

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

*Para optar al título de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico Molecular,
Hematología y Medicina Transfusional*

**“Efecto de la inhibición de modificadores de histonas sobre el IC50 de Olaparib en
líneas celulares derivadas de cáncer de mama RE+ (MCF7) y triple negativas
(MDA-MB-231)”**

MARÍA IGNACIA CALDERÓN PINO

Tutor: Katherine Marcelain

Laboratorio de Genómica del Cáncer

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Firma

Santiago de Chile

2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

*Para optar al título de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico Molecular,
Hematología y Medicina Transfusional*

**“Efecto de la inhibición de modificadores de histonas sobre el IC50 de Olaparib en
líneas celulares derivadas de cáncer de mama RE+ (MCF7) y triple negativas
(MDA-MB-231)”**

MARÍA IGNACIA CALDERÓN PINO

Tutor: Katherine Marcelain

Laboratorio de Genómica del Cáncer

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Firma

Santiago de Chile

2023

Santiago, 29 de enero de 2024

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La **Srta. María Ignacia Calderón Pino**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el décimo semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Efecto de la inhibición de modificadores de histonas sobre el IC50 de Olaparib en líneas celulares derivadas de cáncer de mama RE+ (MCF7) y triple negativas (MDA-MB-231)”** dirigida por la **Profa. Katherine Marcelain Cubillos**, Académica del Laboratorio de Genómica del Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por el: **Dr. Nelson Varela**, académico del Departamento de Medicina Interna Oriente Facultad de Medicina, Universidad de Chile y la **Dra. Marioly Müller**, Académica del Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Dr. Nelson Varela	6.45	25%
Corrector 2 Dra. Marioly Müller	6.81	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	6.17	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.61	

En consecuencia la estudiante **María Ignacia Calderón Pino** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Profa. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



HERNAN RODRIGO
TORRES RIVERA
15.932.579-2
31/01/2024 - 13:43
UNIVERSIDAD
DE CHILE
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
CV: nbys9pq55ipsfaddkobb3mbksr

Prof. Hernán Torres
PEC curso
Trabajo de Investigación

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta investigación a mi familia, la cual ha sido un apoyo fundamental en este proceso, por estar siempre pendientes de mis necesidades, por ser un apoyo constante con sus palabras de aliento y su fé depositada en mí. También de manera especial, quiero dedicar esto a mi pareja, quien estuvo a mi lado brindándome su constante y arduo apoyo en los momentos más críticos, siendo la contención necesaria en momentos de cansancio y agotamiento, así como también otorgándome entusiasmo y energía para finalizar con éxito este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincera gratitud a todos quienes hicieron posible que esta investigación se llevara a cabo, a mis seres queridos que me dieron su apoyo en la distancia, a mi tutora Katherine Marcelain, quien me acogió como tesista en un complicado contexto, le agradezco la confianza que depositó en mí, y su apoyo para poder tener un desempeño adecuado con completa libertad y desplante en su laboratorio durante el tiempo que necesité. También quiero agradecer a Fernanda Morales, por guiarme de cerca en todo el proceso experimental, y estar pendiente de cada momento en que requerí su apoyo y orientación. Por último y no menos importante, agradecer a todas aquellas maravillosas personas que conocí en el laboratorio, que igualmente me brindaron su apoyo y empatía al momento de necesitar de sus tiempos y disposición para lograr finalizar con éxito mi investigación.

FINANCIAMIENTO

Proyecto Fondecyt regular #1221162 “UNRAVELING THE MECHANISM BEHIND SKI-DEPENDENT TRIMETHYLATION OF LYS9 IN HISTONE H3 IN PERICENTRIC HETEROCHROMATIN AND ITS ROLE IN THE MAINTENANCE OF GENOME STABILITY”.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 Generalidades del cáncer de mama.....	5
2.2 Subtipos moleculares de cáncer de mama.....	6
2.3 Tratamiento según subtipos moleculares.....	7
2.4 Tratamiento al cáncer de mama con Olaparib.....	8
2.5 Respuesta al daño y reparación del DNA por HRR.....	10
2.6 Modificación de histonas en respuesta al daño y reparación del DNA.....	12
2.6.1 Otras modificaciones de histonas.....	14
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
- 4.2.1 Objetivo específico 1.....	16
- 4.2.2 Objetivo específico 2.....	16
- 4.2.3 Objetivo específico 3.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 Materiales.....	17
5.1.1 Líneas celulares.....	17
5.1.2 Inhibidores.....	17
5.2 Métodos de laboratorio.....	17
5.2.1 Cultivo celular.....	17
5.2.2 Recuento celular.....	18
5.2.3 Ensayo MTS.....	19
5.3 Diseño experimental.....	20
5.3.1 Experimento 1: Curva IC50 de Olaparib e inhibidores en MCF7 y MDA-MB-231..	20
5.3.2 Experimento 2: Efecto de inhibidores en sensibilidad a Olaparib en células	
MCF7 y MDA-MB-231.....	21
5.4 Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS.....	22
6.1 IC50 de Olaparib e inhibidores de EYA2 y HDACs en células MCF7 y MDA-231.....	22
6.2 Efecto de inhibidores de HDAC y EYA2 sobre la sensibilidad a Olaparib en células	
MCF7 y MDA-MB-231.....	26
6.2 Comparación entre la sensibilidad de las células MCF7 y MDA-MB-231 a Olaparib y	
los distintos inhibidores.....	32
7. DISCUSIÓN.....	39
8. CONCLUSIÓN.....	44
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
10. ANEXOS.....	54

1. RESUMEN

El cáncer de mama es la principal enfermedad oncológica en mujeres. Existen distintos subtipos moleculares de este cáncer, los cuales responden de distinta manera a los tratamientos específicos.

Los inhibidores de PARP como Olaparib, son fármacos que se utilizan en pacientes cuyos tumores presentan deficiencia en la reparación del DNA. El objetivo de esta investigación fue evaluar si la inhibición de enzimas desacetilasas de histonas (HDAC) y fosfatasa de H2AX (EYA2), sensibiliza a las células de cáncer de mama a los efectos del Olaparib.

Mediante el ensayo de viabilidad MTS, se evaluó si se potenciaba la sensibilidad de Olaparib mediante el uso de distintos inhibidores en células MCF7 y MDA-MB-231, las que representan a dos subtipos de cáncer de mama. Los resultados mostraron que la combinación redujo el IC50 de Olaparib en células MCF7, lo que indica que la combinación puede ser más efectiva que Olaparib por sí solo. Este efecto sinérgico no ocurrió en las células MDA-MB-231, pues la combinación de Olaparib con inhibidores tuvo un efecto menor en la sensibilidad a Olaparib. No obstante, la combinación con Cisplatino fue la única que potenció el efecto de Olaparib en este tipo de células.

Estos resultados sugieren que el uso de Olaparib en conjunto con fármacos que generen daño en el DNA, pueden ser una estrategia eficaz para el tratamiento del cáncer de mama luminal.

Palabras clave: Cáncer de mama, reparación del DNA, modificaciones de histonas, Olaparib, inhibidores de HDAC y EYA2, Cisplatino, subtipos MCF7 y MDA-MB-23.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades del cáncer de mama

El cáncer es una enfermedad que ha afectado a miles de millones a lo largo de la historia, siendo el cáncer de mama la enfermedad oncológica más frecuente en mujeres. Se estima que 1 de cada 12 mujeres contraerán esta enfermedad a lo largo de su vida. (1). En el mundo, el cáncer de mama es la causa principal de mortalidad en mujeres, como también en Chile, según datos del Ministerio de Salud (2)(3). En el año 2020 en Chile se diagnosticaron 55 cánceres de mama por cada 100.000 mujeres y fallecieron 17,3 por cada 100.000 mujeres (4).

En este contexto, es crucial tener en cuenta que existen diversos tipos y subtipos de cáncer de mama, como también distintos estadios de la enfermedad, los cuales están relacionados al pronóstico de cada paciente según el momento en que se le diagnostica. Conocer el estadio del cáncer de un paciente permite evaluar el pronóstico y seleccionar el tratamiento más adecuado para su subtipo de cáncer y estadio. El correcto análisis de cada caso clínico permite dar una posible mejora o cuidado a los pacientes y familiares, como también poder conocer y saber manejar posibles eventualidades que puedan ocurrir en el transcurso de la enfermedad (5).

Dentro de los desafíos que sigue habiendo en la actualidad con respecto al tratamiento del cáncer, se encuentra la recidiva del cáncer, la etapa metastásica, algunos subtipos de cáncer más agresivos, la resistencia o el fallo al tratamiento (6,7). Es por ello que numerosos estudios se han focalizado en entender los mecanismos por los cuales el cáncer se desarrolla y el modo en que los tratamientos pueden interrumpir la progresión del mismo. Sin embargo, si bien existen muchos mecanismos fisiopatológicos para resistir los tratamientos,

muchas veces existen algunas variables manipulables médicamente para poder hacer efectivo un tratamiento, siendo en la actualidad lo que se sigue investigando.

2.2 Subtipos moleculares de cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad del cáncer de mama no está limitada a un solo tipo de enfermedad, sino que existen distintos tipos y subtipos de cáncer de mama. Si bien el cáncer de mama se ha clasificado de diversas maneras, los investigadores lograron demostrar que, según la distinta expresión génica del cáncer de mama, se puede subtipificar para poder analizar el comportamiento biológico de cada tipo de cáncer, como también su pronóstico. Para comprender los subtipos moleculares, primero se deben entender algunos conceptos claves como RH, HER2, Ki67. El receptor hormonal (RH) hace referencia a la presencia de receptores hormonales de estrógeno o progesterona, que favorecen el crecimiento tumoral, es decir, son hormono-dependientes, lo que se denomina RH positivo (RH +). En el caso contrario, en el cual las células tumorales no presentan receptores de hormonas, corresponden a un cáncer RH negativo (RH -). El receptor de factor de crecimiento epidérmico tipo 2, corresponde a HER2 (del inglés "*Human Epidermal growth factor Receptor 2*") y se denomina subtipo HER2 positivo (HER2 +) cuando las células tienen altos niveles del receptor, en contraparte, cuando el cáncer es HER2 negativo (HER2 -), las células tienen niveles normales del receptor. Por último, Ki67 es un marcador que permite conocer la tasa proliferativa de las células tumorales, el cual tiene una relación directa con el empeoramiento del pronóstico de los pacientes (8,9). En conjunto, los factores antes mencionados definen los subtipos del cáncer de mama, los cuales son: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y triple negativo (TNBC, del inglés "*Triple-Negative Breast Cancer*").

Las células del cáncer de mama subtipo Luminal A expresan receptores de estrógeno y progesterona, no expresan HER2, y tienen bajos niveles de Ki67. Este corresponde a un

cáncer de lenta progresión y se caracteriza por ser poco agresivo, por lo tanto tiene mejor pronóstico. Por otro lado, el cáncer de mama subtipo Luminal B es RH + para receptores de estrógeno, puede ser negativo o positivo para HER2, y presenta altos niveles de Ki67, por lo tanto, esto implica que tiene una tasa de proliferación tumoral más alta, empeorando el pronóstico. El cáncer de mama HER2 positivo, es negativo para RH y positivo para HER2, si bien este cáncer está asociado a peores pronósticos, la terapia dirigida a HER2 ha resultado exitosa. Por último, el TNBC corresponde a un subtipo de cáncer de mama que es negativo para todos los receptores previamente mencionados, tiene características clínicas que incluyen alta invasividad, alto potencial metastásico, propensión a recaídas y mal pronóstico, por lo que, es más agresivo que los subtipos Luminal, y al carecer de la expresión de RH y HER2, se dificulta la terapia de este cáncer. (10,11,12).

Cada uno de los subtipos de cáncer al tener distintas características, responderían de distinta manera a los distintos tratamientos. En esta investigación se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7, que pertenecen a los subtipos TNBC y Luminal A, respectivamente, como modelos para evaluar in vitro, la sensibilidad o resistencia a Olaparib y a los inhibidores de modificaciones de histonas.

2.3 Tratamiento según subtipos moleculares

El tratamiento contra el cáncer de mama va a depender del estadio en el que se encuentre la persona, como también el subtipo molecular que presente. Usualmente cuando el cáncer de mama es localizado, la terapia consiste en la resección quirúrgica del tumor y de los ganglios linfáticos axilares, además se suele complementar con radiación postoperatoria. En etapa metastásica, el objetivo es prolongar la vida y aliviar la sintomatología, ya que, hasta el presente, en este estadio el cáncer es incurable. En esta etapa se usa terapia preoperatoria (neoadyuvante), postoperatoria (adyuvante) o ambas (13).

Generalmente el subtipo de cáncer de mama es lo que guía la terapia administrada. Aquellos que son RH + reciben terapia endocrina, que consiste en medicamentos que bloquean los receptores de estrógeno y progesterona; sin embargo, algunos casos particulares, igualmente requieren quimioterapia (14,15). Algunos de los tratamientos que se usan en el cáncer de mama RH + son el tamoxifeno, el cual es un modulador selectivo de los receptores de estrógeno, y los bloquea. Se utiliza tanto en cáncer de mama Luminal A y Luminal B. También es común el uso de inhibidores de aromatasa, que bloquean la producción de estrógeno (16). Para los pacientes con cáncer de mama HER2 + se suele utilizar terapia dirigida, la cual consiste en medicamentos que se dirigen contra blancos celulares como genes, proteínas o moléculas, como por ejemplo Trastuzumab y Pertuzumab, que corresponden a anticuerpos monoclonales que bloquean a HER2 +. También en este cáncer se utiliza Tucatinib, un inhibidor de la tirosina quinasa que bloquea a HER2. También en algunos casos se complementa con quimioterapia (17). Por último, para el TNBC en algunos casos se realiza la resección quirúrgica de tumores, quimioterapia, radioterapia y/o terapia dirigida para bloquear mecanismos que impulsan el desarrollo del cáncer, como lo son la inmunoterapia y los inhibidores de PARP como el Olaparib. (18)(12).

2.4 Tratamiento al cáncer de mama con Olaparib

Como bien se conoce, el cáncer es una patología en la cual hay una alta tasa proliferativa celular. Al haber una exacerbada replicación del DNA y las vías de reparación del DNA no logren su objetivo, como resultado puede ocurrir inestabilidad genética y epigenética, fragmentación del DNA, pérdida o reordenamiento de cromosomas en las células cancerosas, entre otros efectos (19). Es por ello por lo que, al ocurrir una desregulación de los mecanismos celulares de reparación, una estrategia terapéutica para el cáncer es inhibir

los mecanismos de reparación del DNA, para inducir la muerte celular de las células cancerosas, en vez de permitir que la maquinaria celular intente reparar y ocurran más daños en el proceso (20).

PARP (del inglés "*Poly (ADP-ribose) Polymerases*") corresponde a una familia de proteínas de unión al DNA que tienen el rol de mantener la integridad genómica y la modificación de la transcripción en respuesta a daño en el DNA (DDR, del inglés "*DNA Damage Response*") (21). PARP corresponde a una familia de 17 proteínas, dentro de las cuales se destaca PARP1 y PARP2, que participan en la detección y reparación de roturas de simple hebra (SSB, del inglés "*Single Strand Break*") (22). Cuando PARP es inhibida, las roturas monocatenarias se acumulan, provocando roturas de doble cadena (DSB, del inglés "*Double Strand Break*"). En condiciones normales, estas DSB serán reparadas por el mecanismo de "reparación por recombinación homóloga" (HRR, del inglés "*Homologous Recombination Repair*"). Si existe una deficiencia en este mecanismo de reparación, las DSB se repararán por un mecanismo alternativo de "reparación por unión de extremos no homólogos" (NHEJ, del inglés "*Non-Homologous End Joining*"). Este mecanismo es poco preciso, por lo que genera alteraciones genómicas que finalmente llevan a la muerte celular. Por lo tanto, para que la inhibición de PARP produzca muerte celular, las células deben tener disminuida su capacidad de reparar las DSB mediante el mecanismo HRR. A este tipo de interacción farmacológica se le denomina letalidad sintética (La imagen presentada en el anexo 1, es extraída de Yap et al. (2019)) (23,24). Dentro de los inhibidores de PARP se encuentran Rucaparib, Veliparib y Olaparib (25).

