta al daño celular mediado por p53.....	9
Figura 2. Localización y función de las aurora quinasas durante la mitosis.....	11
Figura 3. Interacción de las aurora quinasas y el supresor tumoral p53.	13
Figura 4. Principales mecanismos de acción antitumoral de PRIMA-1 y APR-246.	14
Figura 5. Mecanismo de acción de la combinación de APR-246 con componentes de platino.	15
Figura 6. Esquema del procedimiento experimental para la cuantificación del efecto citotóxico de los fármacos APR-246 y Carboplatino.....	18
Figura 7. Morfología de las líneas celulares incluidas en el estudio.....	23
Figura 8. Efecto de APR-246 y Carboplatino en la viabilidad de las líneas celulares de CMTN..	25
Figura 9. Efecto de APR-246 y Carboplatino en la viabilidad de las líneas celulares de COSAG.	26
Figura 10. Resultados de la combinación de APR-246 y carboplatino con dosis única en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.	27
Figura 11. Resultados de la combinación de APR-246 y carboplatino con dosis única en las líneas celulares de cáncer de ovario seroso de alto grado.....	28
Figura 12. Efecto de carboplatino y efecto de la combinación de carboplatino y APR sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de CMTN.....	29
Figura 13. Efecto de carboplatino y efecto de la combinación de carboplatino y APR-246 sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de COSAG.....	30
Figura 14. Expresión génica de diferentes genes tras el tratamiento con APR-246.	31
Figura 15. Expresión génica de diferentes genes tras el tratamiento con carboplatino en las líneas celulares de CMTN y COSAG.....	32
Figura 16. Expresión proteica por inmunocitoquímica de p-53 en MDA-MB-231.....	32
Figura 17. Expresión proteica por inmunocitoquímica de p-53 en Kuramochi tras el tratamiento individual con APR-246 y carboplatino.....	33
Figura 18. Expresión proteica de AURKA medida por transferencia Western después de 72h de tratamiento con el IC ₅₀ de APR-246 y carboplatino (CBP) en las líneas cancerígenas.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones identificadas en las líneas celulares de CMTN y COSAG mediante MiSeq de Illumina.....	24
Tabla 2. Valores de IC ₅₀ de APR-246 y carboplatino en las líneas cancerígenas.....	26

ABREVIATURAS

AURK: Aurora quinasas.

AURK-A: Aurora quinasa A.

AURK-B: Aurora quinasa B.

AURK-C: Aurora quinasa C.

CDK: quinasas dependientes de ciclina.

CMTN: Cáncer de mama triple negativo.

COSAG: Cáncer de ovario seroso de alto grado.

E2F3: factor de transcripción 3 de la familia E2.

ER: receptor de estrógeno

HER-2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2.

HRD: defectos de recombinación homóloga.

INCEP: Proteína de unión al centrómero.

MDM4: Ubiquitina ligasa E4.

MQ: metileno quinuclidinona.

NIR: complejo represor de la histona acetiltransferasa.

PR: receptor de progesterona.

P-Rb: proteína retinoblastoma.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

TrxR1: selenoproteína tiorreductasa 1.

Título: Análisis del efecto de un tratamiento combinado con APR-246 y carboplatino sobre la viabilidad de líneas de cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario seroso de alto grado a través de la vía de las aurora quinasas-p53.

Introducción: El cáncer de mama triple negativo (CMTN) y el cáncer de ovario seroso de alto grado (COSAG) son dos subtipos de cáncer con mayor mortalidad en las mujeres. Tanto el cáncer de seno como el de ovario son altamente heterogéneos y presentan diversa morfología y respuesta al tratamiento. No obstante, estos subtipos de cáncer comparten características moleculares, como las mutaciones de p53 (mayor del 70% en ambos) y la sobreexpresión de aurora quinasas (AURKA) (entre un 20-50%). Las Aurora quinasas (AURKA, AURKB y AURKC) son enzimas reguladoras que participan en la segregación cromosómica durante el proceso de mitosis. Por otra parte, p53 actúa como un supresor tumoral restringiendo el crecimiento de las células que albergan irregularidades genómicas. Además, existe una regulación recíproca entre AURKA y p53. Las mutaciones genéticas de p53 y AURK contribuyen al desarrollo del cáncer al inducir la inestabilidad genómica y al mejorar la proliferación, supervivencia, migración e invasión de las células cancerosas. Debido a la agresividad y la falta de una terapia efectiva para COSAG y CMTN, es necesario estrategias de tratamiento alternativas. Una estrategia empleada en los últimos tiempos es la utilización de fármacos que reconstruyan la función normal de p53. APR-246 (PRIMA-1^{MET}) es el primer componente en fase clínica que restaura la proteína mutante p53 e induce la apoptosis. El tratamiento combinado de APR-246 y compuestos basados en platino podría permitir mejorar la terapia de tumores portadores de mutaciones en p53. Por tanto, nos planteamos analizar el efecto de un tratamiento combinado con APR-246 y carboplatino sobre la viabilidad de líneas cancerígenas de CMTN y COSAG a través de la vía AURK-p53.

Materiales y Métodos: se empleó el ensayo de viabilidad MTT para analizar el efecto individual y en combinación de APR-246 y carboplatino sobre la viabilidad de las líneas cancerígenas, y para determinar la correspondiente concentración media citotóxica (IC₅₀). Se caracterizó el estado mutacional de p53 en todas las líneas celulares por secuenciación utilizando la plataforma MiSeq de Illumina. También se analizó el efecto de APR-246 y carboplatino sobre la vía AURK-p53 empleando q-PCR a tiempo real, inmunocitoquímica y análisis por transferencia Western de la expresión proteína de las aurora quinasas y p53.

Resultados: Todas líneas celulares de CMTN y COSAG mostraron valores de IC₅₀ similares para el tratamiento con APR-246, aproximadamente 20 µM. La línea MDA-MB-231 es menos sensible a carboplatino, con un IC₅₀ de 110 µM aproximadamente, que el resto de las líneas celulares que mostraron valores de IC₅₀ de aproximadamente 30 µM. También, se observó que APR-246 potencia el efecto citotóxico del carboplatino en líneas celulares de CMTN y COSAG.

Conclusión: Los resultados sugieren que la combinación de APR-246 con quimioterapia basada en platino, como el carboplatino, incrementa el efecto citotóxico en líneas de CMTN y COSAG. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para validar estos resultados.

Palabras clave: Cáncer de mama triple negativo (CMTN), Cáncer de ovario seroso de alto grado (COSAG), aurora quinasas, mutación p53, terapia de cáncer, APR-246 (PRIMA-1^{MET}), reactivación de p53, fármacos basados en platinos y carboplatino.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama y el cáncer de ovario son la segunda y octava causa principal de muerte entre las mujeres de todo el mundo (Bray et al., 2018; Lisio et al., 2019). El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es un subtipo heterogéneo de cáncer de mama (CM) que se caracteriza principalmente por la falta de expresión de 3 receptores: el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2) (Nakhjavani et al., 2019). En comparación con otros tipos de CM la incidencia del CMTN es de aproximadamente de 15-20% y los pacientes afectados muestran una reducida tasa de supervivencia y una mayor probabilidad de recurrencia del cáncer (Nakhjavani et al., 2019). El carcinoma seroso de alto grado (COSAG) es el subtipo histológico más importante del cáncer de ovario. Esta neoplasia maligna puede originarse en el ovario, las trompas de Falopio o el peritoneo (J. Kim et al., 2018). El COSAG es el subtipo de cáncer de ovario más común y mortal, representa más del 60% de los cánceres de ovario epitelial y más del 70% de las muertes por cáncer de ovario.

Tanto el cáncer de seno como el de ovario son altamente heterogéneos y presentan diversa morfología y respuesta al tratamiento. No obstante, los subtipos de cáncer de mama triple negativo (CMTN) y el carcinoma de ovario seroso de alto grado (COSAG) comparten características moleculares, como las mutaciones de p53 (mayor del 70% en ambos), la sobreexpresión de aurora quinasa (AURKA) (entre un 20-50%) o los defectos de recombinación homóloga (HRD) (Synnott et al., 2017; Tang et al., 2017; Yan et al., 2016).

Por una parte, la proteína TP53 es un regulador transcripcional nuclear que participa en múltiples procesos celulares controlando la expresión de cientos de genes diana para mantener la homeostasis y la integridad del genoma: detención del ciclo celular, senescencia, diferenciación o apoptosis. p53 se conoce como el ‘guardián del genoma’, ya que actúa como un supresor tumoral restringiendo el crecimiento de las células que albergan irregularidades genómicas (Pitolli et al., 2019). Las mutaciones en p53 causan la pérdida de su función fisiológica, y a su vez pueden producir la ganancia de propiedades oncogénicas que favorecen la proliferación celular descontrolada y la acumulación de mutaciones genómicas que culminan en un crecimiento tumoral (M. P. Kim & Lozano, 2018).

Por otra parte, las aurora quinasas son unas enzimas reguladoras que participan en la segregación cromosómica durante el proceso de mitosis (Pérez Fidalgo et al., 2009). Las Aurora quinasas (AURK) son una familia de proteínas tipo serina-treonina quinasas formada por 3

proteínas: Aurora A (AURKA), Aurora B (AURKB) y Aurora C (AURKC). Se ha informado que la sobreexpresión o amplificación génica de las AURK se produce en gran cantidad de cánceres humanos, tales como el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer gástrico/gastrointestinal y otros tipos de tumores. Las Aurora quinasas promueven la carcinogénesis, ya que pueden colaborar con numerosas proteínas incluyendo proteínas supresoras de tumores y oncogenes. La sobreexpresión de AURK se asocia con una peor prognosis. Debido a esto, las AURK se han considerado como una diana terapéutica y en los últimos años se ha desarrollado diversos inhibidores (Tang et al., 2017).

Por último, estos subtipos de cáncer, COSAG y CMTN, con frecuencia muestran fallos en la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga (HR). La HR es un mecanismo de reparación de las rupturas dobles del ADN. En la mayoría de los casos los HRD se deben a mutaciones en los genes implicados en la reparación del ADN, como BRCA1 y BRCA2. Se ha demostrado que las mutaciones en los genes supresores tumorales BRCA1/2 se encuentran frecuentemente en COSAG y CMTN (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011; Geenen et al., 2018).

El desequilibrio causado por la deficiencia de p53 o la sobreexpresión de Aurora A se manifiesta en enfermedades cancerosas como el CMTN y COSAG (Synnott et al., 2017). Las mutaciones de p53 son una diana que están siendo objeto de investigación tanto en cáncer de mama triple negativo como cáncer de ovario. De hecho, un reciente estudio preclínico con un nuevo fármaco llamado PRIMA-1, demostró que se inducía la inhibición de la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama TN (Synnott et al., 2017). Se trata de un compuesto de bajo peso molecular con diana en tumores p53 mutados, que se dirige selectivamente a la proteína p53 alterada promoviendo su correcto plegamiento y restaurando su función normal (Mohell et al., 2015). Previamente, un ensayo clínico con pacientes de cáncer de próstata y malignidad hematológica demostró la seguridad de PRIMA-1, una buena tolerancia y un perfil farmacocinético y biológico favorable (Perdrix et al., 2017). Actualmente, PRIMA-1 está siendo ensayado en la práctica clínica en cáncer seroso de ovario de alto grado con p53 mutado (NCT02098343).

El tratamiento convencional tanto en CMTN como en COSAG es una terapia basada en platinos, principalmente con cisplatino y carboplatino. Este tipo de tratamiento tiene la desventaja de que muchos de los pacientes desarrollan resistencia a este tipo de fármacos. Además, diversos estudios han indicado que los tumores portadores de mutaciones en p53 son

más resistentes a la quimioterapia. La utilización de fármacos que reconstruyan la función normal de p53 podría contribuir a que las células tumorales respondan mejor a la quimioterapia.

1.1. MECANISMO DE SUPRESIÓN TUMORAL DE P53

Las proteínas supresoras tumorales, como p53, juegan un papel fundamental en la prevención de la transformación oncogénica controlando el crecimiento celular. En particular, p53 es un gen mutado con mayor frecuencia en la mayoría de los cánceres humanos. Las mutaciones en p53 dan como resultado una pérdida de su función fisiológica, pero también se ha sugerido la ganancia de nuevas propiedades oncogénicas. La función supresora de tumores de p53 se asocia principalmente con su actividad transcripcional (Pitolli et al., 2019).

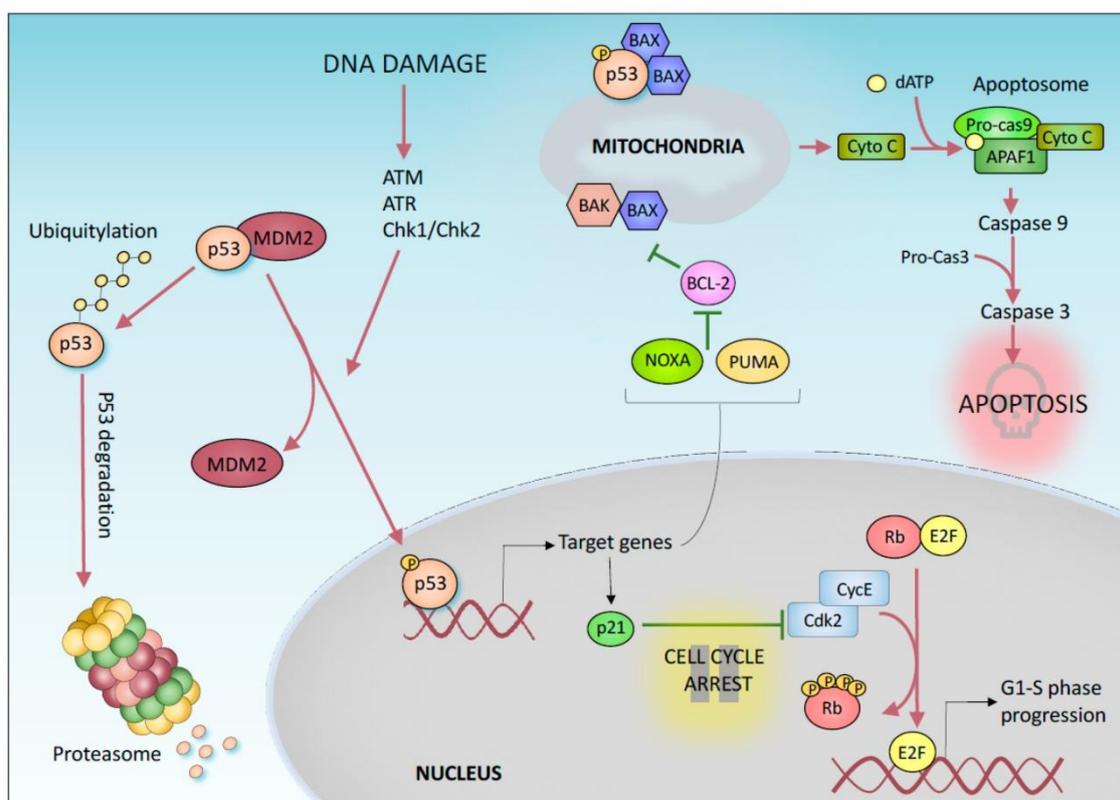


Figura 1. Mecanismo general de respuesta al daño celular mediado por p53. Extraído de Pitolli et al., 2019.