Olaparib es un inhibidor de PARP1 y PARP2, y en cáncer de mama está indicado para pacientes que poseen mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*. Estos genes son supresores de tumores que codifican proteínas implicadas en la reparación de roturas de

DSB del ADN mediante la vía de HRR (22). Así, cuando *BRCA1* o *BRCA2* se encuentra mutado, el bloqueo o inhibición de las proteínas PARP provoca daños irreparables en el DNA, llevando la célula a apoptosis (26).

En otros tipos tumorales, como cáncer de ovario, próstata y páncreas, la indicación de Olaparib no se restringe a las mutaciones en los genes *BRCA1* o 2, sino que está abierta a mutaciones en otros genes que afecten el HRR (27).

Por otro lado, se ha descrito resistencia a este medicamento, debido a señalización molecular desreguladas, mutaciones inversas (como la restauración de *BRCA1/2*), restauración de la estabilidad de la horquilla de replicación y aumento del flujo de salida de los fármacos (28). Estos mecanismos afectan la sensibilidad de Olaparib, perjudicando el tratamiento efectivo para los pacientes.

Considerando estos antecedentes, en esta tesis se evaluó el efecto de inhibidores de modificaciones de histonas que pueden afectar indirectamente la reparación de las DSB, sobre muerte celular inducida in vitro por Olaparib, así como también el uso de Cisplatino como inhibidor de la síntesis de DNA, para inducir daño en este. El uso de Cisplatino se fundamenta en generar la condición basal necesaria para que Olaparib logre su mecanismo de acción.

2.5 Respuesta al daño y reparación del DNA por HRR

Para mantener la estabilidad celular, es importante que ocurra una transmisión correcta de la información genética, por lo tanto debe haber una correcta división celular, duplicación y segregación cromosómica, como también una adecuada duplicación y modificación de histonas. Cuando ocurren errores en los procesos del ciclo celular debido a mutaciones o

daños en el DNA, resulta en una gran inestabilidad genómica, fenómeno que es característico en células cancerosas (29).

Frente al daño en el DNA, se activa la “respuesta al daño en el DNA” (DDR, del inglés “*DNA Damage Response*”) que corresponden a un conjunto de mecanismos que se encargan de la reparación del DNA, la tolerancia al daño y vías de control del ciclo celular. Estas vías si bien son distintas entre sí, su acción se superponen generando una red compleja de reparación del DNA (30).

Las vías de reparación de daño al DNA son variadas y tienen especificidad según el origen del daño. Algunas de estas vías son la reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos, HRR y NHEJ (31). Cuando hay daño en el DNA que no es eliminado por ninguna vía de reparación, se ralentiza la síntesis de DNA y estanca la horquilla de replicación, por lo tanto las bifurcaciones resultantes son el origen mediante el cual ocurre daño en el DNA del tipo SSB o DSB (32).

De los daños mencionados, las roturas de doble cadena del DNA (DSB) son las más graves y tóxicas para las células, es por ello que el sistema de reparación debe estar altamente regulado. Estas DSB pueden surgir desde agentes exógenos como la radiación ultravioleta, la alimentación, el tabaquismo, etc; así como también de agentes endógenos como lo son el estrés replicativo y los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo mitocondrial, en respuesta a inflamación, infecciones, y otros (33).

Como se mencionó previamente, la reparación de DSB es realizada por dos vías principales, NHEJ -puede ocurrir en cualquier fase del ciclo celular- y la reparación por recombinación homóloga (HRR) -ocurre en las fases S y G2 del ciclo celular-. NHEJ es la vía más utilizada

para la reparación de DSB, ya que permite la unión directa de los extremos rotos de las cadenas de DNA, sin que haya resección del DNA (34). Durante la etapa final de esta vía, pueden ocurrir pérdidas o cambios en algunos nucleótidos, lo que implica que NHEJ si bien es rápido al reparar, no está exento de errores. Por otro lado, la HRR a diferencia de NHEJ, necesita una hebra planilla del DNA para reparar la hebra rota. Esta vía inicia con la unión del complejo MRN a DSB, para crear regiones monocatenarias que permiten el reclutamiento de proteínas reparadoras del DNA, y así generar la hibridación en homologías largas. Si bien no es la vía más utilizada para la reparación de DSB, es más confiable que NHEJ (35).

2.6 Modificación de histonas en respuesta al daño y reparación del DNA

Como bien se conoce, las histonas corresponden a proteínas que se organizan en octámeros que incluye dos moléculas de cada una de las histonas H3, H4, H2A y H2B y en esta estructura se envuelve la cromatina, formando un nucleosoma (36). La interacción DNA-histona está regulada por enzimas mediante acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, lo cual se denomina modificaciones post-traduccionales (PTM, del inglés "*Post-translational modification*") (37).

Cuando se presenta una DSB, uno de los primeros eventos que ocurre es la fosforilación de H2AX (30). H2AX corresponde a una variante de la histona H2A, que es una de las proteínas del octámero presentes en el nucleosoma; esta desempeña un rol en la DDR al reclutar a proteínas que participan en la reparación del daño, y al tener la capacidad de detener el ciclo celular para permitir esta reparación (38). La fosforilación de H2AX es mediada por las quinasas ATM y ATR, las cuales se activan en DDR y se unen a H2AX para fosforilar a la serina 139 de H2AX, lo que provoca la formación de γ H2AX. Esta última, entre todas sus funciones, actúa como marcador para que las células puedan reconocer donde ocurrió el daño en el DNA (39), y además de aquello, ayuda en la reparación de las roturas del mismo,

participando de la reparación, como también activando otras vías de reparación. La formación de DSB desencadena la activación de muchos factores, incluida la fosforilación de la variante de histona H2AX, por lo tanto, en el caso de ausencias de γ H2AX, puede haber una ineficiente DDR, promoviendo el cáncer y otras enfermedades (39,38).

EYA2 es una proteína de unión al DNA, que juega un papel importante en la DDR. EYA2 es tiene actividad fosfatasa con especificidad por la tirosina 142 de H2AX (Y142), regulando el estado de fosforilación de H2AX, por lo tanto, tendría un rol en la reparación del ADN (40). La pérdida de la actividad de EYA2 se asocia con un aumento de la muerte celular apoptótica (41); esto fue corroborado en otro estudio en el cual se encontró que el aumento de apoptosis en células que carecían de EYA2, se debía a la fosforilación persistente de H2AX Y142 (42).

En un estudio realizado en ajolotes, a estos se les mutó EYA2, y aquello generó una pérdida de la capacidad regenerativa de sus extremidades y un aumento de γ H2AX. Sin embargo, no detectaron una acumulación de daño en el DNA. Además, en la misma investigación se encontró que los perfiles de expresión de genes involucrados en la reparación del DNA y el ciclo celular se correlacionaron positivamente con la expresión de EYA2, y que esta fosfatasa interactúa físicamente con un complejo que contiene H2AX en las células (43).

Por lo tanto, según la evidencia que existe hasta la actualidad, la información respecto a cuál es rol de EYA2 en los mecanismos de reparación, aún es una incógnita, debido a la contradicción con respecto a su respuesta en el daño del DNA. Pese a estos hallazgos, falta evidencia en humanos que demuestren una relación directa entre el rol de EYA2, con la reparación del DNA. Más aún no hay estudios que relacionen la actividad de esta enzima con el efecto de Olaparib, y es lo que se espera evaluar en este estudio.

2.6.1 Otras modificaciones de histonas

En las células eucariotas, la cromatina está organizada según sus distintos dominios y niveles de expresión según su grado de compactación, pudiendo encontrarse como eucromatina y heterocromatina. La eucromatina corresponde a la cromatina que se encuentra levemente compactada y se compone de genes activos transcripcionalmente, además se caracteriza por presentar baja metilación del DNA y alta acetilación de histonas (44). Por otro lado, la heterocromatina corresponde a cromatina altamente compactada, silenciosa transcripcionalmente, hay genes inactivos y repetidos, y alto grado de tri-metilación del DNA en histonas (44,45). Las modificaciones estructurales de las histonas, llevadas a cabo por enzimas específicas, como las histonas acetiltransferasas (HATs), las histonas desacetilasas (HDACs), las histonas metiltransferasas (HMTs) y las histonas desmetilasas (HDMs), generan cambios conformacionales de la cromatina que determinan el grado de actividad transcripcional que hay en estas (46).

Las modificaciones de histonas tienen un papel importante en la regulación de la expresión génica, la replicación del ADN, la reparación del ADN y otros procesos celulares. En el contexto del daño del ADN, las modificaciones de histonas desempeñan un papel importante en la activación de la DDR (47).

Las HMTs son responsables de la adición de grupos metilo a los residuos de lisina de las histonas. Esta metilación puede tener efectos tanto positivos como negativos en la expresión génica. Por ejemplo, la metilación de histonas en regiones promotoras de genes puede reprimir la expresión de esos genes, mientras que la metilación de histonas en regiones promotoras de genes supresores de tumores puede activar la expresión de esos genes (48,49). La metilación de histonas también desempeña un papel importante en la DDR, ya que metilación de histonas en el residuo de lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) es un

marcador de la DDR, ya que, al acumularse en el sitio del daño del DNA, ayuda a activar la DDR (50).

Las histonas cuando están recién sintetizadas se encuentran en su forma acetilada (51). Se ha encontrado que existen varios residuos acetilados asociados al DNA inicialmente, y entre ellos se encuentra H3K9ac unida a la horquilla de replicación (52). Luego, para que ocurra la metilación de histonas, primeramente, debe eliminarse la acetilación mediante histonas desacetilasas (HDACs) (53). Así, en las células con deficiencia de HDACs, los niveles de H3K9me3 se reducen y al ser esta una marca de reparación del DNA, su ausencia puede conducir a un estrés replicativo, por ende, un potencial daño del ADN y a una inactivación de los mecanismos de DDR (54). Por lo tanto, una inactivación de las HDACs podría potenciar el efecto de los inhibidores de PARP. Esto fue evaluado en esta tesis, al combinar distintos inhibidores de histonas, con Olaparib.

3. HIPÓTESIS

La inhibición de EYA2 y de HDACs potenciará el efecto de Olaparib en células MCF7 y MDA-MB-231.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar si la inhibición de las modificaciones de histonas sensibiliza a las células MCF7 y MDA-MB-231 a los efectos del Olaparib.

4.2 Objetivos específicos

- **4.2.1 Objetivo específico 1**

Determinar el IC50 de Olaparib y de inhibidores de EYA2 y HDACs en células MCF7 y MDA-MB-231.

- **4.2.2 Objetivo específico 2**

Evaluar el efecto de inhibidores de HDAC y EYA2 sobre la sensibilidad a Olaparib en células MCF7 y MDA-MB-231.

- **4.2.3 Objetivo específico 3**

Evaluar si existen diferencias entre la sensibilidad de las células MCF7 y MDA-MB-231 a Olaparib y los distintos inhibidores.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Líneas celulares

- MCF7: células de epitelio mamario tumoral RE+ subtipo luminal A.

- MDA-MB-231: células de carcinoma mamario triple negativo.

5.1.2 Inhibidores

- Olaparib: Inhibidor de PARP
- RGFP 966: Inhibidor de HDAC3
- SAHA (Vorinostat): Inhibidor HDACs clase I y II
- EYA2 inhibitor 9987: Inhibidor de la actividad fosfatasa de EYA2
- Cisplatino: Inhibidor de la síntesis de DNA

5.2 Métodos de laboratorio

5.2.1 Cultivo celular

En esta investigación, todas las líneas celulares se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro con medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F-12) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, con penicilina-estreptomicina (10000 µg/mL) en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 a 37° C. Se realizó cambio de medio de cultivo suplementado y lavados con PBS al 1X cada tres días, hasta llegar a una confluencia del 80% como máximo.

5.2.2 Recuento celular

Para el recuento celular se tripsinizaron las células de la placa, para ello se extrajo el medio de cultivo de la placa, se lavó dos veces con PBS al 1X, y se agregó 1 mL de tripsina 1X. Se puso a incubar la placa (durante 5 minutos las células MCF7 y 8 minutos las células MDA-MB-231) en la incubadora a 37°C y 5% de CO_2 . Una vez terminado el tiempo de incubación, se agregó 2 mL de medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado a la placa y se procedió a levantar las células mediante sutiles golpes por los laterales de ésta. Una vez

desprendidas todas las células observando la placa translúcida, se tomaron los 3 mL de la suspensión de células de la placa y se agregó el contenido a un tubo falcon de 15 mL, al cual se le agregó 2 mL más de medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado. Posteriormente el tubo con los 5 mL de suspensión se pone a centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm. Luego se eliminó el sobrenadante, y el pellet fue resuspendido en 5 mL de DMEM/F-12 suplementado. De la suspensión se tomó 20 μ L, y se mezcló en un tubo eppendorf de 0,6 μ L, con 20 μ L de azul de tripán y se resuspendió adecuadamente. De esa mezcla se tomó 10 μ L y se depositó en la ranura A del slide de conteo del equipo LUNA II, y 10 μ L para la ranura B de este slide. Finalmente se introdujo la placa en el equipo, y siguiendo las indicaciones de su manual, se selecciona el protocolo de conteo a utilizar según la línea celular que se cuenta, y luego se realizó el recuento celular de la ranura A y B, para calcular el promedio entre ambas (anexo 2). Posterior a eso se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el volumen necesario a tomar de la suspensión de células, y generar una dilución para cargar la cantidad de células determinadas para cada pocillo de una placa de 96 pocillos (30000 células/mL de MCF7 y 60000 células/mL de MDA-MB-231, para cargar 3000 y 6000 células por pocillo en 100 μ L, de MCF7 y MDA-MB-231, respectivamente (anexo 3).

5.2.3 Ensayo MTS

La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo colorimétrico MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). Las células MCF7 fueron sembradas en placas de 96 pocillos con una densidad de 3000 células por pocillo, y las células MDA-MB-231 se sembraron con una densidad de 6000 células por pocillo. Las células se mantuvieron durante 24 horas a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 . Luego de 24 horas, a las células se le extrajo el medio de cultivo, y se les agregó medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado, y el medicamento y/o inhibidor según las

concentraciones calculadas para cada pocillo correspondiente (anexo 4), después se incubó por 72 horas las células MCF7 y 48 horas las células MDA-MB-231, en las mismas condiciones anteriormente mencionadas (anexo 3). Terminando el tiempo de incubación, se extrae todo el medio con las drogas de todos los pocillos y se procede a cargar el mix MTS.

El mix MTS se elabora según la cantidad de pocillos a cargar, y el cálculo se realiza multiplicando la cantidad de pocillos por 1 μL de PMS, 100 μL de medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado, y 20 μL de reactivo MTS (previamente preparado). Para preparar el reactivo MTS, en primer lugar, se tomó un vaso de precipitado de 50 mL, se le agregó 21 mL de PBS 1X y se cubrió el vaso con papel aluminio (debido a que este reactivo es fotosensible). Después se pesó 42 mg de reactivo MTS en una balanza analítica y se vertió el polvo MTS en el vaso de precipitado que contenía los 21 mL de PBS. Luego de eso se agregó una barra de agitación para mezclar el contenido en un agitador magnético durante 15 minutos. Terminada la agitación y habiendo verificado la adecuada homogeneización del reactivo, se midió el pH en un pHmetro, verificando que el pH se encontrara dentro del rango 6,0 - 6,5. Finalmente se filtró la solución con papel filtro y se vertió el contenido en un tubo falcon de 50 mL, previamente envuelto con papel aluminio, y se almacenó a -20°C (anexo 5).

Se cargó 120 μL del mix MTS en todos los pocillos y se incubó durante 3 horas para ambas líneas celulares, a 37°C en la incubadora humidificada con 5% de CO_2 . Pasadas las horas de incubación, la placa de 96 pocillos se dejó a temperatura ambiente para evaporar la humedad y así finalmente medir su absorbancia a 490 nm en equipo Cytation 3, usando el programa "MTS 96 well" cuando este alcanza una temperatura de 37°C (anexo 6).

5.3 Diseño experimental

5.3.1 Experimento 1: Curva IC50 de Olaparib e inhibidores en MCF7 y MDA-MB-231.

Para obtener el IC50 de Olaparib y los inhibidores RGFP-966, SAHA, EYA2 inhibitor 9987 y Cisplatino, en primer lugar, se tuvo que reconstituir cada uno según datos del fabricante y luego ser congelados a -20°C . El proceso comenzó con la tripsinización en una placa de 100 mm de diámetro con células MCF7 y una placa de MDA-MB-231, las cuales tenían un 80% de confluencia, para posteriormente ser contadas en el equipo LUNA II (Recuento celular 5.2.2).

Según el recuento de células vivas, arrojados por LUNA II, se realizaron los cálculos y se realizó la dilución de células para sembrar en una placa de 96 pocillos, una densidad de 3000 y 6000 células/pocillo, de células MCF7 y MDA-MB-231, respectivamente. Esto quiere decir, que en un tubo falcon de 15 mL se generó una dilución de células con una concentración de 30000 células por mL y 60000 células por mL para cargar 3000 y 6000 células en 100 μL por pocillo, de MCF7 y MDA-MB-231 respectivamente. Las células fueron sembradas en 100 μL durante 24 horas en la incubadora a 37°C con 5% de CO_2 , y al finalizar las 24 horas, se realizó el estímulo con Olaparib, RGFP-966, SAHA, EYA2 inhibitor 9987 y Cisplatino en cinco concentraciones distintas de cada droga, en triplicado (anexo 4). Para realizar este estímulo, se cargó primero 280 μL de medio de cultivo, y luego 20 μL de Olaparib, RGFP-966, SAHA, EYA2 inhibitor 9987 y Cisplatino, según la distribución de la placa (anexo 7).

Una vez cargados todos los pocillos correspondientes, se procedió a incubar la placa a 37°C con 5% de CO_2 en la incubadora, durante 72 horas para las células MCF7 y 48 horas para las células MDA-MB-231. Finalmente, una vez pasado el tiempo de incubación con el estímulo

para cada línea celular, se cargó 120 μ L del mix MTS y se puso a incubar la placa para medir su absorbancia en el equipo Cytation 3.

5.3.2 Experimento 2: Efecto de inhibidores en sensibilidad a Olaparib en células MCF7 y MDA-MB-231.

Para evaluar el efecto de los inhibidores, en Olaparib, se realiza el mismo procedimiento del experimento 1, siendo la única diferencia el contenido de cada pocillo en la placa. La placa de 96 pocillos tiene una distribución diferente al experimento 1 (anexo 8). Por lo tanto, se realizó la tripsinización de la placa de células de 100 mm, y una vez centrifugadas y obtenida la suspensión de células, se cargó en la placa de 96 las 3000 y 6000 células por pocillo, de MCF7 y MDA-MB-231 respectivamente, en 100 μ L de medio de cultivo. Se incubaron por 24 horas y luego se les retiró el medio para hacer el estímulo con las drogas, cargando primero 260 μ L de medio de cultivo, y posteriormente 20 μ L de Olaparib en todos los pocillos, y después 20 μ L de RGFP-966, SAHA, EYA2, Cisplatino, según corresponda en la distribución de la placa (Anexo 3). Hecho el estímulo, se pusieron a incubar por 72 y 48 horas, las células MCF7 y MDA-MB-231 respectivamente. Finalmente se cargó 120 μ L del mix MTS y se midió la absorbancia en Cytation 3.

5.4 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces en días independientes, y cada día se realizó el experimento en triplicado ($n=3$ $N=9$). El análisis estadístico para buscar diferencias estadísticamente significativas se realizó mediante el software GraphPad Prism 8.0.2 con la prueba t de Student. Los datos estadísticamente significativos fueron definidos como un valor de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

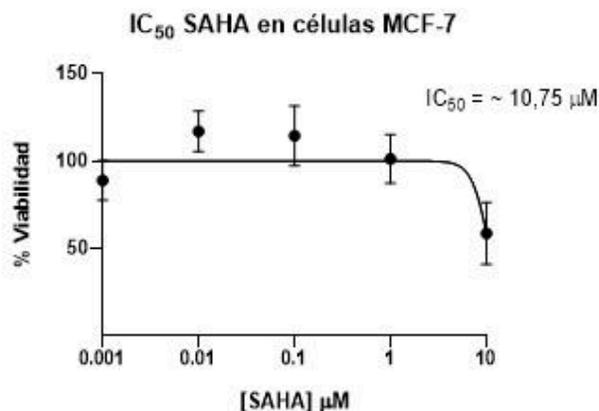
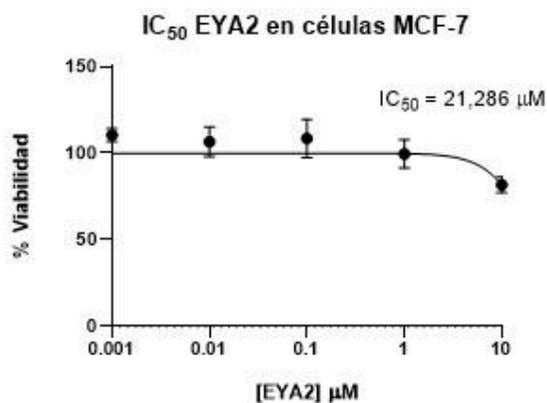
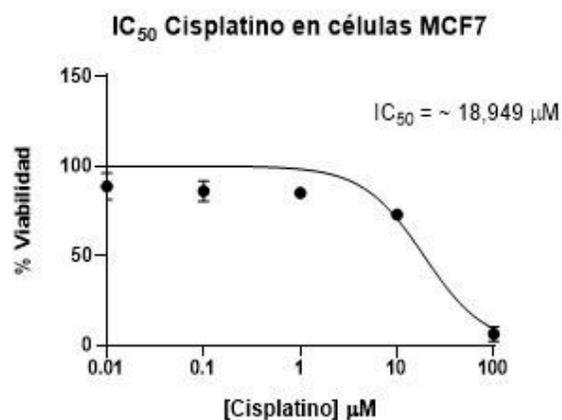
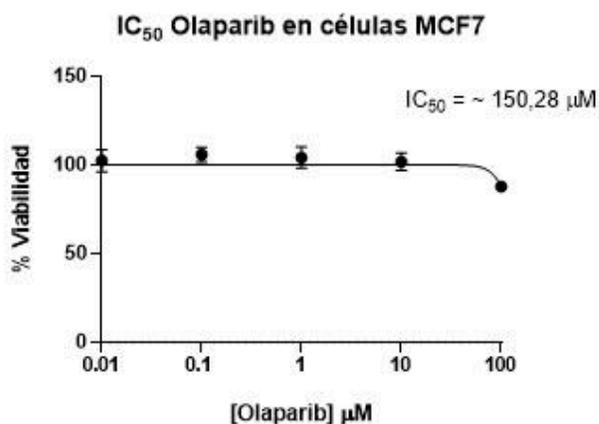
6.1 IC₅₀ de Olaparib e inhibidores de EYA2 y HDACs en células MCF7 y MDA-231

El objetivo específico 1 de este estudio busca encontrar el IC₅₀ de Olaparib, Cisplatino, EYA2 inhibitor 9987, SAHA y RGFP-966 en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Para ello se realizó el experimento en triplicado técnico, y se repitió el experimento en tres días independientes (n=3 N=9). En primer lugar, a las absorbancias obtenidas por el equipo Cytation 3 se les restó la absorbancia promedio de los pocillos “blanco”, que corresponden a aquellos pocillos que no fueron cargados con células, durante el tiempo de incubación con el estímulo sólo tuvieron medio de cultivo suplementado y al momento de realizar el ensayo de viabilidad MTS, solo contenían mix MTS, por lo tanto, estos pocillos permitieron identificar la absorbancia que aporta el mix MTS por si solo, y así obtener la absorbancia real que aportan las células vivas en cada pocillo, al restar su promedio con el resto de las absorbancias. Las absorbancias resultas de la resta fueron analizadas por el software GraphPad Prism en su versión 8.0.2, en el cual se normalizaron tomando como 100% de viabilidad celular, aquellas absorbancias correspondientes a los pocillos “control”. Los pocillos control corresponden a aquellos que solo contienen células en medio de cultivo suplementado, sin Olaparib ni inhibidores. Luego de normalizar las absorbancias se realizó una curva de regresión lineal que grafica [inhibidor] vs. respuesta normalizada. El software entregó el IC₅₀ obtenido y se adjuntó en el gráfico.

En la línea celular MCF7 (figura 1), el medicamento Olaparib obtuvo un IC₅₀ aproximado de 150,28 μ M, con Cisplatino se obtuvo un IC₅₀ aproximado de 18,949 μ M, EYA2 inhibitor 9987 resultó con un IC₅₀ correspondiente a 21,286 μ M, SAHA obtuvo un IC₅₀ aproximado de 10,75 μ M aproximadamente y RGFP-966 obtuvo un IC₅₀ aproximado de 13,336 μ M. Por su contraparte, la línea celular MDA-MB-231 (figura 2) obtuvo IC₅₀ mayores para Olaparib e

inhibidores. En Olaparib se obtuvo un IC₅₀ de 197,068 μM , con Cisplatino se obtiene un IC₅₀ de 29,388 μM , con EYA2 inhibidor 9987 el IC₅₀ de 28,703 μM aproximadamente. Con SAHA se obtuvo un IC₅₀ de 10,75 μM aproximadamente, y con RGFP-966 se obtuvo un IC₅₀ de 27,787 μM aproximadamente.

Con respecto a estos resultados, solo SAHA resultó tener un IC₅₀ mayor en MCF7 que en MDA-MB-231, por ende, todos los otros inhibidores y Olaparib tuvieron un IC₅₀ mayor en las células MDA-MB-231, respecto a MCF7. Por otro lado, el inhibidor con IC₅₀ más bajo resultó ser SAHA, seguido de Cisplatino, para ambas líneas celulares; por el contrario, Olaparib fue el fármaco con mayor IC₅₀ en ambas líneas celulares.



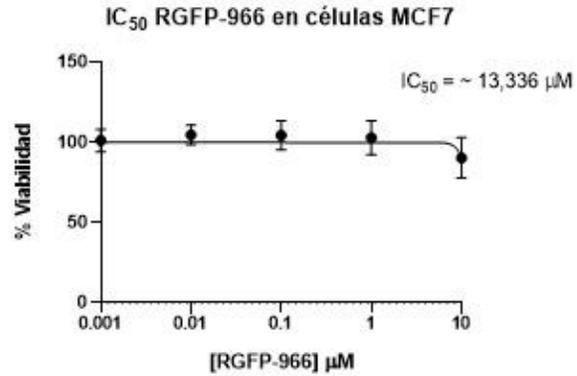
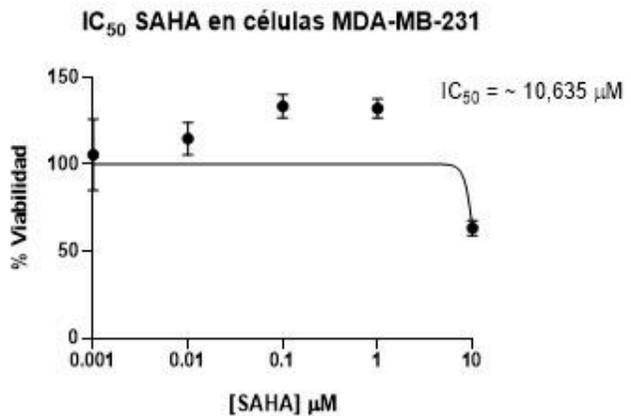
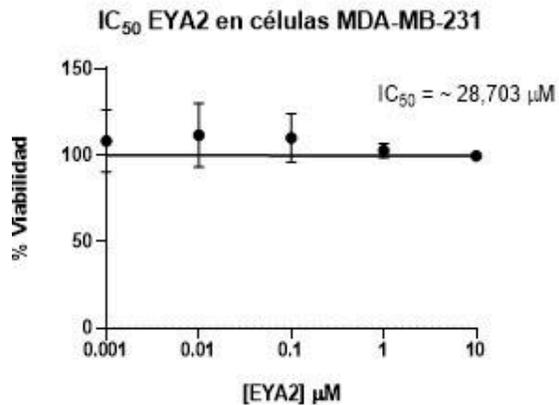
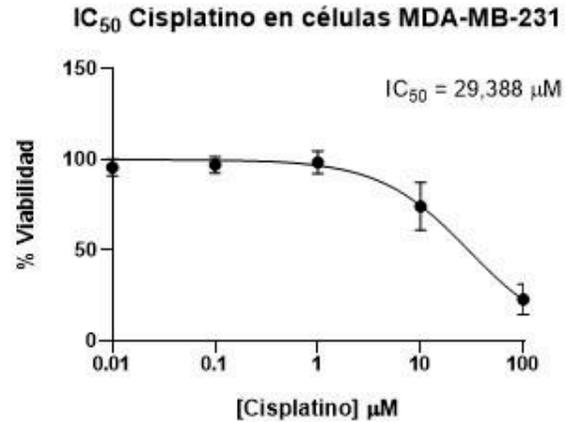
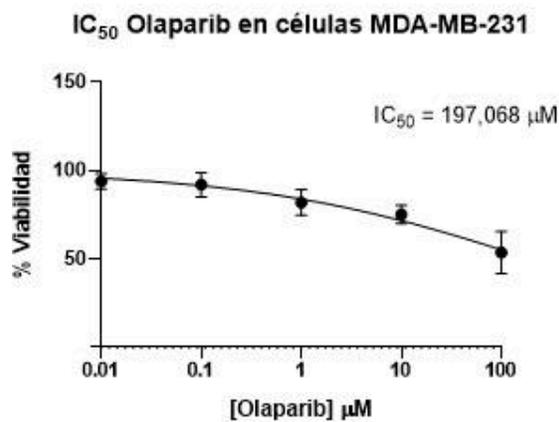


Figura 1: IC₅₀ de Olaparib e inhibidores de EYA2 y HDACs en células MCF7

Las células MCF7 fueron estimuladas durante 72 horas por distintas concentraciones de Olaparib, Cisplatino, EYA2 (EYA2 inhibitor 9987), SAHA y RGFP-966 (anexo 9). Los gráficos fueron obtenidos a través del software estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.2). Los resultados se presentan como una media (n=3 N=9) \pm DE. DE: desviación estándar.