En condiciones normales de crecimiento, los niveles de p53 se mantienen reducidos por la acción de la ubiquitina ligasa E3 MDM2, que en complejo con MDM4, media la degradación proteasomal de p53 (*Figura 1*). En respuesta a diversas señales de estrés (como daño del ADN activación de oncogén hipoxia y agotamiento de nutrientes), p53 se estabiliza y se activa mediante modificaciones postraduccionales (fosforilación y acetilación). A su vez, p53 activo se une a secuencias de ADN específicas en las regiones promotoras de sus genes diana, lo que provoca varios efectos supresores de tumores potenciales: detección del ciclo celular, la

apoptosis y senescencia. La proteína p53 media estas respuestas activando transcripcionalmente genes diana como p21, que está involucrado en la detección permanente y transitoria del ciclo celular, y miembros proapoptóticos de la familia BCL2 como Noxa y BBC3/PUMA, que median la apoptosis (Pitolli et al., 2019).

1.2. AURORA QUINASAS

1.2.1. Localización y función de las Aurora Quinasas

Las aurora quinasas (AURK) tienen un papel fundamental en la regulación del ensamblaje del huso mitótico, la segregación cromosómica y la citogénesis (Sasai et al., 2016). Las AURK son una familia estrechamente relacionada del tipo serina-treonina quinasas. Esta familia de proteínas está formada por tres miembros: Aurora quinasa A (AURK-A), Aurora quinasa B (AURK-B), Aurora quinasa C (AURK-C) (Pérez Fidalgo et al., 2009). Cada miembro de la familia juega un papel diferente como regulador de la división celular (Pérez-Fidalgo et al., 2020).

En primer lugar, **Aurora A** participa en varios procesos relacionados con la formación del huso mitótico como la maduración y separación del centrosoma, la entrada en mitosis y el ensamblaje del huso bipolar. En las células humanas, el nivel y la actividad quinasa de Aurora A incrementan durante el paso de la fase G2 a la M y su localización cambia dinámicamente a lo largo del ciclo celular (*Figura 2*).

En segundo lugar, **Aurora B** se localiza en los cromosomas y luego durante la prometafase y la metafase se encuentra en el centrómero entre las cromátidas hermanas. Su expresión y actividad en los tejidos en proliferación se regulan por el ciclo celular: hay un pico de expresión en la transición de la fase G2-M y la actividad quinasa es máxima durante la mitosis. AURKB es parte del complejo cromosómico pasajero que está formado por AURKB, INCEP (Inner Centromere Protein), survivina y borelina. La Aurora B está involucrada en diversos procesos mitóticos, incluyendo la fosforilación de la histona H3 (necesario para la condensación cromosómica). También, la AURKB juega un papel en la segregación cromosomal, la citoquinesis, la unión de los microtúbulos y el cinetocoro y la regulación de los puntos de control mitóticos. Además, Aurora B participa en el establecimiento de la biorientación de los cromosomas que es necesaria para garantizar que el alineamiento y la segregación cromosómica sea precisa. En este punto de la mitosis una de las funciones de Aurora B es reparar las uniones incorrectas de los microtúbulos a los cinetocoros.

Por último, la función de **Aurora C** es poco conocida. También, se localiza en los polos del huso mitótico, pero suele aparecer en las fases tardías de la mitosis, donde tiene una función similar a la de AURKB.

La expresión aberrante de las aurora quinasas causa defectos en el ensamblaje del huso mitótico, activación de la respuesta de punto de control y la segregación cromosómica que conduce a la inestabilidad cromosómica.

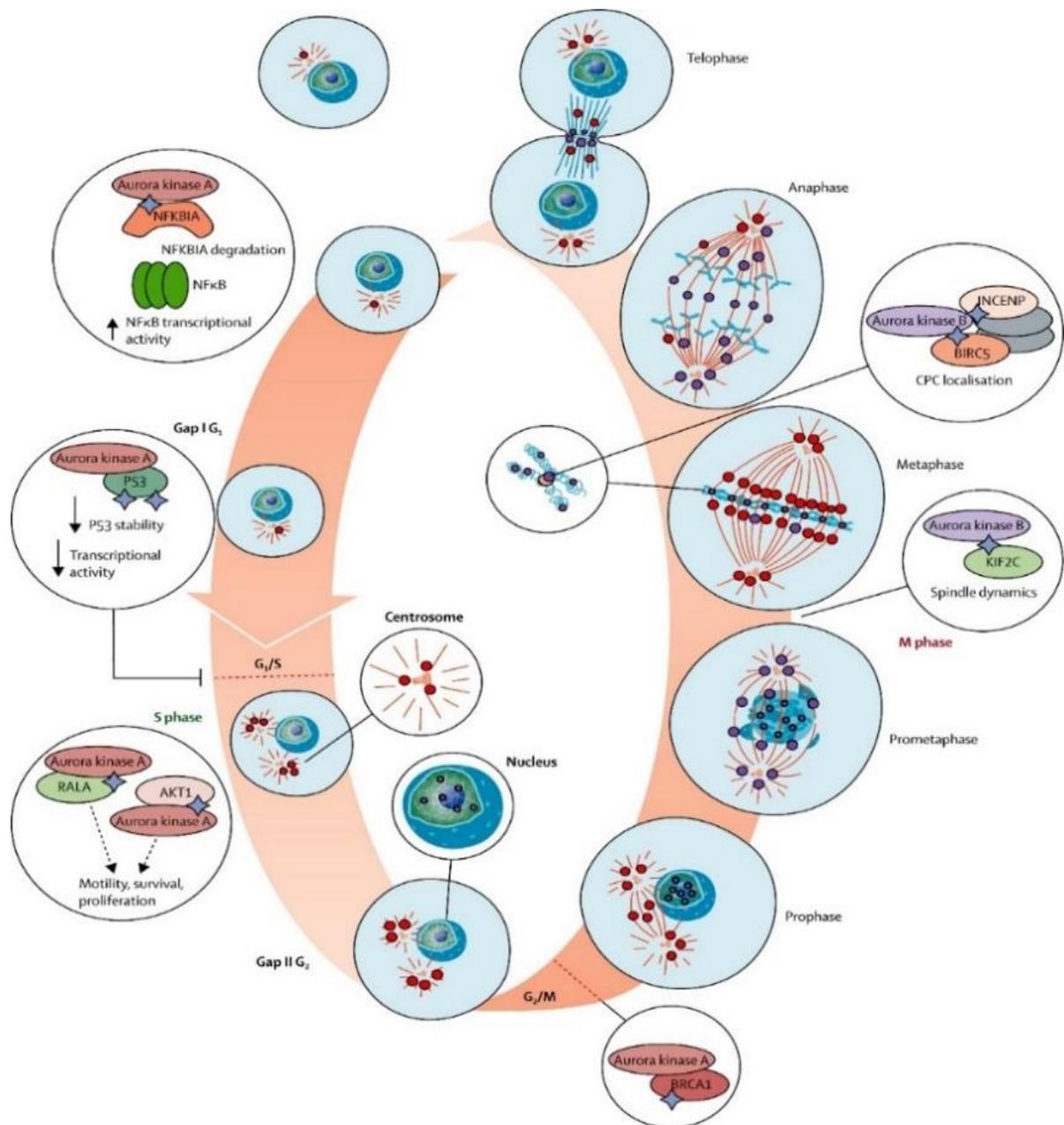


Figura 2. Localización y función de las aurora quinasas durante la mitosis. (Mehra et al., 2013).

1.2.2. Las Aurora quinasas y el cáncer

El control del ciclo celular y la reparación del ADN son dos procesos que están estrechamente relacionados. La detención del ciclo celular facilita que el sistema de reparación del ADN supervise y repare cualquier daño. En células altamente proliferativas, como las células tumorales, la inestabilidad genética aumenta a medida que la reparación del ADN se vuelve más difícil. Varios tumores como el cáncer de mama triple negativo o el cáncer de ovario seroso de alto grado muestran una elevada frecuencia de fenotipos con ganancia de función de AURK y una pérdida de función de p53. Se ha demostrado que las aurora quinasas son componentes claves de la vía p53 (Pérez-Fidalgo et al., 2020).

1.2.3. Regulación entre AURK y p53.

Varios estudios han demostrado que hay una regulación recíproca entre las AURK y p53. Por una parte, las AURK pueden regular negativamente a p53 mediante un proceso de fosforilación postranscripcional (Sasai et al., 2016). En concreto, AURKA regula a p53 fosforilando los residuos de Ser215 y Ser315. La fosforilación de la Ser215 inhibe la actividad transcripcional mientras que la fosforilación de la Ser315 incrementa la degradación proteasomal de p53 mediada por MDM2 (ubiquitina ligasa E3) (Pitolli et al., 2019). Aurora quinasas A funciona como un oncogén al regular múltiples objetivos moleculares y vías de señalización. En general, todos estos mecanismos inducirían una pérdida de función de p53 provocada por AURKA contribuyendo al desarrollo del cáncer al inducir la inestabilidad genómica y al mejorar la proliferación, supervivencia, migración e invasión de las células cancerosas (Yan et al., 2016).

De manera similar, AURKB puede suprimir la actividad transcripcional de p53 a través de la formación de un complejo con NIR (represor de la histona acetiltransferasa). NIR funciona como una proteína andamio para mediar la localización de AURKB en el sitio de unión al ADN de p53 (Sasai et al., 2016). En cuanto a AURKC, actualmente, no se ha determinado que se produzca una interacción con p53. Tanto AURKA como AURKB pueden regular p53 de una forma directa o indirecta como se indicó anteriormente. Además, la deficiencia de p53 que se muestra a menudo en numerosos cánceres contribuye a la expresión de las aurora quinasas, facilitando el desarrollo de tumores.

Por otra parte, p53 es un regulador negativo de AURKA (**Figura 3**). En condiciones normales, p53 actúa inhibiendo a AURKA a través de una regulación tanto transcripcional como postranscripcional (Wu et al., 2012). La deficiencia de p53 causa la reducción de la

expresión de p21 (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, CKI) e induce la expresión de CDK2 (quinasa dependiente de ciclina 2). CDK2 fosforila a la proteína retinoblastoma (Rb) desencadenando la disociación de E2F3 (factor de transcripción 3 de la familia E2). La proteína de retinoblastoma (p-Rb) es esencial para el control normal del ciclo celular. La función Rb depende, al menos en parte, de las interacciones con la familia de factores de transcripción de unión al ADN E2F. Luego, E2F3 se une al promotor del gen de AURKA y transactiva su expresión (Wu et al., 2012). Además, la mutación de p53 o la pérdida de la función de p53 causa un incremento de la expresión de miR-25 y una disminución de FBXW7 (componente de la ubiquitina ligasa E3), lo que resulta en una sobreexpresión de AURKA (Tang et al., 2017). A su vez, esta sobreexpresión de la AURKA conduce a una mayor degradación de p53, provocando la desregulación de las vías del punto de control y facilitando la transformación oncogénica de las células.

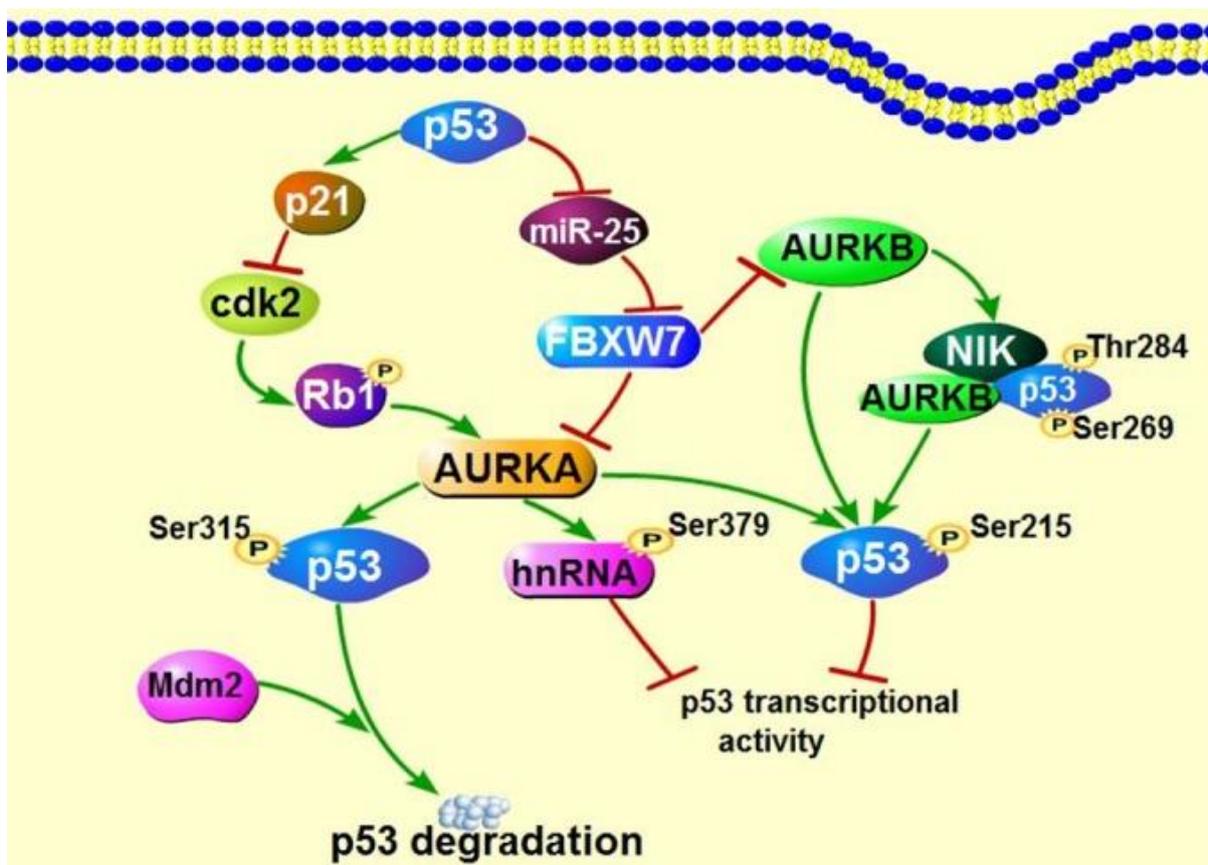


Figura 3. Interacción de las auroras quinasas y el supresor tumoral p53. Extraído de (Tang et al., 2017).