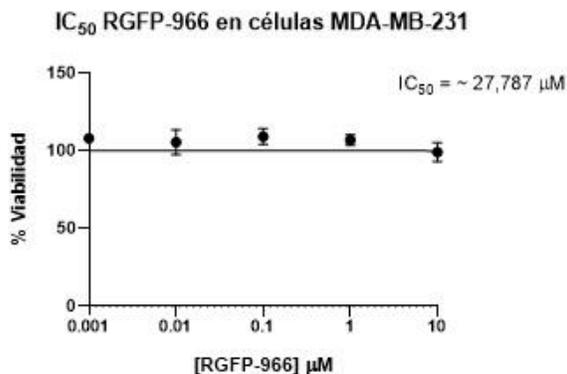


Figura 2: IC₅₀ de Olaparib e inhibidores de EYA2 y HDACs en células MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231 fueron estimuladas durante 48 horas por distintas concentraciones de Olaparib, Cisplatino, EYA2 (EYA2 inhibitor 9987), SAHA y RGFP-966 (anexo 9). Los gráficos fueron obtenidos a través del software estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.2). Los resultados se presentan como una media ($n=3$ $N=9$) \pm DE. DE: desviación estándar.

6.2 Efecto de inhibidores de HDAC y EYA2 sobre la sensibilidad a Olaparib en células MCF7 y MDA-MB-231.

El objetivo específico 2 de este estudio busca encontrar si el uso de inhibidores como Cisplatino, EYA2 inhibitor 9987, SAHA y RGFP-966, logra afectar la sensibilidad a Olaparib en células MCF7 y MDA-MB-231. Para ello se realizó los mismos pasos para graficar que en el experimento anterior, por lo que también este experimento se realizó en triplicado técnico, y se repitió en tres días independientes ($n=3$ $N=9$). Las absorbancias fueron restadas con el promedio de las absorbancias de los pocillos “blanco”, para posteriormente graficar a modo de gráfico de IC₅₀, comparando el nuevo IC₅₀ de Olaparib, versus el IC₅₀ de Olaparib más cada uno de los inhibidores, por separado. Para ello se utilizó 15 μM de Cisplatino, 3 μM de EYA2 inhibitor 9987, 1,6 μM de SAHA, y 0,08 μM de RGFP-966; en células MCF7 y MDA-MB-231.

En las células MCF7 (figura 3), Olaparib posee un IC50 de 129,812 μM , este valor es superior al IC50 de Olaparib en combinación con Cisplatino (1,946 μM), SAHA (43,204 μM), EYA2 inhibitor 9987 (75,172 μM) y RGFP-966 (69,739 μM). Por otro lado, en las células MDA-MB-231 (figura 4), el IC50 de Olaparib es de 164,028 μM , este valor es superior al IC50 de Olaparib en combinación con Cisplatino (150,711 μM). En contraste, el IC50 de Olaparib es menor al compararlo con el IC50 de Olaparib junto con EYA2 inhibitor 9987 (716,206 μM), SAHA (1670,471 μM) y RGFP-966 (224904 μM). Por ende, según los resultados obtenidos, solo la línea celular MCF7 obtiene IC50 menores cuando se mezcla Olaparib con un inhibidor, con todos los inhibidores.

Dentro de los IC50 de Olaparib más un inhibidor en células MCF7, la mezcla con la cual hay un menor IC50, es Olaparib con Cisplatino, y aquel inhibidor con Olaparib que tiene el mayor IC50, es EYA2 inhibitor 9987, seguido de RGFP-966. Por otro lado, en la línea celular MDA-MB-231, el menor IC50 se obtuvo con Olaparib más Cisplatino, por el contrario, el IC50 mayor resultó ser Olaparib con RGFP-966, seguido de Olaparib más SAHA.

Con respecto a la viabilidad celular en células MCF7 (figura 5), la diferencia entre la curva de Olaparib versus la combinación de Olaparib + Cisplatino, es significativamente mayor a la de Olaparib con EYA2 inhibitor 9987, SAHA y RGFP-966, dado que las tres concentraciones de 1 μM , 10 μM y 100 μM cuentan con una significancia de **** $P < 0,0001$. En contraparte, al comparar la curva de Olaparib versus Olaparib + EYA2 inhibitor 9987, solamente en la concentración de 1 μM presenta una significancia de **** $P < 0,0001$ al comparar ambas curvas, y en las otras dos concentraciones estadísticamente no es significativo (ns). En Olaparib + SAHA las tres concentraciones son estadísticamente significativas, en donde 1 μM cuenta con **** $P < 0,0001$, 10 μM y 100 μM con * $P < 0,05$. En Olaparib + RGFP-966 hay una significancia de **** $P < 0,0001$ en la concentración de 10 μM y en los dos puntos de la

curva restantes del mismo gráfico estadísticamente no es significativo (ns). Por lo tanto, se obtiene que la combinación de Olaparib + Cisplatino versus Olaparib por sí solo, posee una diferencia significativa mayor que las otras combinaciones.

Con respecto a la viabilidad celular en células MDA-MB-231 (figura 6), se observa que ninguno de los cuatro gráficos presenta en todas las concentraciones a la vez, significancia estadística. No obstante, Olaparib en combinación con EYA2 inhibitor 9987 y SAHA, versus Olaparib, cuentan ambas con una diferencia significativa en las concentraciones de 10 μM y 100 μM , correspondiente a ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$, y * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$ respectivamente. Por otro lado, Olaparib en combinación con Cisplatino y RGFP-966, al compararlo con Olaparib, se contempla significancia estadística sólo en una concentración, en 1 μM (Cisplatino) y 100 μM (RGFP-966), * $P < 0,05$ y *** $P < 0,0005$ respectivamente. Por consiguiente, cada comparación de los puntos de las curvas no mencionadas es producto de resultados estadísticamente no significativos (ns).

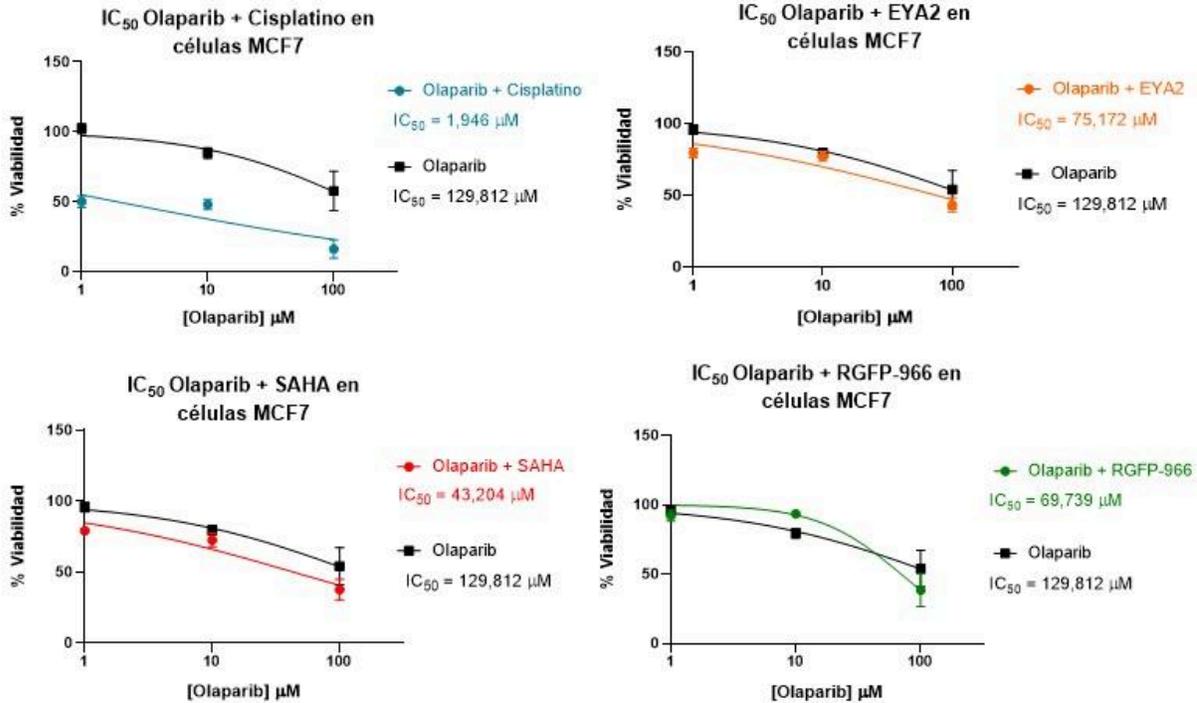


Figura 3: Efecto de inhibidores de HDAC y EYA2 sobre la sensibilidad a Olaparib en células MCF7.

Las células MCF7 fueron estimuladas durante 72 horas por distintas concentraciones de Olaparib, usando en conjunto 15 μM de Cisplatino, 3 μM de EYA2 (EYA2 inhibitor 9987), 1,6 μM de SAHA, y 0,08 μM de RGFP-966. Los gráficos fueron obtenidos a través del software estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.2). Los resultados se presentan como una media (n=3 N=9) ± DE. DE: desviación estándar.

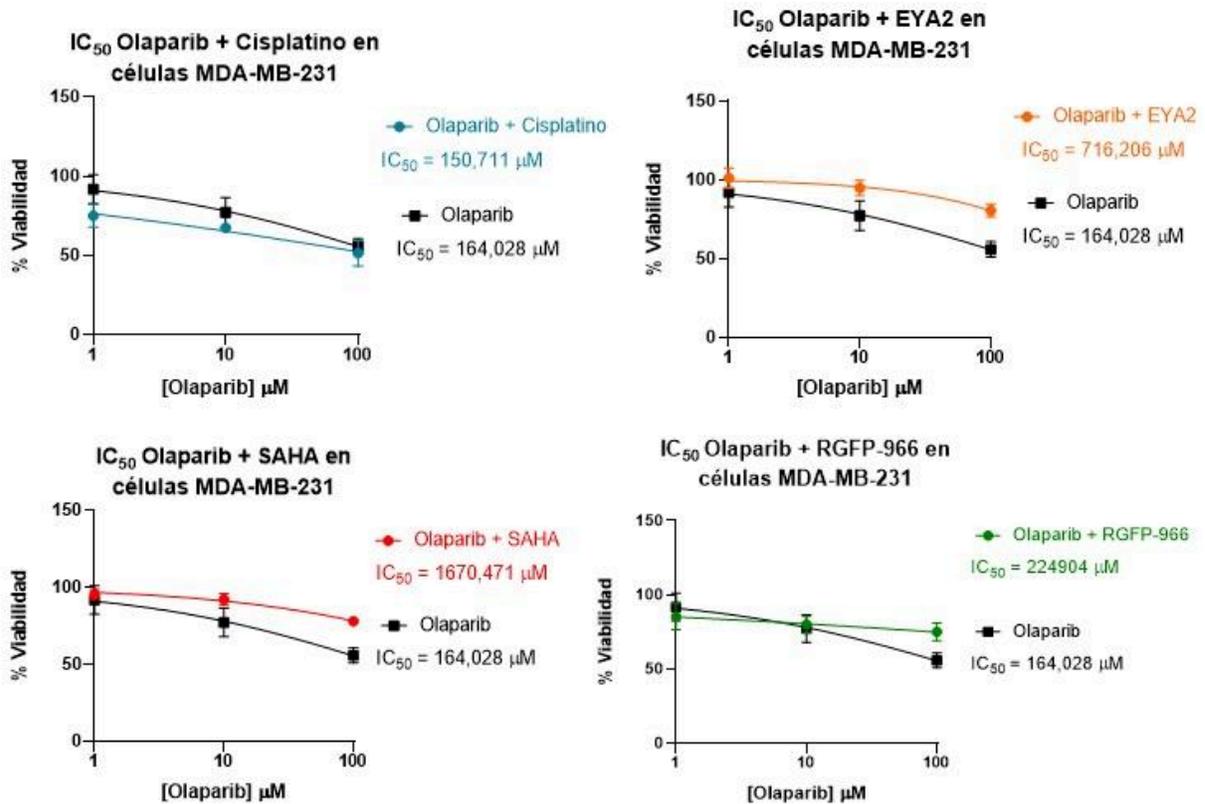


Figura 4: Efecto de inhibidores de HDAC y EYA2 sobre la sensibilidad a Olaparib en células MDA-MB-231.

Las células MDA-MB-231 fueron estimuladas durante 48 horas por distintas concentraciones de Olaparib, usando en conjunto 15 μM de Cisplatino, 3 μM de EYA2 (EYA2 inhibitor 9987), 1,6 μM de SAHA, y 0,08 μM de RGFP-966. Los gráficos fueron obtenidos a través del software estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.2). Los resultados se presentan como una media (n=3 N=9) ± DE. DE: desviación estándar.

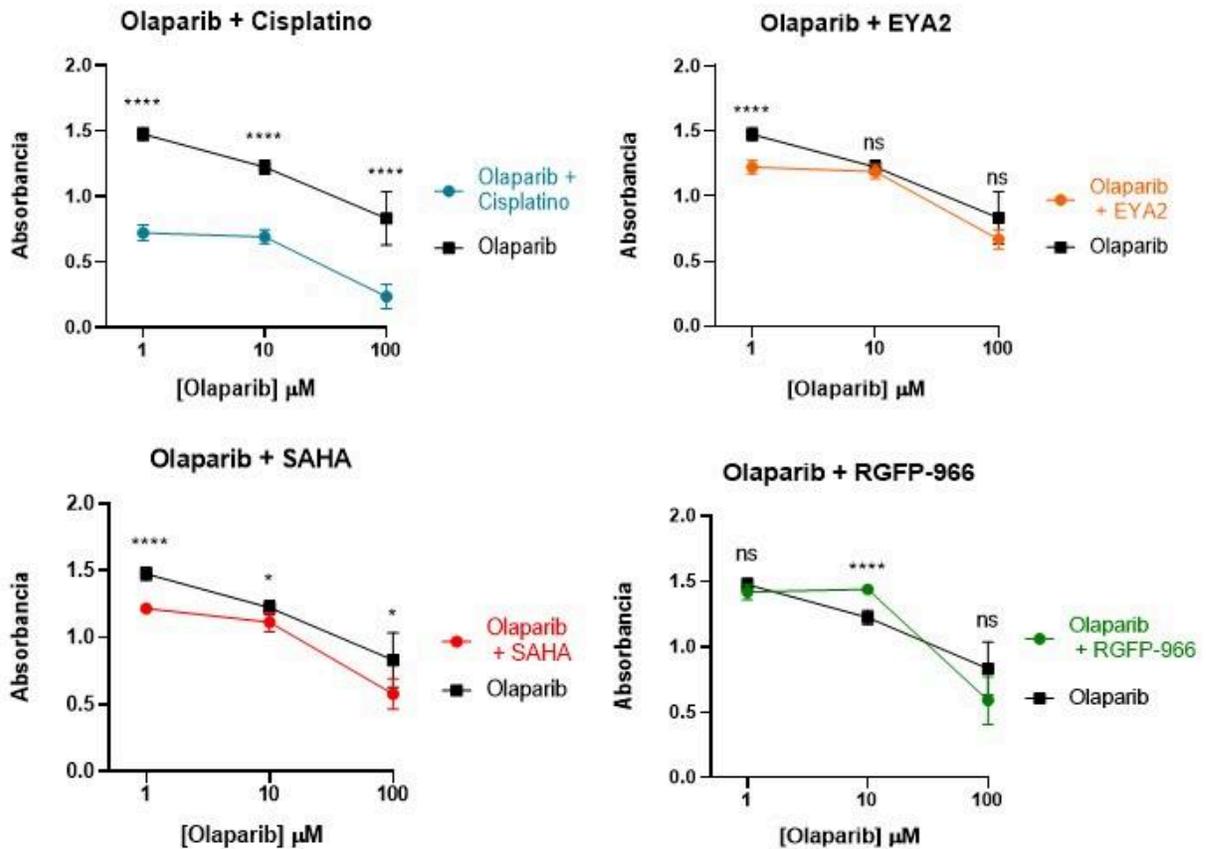


Figura 5: Comparación de viabilidad celular entre Olaparib versus Olaparib más inhibidores de EYA2 y HDACs, en células MCF7.