1.3. APR-246: COMPONENTE ANTICANCERÍGENO.

APR-246 es el primer compuesto en etapa clínica que reactiva al mutante p53 e induce la apoptosis. El mecanismo de acción de APR-246 como componente anticancerígeno se ha documentado previamente (**Figura 4**). APR-246 es un profármaco que se convierte en el compuesto activo metileno quinuclidinona (MQ), un aceptor de Michael que se une a los residuos de cisteína de p53 mutado (dominio central) y restaura su conformación de tipo salvaje. La reactivación de la mutación de p53 induce la expresión de genes diana de p53 proapoptóticos incluyendo Puma, Noxa y Bax, seguido de la activación de vía de apoptosis mitocondrial (Mohell et al., 2015). No obstante, también se ha visto que APR-246 puede inducir apoptosis independientemente del estado de p53, a través de la inducción de ROS (especies reactivas de oxígeno), generado estrés en el retículo endoplasmático causado por las proteínas mal plegadas, y por la inhibición de la selenoproteína tiorreductasa 1 (TrxR1), que es un regulador clave en el equilibrio redox. La unión de MQ a TrxR convierte la enzima en una oxidasa activa, que genera ROS, y la unión de MQ al glutatión disminuye la concentración de glutatión libre intracelular y aumenta los niveles de ROS (Bykov et al. 2016).

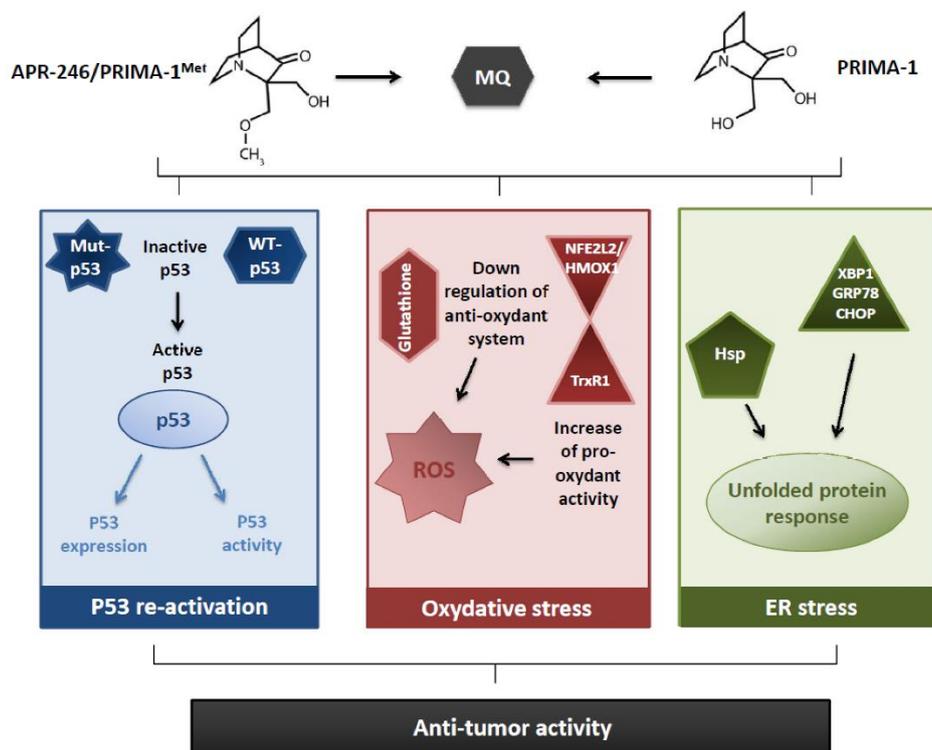


Figura 4. Principales mecanismos de acción antitumoral de PRIMA-1 y APR-246. *Extraído de* (Perdrix et al., 2017).

Los compuestos basados en platino, como carboplatino y cisplatino, son fármacos anticancerígenos que se usan en la primera línea del tratamiento de diversos tumores como el

CMTN y COSAG. Su principal modo de acción es la interacción con el ADN formando aductos, lo cual desencadena el mecanismo de respuesta al daño del ADN que involucra la activación de la apoptosis dependiente de p53. Sin embargo, muchas veces el tratamiento continuo con fármacos basados en platino genera resistencia en los pacientes. Dos de las principales causas de resistencia son las mutaciones de p53 y el incremento de la concentración intracelular de glutatión inducido por los fármacos (Mohell et al., 2015). El glutatión se conjuga con los fármacos de platino y los exporta fuera de las células cancerígenas.

Previamente, se ha investigado el efecto de la combinación de APR-246 con fármacos que dañan el ADN, como cisplatino o carboplatino, en COSAG y CMTN (Fransson et al., 2016; Mohell et al., 2015; Synnott et al., 2017). También, en un estudio con líneas celulares de CMTN se observó que la combinación de estos fármacos tenía un efecto inhibitorio aditivo dependiente de la línea celular (Synnott et al., 2017). Esto se debe a que APR-246/MQ induce la formación de ROS en células tumorales, lo cual promueve una disminución del nivel de glutatión libre intracelular (**Figura 5**). Además, en un estudio *in vitro* con células de cáncer de ovario resistentes a fármacos basados en platino se observó, que APR-246 es capaz de restaurar la sensibilidad de las células al tratamiento con cisplatino y doxorubicina (Mohell et al., 2015).

Es necesario establecer el efecto de la combinación de estos fármacos en nuestras líneas celulares. Por ello, se planteó analizar el efecto de la combinación de APR-246 y carboplatino en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo y de ovario seroso de alto grado.

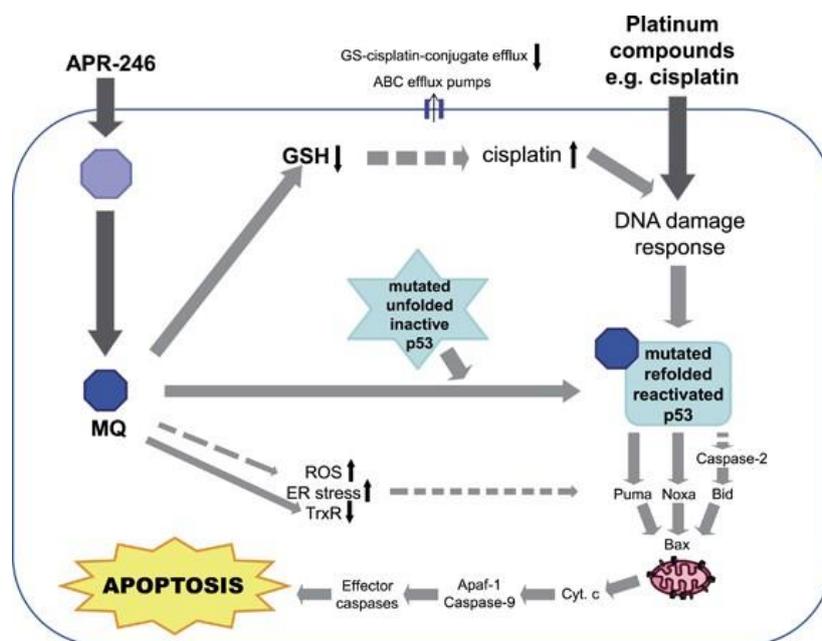


Figura 5. Mecanismo de acción de la combinación de APR-246 con componentes de platino. Las líneas continuas indican un efecto directo y en las líneas discontinuas un efecto no directo. Además, MQ puede inhibir la síntesis de glutatión uniéndose a cisteínas libres. Extraído de (Mohell et al., 2015).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis** del trabajo es que la combinación de APR-246 con quimioterapéuticos convencionales basados en platinos, como el carboplatino, potencia el impacto sobre la viabilidad celular en cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario seroso de alto grado a través de las vías p53 y AURKA.

Para corroborar la hipótesis se planteó como **objetivo principal** analizar el efecto de la combinación de APR-246 y carboplatino sobre la viabilidad celular de líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-436 y HCC-1937 de cáncer de mama triple negativo (CMTN) y, CaOV3 y Kuramochi de cáncer de ovario seroso de alto grado (COSAG).

Para llevar a cabo este objetivo se estableció una serie de objetivos secundarios:

1. Determinar la concentración media citotóxica (IC_{50}) de APR-246 en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-436, HCC-1937, CaOV3 y Kuramochi
2. Determinar la concentración media citotóxica (IC_{50}) de carboplatino en todas las líneas cancerígenas MDA-MB-231, MDA-MB-436, HCC-1937, CaOV3 y Kuramochi.
3. Determinar el índice de combinación de los fármacos APR-246 y carboplatino en todas las líneas celulares.
4. Analizar el efecto que tiene APR-246 y carboplatino en la vía de las aurora quinasas y p53.
5. Determinar en líneas celulares de CMTN y COSAG el efecto de la combinación de APR-246 y carboplatino (APR-CBP) sobre la vía de p53 y Aurora quinasas (p53-AURK).
6. Análisis de los niveles de expresión de AURKA y de otros marcadores de control del ciclo celular como p53 y p21 tras la realización de un tratamiento con APR-246 y carboplatino.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR

Para los estudios *in vitro* de este trabajo se han incluido cinco líneas celulares tumorales humanas: MDA-MB-231, MDA-MB-436 y HCC-1937 para CMTN y Kuramochi y CaOV3 para COSAG. Las líneas celulares de CMTN se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.); MDA-MB-231 (ATCC® HTB26™), MDA-MB-436 (ATCC® HTB130™) y HCC-1937 (ATCC® CRL2336™). Estas líneas celulares proceden de tumores sólidos, por lo que *in vitro* crecen en adhesión, y presentan diferencias entre ellas tanto en su morfología como en la tasa de proliferación.

Las líneas celulares se cultivan en frascos de 25cm² o 75 cm² (T₇₅ y T₂₅) a 37°C de temperatura, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Cada línea se cultivó con medio completo con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 2% de antibiótico (penicilina y estreptomicina) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los medios de cultivo empleados fueron: DMEM-F12 (MDA-MB-231), DMEM-GLutamax (MDA-MB-436), RPMI-1940 (HCC-1937), RPMI 1640 Glutamax (Kuramochi) y DMEM High Glucose (CaOV3).

3.2. SECUENCIACIÓN DEL GEN TP53 EN LÍNEAS CELULARES

Para la identificación de mutaciones en el gen *TP53* en cada una de las líneas celulares, se ha utilizado la plataforma MiSeq de Illumina. Se diseñó un panel para la amplificación de todos los exones y las zonas implicadas en el *splicing* alternativo del gen TP53 (NM_000546). Este panel cuenta con 21 amplicones que se divide en dos mixes para una mejor amplificación.

A partir de los pellets celulares aislados de cada línea celular, se extrajo el ADN y se realizó la cuantificación y posterior amplificación del gen TP53 (Multiplex, Qiagen) para asegurar su calidad y una cantidad de lecturas homogénea en todos los amplicones. Tras evaluar su calidad, se realizó la secuenciación del gen.

3.3. FÁRMACOS UTILIZADOS

APR-246 o **PRIMA-1^{MET}** (1-azabicyclo [2.2.2] octano-3-uno, 2-(hidroximetil)-2-(metoximetil)-) fue obtenido de Selleckchem (Ref. S7724). El fármaco fue reconstruido con DMSO a una concentración de 50 mM, según las recomendaciones del comerciante, y se almacenó en alícuotas de 40 µL a -20°C.

El **carboplatino** (SP-4-2)-diamina [1,1-ciclobutanendicarboxilato(2-)-κO,κO^{''}]-platino) se adquiere del departamento de farmacia del del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Se adquiere en alícuotas de una concentración de 26 mM.

3.4. DETERMINACIÓN DEL IC₅₀ DE APR-246 Y CARBOPLATINO

Para analizar el efecto de los fármacos APR-246 y carboplatino sobre las líneas celulares fue necesario determinar la concentración que reduce al 50% la viabilidad celular, este valor se denomina la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀). Para ello, se estableció un procedimiento experimental para todas las líneas (**Figura 6**). El procedimiento cuenta con diferentes pasos: (1) Recolección celular, (2) Recuento celular, (3) Siembra celular, (4) Tratamiento y (5) Cuantificación de la viabilidad con ensayo MTT.

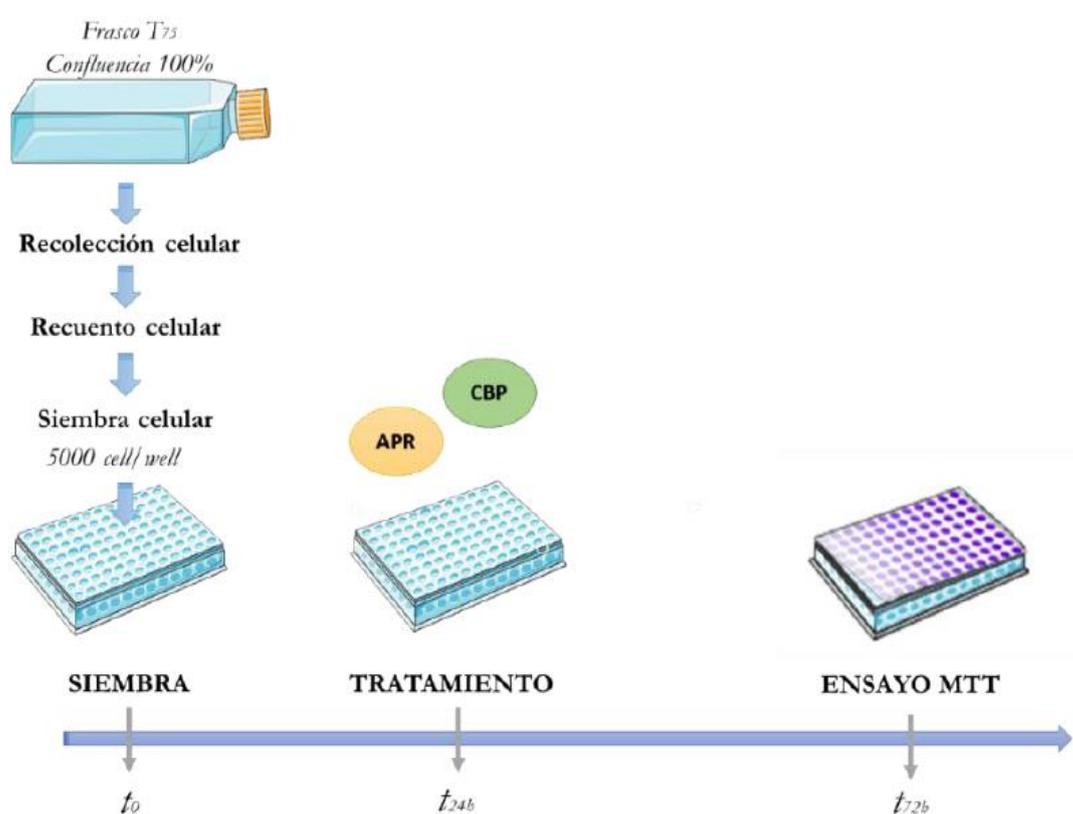


Figura 6. Esquema del procedimiento experimental para la cuantificación del efecto citotóxico de los fármacos APR-246 y Carboplatino.

3.4.1. Ensayo de viabilidad celular

El efecto de carboplatino y APR-246, solos y en combinación, sobre la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. El ensayo MTT es una técnica colorimétrica con la que se evalúa la actividad metabólica de las células empleando el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo está basado en la reducción

enzimática de la molécula MTT a formazán en las células viables. Las mediciones de absorbancia relativos a un control determinan el porcentaje restante de las células cancerosas viables después de su tratamiento con concentraciones variables de un compuesto ensayado, que se traduce en la actividad anticancerígena del compuesto y sus valores de IC₅₀.

En una placa de 96 pocillos, se sembraron 5x10³ células/pocillo y se incubaron bajo condiciones de cultivo estándar durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con varias concentraciones del tratamiento solo o en combinación (carboplatino y APR-246). Después de 72 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂, las soluciones de tratamiento se eliminaron por aspiración y se añadió la solución de MTT (100 µL, 0,5 mg/mL en PBS). Tras 3–4 h de incubación a 37°C/5% CO₂, se eliminó la solución de MTT, y los cristales de formazán violetas formados dentro de las células se disolvieron con isopropanol (100 µL) mediante agitación. La viabilidad celular se evaluó midiendo la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de microplaca y el programa SpectraMax.

3.4.2. Determinación del IC₅₀

La IC₅₀ de los fármacos APR-246 y carboplatino por separado se determinó utilizando concentraciones crecientes de los fármacos: APR-246 2µM-75µM; CBP 1µM-5mM. Para el experimento con carboplatino se utilizaron células sin tratamiento como control experimental, mientras que para APR-246 las muestras del control se trataron con la misma concentración final del disolvente del fármaco (DMSO).

3.5. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE LOS FÁRMACOS

Para establecer el efecto de la combinación de APR-246 y carboplatino sobre la viabilidad en nuestras líneas celulares se estableció un diseño experimental con diversas estrategias: (1) Tratamiento combinado con dosis únicas de los fármacos y (2) Tratamiento combinado con la dosis fija de uno de los fármacos.

Para determinar el IC₅₀ de carboplatino y APR-246 en combinación se utilizó una concentración constante de 20 µM de APR-246, mientras que la concentración de carboplatino se varió con concentraciones crecientes 5µM-1mM.

Ensayo experimental de la combinación de los fármacos con dosis únicas. Para determinar si el tratamiento combinado con las IC₅₀ de Carboplatino y APR-246 tiene un efecto citotóxico más potente que el tratamiento con un solo fármaco, se realizó un ensayo experimental de viabilidad mediante MTT en el que las células fueron tratadas individualmente con una dosis

fija de los medicamentos. Las dosis seleccionadas correspondían a los valores de IC_{50} (CBP) y IC_{50} (APR-246), respectivos de cada línea celular. Se empleó como control: células sin tratamiento y tratadas con DMSO.

Ensayo experimental de combinación con la dosis fija de uno de los fármacos. Para determinar el tipo de efecto de la combinación de los fármacos (sinérgico, aditivo o antagónico) Se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante MTT en el que las células fueron tratadas con una dosis fija de APR-246, correspondiente a su IC_{50} (APR-246) (20 μ M), y concentraciones crecientes de carboplatino. Las concentraciones de carboplatino en la línea MDA-MB-231 fueron 50 μ M, 70 μ M, 100 μ M, 110 μ M, 300 μ M, 500 μ M, 1000 μ M y en el resto de las líneas celulares 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 300 μ M. Se incluyeron los correspondientes controles, sin tratamiento para carboplatino y tratamiento con DMSO para APR-246.

3.6. ANÁLISIS PROTEICO POR WESTERN BLOT

Las células se sembraron en frascos de 75 cm² (Labclinics #PLC71175) y tras una confluencia del 80% se trataron con el valor de IC_{50} correspondiente a cada tratamiento durante 72 horas. Las células se recolectaron con tripsina/EDTA y se lisaron con 250 μ l de tampón Pierce RIPA (Labclinics #PLC71175) suplementado con 10% inhibidor de la proteasas y fosfatasas (# 04906845001, Roche) durante 15 minutos en hielo. Después las muestras se sonicaron con 5 ciclos (50 segundos de descanso y 10 segundos de pulso alto) y se sometieron a centrifugación a 13.000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se aisló el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína total con el kit de ensayo proteico Pierce BCA (Thermo #23227). Los extractos proteicos (40 μ g) se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min en tampón Laemmli buffer. Para la electroforesis, se cargaron cuarenta μ g de proteína total en un gel del 10% de SDS-poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% BSA en 1% TBT-Tween y se realizó la incubación durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-AURKA (Abcam #ab115883, 1:500), anti-p53 (Cell signalling #2524, 1:500) y anticuerpo anti-GAPDH (Invitrogen #, 1:1000) diluidos en 5% BSA TBST 1x. Luego, las membranas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario anti-cabra (Sigma #, 1:40000) o Anti-ratón (Cell signaling #, 1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas fueron lavadas e incubadas por pocos minutos con un el agente de quimioluminiscencia Novex ECL HRP (Invitrogen) y las imágenes fueron capturadas utilizando ImageQuant LAS 4000. Los píxeles oscuros se midieron para la cuantificación de bandas de proteínas usando ImageJ.

3.7. ENSAYO DE INMUNOCITOQUÍMICA

Se realizó un ensayo de inmunocitoquímica de todas las líneas celulares en condición basal, para determinar la expresión proteica de los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y HER2, y en líneas celulares tratadas y no tratadas con la IC₅₀ de carboplatino y APR-246 para determinar la expresión de las proteínas p53, AURKA, AURKB y AUKC. Con este propósito las células fueron sembradas en placas de 8 pocillos (Labclinics #PLC30108) y tratadas al 80% de confluencia celular con la IC₅₀ respectiva de los fármacos y fueron incubadas durante 72h a 37°C y CO₂ 5%. Después de 72 horas de incubación, las placas fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% y usadas en el ensayo inmunocitoquímico (Ventana protocol, automat Benchmark Xt). Los anticuerpos empleados fueron anti-ER (SP1; 790–4324), Ventana Medical Systems; anticuerpo monoclonal de ratón anti-PgR (1E2; 790–2223), Ventana Medical Systems; anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2 (4B5; 790–2991), Ventana Medical Systems; anticuerpo monoclonal primario de ratón Anti-P53 (800–2912), Roche; anticuerpo policlonal de conejo anti-Aurora A (AB12875), Abcam; anticuerpo monoclonal de ratón anti-Aurora B (AB3609), Abcam; anticuerpo policlonal de conejo anti-Aurora C (AB38299), Abcam.

3.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión de los genes AURKA, AURKB, AURKC y P53 se analizó mediante qPCR a tiempo real en todas las líneas celulares tratadas y no tratadas con su correspondiente IC₅₀ de APR-246 y carboplatino, 20 µM y 30 µM respectivamente. Primero, se realizó una retrotranscripción de 1000 ng de ARN a cADN usando el Kit High-Capacity cADN Reverse Transcription (Applied Biosystems).

Luego, se sintetizó el cADN a 25 °C durante 10 minutos y a 37 °C durante 2 h. Se usó el sistema de PCR a tiempo real 9700HT (Applied Biosystems) para detectar el nivel de transcripción. Las reacciones se llevaron a cabo empleando TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems) y la prueba TaqMan®20× de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las condiciones de PCR fueron: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, 95 °C durante 40 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los resultados se estandarizaron en función de la expresión del gen constitutivo GAPDH. Se determinó el valor umbral de los ciclos (CT) para cada medida. Se usó el método de comparación de CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para calcular la expresión relativa de mRNA del control. Cada experimento se realizó por triplicado.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC_{50}) para cada fármaco solo o en combinación se determinó mediante análisis de regresión no lineal empleando el programa GraphPad Prisma 6.0. Para la comparación de la combinación de efecto de los tratamientos se empleó el análisis estadístico prueba *T-Student* y la prueba *F* considerando valores estadísticamente significativos menores a 0.05.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES

Para los estudios *in vitro* de este trabajo se incluyeron cinco líneas celulares tumorales humanas: MDA-MB-231, MDA-MB-436 y HCC-1937 para CMTN, y Kuramochi y CaOV3 para cáncer de ovario seroso de alto grado. Estas líneas celulares proceden de tumores sólidos, por lo que *in vitro* crecen en adhesión, y presentan diferencias entre ellas tanto en su morfología (*Figura 7*) como en la tasa de proliferación. Las líneas celulares cancerígenas se seleccionaron en función de sus características genéticas, concretamente según el estado de los genes *TP53* y *BRCA*.

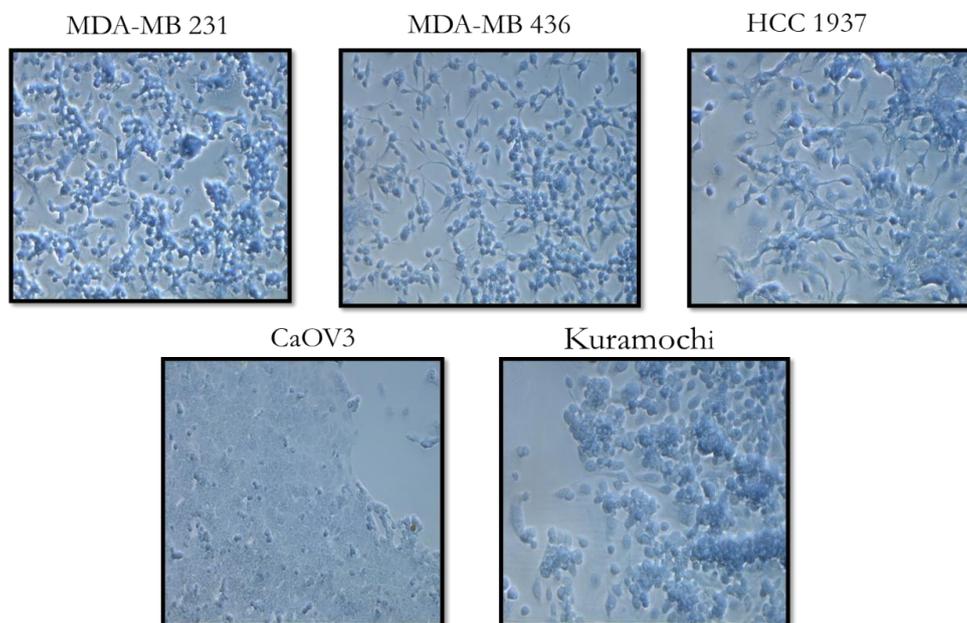


Figura 7. Morfología de las líneas celulares incluidas en el estudio.

4.1.1. Líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (CMTN)

Las líneas celulares de CMTN seleccionadas presentan las características que definen a este subtipo de cáncer, es decir, ausencia de los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y HER-2. Estas líneas celulares fueron caracterizadas mediante inmunocitoquímica en el laboratorio corroborando su estatus negativo para cada uno de estos receptores.

La morfología de las líneas celulares de CMTN es diferente (*Figura 7*): MDA-MB-231 presenta una morfología alargada, MDA-MB-436 tiene una morfología pleomórfica con componentes celulares multinucleados y HCC-1937 crece como células alargadas con tendencia a flotar a altas densidades celulares.

Además, las líneas celulares de CMTN se seleccionaron en función del estado mutacional de los genes *TP53* y *BRCA1* descrito en las bases de datos: MDA-MB-231 línea celular *TP53* mutado y *BRCA1* no mutado, MDA-MB-436 línea celular *TP53* no mutado y *BRCA1* mutado, HCC-1937 línea celular con doble mutación *TP53* y *BRCA1*. Las mutaciones en *TP53* fueron analizadas en nuestro laboratorio mediante secuenciación (MiSeq de Illumina) para confirmar esas características mutacionales (**Tabla 1**). Los resultados obtenidos de la secuenciación del gen *TP53* en las líneas celulares basales mostraron la presencia de mutaciones en todas las líneas celulares excepto para MDA-MB 436 que no presentó ninguna mutación para el gen. En concreto, las células MDA-MB-231 presentan una mutación *missense* (c.839G>A (p.R280K), 99.8%) que genera una proteína con pérdida de función. En el caso de HCC-1937 se identificó una mutación *non-sense* (c.916C>T (p.R306*), 99.7%) que en este caso da lugar a una proteína truncada.

Tabla 1. Mutaciones identificadas en las líneas celulares de CMTN y COSAG mediante MiSeq de Illumina.

Muestra	Estado <i>TP53</i>	Variación	% Variación	Estado de p53
MDA-MB-231	<i>mt</i>	c.839G>A (p.R280K)	99.8% <i>MS</i>	estructural
HCC-1937	<i>mt</i>	c.916C>T (p.R306*)	99.7% <i>NS</i>	truncada
MDA-MB-436	<i>wt</i>	/	/	normal
Kuramochi	<i>mt</i>	c.841G>T (p.D281Y)	100 % <i>MS</i>	estructural
CaOV3	<i>mt</i>	c.406C>T (p.Q136*)	99.8 % <i>NS</i>	truncada

Abreviaturas 1. Se muestra el estado de *TP53* (*wt*, proteína wild-type; *mt*, proteína mutante; /, ausencia de mutación), alteración en el codón (c.) y en la proteína (p.), % de variación de la mutación (pérdida sentido (*MS*), sin sentido (*NS*) y ausencia de mutación (/). (*) codón stop.

4.1.2. Líneas celulares de cáncer de ovario seroso de alto grado (COSAG)

Estas líneas celulares también presentan morfologías diferentes: CaOV3 tiene una morfología alargada con una tendencia a formar cúmulos mientras que Kuramochi presenta células con una forma globular (**Figura 7**). A sí mismo, las líneas celulares de COSAG elegidas para el estudio se seleccionaron en función de las mutaciones descritas para los genes *TP53* y *BRCA1* (**Tabla 1**): CaOV3 *TP53* mutado y *BRCA* no mutado; Kuramochi doble mutación para *TP53* y *BRCA2*. En las dos líneas de COSAG se producen mutaciones en dominios altamente conservados del gen *TP53*, produciendo un cambio en un único aminoácido (Zhang et al. 2016).