Los gráficos muestran una comparación entre las absorbancias de Olaparib versus Olaparib más Cisplatino, EYA2 (EYA2 inhibitor 9987), SAHA, RGFP-966 por separado, según cada concentración utilizada de Olaparib. Las concentraciones usadas de los inhibidores corresponden a las mismas detalladas en la Figura 3 y 4. Los gráficos fueron obtenidos a través del software estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.2). Los resultados se presentan como una media ($n=3$ $N=9$) \pm DE. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba de t student. * $P < 0,05$ y **** $P < 0,0001$, ns: no significativo, DE: desviación estándar.

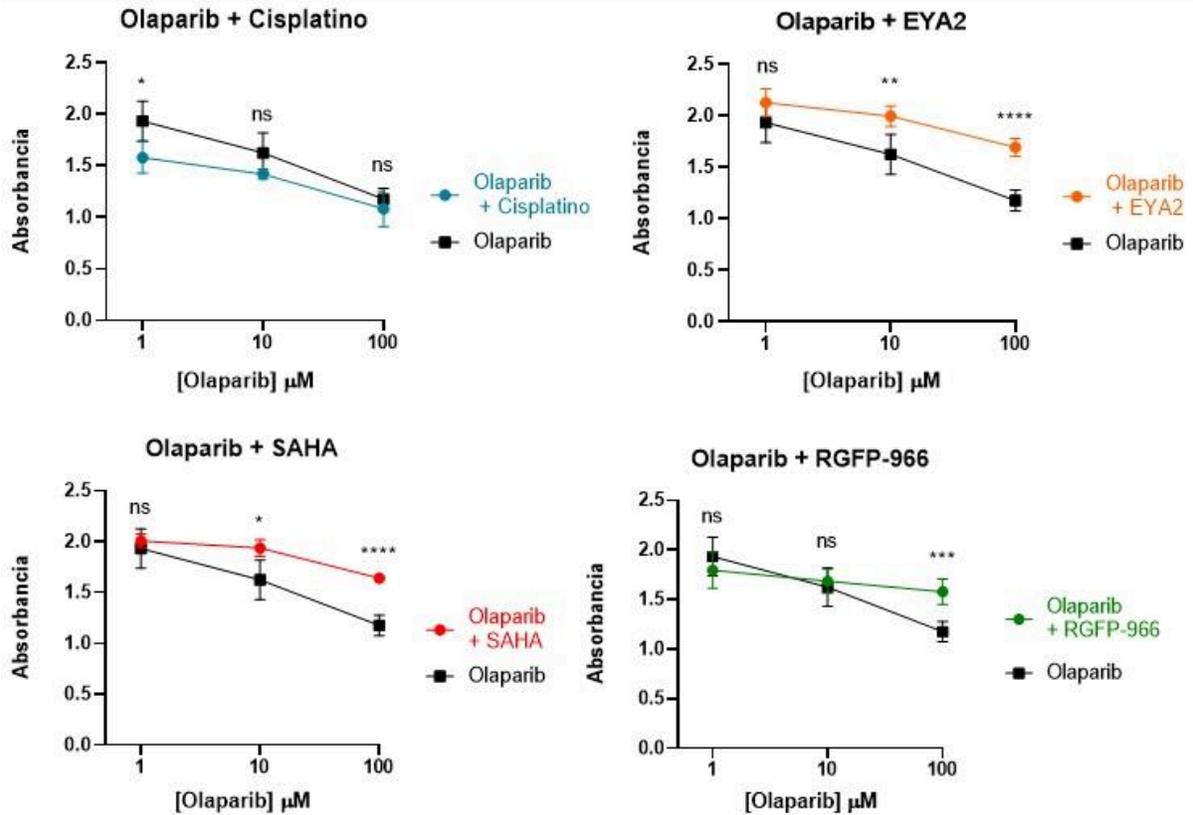


Figura 6: Comparación de viabilidad celular entre Olaparib versus Olaparib más inhibidores de EYA2 y HDACs, en células MDA-MB-231.

Los gráficos muestran una comparación entre las absorbancias de Olaparib versus Olaparib más Cisplatino, EYA2 (EYA2 inhibidor 9987), SAHA, RGFP-966 por separado, según cada concentración utilizada de Olaparib. Las concentraciones usadas de los inhibidores corresponden a las mismas detalladas en la Figura 3 y 4. Los gráficos fueron obtenidos a través del software estadístico GraphPad Prism (versión 8.0.2) Los resultados se presentan como una media ($n=3$ $N=9$) \pm DE. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba de t student. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0005$, **** $P < 0,0001$, ns: no significativo, DE: desviación estándar.

6.2 Comparación entre la sensibilidad de las células MCF7 y MDA-MB-231 a Olaparib y los distintos inhibidores.

El objetivo específico 3 de este estudio busca evaluar si existen diferencias entre la sensibilidad de las células MCF7 y MDA-MB-231 a Olaparib y los distintos inhibidores. En los gráficos de la figura 7, se observa la comparación de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, en donde se presenta un gráfico de viabilidad celular por cada una de las distintas concentraciones de Olaparib, Cisplatino, EYA2, SAHA y RGFP-966.

Respecto a los gráficos de Olaparib, se contemplan diferencias estadísticamente significativas en el % de viabilidad celular para las concentraciones de 0,1 μM y 1 μM entre ambas líneas celulares; por otro lado, en las concentraciones de 0,01 μM , 10 μM y 100 μM de Olaparib, las diferencias de viabilidad entre MCF7 y MDA-MB-231 estadísticamente no son significativas (ns). Se distingue que MCF7 tiende a tener un % de viabilidad celular mayor al de las células MDA-MB-231, siendo más apreciable en aquellas contracciones con diferencias estadísticamente significativas (** $P < 0,01$ y * $P < 0,05$).

En base a los gráficos de Cisplatino, se observan diferencias estadísticamente significativas en el % de viabilidad celular solo para la concentración de 100 μM entre ambas líneas celulares; por otra parte, en las concentraciones de 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM y 10 μM de Cisplatino, las diferencias de viabilidad entre MCF7 y MDA-MB-231 estadísticamente no son significativas (ns). Finalmente, se aprecia en las células MCF7 una mayor disminución en el % de viabilidad celular que en MDA-MB-231, distinguiéndose aún más en la concentración de 100 μM con diferencia estadísticamente significativa (* $P < 0,05$).

Con respecto a EYA2 inhibidor 9987, se obtuvo solo diferencias estadísticamente significativas (** P <0,01), en la concentración de 10 μ M, entre las células MCF7 y MDA-MB-231, siendo MCF7 aquella línea celular con menor % de viabilidad celular. Las otras concentraciones correspondientes a 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M y 1 μ M no fueron estadísticamente significativas (ns).

En relación a los gráficos de SAHA, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el % de viabilidad celular únicamente en la concentración de 1 μ M entre MCF7 y MDA-MB-231; por contraparte, en las concentraciones de 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M y 10 μ M de SAHA las diferencias en viabilidad entre ambas líneas celulares estadísticamente no son significativas (ns). De igual manera, se identifica en los cuatro gráficos de SAHA -menos en la concentración de 0,01 μ M- una disminución mayor de su % de viabilidad celular en las células MCF7, aún más verificable en la concentración estadísticamente significativa (* P <0,05).

Sobre los gráficos de RGFP-966, no se encuentra ninguna diferencia significativa en el % de viabilidad celular para ambas líneas celulares en las respectivas concentraciones de RGFP-966. No obstante, se observa una leve disminución en la viabilidad de MCF7 con respecto a MDA-MB-231, siendo más apreciable en la concentración de 10 μ M.

En síntesis, los resultados obtenidos muestran que solo Olaparib alcanza una disminución mayor en el % de viabilidad en las células MDA-MB-231, basada en la concentración de 0,1 μ M y 1 μ M -teniendo diferencias estadísticamente significativas- en comparación a MCF7. Asimismo, Olaparib sobrepasa a Cisplatino, EYA2 inhibidor 9987, SAHA y RGFP-966 respecto a la cantidad de las diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, Cisplatino es el único inhibidor que disminuye la viabilidad celular en menos del 50%, tanto

para MCF7 y MDA-MB-231. Con respecto a EYA2 inhibitor 9987 y RGFP-966 se observa que ninguna concentración redujo la viabilidad en al menos un 50%, en ambas líneas celulares. En contraste, Olaparib y SAHA son los únicos inhibidores que se acercan a una viabilidad celular de al menos un 50%, específicamente en sus concentraciones mayores, Olaparib con 100 μ M y SAHA con 10 μ M.

En los gráficos de la figura 8, se observa la comparación de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, en donde se presenta un gráfico de viabilidad celular por cada una de las distintas concentraciones de Olaparib + Cisplatino, Olaparib + EYA2 inhibitor 9987, Olaparib + SAHA y Olaparib + RGFP-966.

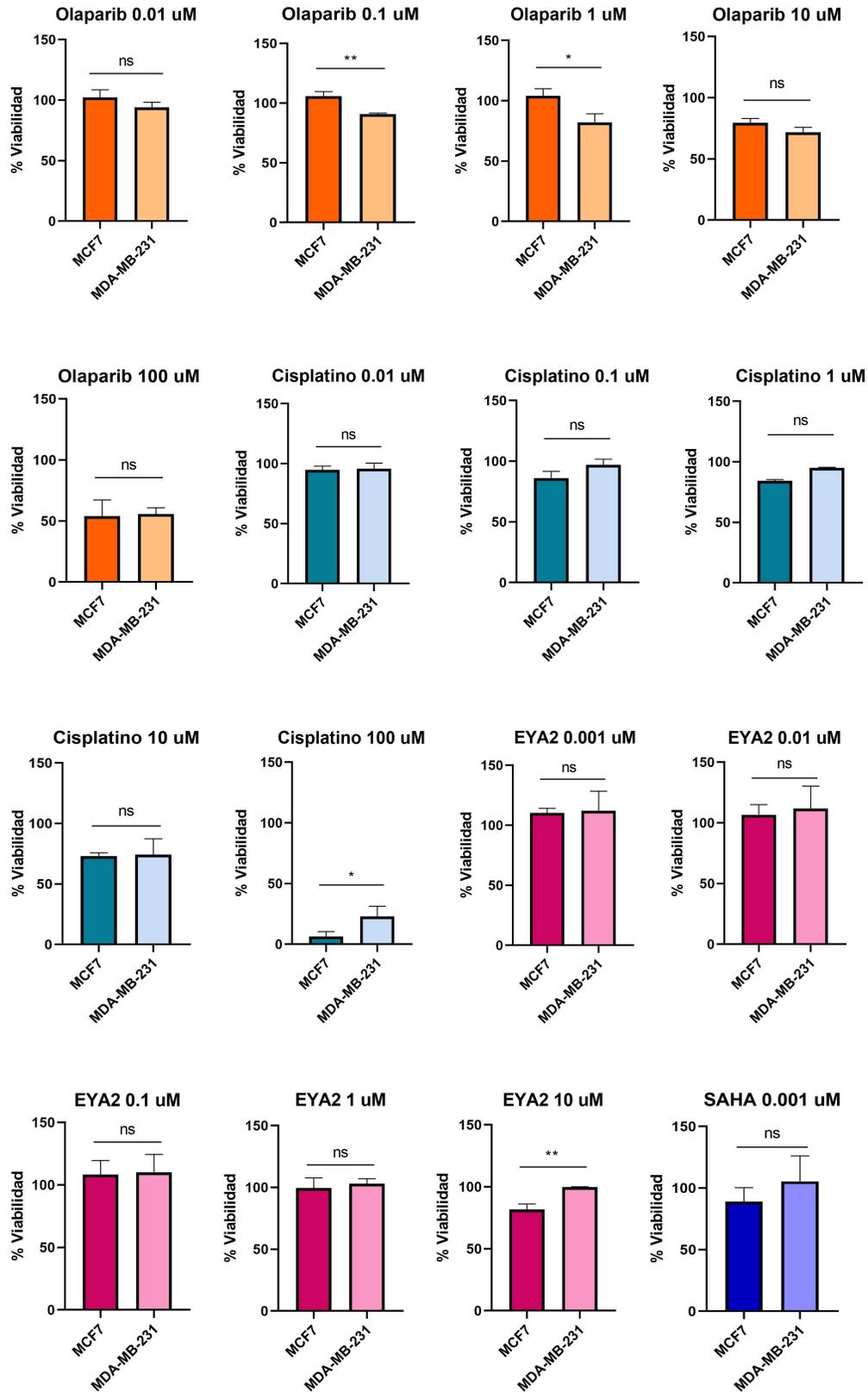
En relación con los gráficos de Olaparib + Cisplatino, se muestran diferencias estadísticamente significativas (**** $P < 0,0001$) en el % de viabilidad para todas sus concentraciones, entre las células MCF7 y MDA-MB-231. En la concentración de 100 μ M, en las células MCF7 se aprecia una disminución por debajo del 50% de viabilidad celular, no obstante, en las concentraciones de 1 μ M y 10 μ M las células MCF7 se acercan a una viabilidad de un 50%. Por el contrario, en las células MDA-MB-231 solo la concentración de 100 μ M aproxima una viabilidad celular de 50%.

Respecto a los gráficos de Olaparib + EYA2 inhibitor 9987, se observan diferencias estadísticamente significativas (1 μ M con *** $P < 0,005$; 10 μ M y 100 μ M con **** $P < 0,0001$) en el % de viabilidad para todas sus concentraciones, entre ambas líneas celulares. Por otra parte, solo en la concentración de 100 μ M, se presenta una disminución por debajo del 50% de viabilidad celular para las células MCF7.

En base a los gráficos de Olaparib + SAHA, se aprecian diferencias estadísticamente significativas (**** P <0,0001) en el % de viabilidad para todas sus concentraciones, entre ambas líneas celulares. Por lo demás, solo la concentración de 100 µM de las células MCF7 presentan una disminución por debajo del 50% de viabilidad celular, en comparación con las concentraciones restantes de ambas líneas celulares.

Sobre los gráficos de Olaparib + RGFP-966, se observan diferencias estadísticamente significativas con ** P <0,01 y *** P <0,005 en el % de viabilidad para las concentraciones de 10 µM y 100 µM, respectivamente, entre ambas líneas celulares; siendo únicamente la concentración de 1 µM estadísticamente no significativa (ns). Por otro lado, solo la concentración de 100 µM de las células MCF7 tiene una disminución por debajo del 50% de viabilidad celular, además de ser la única que se encuentra por debajo de las células MDA-MB-231 en cuanto a viabilidad celular.

En síntesis, todas las concentraciones de Olaparib + Cisplatino, Olaparib + EYA2 inhibitor 9987 y Olaparib + SAHA tienen diferencias estadísticamente significativas en viabilidad celular, no así Olaparib + RGFP-966, donde solo en las concentraciones de 10 µM y 100 µM se observan diferencias estadísticamente significativas. Además, en todas las combinaciones de Olaparib con sus inhibidores, en la concentración de 100 µM, las células MCF7 alcanzan una disminución por debajo del 50% de viabilidad celular. Finalmente, se encuentra un resultado estadísticamente no significativo en Olaparib 1 µM + RGFP-966, en donde con 10 µM las células MCF7 son las únicas concentraciones que sobrepasan a las células MDA-MB-231, en comparación con los otros inhibidores de Olaparib.