Estas mutaciones fueron analizadas mediante secuenciación en nuestro laboratorio para confirmar el estatus mutacional de *TP53* en las líneas de COSAG (**Tabla 1**). Los resultados

mostraron que la línea celular Kuramochi presenta una mutación en *TP53* del tipo *missense* (c.841G>T (p.D281Y),100%) y da lugar a una proteína con pérdida de función, mientras que la mutación detectada en CAO3, se trata de una mutación *non-sense* (c.406C>T (p.Q136*), 99.8%, que genera una proteína truncada.

4.2.DETERMINACIÓN DE IC₅₀ DE CARBOPLATINO Y APR-246

Tras estudiar la sensibilidad de las líneas celulares de CMTN y COSAG a carboplatino y APR-246 utilizando el ensayo de viabilidad MTT se obtuvieron los valores de IC₅₀ para cada uno de los tratamientos individuales (IC₅₀ de APR-246 y IC₅₀ de Carboplatino). Los valores de IC₅₀ para APR-246 fueron similares, tanto en las líneas de CMTN como en las líneas de COSAG, aproximadamente 20 μ M (*Tabla 2*). Respecto al carboplatino, todas las líneas celulares presentaron valores de IC₅₀ alrededor de 30 μ M (*Tabla 2*) a excepción de MDA-MB-231 que presentó un IC₅₀ bastante mayor que en el resto de las líneas celulares (109.70 μ M). En general podemos observar que tanto APR-246 como carboplatino disminuyen la viabilidad celular de una manera dosis dependiente (*Figura 8* y *Figura 9*).

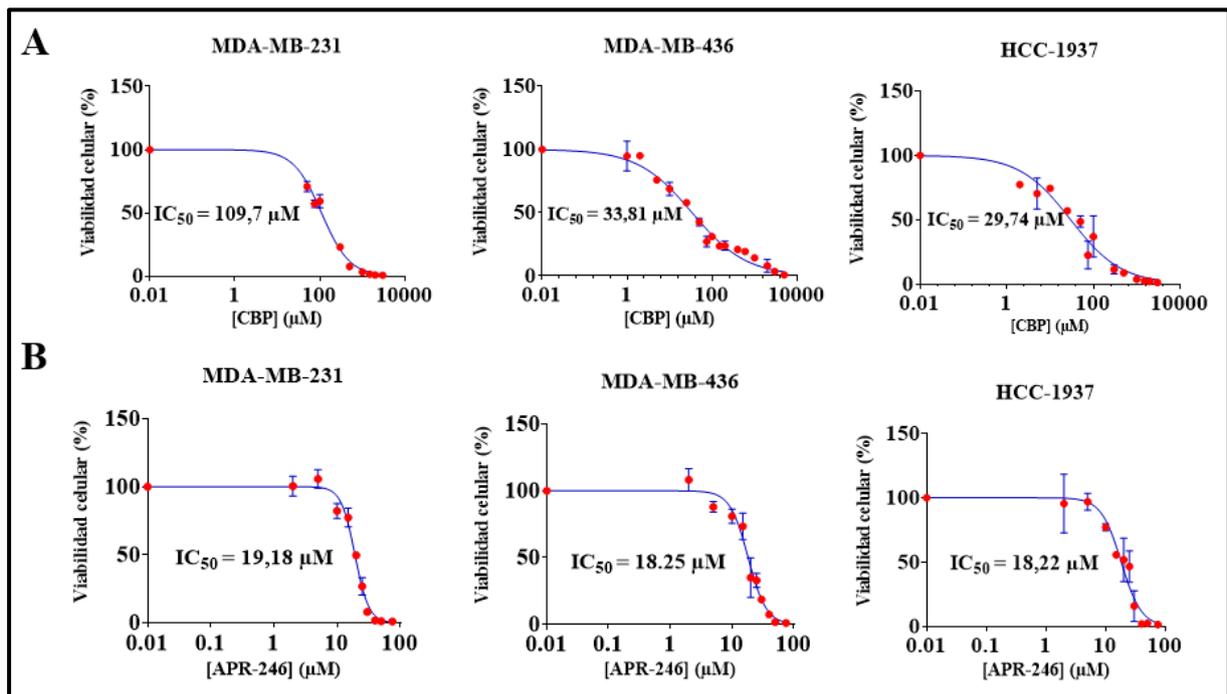


Figura 8. Efecto de APR-246 y carboplatino en la viabilidad de las líneas celulares de CMTN. (A) Efecto de carboplatino (CBP) en las líneas celulares de CMTN. **(B)** Efecto de APR-246 en las líneas celulares de CMTN. El ensayo MTT fue utilizado para medir la viabilidad celular. Se muestra la curva dosis-respuesta logarítmica. Los resultados mostrados son las medias \pm S.E.M. ($n \geq 2$).

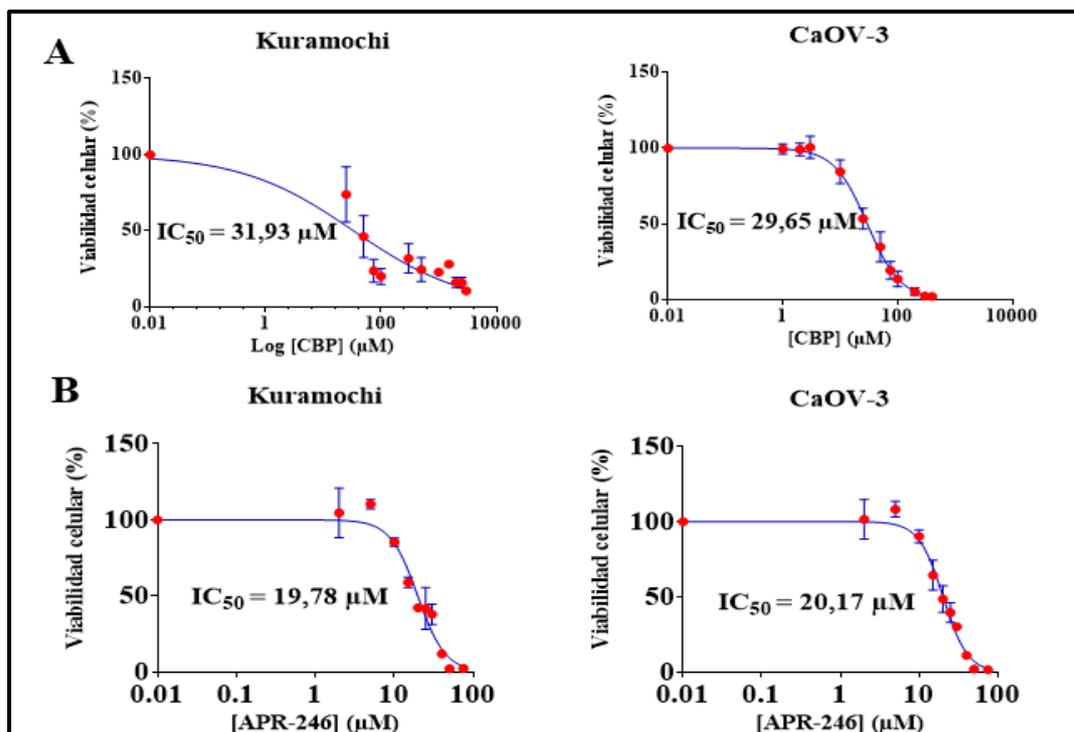


Figura 9. Efecto de APR-246 y Carboplatino en la viabilidad de las líneas celulares de COSAG. (A) Efecto de carboplatino (CBP) en las líneas celulares de COSAG. (B) Efecto de APR-246 en las líneas celulares de COSAG. El ensayo MTT fue utilizado para medir la viabilidad celular. Se muestra la curva dosis-respuesta logarítmica. Los resultados mostrados son las medias \pm S.E.M. ($n \geq 2$).

Tabla 2. Valores de IC_{50} de APR-246 y carboplatino en las líneas cancerígenas.

Línea Celular	IC_{50} (APR-246) (μM)	CI 95%	IC_{50} (CBP) (μM)	CI 95%
MDA-MB-231	19.18	[17.95 - 20.49]	109.70	[98.61-122.10]
MDA-MB-436	18.25	[16.27-20.21]	33.81	[27.75 – 40.94]
HCC-1937	18.22	[15.57 - 21.32]	29.74	[21.82 - 39.53]
Kuramochi	19.78	[17.35 - 22.55]	31.93	[5.185-70.92]
CaOV3	20.17	[18.41 - 22.05]	29.65	[25.23 – 34.42]

Abreviaturas 2. Se muestra el valor de IC_{50} para todas las líneas celulares y los intervalos de confianza de 95% (CI 95%).

4.3. EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE CARBOPLATINO Y APR-246

4.3.1. Ensayo experimental de la combinación de los fármacos con dosis únicas

Para estudiar de forma directa el efecto de la combinación de los fármacos en la viabilidad de las líneas cancerígenas. Todas las líneas celulares se trataron con la concentración del IC_{50} de APR-246 y de carboplatino por separado y en combinación. No obstante, solo se pudo

realizar una réplica experimental, por lo cual, los resultados obtenidos no son concluyentes. A continuación, explicaré los resultados obtenidos en función de los triplicados experimentales.

En general, en todas las líneas celulares de CMTN el tratamiento combinado con los IC₅₀ de cada fármaco mostró un efecto citotóxico significativamente mayor que el tratamiento con los fármacos por separado (**Figura 10**), llegando a reducir casi por completo la viabilidad en algunas de las líneas celulares. En la línea MDA-MB-231 este tratamiento combinado mata más células (entre un 30% y 50% más), que el tratamiento con carboplatino ($p=0,0015$) y APR-246 ($p=0,0088$), (**Fig.10.A**). El tratamiento combinado en MDA-MB-436 (**Fig.10.B**) mostró un efecto citotóxico significativamente mayor en comparación con los tratamientos por separado ($p<0,0001$, carboplatino y $p=0,0015$, APR-246) mostrando una supervivencia celular de 2.7%. En HCC-1937 (**Fig.10.C**) al comparar el tratamiento combinado con el tratamiento con carboplatino y APR-246, se observa un efecto citotóxico significativamente mayor ($p=0,0020$ y $p=0,0171$, respectivamente), dejando solamente un 0.8% de viabilidad celular.

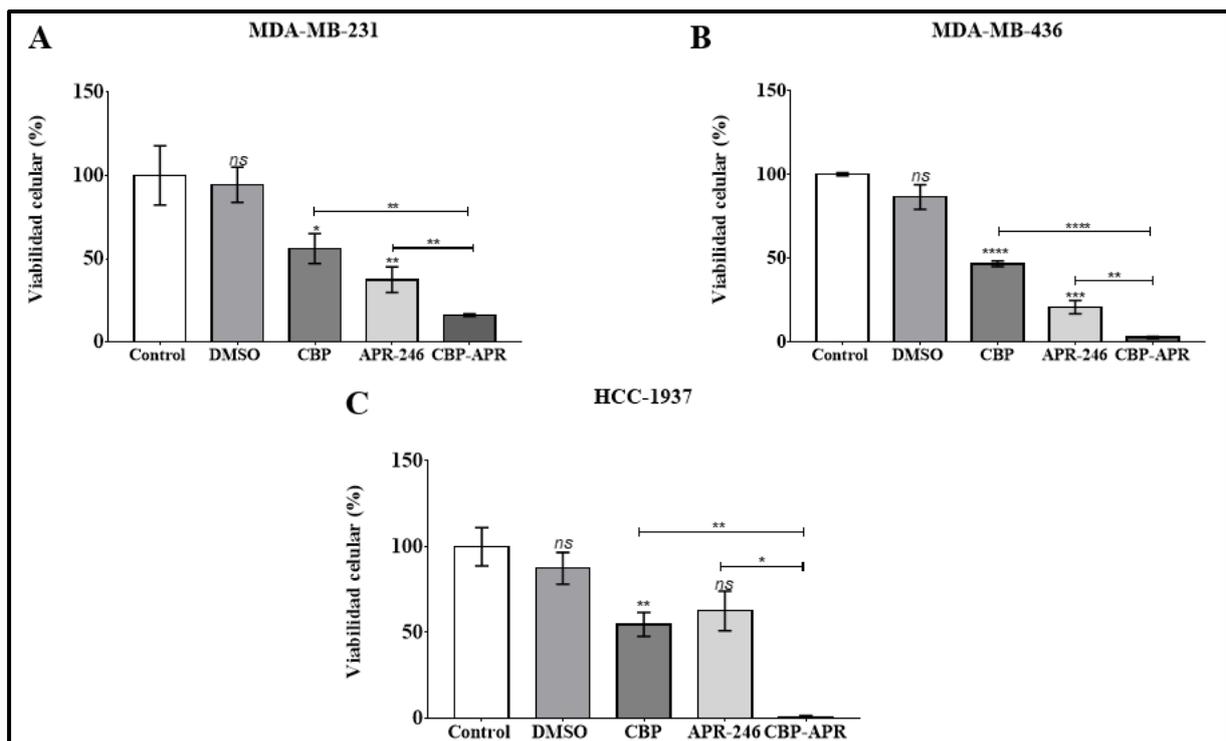


Figura 10. Resultados de la combinación de APR-246 y carboplatino con dosis única en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. En todas las líneas celulares se muestra los grupos de control (sin tratamiento y tratadas con DMSO), el tratamiento con el IC₅₀ de carboplatino (CBP) y el tratamiento con el IC₅₀ de APR-246 (APR) y su combinación (CBP+APR). Se muestra la media de los triplicados de una réplica experimental: Media \pm S.E.M. Se utilizó t-test no emparejado para analizar los grupos de tratamiento. p-valor significativo 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****). Asume que las poblaciones tienen la misma media SD.

Por otra parte, en las líneas de COSAG los datos no son concluyentes (*Figura 11*). En Kuramochi (*Fig.10.B*) el tratamiento combinado reduce aproximadamente un 60% la viabilidad celular en comparación al carboplatino, pero no fue significativa con APR-246. Igualmente, en CaOV3 el tratamiento combinado no muestra una diferencia significativa respecto al tratamiento individualizado con APR-246 (*Fig.10.A*).

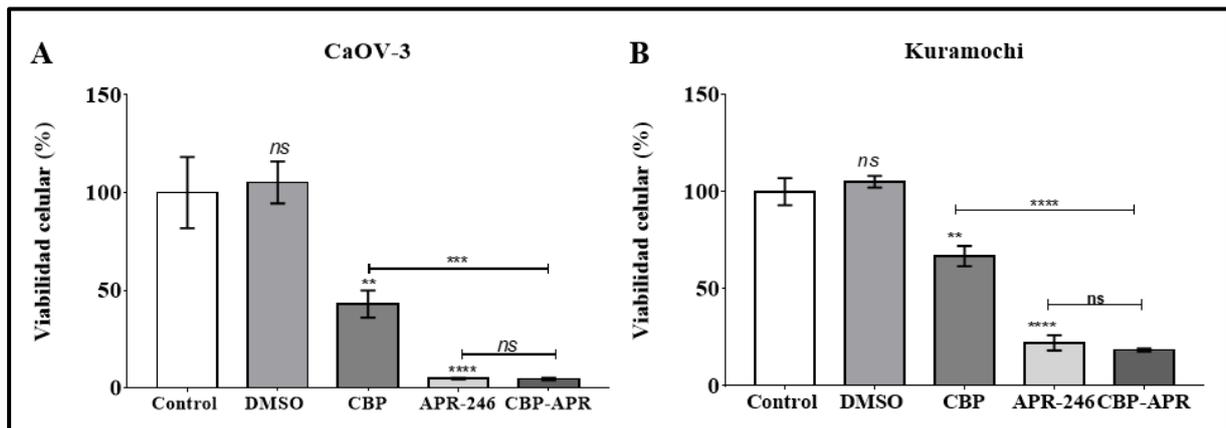


Figura 11. Resultados de la combinación de APR-246 y carboplatino con dosis única en las líneas celulares de cáncer de ovario seroso de alto grado. En todas las líneas celulares se muestra los grupos de control (sin tratamiento y tratadas con DMSO), el tratamiento con el IC_{50} de carboplatino (CBP) y el tratamiento con el IC_{50} de APR-246 (APR) y su combinación (CBP+APR). Se muestra la media de los triplicados de una réplica experimental: Media \pm desviación estándar (S.D). Se utilizó t-test no emparejado para comparar los grupos de tratamiento. p-valor significativo 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), < 0.0001 (****). Asume que las poblaciones tienen la misma media SD.

4.3.2. Ensayo experimental de combinación con la dosis fija de uno de los fármacos.

Con el objetivo de establecer el efecto de la combinación de los fármacos APR-246 y carboplatino, primero se realizó en todas las líneas celulares el tratamiento combinado con un gradiente de concentraciones de carboplatino manteniendo constante la concentración de APR-246 correspondiente a su IC_{50} (20 μ M). Los resultados obtenidos de este experimento no son definitivos, ya que no se pudieron realizar replicas experimentales para obtener diferencias significativas concluyentes. No obstante, se llevó a cabo un análisis estadístico preliminar de los triplicados experimentales para analizar las diferencias entre los valores de IC_{50} obtenidos con la combinación de los fármacos. Estos resultados experimentales mostraron que APR-246 incrementaba significativamente el efecto citotóxico de carboplatino en todas las líneas celulares, ya que al añadir APR-246 se requiere de una concentración menor de carboplatino para reducir al 50% la viabilidad de las células cancerígenas.

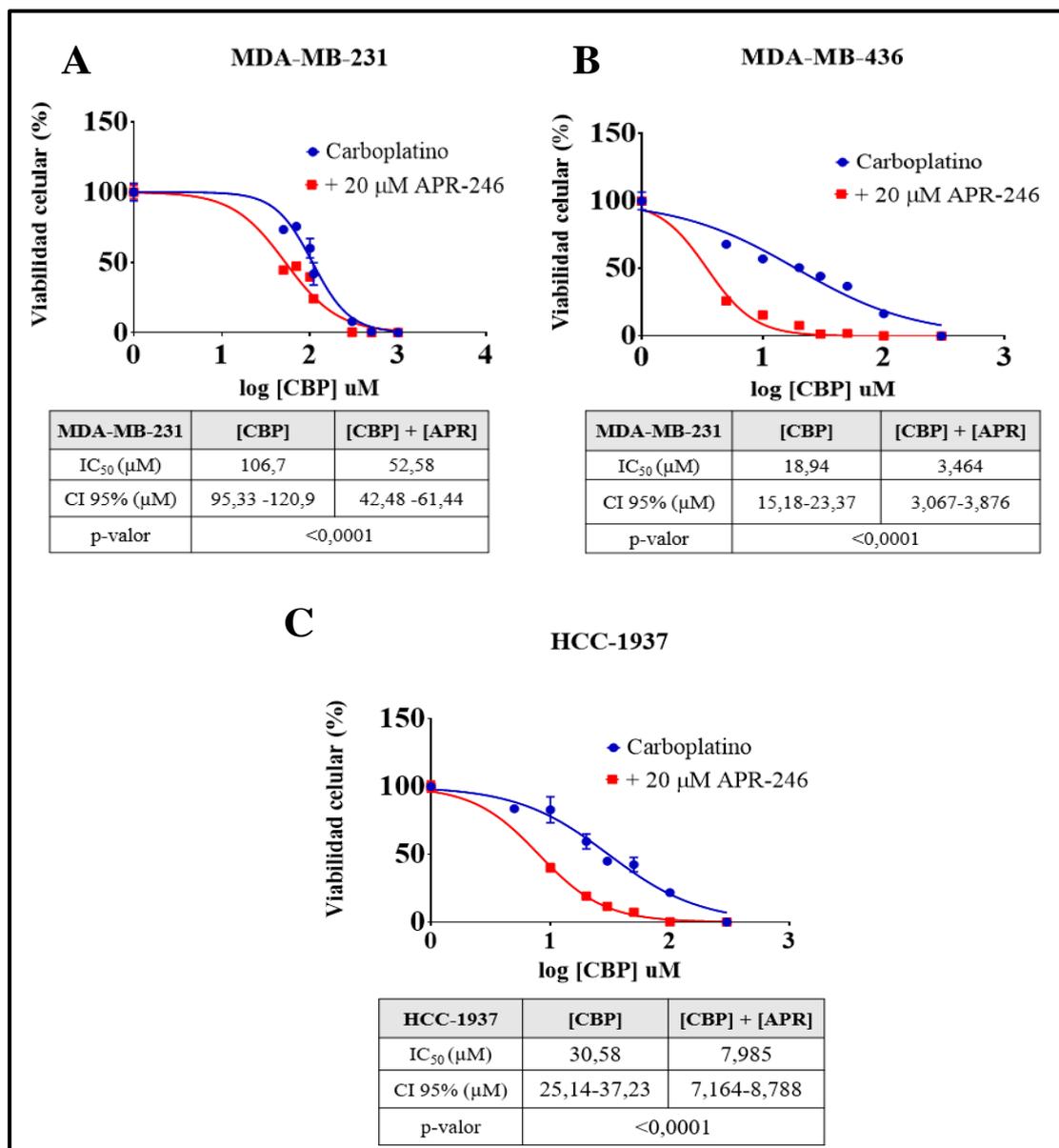


Figura 12. Efecto de carboplatino y efecto de la combinación de carboplatino y APR sobre la viabilidad celular en las líneas de CMTN. (A) MDA-MB-231, (B) MDA-MB-436 y (C) HCC-1937. El ensayo MTT fue utilizado para medir la viabilidad celular. Las células se trataron con concentraciones crecientes de carboplatino (línea azul) y con la combinación de concentraciones crecientes de carboplatino y APR-246 a concentración estable (IC₅₀ 20 μM) (línea roja). Los resultados mostrados son las curvas dosis-respuesta logarítmicas. También, se muestra un cuadro resumen de los valores de IC₅₀ del tratamiento con carboplatino y del tratamiento combinado. Se utilizó el Test-F para determinar si hay diferencias significativas (p -valor <0.05) entre los valores de IC₅₀ obtenidos con la combinación de los fármacos. Se muestra el resultado del análisis de triplicados experimentales.

En MDA-MB-231 (*Fig. 12.A*), el tratamiento combinado disminuye a la mitad la concentración de carboplatino necesaria para disminuir al 50% la población celular cancerígena, de 106.7 μM a 54.8 μM (p -valor <0.0001). También, en HCC-1937 (*Fig. 12.C*) se produce una reducción significativa del IC₅₀ de carboplatino de 30.58 μM a 7.985 μM cuando se combina con APR-246 (p -valor <0.0001). Para MDA-MB-436 (*Fig. 12.B*) también se

observa una disminución significativa del IC_{50} del carboplatino (p -valor <0.0001) tras el tratamiento combinado, aunque en este caso, el valor de IC_{50} obtenido del tratamiento individual con carboplatino no se ajusta al determinado previamente, $30 \mu M$, por tanto, sería necesario ajustar las curvas dosis respuesta antes de repetir el experimento.

En el caso de las líneas de COSAG, tanto Kuramochi (**Fig. 13.A**) como CaOV3 (**Fig.13.B**), los valores de IC_{50} obtenidos del tratamiento individual con carboplatino tampoco se ajustaron al determinado previamente ($30 \mu M$), por tanto, también sería necesario ajustar las curvas dosis respuesta antes de repetir el experimento. Pese a ello, los resultados también mostraron una disminución significativa del IC_{50} del carboplatino (p -valor <0.0001) tras el tratamiento combinado.

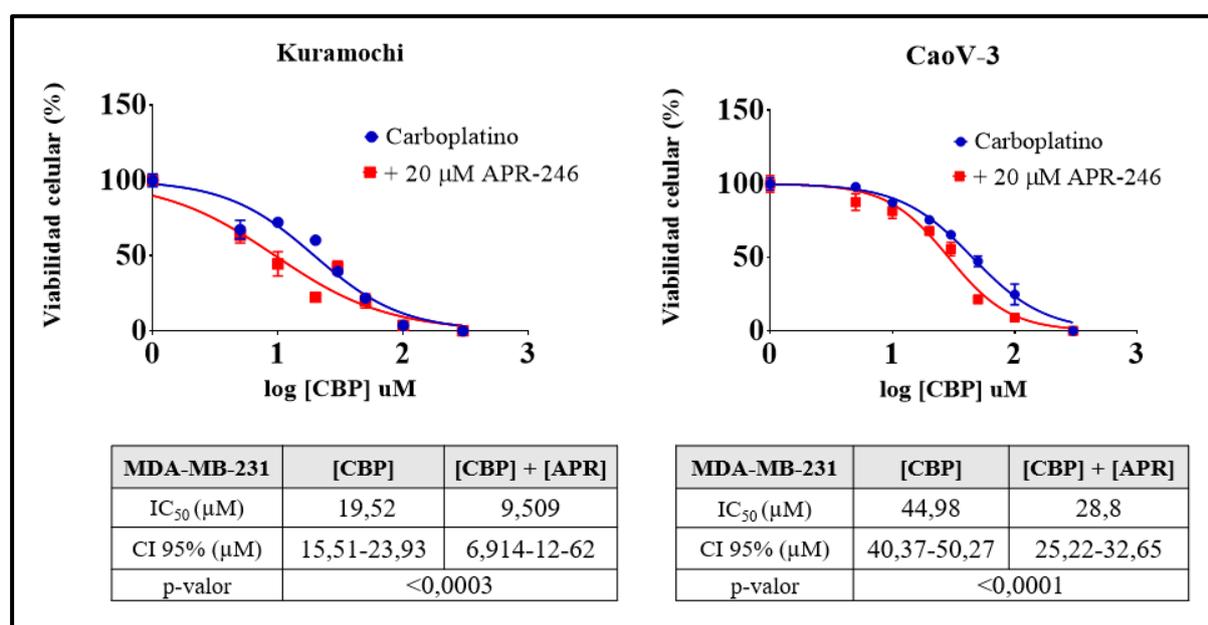


Figura 13. Efecto de carboplatino y efecto de la combinación de carboplatino y APR-246 sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de COSAG. (A) Kuramochi y (B) CaOV3. El ensayo MTT fue utilizado para medir la viabilidad celular. Las células se trataron con concentraciones crecientes de carboplatino (línea azul) y con la combinación de concentraciones crecientes de carboplatino y APR-246 a concentración estable (IC_{50} $20 \mu M$) (línea roja). Los resultados mostrados son las curvas dosis-respuesta logarítmicas. También, se muestra un cuadro resumen de los valores de IC_{50} del del tratamiento con carboplatino y del tratamiento combinado. Se utilizó el Test-F para determinar si hay diferencias significativas (p -valor <0.05) entre los valores de IC_{50} obtenidos con la combinación de los fármacos. Se muestra el resultado del análisis de triplicados experimentales.

4.4. EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS POR RT-qPCR

En todas las líneas celulares se evaluó la expresión de los genes *AURKA*, *AURKB*, *AURKC* y *TP53* tras el tratamiento con las correspondientes IC_{50} de APR-246 y CBP por q-PCR a tiempo real. Los resultados mostraron que el tratamiento individualizado con APR-246

y carboplatino influye sobre la expresión de las aurora quinasas y p53 tanto en las líneas celulares de CMTN como las de COSAG (*Figura 14* y *Figura 15*).

En la línea celular MDA-MB-231 se observó un incremento significativo de la expresión de *AURKA* ($p < 1 \times 10^{-4}$) y *AURKB* ($p < 0.01$) tras el tratamiento con APR-246. Mientras que tras el tratamiento con CBP se observó un incremento de *AURKA* ($p < 0.003$) y *AURKC* ($p < 0.007$). En la línea MDA-MB-436 se observó un incremento significativo de la expresión de las auroras quinasas, *AURKA* ($p < 0.044$), *AURKB* ($p < 0.01$) y *AURKC* ($p < 0.001$), tras el tratamiento con APR-246. El tratamiento con carboplatino mostró un incremento de la expresión de *AURKB* ($p < 0.018$), *AURKC* ($p < 0.03$) y p53 ($p < 10^{-5}$). En HCC-1937 tras el tratamiento con APR-246 se produjo un incremento significativo de la expresión de p53 ($p < 0.012$) y tras el tratamiento de carboplatino se observó un incremento significativo de *AURKA* ($p < 0.23$).

En Kuramochi incremento la expresión significativamente en *AURKA* ($p < 0.00007$) y p53 ($p < 0.02$) después de un tratamiento de 72 h con la IC_{50} de APR-246, así mismo se observó un incremento significativo de *AURKA* ($p < 0.015$), *AURKB* ($p < 0.01$), *AURKC* ($p < 0.01$) y p53 ($p < 0.01$) tras el tratamiento con carboplatino. En CaOV3 incremento la expresión significativamente en *AURKB* ($p < 0.00016$) y *TP53* ($p < 0.01$) después de un tratamiento de 72h con la IC_{50} de APR-246. Así mismo se observó un incremento significativo de *AURKA* ($p < 0.009$), *AURKC* ($p < 0.01$) y *TP53* ($p < 0.01$) tras el tratamiento con carboplatino.