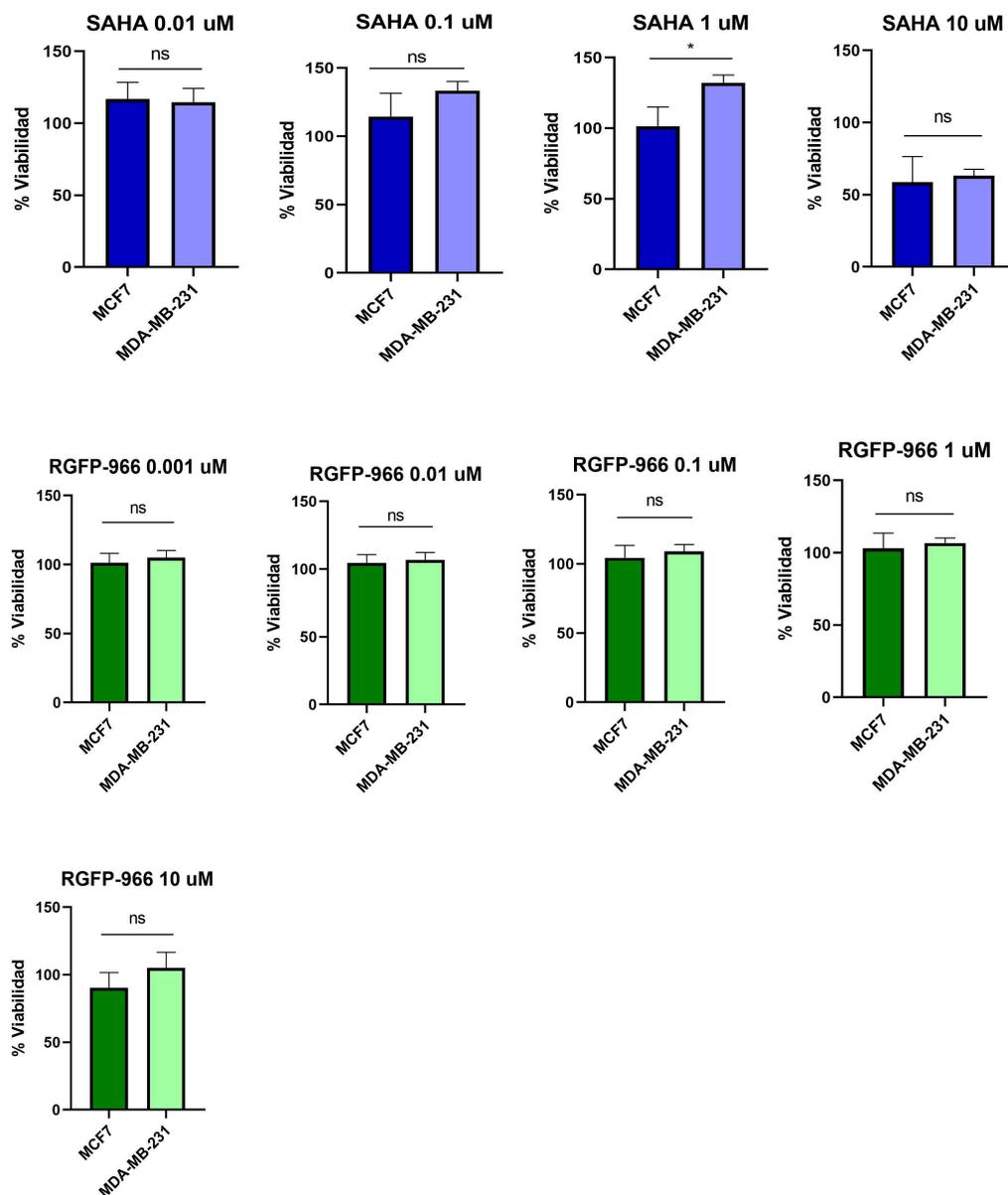


Figura 7: Comparación de la sensibilidad de Olaparib e inhibidores de EYA2 y HDACs entre MCF7 y MDA-MB-231

Los gráficos muestran una comparación del % de viabilidad celular de cada una de las 5 distintas concentraciones usadas por Olaparib, Cisplatino, EYA2 (EYA2 inhibitor 9987), SAHA y RGFP-966. Los resultados se muestran como medias \pm DE. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba de t student. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, ns: no significativo, DE: desviación estándar.

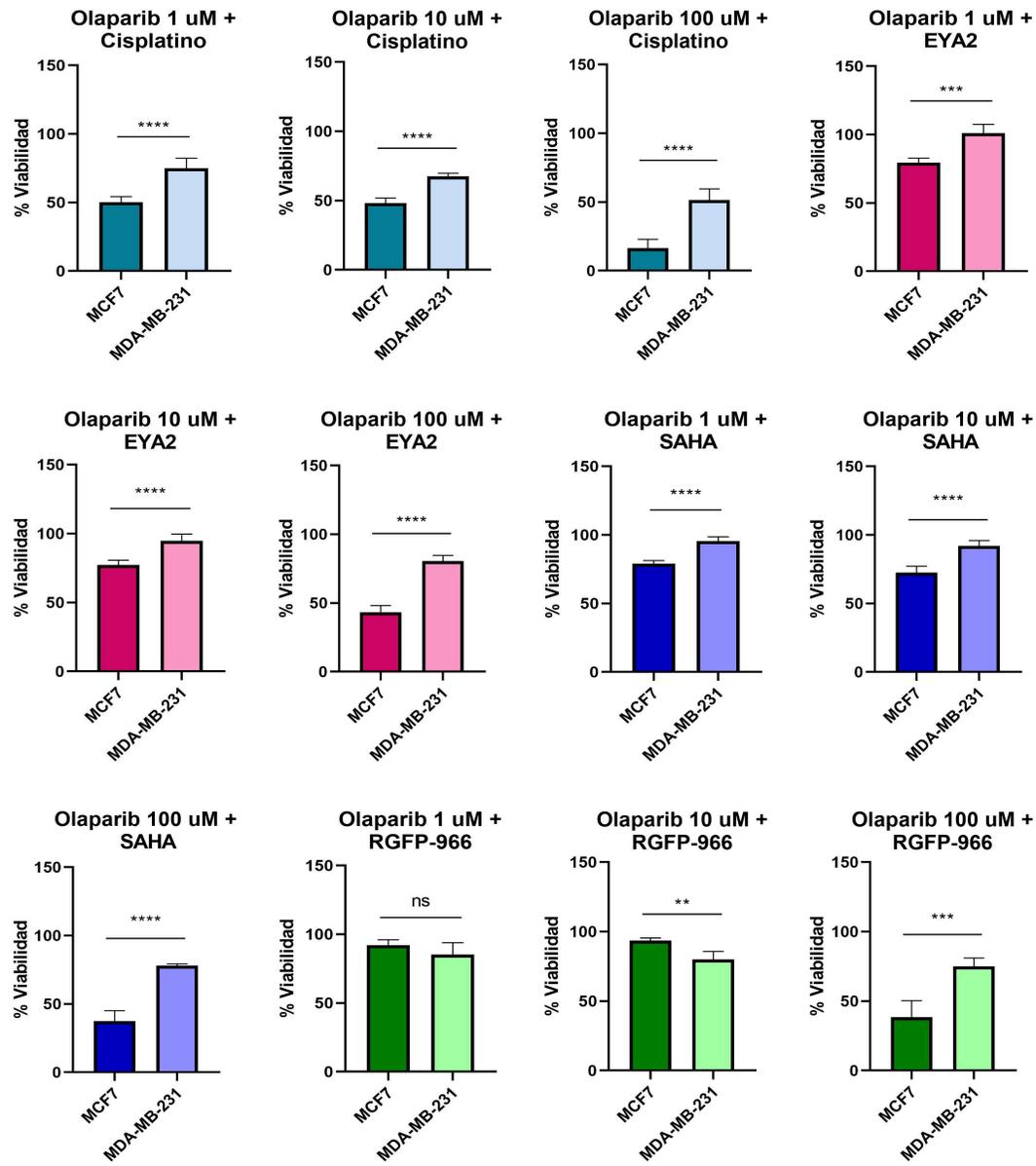


Figura 8: Comparación del efecto de inhibidores de EYA2 y HDACs en la sensibilidad a Olaparib entre MCF7 y MDA-MB-231

Los gráficos muestran una comparación del % de viabilidad celular de cada una de las 5 distintas concentraciones usadas por Olaparib, en conjunto con Cisplatino, EYA2 (EYA2 inhibitor 9987), SAHA y RGFP-966. Los resultados se muestran como medias \pm DE. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba de t student. * P <0,05 y ** P <0,01, *** P <0,0005, **** P <0,0001, ns: no significativo, DE: desviación estándar.

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue evaluar si la inhibición de las modificaciones de histonas sensibiliza a las células MCF7 y MDA-MB-231 a los efectos del Olaparib. La evidencia que existe indica que, en cáncer de mama, los inhibidores de PARP han mostrado mejores eficacias cuando se combinan con Cisplatino, esto debido a que Cisplatino al ser un inductor del daño en el DNA, genera la condición basal necesaria para que Olaparib surja efecto (55); así como también se ha encontrado que en cáncer de próstata y cáncer de ovario, hay una disminución sinérgica en la viabilidad celular al usar Olaparib con SAHA, en comparación al tratamiento con un solo agente (56,57). En un estudio realizado en TNBC se observó que al agotar HDAC3, indujo sinérgicamente con un inhibidor de PARP, la apoptosis de las células TNBC (58). Bajo esta premisa, se esperaba que los inhibidores logren sensibilizar a las células, a Olaparib.

Los resultados en este estudio muestran que Olaparib, Cisplatino, EYA2 inhibitor 9987, SAHA y RGFP-966, tienen un efecto citotóxico sobre las células MCF7 y MDA-MB-231, en diferentes grados. Por contraparte, en células MCF7, Olaparib es el inhibidor que tiene el IC50 más alto, seguido de Cisplatino, EYA2 inhibitor 9987, SAHA y RGFP-966, siendo un resultado esperado debido a las condiciones necesarias para que Olaparib surja efecto. Sin embargo, cuando Olaparib se combina con Cisplatino, EYA2 inhibitor 9987, SAHA o RGFP-966, Olaparib tiene un IC50 menor, lo que indica que la combinación de estos fármacos sensibiliza a las células MCF7 a los efectos de Olaparib.

En células MDA-MB-231, Olaparib también es el inhibidor que tiene el IC50 más alto, seguido de Cisplatino, EYA2 inhibitor 9987, RGFP-966 y SAHA. Sin embargo, cuando Olaparib se combina con estos inhibidores, la combinación tiene un IC50 mayor, lo que indica

que estos fármacos no aumentan la eficacia de Olaparib, más bien la perjudica. La combinación de Olaparib + Cisplatino es la única que tiene un IC50 menor al de Olaparib, en células MDA-MB-231, por lo que, según estos resultados, Cisplatino sería el único inhibidor que sensibiliza a estas células al efecto de Olaparib.

Los resultados de la combinación de Olaparib con un inhibidor, en células MDA-MB-231 se contradicen con los hallazgos que hay hasta la actualidad. Esto puede tener diversas explicaciones, entre ellas es importante mencionar que, en primera instancia, al elaborar los gráficos de IC50 correspondientes al experimento N°1, el tipo de curva de regresión lineal utilizada fue inadecuada para obtener el IC50 correcto; este error no fue percatado en un inicio, por lo que las concentraciones de IC50 de los inhibidores que fue utilizada como concentración fija en el experimento N°2, es erróneo. Además, no se pudo determinar el IC50 de EYA2 inhibitor 9987 y RGFP-966, por lo que se decidió utilizar el IC50 del fabricante, siendo 3 μ M y 0,08 μ M, respectivamente. Por lo tanto, los IC50 de los inhibidores utilizados en el experimento N°2, versus el real IC50, son diferentes. Es posible que la razón por la cual este error no afectó en desmedida a las células MCF7, se deba a que este IC50 errado versus el IC50 real, no son tan distintos como con las células MDA-MB-231 (anexo 9). Sumado a esto último, con las condiciones del laboratorio en que se trabajó, la línea celular MDA-MB-231 se divide más rápido que las células MCF7, esto se correlaciona con la literatura en la cual un estudio indica que las células MCF7 se dividen cada 21 horas y las células MDA-MB-231 cada 32 horas (59). Sin embargo, estas explicaciones técnicas no logran ser suficientes para justificar que en las células MDA-MB-231 ocurra un aumento de IC50 de Olaparib junto con inhibidores, al compararlo con el IC50 de Olaparib por sí solo; ya que los resultados se presentan como una media de triplicados técnicos y repeticiones en días independientes ($n=3$ $N=9$) \pm desviación estándar, y el fenómeno ocurrió a repetición, por lo tanto, es altamente probable que esto no tenga relación con errores técnicos. Por ello, es

interesante mencionar que si en ambas líneas celulares se usó la misma concentración de los inhibidores en el experimento N°2, existe un aumento importante en el IC50 de Olaparib al usarse en conjunto con inhibidores, en células MDA-MB-231, demostrando que el uso de inhibidores disminuye el efecto de Olaparib. Esto sugiere que las diferencias biológicas entre ambas líneas celulares generan este efecto.

Las células MCF7 son una línea celular de cáncer de mama RE+ luminal, mientras que las células MDA-MB-231 son una línea celular de cáncer de mama triple negativo. Es posible que las células MDA-MB-231 tengan DDR más eficientes que las células MCF7, esto implicaría que, al ser sometidas las células a mayor daño por el uso de inhibidores, esto podría activar DDR de manera más eficaz. Aquello podría explicar por qué la combinación de Olaparib con inhibidores de HDACs y EYA2, no aumenta su eficacia en células MDA-MB-231, más bien, disminuye.

También es importante recalcar que los IC50 reales de los inhibidores, sobrepasan la concentración más alta usada para todos ellos en el experimento N°1, por lo que resulta claro que visualmente en los gráficos no se aprecie el acercamiento de la curva al 50% de viabilidad celular. Sumado a esto, es interesante que en las células MCF7 los inhibidores hayan logrado potenciar el efecto Olaparib, siendo que las concentraciones usadas por estos inhibidores están muy por debajo de su IC50 real, esto permite sugerir que de usarse la apropiada concentración de IC50, se podría apreciar de mejor manera un mayor efecto sinérgico de Olaparib con inhibidores, en esta línea celular. Es por ello que sería ideal ampliar este estudio para poder determinar qué tanto aumenta este efecto sinérgico en esta línea celular.

Es interesante destacar que los Inhibidores EYA2 inhibitor 9987 y SAHA se comportan igual con respecto a sus % de viabilidad celular en las distintas concentraciones de Olaparib, tanto en MCF7 y MDA-MB-231, ya que son dos tipos de inhibidores de modificaciones de histonas que actúan de manera diferente. Esto sugiere que la eficacia de Olaparib es más compleja de lo que se pensaba inicialmente, por lo que su acción no solo estaría afectada por la actividad de las HDACs. Es posible que haya otros factores que influyen, como las diferencias en la expresión de genes entre las células MCF7 y MDA-MB-231, y los distintos mecanismos de reparación entre ellas. Para comprender mejor los resultados de este estudio, se necesita más investigación.