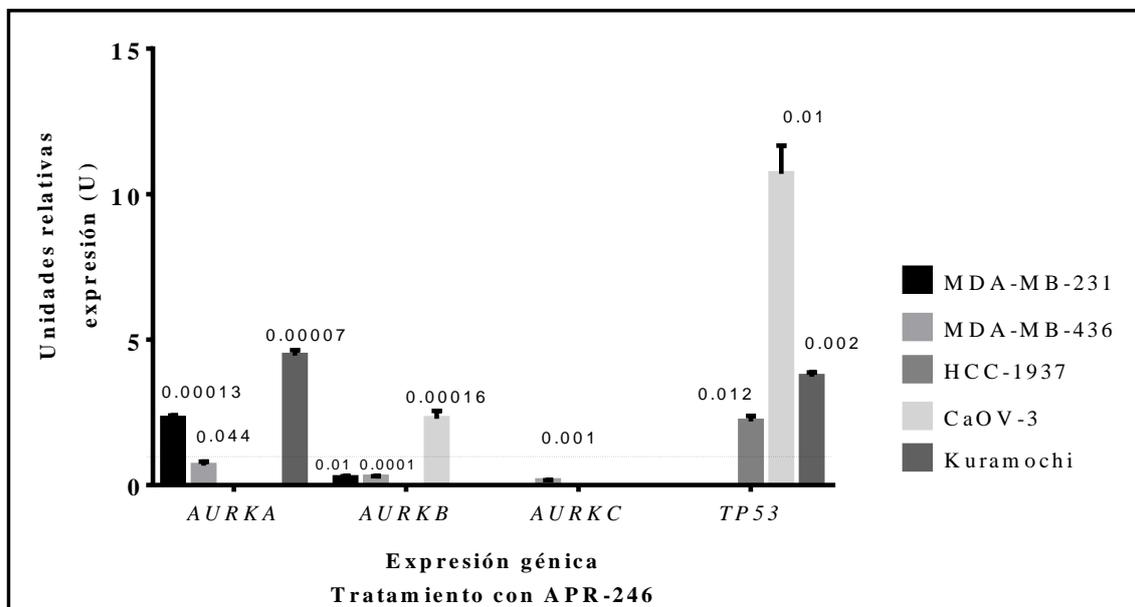


Figura 14. Expresión génica de diferentes genes tras el tratamiento con APR-246. Se trató con IC_{50} de APR-246 (20 μ M) durante 72h en MDA-MB-231, MDA-MB436, HCC-1937, CaOV3 y Kuramochi. La expresión génica se midió por q-PCR a tiempo real. Usamos el valor uno como control (línea negra). Las barras de error representan triplicados experimentales. En la gráfica solo se representan los genes que mostraron p -valor < 0.05 (los “ p -valor” se muestran sobre las barras).

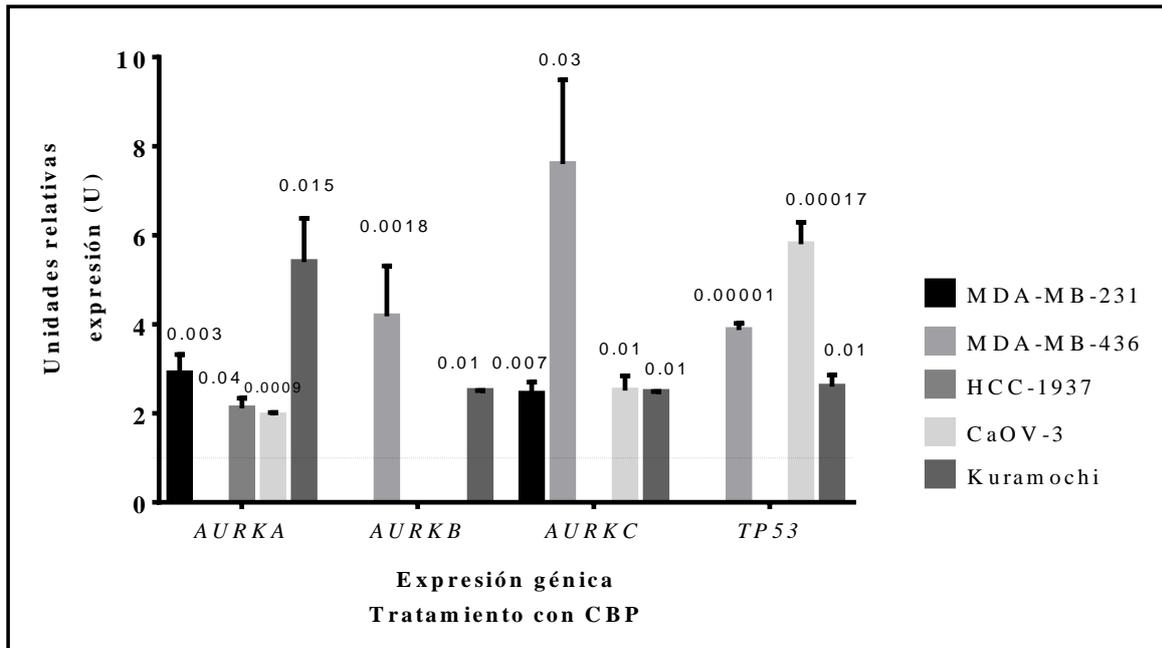


Figura 15. Expresión génica de diferentes genes tras el tratamiento con carboplatino en las líneas celulares de CMTN y COSAG. Se realizó un tratamiento con carboplatino de 72 h con la IC_{50} correspondiente a cada línea celular: 110 μM para MDA-MB-231 y 30 μM para el resto de las líneas celulares. La expresión génica se midió por q-PCR a tiempo real. Usamos el valor uno como control (línea negra). Las barras de error representan triplicados experimentales. En la gráfica se representan los genes que mostraron p -valor < 0.05 . (los “ p -valor” se muestran sobre las barras).

4.5. ENSAYO INMUNOCITOQUÍMICO

Por otra parte, al analizar la expresión proteica por inmunocitoquímica de p53 en todas las líneas celulares, se observó una disminución de su expresión en las líneas celulares MDA-MB-231 (*Figura 16*) y Kuramochi cuando se trataron con el IC_{50} de APR-246 (*Figura 17*). El resto de líneas celulares no mostraron ningún cambio en la expresión de p53 tras tratar con el IC_{50} de APR-246. Cuando las células se trataron con carboplatino, únicamente, Kuramochi mostró una disminución de la expresión de p53 (*Fig. 17.B*).

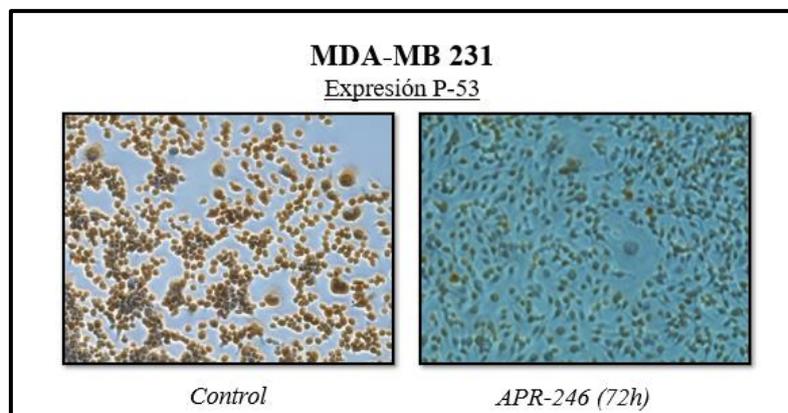


Figura 16. Expresión proteica por inmunocitoquímica de p-53 en MDA-MB-231. Se muestra células sin tratamiento (control) y células tratadas con el IC_{50} de APR-246 (20 μM) durante 72h.

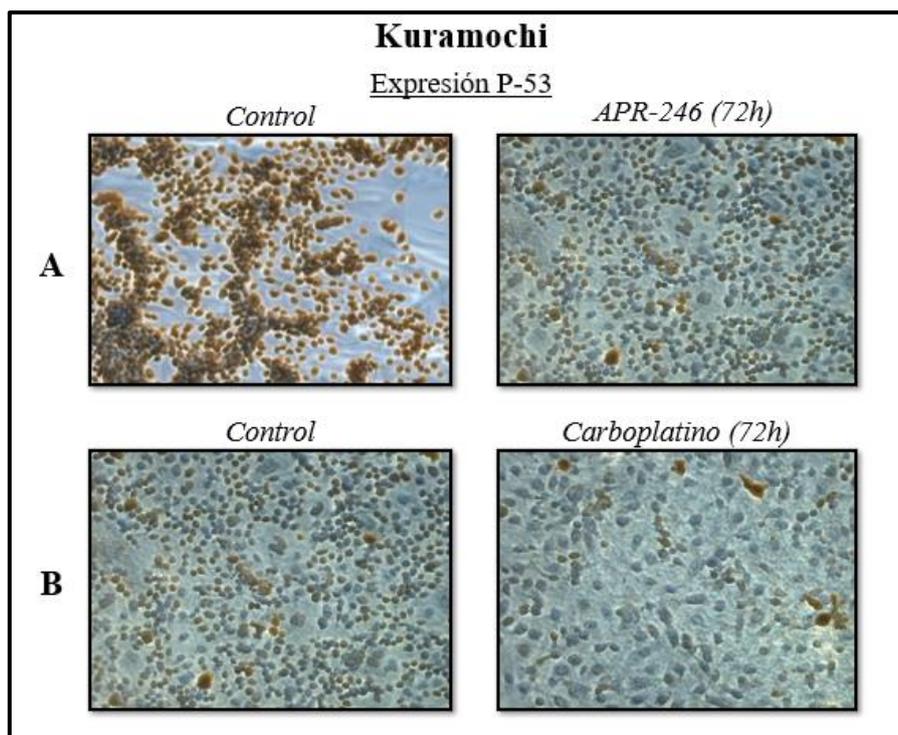


Figura 17. Expresión proteica por inmunocitoquímica de p-53 en Kuramochi tras el tratamiento individual con APR-246 y carboplatino. (A) Se muestra células sin tratamiento (control) y tratadas con el IC₅₀ de APR-246 durante 72h (20 μM). (B) Se muestra el control (sin tratamiento) y células tratadas con el valor de IC₅₀ de carboplatino en la línea celular Kuramochi (30 μM).

4.6. REGULACIÓN DE AURKA CON CARBOPLATINO Y APR-246

Con el objetivo de determinar cómo afecta el tratamiento con carboplatino y APR-246 a la vía AURKA-p53, se analizó la expresión proteica de AURKA en las líneas celulares mediante Western Blot tras ser tratadas con IC₅₀ APR-246 y con IC₅₀ carboplatino de forma individual. En la **Figura 18** se muestra los resultados del análisis proteico de AURKA en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-436, HCC-1937 y Kuramochi. Se utilizó como control la proteína de expresión constitutiva GAPDH. En MDA-MB-231 se observó que la expresión proteica de AURKA disminuye al tratar con el IC₅₀ de APR-246 e incrementa al tratar con el IC₅₀ de carboplatino. En HCC-1937, se observó un leve incremento de AURKA al tratar con el IC₅₀ de carboplatino. En MDA-MB-436 y Kuramochi, no se observan cambios en los niveles de AURKA tras el tratamiento con los fármacos. No se obtuvieron datos de la línea CaOV3. Este experimento solo se pudo realizar una vez, por lo que es necesario repetir el ensayo con triplicados para confirmar las variaciones observadas en este experimento.

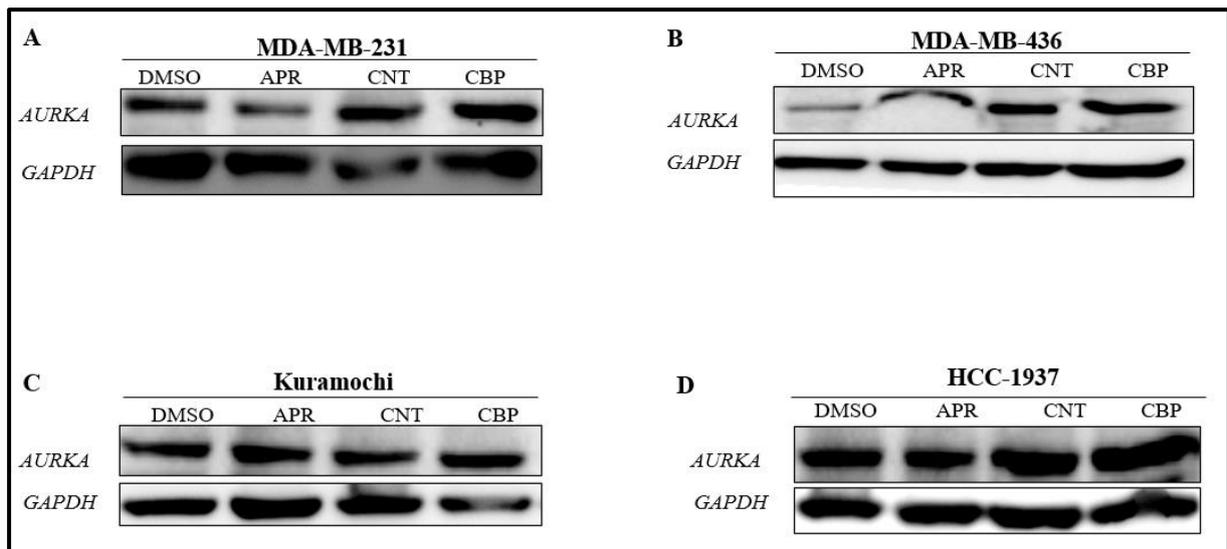


Figura 18. Expresión proteica de AURKA medida por transferencia Western después de 72h de tratamiento con la IC_{50} de APR-246 y carboplatino (CBP) en las líneas cancerígenas. (A) MDA-MB-231, (B) MDA-MB-436, (C) Kuramochi y (D) HCC-1937. Se usó como control GAPDH.

5. DISCUSIÓN

El cáncer mama triple negativo (CMTN) y el cáncer de ovario seroso de alto grado (COSAG) son altamente agresivos y tienen una tasa elevada de mortalidad. La terapia convencional para estos tipos de cánceres se basa en quimioterapia con componentes de platino que, en la mayoría de los casos, resulta ineficaz y genera resistencias a largo plazo. Este hecho, pone de manifiesto la importancia de encontrar terapias alternativas para estos subtipos de cánceres. Una de las características que comparten las pacientes con CMTN y COSAG es la elevada presencia de mutaciones en *TP53*. Por lo tanto, es evidente que la proteína p53 mutante puede ser una buena diana terapéutica. La reactivación farmacológica de p53 mutante ha surgido como una estrategia prometedora para mejorar la terapia del cáncer.