Con respecto a EYA2 inhibitor 9987, no existe suficiente evidencia que permitiese determinar un resultado esperado con anterioridad a los experimentos, sin embargo, los resultados de este estudio en células MCF7 se inclinan por la posibilidad de que EYA2 tenga un rol en la reparación del DNA, en donde su ausencia promueve la apoptosis celular. Del modo contrario, los resultados en células MDA-MB-231 al tener un efecto distinto, esto puede sugerir, que la desfosforilación de H2AX^{Y142} no sea el único mecanismo por el cual EYA2 regula la DDR, o podría ser que esta desfosforilación tenga efectivamente efectos negativos en la reparación del DNA en casos puntuales. Estos resultados están en línea con una investigación del presente de nuestro laboratorio, donde los resultados obtenidos proponen que un aumento de la actividad fosfatasa de EYA2 conduciría a una mayor inestabilidad genómica, causada por una mayor susceptibilidad al daño por DSB (datos no publicados).

Finalmente, es importante destacar la diferencia en las sensibilidades entre MCF7 y MDA-MB-231, a Olaparib y los distintos inhibidores. Se obtuvo que Olaparib es significativamente distinto en su eficacia entre ambas líneas celulares. Una posibilidad es que las células MCF7 sean más sensibles al daño del DNA que las células MDA-MB-231 o

puede ser que las células MCF7 tengan DDR menos eficientes. Esta diferencia es importante porque podría tener implicaciones para el tratamiento del cáncer de mama, ya que, si bien el TNBC es un tipo de cáncer más resistente a la terapia convencional, estos resultados demuestran que la terapia con Olaparib logra ser efectiva en este tipo de cáncer.

Además, el Cisplatino fue el único inhibidor que por sí solo logró disminuir la viabilidad celular por debajo del 50% para ambas líneas celulares. Esto puede deberse a que Olaparib y Cisplatino fueron los únicos fármacos que se estudiaron hasta una concentración de 100 μM . Los otros inhibidores se estudiaron a una concentración máxima de 10 μM debido a que formaban cristales a concentraciones más altas, y se desconocía el posible efecto de estos en la medición de absorbancias.

Los resultados de este estudio sugieren que la combinación de Olaparib con inhibidores de HDACs y EYA2 puede ser una estrategia terapéutica efectiva para el cáncer de mama luminal, no así para el TNBC (a excepción de la combinación Olaparib + Cisplatino). Sin embargo, es importante realizar más estudios en líneas celulares en donde se abarquen más concentraciones para Olaparib e inhibidores, además, estudiar el efecto del aumento del tiempo de incubación con las drogas. Posteriormente se deberá corroborar este efecto en modelos animales y humanos, para confirmar el comportamiento de Olaparib según el inhibidor con el que se estimule, y por sobre todo, según el tipo de cáncer.

8. CONCLUSIÓN

En este estudio, la determinación de IC50 en todos los fármacos, demostró que en las células MCF7 se obtuvo IC50 menores que en las células MDA-MB-231, con excepción de SAHA que tiene un IC50 levemente menor en esta última. Olaparib resultó ser el fármaco con IC50 más alto en ambas líneas celulares, lo que se relaciona con la literatura, pues Olaparib necesita que las células tengan defectos en su reparación por HRR para poder generar su efecto.

En general, la combinación de Olaparib con inhibidores redujo el IC50 de Olaparib en células MCF7. La combinación con Cisplatino fue la más efectiva, seguida de SAHA y RGFP-966, en contraste, la combinación con EYA2 inhibitor 9987 fue la menos efectiva. Por otro lado, la combinación de Olaparib con inhibidores tuvo un efecto menor en la sensibilidad a Olaparib en las células MDA-MB-231. La combinación con Cisplatino fue la única que potenció el efecto de Olaparib en esta línea celular, debido a que Cisplatino induce daño en el DNA necesario para el mecanismo de acción de Olaparib .

Los resultados de este estudio demostraron que los inhibidores de las modificaciones de histonas como EYA2, RGFP-966, SAHA y también Cisplatino, sensibilizan a las células MCF7 a los efectos de Olaparib. Del modo contrario, se comprobó que estos mismos inhibidores, disminuyen el efecto de Olaparib en las células MDA-MB-231. Estos resultados indican que el uso de Olaparib en conjunto con fármacos que generen daño en el DNA, pueden ser una estrategia eficaz para el tratamiento del cáncer de mama luminal, pero no para el cáncer de mama triple negativo.

De todos modos, se necesitan más estudios para confirmar estos resultados en otras líneas celulares de cáncer de mama y en pacientes humanos, así como también estudiar la razón por la cual en las células MDA-MB-231 ocurre una disminución del efecto de Olaparib al usarlo en conjunto con algún inhibidor, pues esto sería un gran aporte para ahondar en el fallo terapéutico y en la dificultad del tratamiento para el cáncer de mama triple negativo. También se deben investigar las posibles causas de las diferencias en la eficacia de la combinación de Olaparib con inhibidores entre las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

Si bien quedan muchas incógnitas por ser resueltas, es importante reconocer que los hallazgos en este estudio son prometedores para aportar al gran desafío de la terapia del cáncer de mama, tanto como para sugerir ampliar estudios en un posible tratamiento eficaz en cáncer de mama luminal, como también para entender el mecanismo que genera una disminución de la eficacia de Olaparib con inhibidores, en cáncer triple negativo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). Cáncer de mama. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>].
2. Global Cancer Observatory. (2020) Chile. Source: GLOBOCAN 2020. Disponible en chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefindmkaj/<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf>
3. Ministerio de Salud de Chile. (2022). Sepa cómo prevenir y detectar el cáncer de mama. Disponible en [<https://www.minsal.cl/sepa-como-prevenir-y-detectar-el-cancer-de-mama/>]
4. International Agency for Research on Cancer (IARC) (2024). Cancer Today. Disponible en <https://gco.iarc.fr/today>.
5. Ministerio de Salud de Chile. (2015). Guías Clínicas AUGE. Cáncer de mama. Disponible en chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfefindmkaj/<https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/GPC-CaMama.pdf>
6. Organización Americana del Cáncer. (2023). ¿Qué es la recurrencia del cáncer? . Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/supervivencia/preocupaciones-de-salud-a-largo-plazo/recurrencia-del-cancer/que-es-la-recurrencia-del-cancer.html>
7. Asociación Española Contra el Cáncer. (2023). Los retos de la investigación en cáncer de mama. Disponible en: <https://blog.contraelcancer.es/investigacion-cancer-mama-reducir-mortalidad/>
8. Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. (2023). ¿Cómo son los diferentes subtipos de cáncer de mama? . Disponible en: <https://sespm.es/como-son-los-diferentes-subtipos-de-cancer-de-mama/>

9. Organización Nacional del Cáncer. (2023). Subtipos moleculares del cáncer de mama. Disponible en: <https://www.breastcancer.org/es/tipos/subtipos-moleculares>: <https://www.breastcancer.org/es/tipos/subtipos-moleculares>.
10. Organización Nacional del Cáncer. (2023). Tipos de cáncer de mama. Disponible en: <https://www.breastcancer.org/es/tipos>
11. Arrechea Irigoyen, M.A., Vicente García, F., Córdoba Iturriagagoitia, A., Ibáñez Beroiz, B., Santamaría Martínez, M., & Guillén Grima, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 34(2), 219-233. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4321/S1137-66272011000200008>
12. Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 61. Disponible en: <https://doi:10.1186/s13058-020-01296-5>
13. Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288–300. Disponible en : <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
14. Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., & Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(18), 1371–1388. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jnci/90.18.1371>
15. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*, 365(9472), 1687–1717. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0)
16. American Cancer Society. (2023). Terapia hormonal para el cáncer de seno. Disponible en :

<https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-hormonal-para-el-cancer-de-seno.html>

17. American Cancer Society. (2023). Terapia dirigida para el cáncer de seno. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/terapia-dirigida-para-el-cancer-de-seno.html>

18. American Cancer Society. (2023). Tratamiento contra cáncer de seno triple negativo. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-seno/tratamiento/tratamiento-de-triple-negativo.html>

19. Jeggo, P., Pearl, L. & Carr, A. (2016) DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer* 16, 35–42 . Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4>

20. Robson, M., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *The New England journal of medicine*, 377(6), 523–533. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>

21. Ryu, K. W., Kim, D. S., & Kraus, W. L. (2015). New facets in the regulation of gene expression by ADP-ribosylation and poly(ADP-ribose) polymerases. *Chemical reviews*, 115(6), 2453–2481. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/cr50042481>

22. Walsh C. S. (2015). Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecologic oncology*, 137(2), 343–350. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.017>

23. Ma, X., Dang, C., Min, W., Diao, Y., Hui, W., Wang, X., Dai, Z., Wang, X., & Kang, H. (2019). Downregulation of APE1 potentiates breast cancer cells to olaparib by inhibiting PARP-1 expression. *Breast cancer research and treatment*, 176(1), 109–117. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05189-w>

24. Yap, T. A., Plummer, R., Azad, N. S., & Helleday, T. (2019). The DNA Damaging Revolution: PARP Inhibitors and Beyond. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 39, 185–195. Disponible en: https://doi.org/10.1200/EDBK_238473
25. Livraghi, L., & Garber, J. E. (2015). PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. BMC medicine, 13, 188. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0425-1>
26. Ocana, A., & Pandiella, A. (2017). Targeting oncogenic vulnerabilities in triple negative breast cancer: biological bases and ongoing clinical studies. Oncotarget, 8(13), 22218–22234. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14731>
27. Murciano-Goroff, Y. R., Schram, A. M., Rosen, E. Y., Won, H., Gong, Y., Noronha, A. M., ... & Drilon, A. (2022). Reversion mutations in germline brca1/2-mutant tumors reveal a brca-mediated phenotype in non-canonical histologies. Nature Communications, 13(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34109-8>
28. Dilmac, Sayra, and Bulent Ozpolat. (2023) "Mechanisms of PARP-Inhibitor-Resistance in BRCA-Mutated Breast Cancer and New Therapeutic Approaches." Cancers vol. 15,14 3642. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cancers15143642>
29. Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P., & Lambert, S. A. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. Seminars in cell & developmental biology, 30, 154–164. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.035>
30. Giglia-Mari, G., Zotter, A., & Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 3(1), a000745. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>
31. Hoeijmakers J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature, 411(6835), 366–374. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/35077232>

32. Hills, S. A., & Diffley, J. F. (2014). DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Current biology* : CB, 24(10), R435–R444. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.012>
33. Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., & Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society transactions*, 46(5), 1213–1224. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/BST20180519>
34. Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., & Jeggo, P. A. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO journal*, 30(6), 1079–1092. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.27>
35. Yixi Xu, Dongyi Xu; Repair pathway choice for double-strand breaks. *Essays Biochem* 26 October 2020; 64 (5): 765–777. Disponible en: doi: <https://doi.org/10.1042/EBC20200007>
36. Khan, AU y Krishnamurthy, S. Modificaciones de histonas como reguladores clave de la transcripción. *Frente. Biosci.* 10 , 866–872 (2005). Disponible en: <https://doi.org/10.2741/1580>
37. Tessarz, P., & Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(11), 703–708. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrm3890>
38. Podhorecka, M., Skladanowski, A., & Bozko, P. (2010). H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of nucleic acids*, 2010, 920161. Disponible en: <https://doi.org/10.4061/2010/920161>
39. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), 5858–5868. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>

40. Krishnan, Navasona et al. "Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2A.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent." *The Journal of biological chemistry* vol. 284,24 (2009): 16066-16070. Disponible en: <https://doi:10.1074/jbc.C900032200>
41. Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K. H., Xiao, J., Garrity, P. A., & Zipursky, S. L. (1997). The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell*, 91(7), 881–891. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80480-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80480-8)
42. Cook, P. J., Ju, B. G., Telese, F., Wang, X., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 458(7238), 591–596. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature07849>
43. Sousounis, K., Bryant, D. M., Martinez Fernandez, J., Eddy, S. S., Tsai, S. L., Gundberg, G. C., Han, J., Courtemanche, K., Levin, M., & Whited, J. L. (2020). Eya2 promotes cell cycle progression by regulating DNA damage response during vertebrate limb regeneration. *eLife*, 9, e51217. Disponible en: <https://doi.org/10.7554/eLife.51217>
44. Grewal, S. I., & Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5634), 798–802. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1086887>
45. Allshire, R. C., & Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 229–244. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119>
46. Pedersen, M. T., & Helin, K. (2010). Histone demethylases in development and disease. *Trends in cell biology*, 20(11), 662–671. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.011>
47. Hunt, C. R., Ramnarain, D., Horikoshi, N., Iyengar, P., Pandita, R. K., Shay, J. W., & Pandita, T. K. (2013). Histone modifications and DNA double-strand break repair after

exposure to ionizing radiations. *Radiation research*, 179(4), 383–392. Disponible en: <https://doi.org/10.1667/RR3308.2>

48. Heit, R., Rattner, J. B., Chan, G. K., & Hendzel, M. J. (2009). G2 histone methylation is required for the proper segregation of chromosomes. *Journal of cell science*, 122(Pt 16), 2957–2968. Disponible en: <https://doi.org/10.1242/jcs.045351>

49. Yunkai Yang, Min Zhang, Yan Wang, (2022) The roles of histone modifications in tumorigenesis and associated inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Center*, Volume 2, Issue 4, (277-290). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2022.09.002>.

50. Gong, F., & Miller, K. M. (2019). Histone methylation and the DNA damage response. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 780, 37–47. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.09.003>

51. Lande-Diner, L., Zhang, J., & Cedar, H. (2009). Shifts in replication timing actively affect histone acetylation during nucleosome reassembly. *Molecular cell*, 34(6), 767–774. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.027>

52. Mani, C., Tripathi, K., Luan, S., Clark, D. W., Andrews, J. F., Vindigni, A., Thomas, G., & Palle, K. (2020). The multifunctional protein PACS-1 is required for HDAC2- and HDAC3-dependent chromatin maturation and genomic stability. *Oncogene*, 39(12), 2583–2596. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1167-x>

53. Xin, H., Yoon, H. G., Singh, P. B., Wong, J., & Qin, J. (2004). Components of a pathway maintaining histone modification and heterochromatin protein 1 binding at the pericentric heterochromatin in Mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(10), 9539–9546. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.M311587200>

54. Meyer, B., Fabbrizi, M. R., Raj, S., Zobel, C. L., Hallahan, D. E., & Sharma, G. G. (2016). Histone H3 Lysine 9 Acetylation Obstructs ATM Activation and Promotes Ionizing Radiation

Sensitivity in Normal Stem Cells. *Stem cell reports*, 7(6), 1013–1022. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.11.004>

55. Basourakos, S. P., Li, L., Aparicio, A. M., Corn, P. G., Kim, J., & Thompson, T. C. (2017). Combination Platinum-based and DNA Damage Response-targeting Cancer Therapy: Evolution and Future Directions. *Current medicinal chemistry*, 24(15), 1586–1606. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/0929867323666161214114948>

56. Chao, O. S., & Goodman, O. B., Jr (2014). Synergistic loss of prostate cancer cell viability by coinhibition of HDAC and PARP. *Molecular cancer research : MCR*, 12(12), 1755–1766. Disponible en: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0173>