Uno de los fármacos desarrollados con el objetivo de actuar sobre p53 es APR-246. Este profármaco restaura la función de la proteína p53 mutante. Este compuesto se convierte en un aceptor de Michel (MQ) que se une covalentemente a las cisteínas de p53, lo que conduce al replegamiento y restauración de la función de p53 de tipo salvaje. MQ también se dirige al equilibrio redox celular inhibiendo la tiorredoxina reductasa (TrxR1) y agotando el glutatión intracelular. Este doble mecanismo de acción puede explicar la sinergia entre APR-246 y los componentes de platino. Además, el daño al ADN causado por fármacos quimioterapéuticos induce la muerte de las células tumorales en gran medida a través de la activación de p53 de tipo salvaje que activa los procesos apoptóticos. Por consiguiente, las células tumorales que portan mutaciones en p53 o que carecen completamente de p53 son a menudo más resistentes a la quimioterapia convencional. Esto sugiere que la restauración de la función de p53 de tipo salvaje por APR-246 podría sinergizar con componentes de platino (Bykov et al., 2016).

APR-246 es el único compuesto dirigido a p53 en desarrollo clínico. Un ensayo clínico de fase I/IIa en neoplasias hematológicas y cáncer de próstata mostró un buen perfil de seguridad y efectos clínicos en algunos pacientes. Además, APR-246 se prueba actualmente en un ensayo de fase Ib / II en pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado (NCT02098343). En este contexto, dada la importancia de APR-246 nos planteamos observar su efecto al combinarlo con compuestos de platino, como el carboplatino que se usa como quimioterapéutico convencional, con líneas celulares de cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario seroso de alto grado.

Las líneas celulares son comúnmente usadas como modelos de estudio para probar nuevas drogas, terapias de combinación y quimioresistencia (Haley et al., 2016). Con el objetivo de

incorporar líneas celulares que representen la heterogeneidad genómica observada en las mutaciones del gen *TP53* en pacientes con CMTN y COSAG, se seleccionaron las líneas celulares cancerígenas en función del estado mutacional de *TP53*.

En este estudio hemos observado, mediante la obtención del IC_{50} , que todas las líneas celulares disminuyen la viabilidad celular de una manera dosis dependiente al tratar tanto con APR-246 como con carboplatino, de forma individual.

Tanto las líneas celulares CMTN como COSAG, mostraron valores de IC_{50} de APR-246 próximos a $20\mu M$. Esto muestra que las líneas seleccionadas son sensibles a APR-246 independientemente del tipo de mutación en p53. Este hecho estaría de acuerdo con lo descrito en la literatura por el grupo de Fransson et al., quien observó que APR-246 reactiva la proteína p53 mutada e induce la expresión de genes diana de p53 proapoptóticos desencadenando la apoptosis (Fransson et al., 2016). Además, también se ha demostrado que APR-246 puede desencadenar la apoptosis de una manera independiente de p53 al inducir estrés en el retículo endoplasmático e inhibir la tiorredoxina reductasa 1 (TrxR1) (Mohell et al., 2015).

Por otra parte, el IC_{50} de carboplatino se mantuvo constante en Kuramochi, CaOV3, HCC-1937 y MDA-MB-436 ($30\mu M$). No obstante, la línea MDA-MB-231 es menos sensible al tratamiento con carboplatino, ya que el valor de IC_{50} ($110\mu M$) era mayor al resto de las líneas celulares.

Aunque en este estudio no se ha podido determinar si APR-246 y carboplatino actúan de forma sinérgica en las líneas celulares seleccionadas, nuestros experimentos de combinación del IC_{50} de APR-246 y diferentes concentraciones de carboplatino sí muestran, de manera preliminar, que APR-246 potencia el efecto citotóxico de carboplatino en todas las líneas celulares. Además, existen estudios previos en la literatura que describen la existencia de un sinergismo entre APR-246 y componentes de platino, entre ellos el carboplatino, en cáncer de ovario seroso de alto grado (Fransson et al., 2016; Mohell et al., 2015). Lo cual apoyaría los resultados preliminares obtenidos en nuestro estudio. No obstante, es necesario continuar con los experimentos para establecer el tipo de interacción de APR-246 y carboplatino en todas las líneas celulares. Para determinar qué tipo de interacción farmacológica tienen APR-246 y carboplatino (sinergia, aditivo o antagónico) sería necesario también realizar una combinación de los fármacos en la que se varíe la concentración de APR-246 y se deje constante la concentración del IC_{50} de carboplatino. Una vez establecido el tipo de interacción, se calcularía el índice de combinación (CI) de los fármacos mediante el método de Chou Talalay (Chou,

2010). El índice de combinación es un valor cuantitativo que indica el sinergismo ($CI < 1$), el efecto aditivo ($CI = 1$) y el antagonismo ($CI > 1$). Estaba contemplado realizar estos experimentos previamente, pero debido a la situación actual de pandemia no se pudieron llevar a cabo.

Para evaluar el efecto del tratamiento individualizado con APR-246 y carboplatino sobre la vía AURK y p53 en las líneas celulares se realizaron análisis de la expresión de los genes *AURKA*, *AURKB*, *AURKC* y *TP53*. También se estudió los cambios a nivel proteico, aunque en este caso, por los motivos anteriormente descritos, solo se pudo realizar un análisis de la expresión proteica de p53 por inmunocitoquímica y de AURKA por Western Blot. Dado que no se dispone de resultados suficientes no se puede concluir cómo se ve alterado el eje AURK-P53 en todas las líneas celulares. No obstante, a continuación, se plantea una posible explicación sobre las variaciones observadas en AURKA y p53 tras el tratamiento con APR-246 y carboplatino en la línea MDA-MB-231.

Teniendo en cuenta que la línea celular MDA-MB-231 tiene la proteína p53 mutada, esperábamos que el tratamiento con APR-246 restaurara funcionalmente a p53 induciendo la apoptosis de las células cancerígenas. Además, dado que hay una regulación recíproca entre p53 y AURKA, pensamos que la reactivación de p53 podría tener un efecto en la expresión de AURKA. Se ha descrito que p53 regula negativamente el nivel de expresión de Aurora A, a través de formas tanto transcripcionales como postraduccionales (Wu et al., 2012).

Al tratar la línea MDA-MB-231 con APR-246, no se observaron diferencias significativas en la expresión de p53, pero si se detectó una disminución de la expresión proteica por inmunocitoquímica. Entendemos por los resultados obtenidos por inmunocitoquímica que al tratar a las células con APR-246 se revierte el estado mutacional de la proteína p53 activándola funcionalmente y, en consecuencia, debido a la regulación postranscripcional que ejerce p53 sobre AURKA podrían disminuir los niveles proteicos de AURKA. Además, según lo descrito en la bibliografía p53 en estado *wild type* sería capaz de regular al alza *Fbw7 α* , un componente proteico de caja F de la ligasa E3 de Aurora A, que se ha comprobado que desencadena la degradación de Aurora A (Wu et al., 2012). Esto se correlacionaría con los resultados obtenidos en nuestro estudio preliminar del análisis por Western, en el cuál hemos observado una disminución de AURKA tras el tratamiento con APR-246.

En cuanto al tratamiento con carboplatino, las células MDA-MB-231 mostraron un incremento de la expresión de Aurora quinasa A tanto génica como proteica. El daño que produce carboplatino en el ADN desencadenaría la activación de los mecanismos de respuesta

al daño del ADN, como p53. No obstante, la mutación de p53, en estas células y según lo descrito anteriormente, podría estar causando la disminución de la regulación de Fbw7 α , lo que resulta en una sobreexpresión de AURKA.

Como conclusión general del estudio se podría decir que puesto que el tratamiento con APR-246 y carboplatino parece influir en la ruta AURK-p53. Es necesario realizar experimentos adicionales para determinar con exactitud la influencia de APR-246 sobre el eje AURK-p53 en todas las líneas celulares. Además, también sería de gran interés analizar las variaciones en las formas fosforiladas de p-53 y de las aurora quinasas y otros marcadores de control del ciclo celular como p21 y p73, e indagar el papel de Fbw7 α en la vía AURK-p53.

En un principio uno de los objetivos era analizar el efecto de la combinación de APR-246 y carboplatino sobre la vía AURK-p53. No obstante, por la falta de tiempo dadas las circunstancias epidemiológicas que concurrieron durante la realización de este trabajo, no se pudo finalizar este análisis dentro del cronograma previsto.

En definitiva, los resultados sugieren que la terapia combinada de APR-246 con fármacos basados en platinos es una estrategia útil para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo y el cáncer de ovario seroso de alto grado por ello en un futuro se plantea continuar con estos estudios para establecer la influencia de la terapia combinada de APR-246 y carboplatino en la vía de las aurora quinasas y p53.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se podrían extraer del estudio serían:

1. Las líneas de CMTN y COSAG son sensibles al tratamiento individual con APR-246 y carboplatino de una manera dosis dependiente.
2. Tanto las líneas de COSAG como las de CMTN muestran la misma sensibilidad a APR-246, mostrando el mismo valor de la concentración media citotóxica (IC_{50}) de 20 μM , independientemente del tipo de mutación de p53.
3. Las líneas celulares MDA-MB-436, HCC-1937, Kuramochi y CaOV3 muestran una sensibilidad a carboplatino similar, con valores de concentración media citotóxica (IC_{50}) aproximados a 30 μM . La línea MDA-MB-231 es menos sensible a carboplatino que el resto de las líneas celulares, mostrando un IC_{50} de 110 μM .
4. En la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, se observa que el tratamiento individual con carboplatino y APR-246 tiene un efecto sobre la vía AURK-p53.
5. APR-246 potencia el efecto citotóxico del carboplatino en líneas de cáncer de mama triple negativo y cáncer de ovario seroso de alto grado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 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*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bykov, V. J. N., Zhang, Q., Zhang, M., Ceder, S., Abrahmsen, L., & Orazi, G. D. (2016). Targeting of Mutant p53 and the Cellular Redox Balance by APR-246 as a Strategy for efficient Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 6(21), 17–23. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00021>
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2011). Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nature10166>. Integrated
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Fransson, Å., Glaessgen, D., Alfredsson, J., Wiman, K. G., Bajalica-Lagercrantz, S., & Mohell, N. (2016). Strong synergy with APR-246 and DNA-damaging drugs in primary cancer cells from patients with TP53 mutant High-Grade Serous ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0239-6>
- Geenen, J. J. J., Linn, S. C., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2018). PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(4), 427–437. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0587-4>
- Haley, J., Tomar, S., Pulliam, N., Xiong, S., Perkins, S. M., Karpf, A. R., Mitra, S., Nephew, K. P., & Mitra, A. K. (2016). Functional characterization of a panel of high-grade serous ovarian cancer cell lines as representative experimental models of the disease. *Oncotarget*, 7(22), 32810–32820.
- Kim, J., Park, E. Y., Kim, O., Schilder, J. M., Coffey, D. M., Cho, C. H., & Bast, R. C. (2018). Cell origins of high-grade serous ovarian cancer. *Cancers (Basel)*, 10(11), 433. <https://doi.org/10.3390/cancers10110433>
- Kim, M. P., & Lozano, G. (2018). Mutant p53 partners in crime. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 161–168. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.185>
- Lisio, M. A., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z. H., & Telleria, C. (2019). High-grade serous ovarian cancer: Basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 952. <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>
- Mehra, R., Serebriiskii, I. G., Burtness, B., Astsaturov, I., & Golemis, E. A. (2013). Aurora kinases in head and neck cancer. *The Lancet Oncology*, 14(10), e425–e435. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70128-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70128-1)
- Mohell, N., Alfredsson, J., Fransson, Å., Uustalu, M., Byström, S., Gullbo, J., Hallberg, A., Bykov, V. J. N., Björklund, U., & Wiman, K. G. (2015). APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells. *Nature*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.143>
- Nakhjavani, M., Hardingham, J. E., Palethorpe, H. M., Price, T. J., & Townsend, A. R. (2019). Druggable molecular targets for the treatment of triple negative breast cancer. *Journal of Breast Cancer*, 22(3), 341–361. <https://doi.org/10.4048/jbc.2019.22.e39>

- Perdrix, A., Najem, A., Saussez, S., Awada, A., Journe, F., Ghanem, G., & Krayem, M. (2017). PRIMA-1 and PRIMA-1Met (APR-246): From Mutant/Wild Type p53 Reactivation to Unexpected Mechanisms Underlying Their Potent Anti-Tumor Effect in Combinatorial Therapies. *Cancers*, *9*(172), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers9120172>
- Pérez-Fidalgo, J. A., Gambardella, V., Pineda, B., Burgues, O., Piñero, O., & Cervantes, A. (2020). Aurora kinases in ovarian cancer. *ESMO Open Cancer Horizons*, *5*(5), e000718. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000718>
- Pérez Fidalgo, J. A., Roda, D., Roselló, S., Rodríguez-Braun, E., & Cervantes, A. (2009). Aurora kinase inhibitors: A new class of drugs targeting the regulatory mitotic system. *Clinical and Translational Oncology*, *11*(12), 787–798. <https://doi.org/10.1007/s12094-009-0447-2>
- Pitolli, C., Wang, Y., Candi, E., Shi, Y., Melino, G., & Amelio, I. (2019). p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers*, *11*(12), 1983.
- Sasai, K., Treekitkarnmongkol, W., Kai, K., Katayama, H., & Sen, S. (2016). Functional significance of Aurora kinases-p53 protein family interactions in cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 6, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00247>
- Synnott, N. C., Murray, A., McGowan, P. M., Kiely, M., Kiely, P. A., Donovan, N. O., & Connor, D. P. O. (2017). Mutant p53 : a novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer ? *International Journal of Cancer*, *140*, 234–246. <https://doi.org/10.1002/ijc.30425>
- Tang, A., Gao, K., Chu, L., Zhang, R., Yang, J., & Zheng, J. (2017). Aurora kinases: Novel therapy targets in cancers. *Oncotarget*, *8*(14), 23937–23954. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14893>
- Wu, C., Yang, T., Yu, C. R., Phan, L., Ivan, C., Sood, A. K., Hsu, S., & Lee, M. (2012). p53 negatively regulates Aurora A via both transcriptional and posttranslational regulation. *Cell Cycle*, *11*(18), 3433–3442. <https://doi.org/10.4161/cc.21732>
- Yan, M., Wang, C., He, B., Yang, M., Tong, M., Long, Z., Liu, B., Peng, F., Xu, L., Zhang, Y., Liang, D., Lei, H., Subrata, S., Kelley, K. W., Lam, E. W.-F., Bilian, J., & Liu, Q. (2016). Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy. *Medicinal Research Reviews*, *36*(6), 1036–1079. <https://doi.org/10.1002/med>