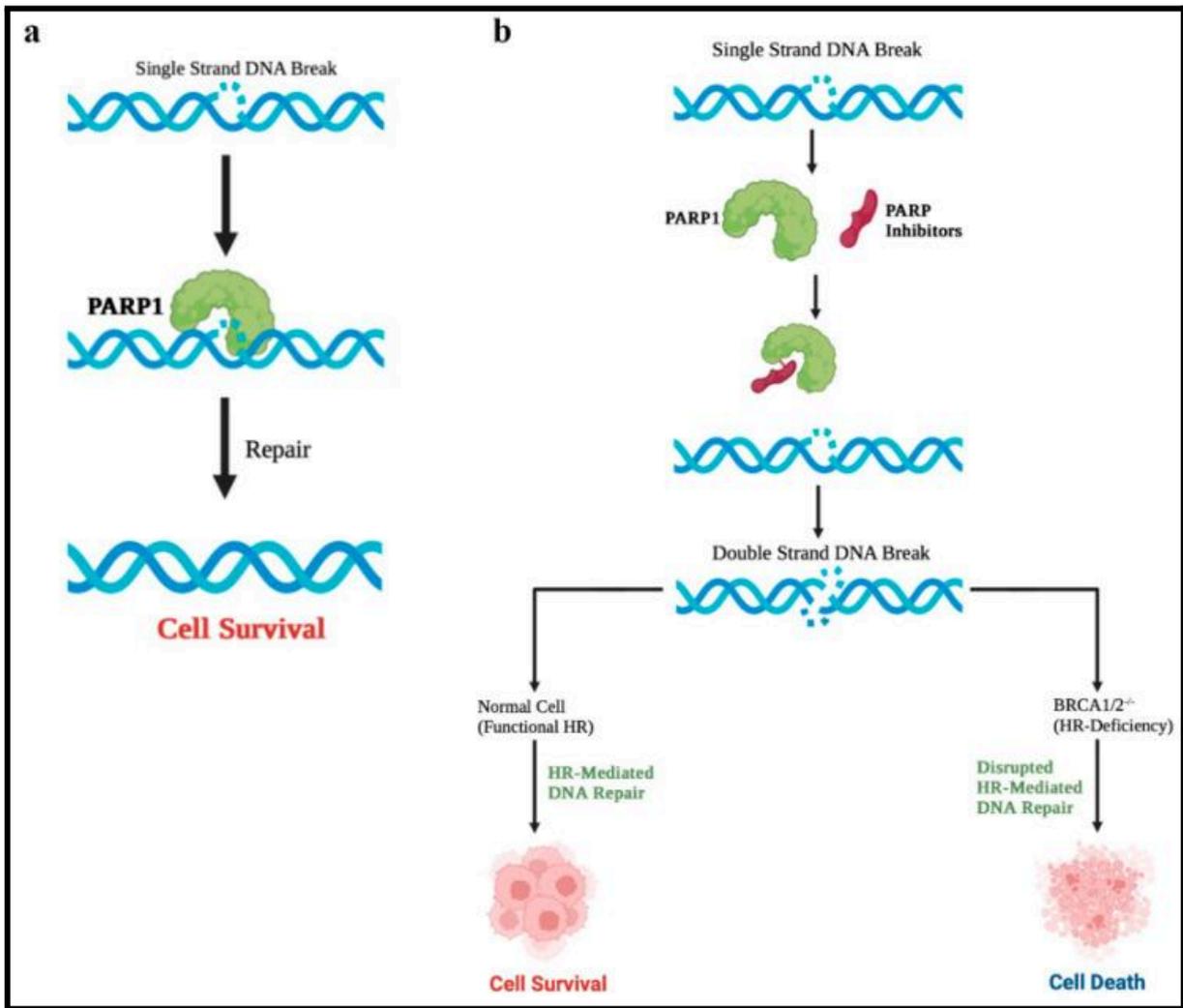
57. Konstantinopoulos, P. A., Wilson, A. J., Saskowski, J., Wass, E., & Khabele, D. (2014). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances olaparib activity by targeting homologous recombination DNA repair in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 133(3), 599–606. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.007>

58. Ha, K., Fiskus, W., Choi, D. S., Bhaskara, S., Cerchietti, L., Devaraj, S. G., Shah, B., Sharma, S., Chang, J. C., Melnick, A. M., Hiebert, S., & Bhalla, K. N. (2014). Histone deacetylase inhibitor treatment induces 'BRCAness' and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 5(14), 5637–5650. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2154>

59. Kremmer, T., Pályi, I., Daubner, D., Boldizsár, M., Vincze, B., Paulik, E., Sugár, J., Pokorny, E., & Túry, E. (1991). Comparative studies on the polyamine metabolism and DFMO treatment of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines and xenografts. *Anticancer research*, 11(5), 1807–1813.

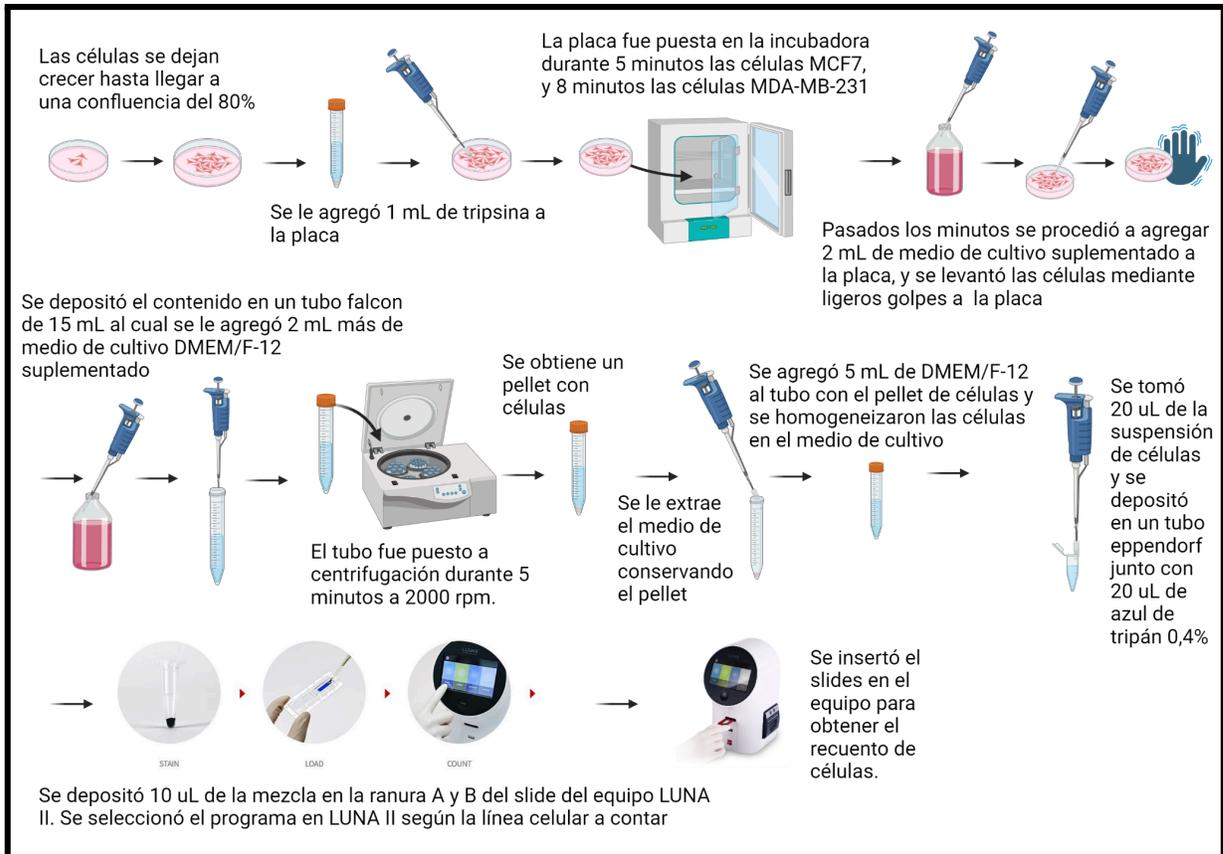
60. Dilmac, Sayra & Ozpolat, Bulent. (2023). Mechanisms of PARP-Inhibitor-Resistance in BRCA-Mutated Breast Cancer and New Therapeutic Approaches. *Cancers*. 15. 3642. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cancers15143642>

10. ANEXOS

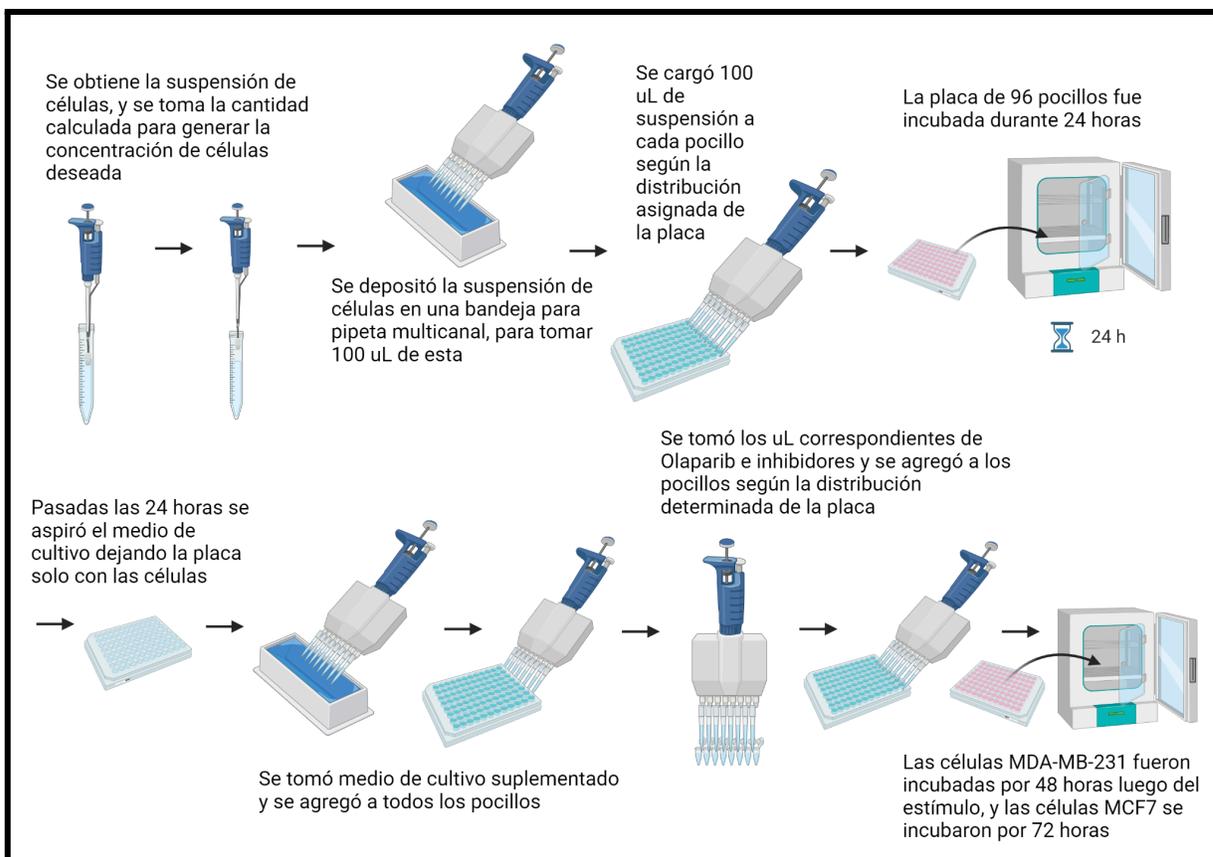


Anexo 1: Mecanismo de los inhibidores de PARP.

(a) Las roturas endógenas de una sola cadena (SSB) se observan con frecuencia en células que proliferan rápidamente, como las células cancerosas. Una SSB se repara con la ayuda de PARP. La reparación eficaz de las SSB dentro de la célula es importante para la supervivencia celular. (b) Los inhibidores de PARP inhiben la unión de PARP a las roturas del ADN. Las SSB no reparadas pueden degenerar en roturas de doble cadena (DSB) que son tóxicas para las células; La recombinación homóloga (HR) es la vía principal para reparar dichas roturas del ADN durante la replicación celular. Las células competentes en HR pueden reparar DSB derivadas de SSB para garantizar la estabilidad del genoma y la supervivencia celular; mientras que las células con deficiencia de HR no pueden reparar los DSB y se produce apoptosis. (Yap et al. (2019))(60).



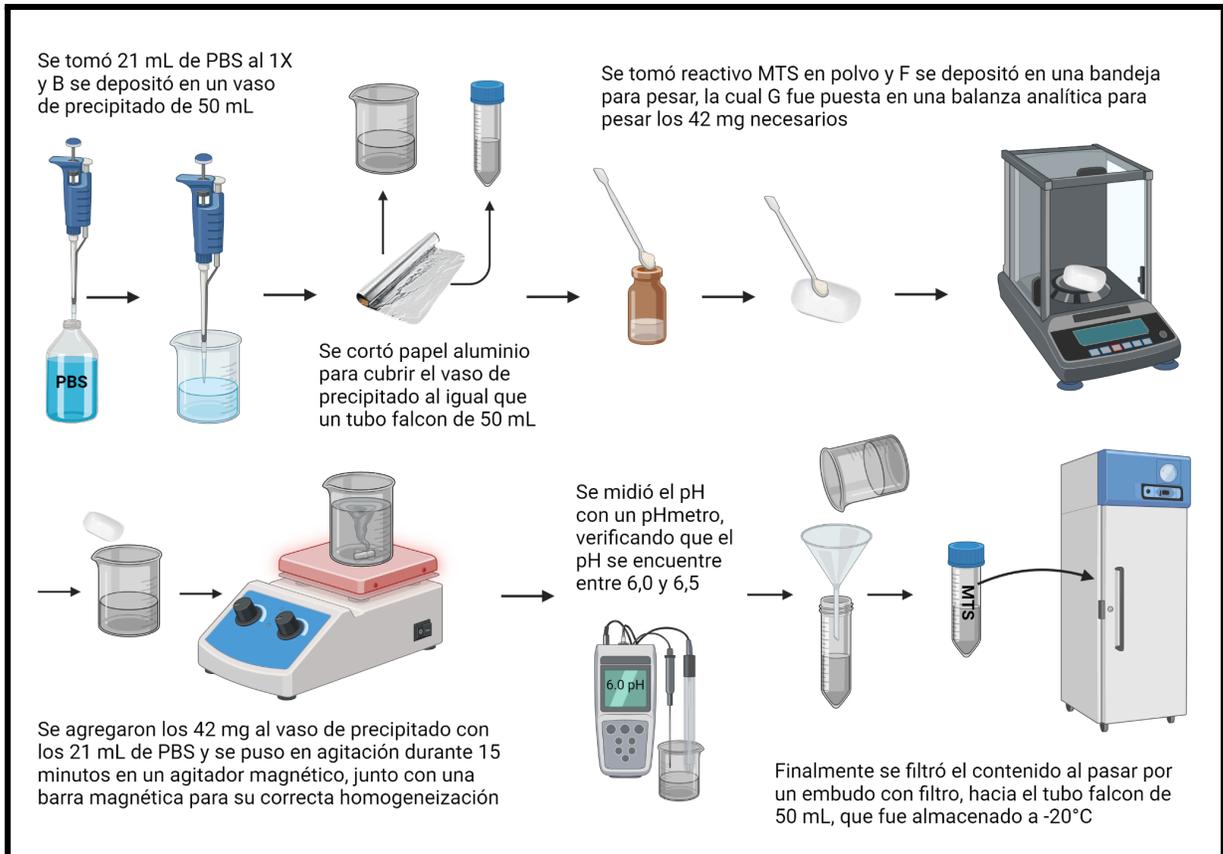
Anexo 2: La figura muestra la secuencia de trabajo desde la tripsinización de la placa con células ya sea MCF7 o MDA-MB-231, hasta el conteo celular obtenido del equipo LUNA II.



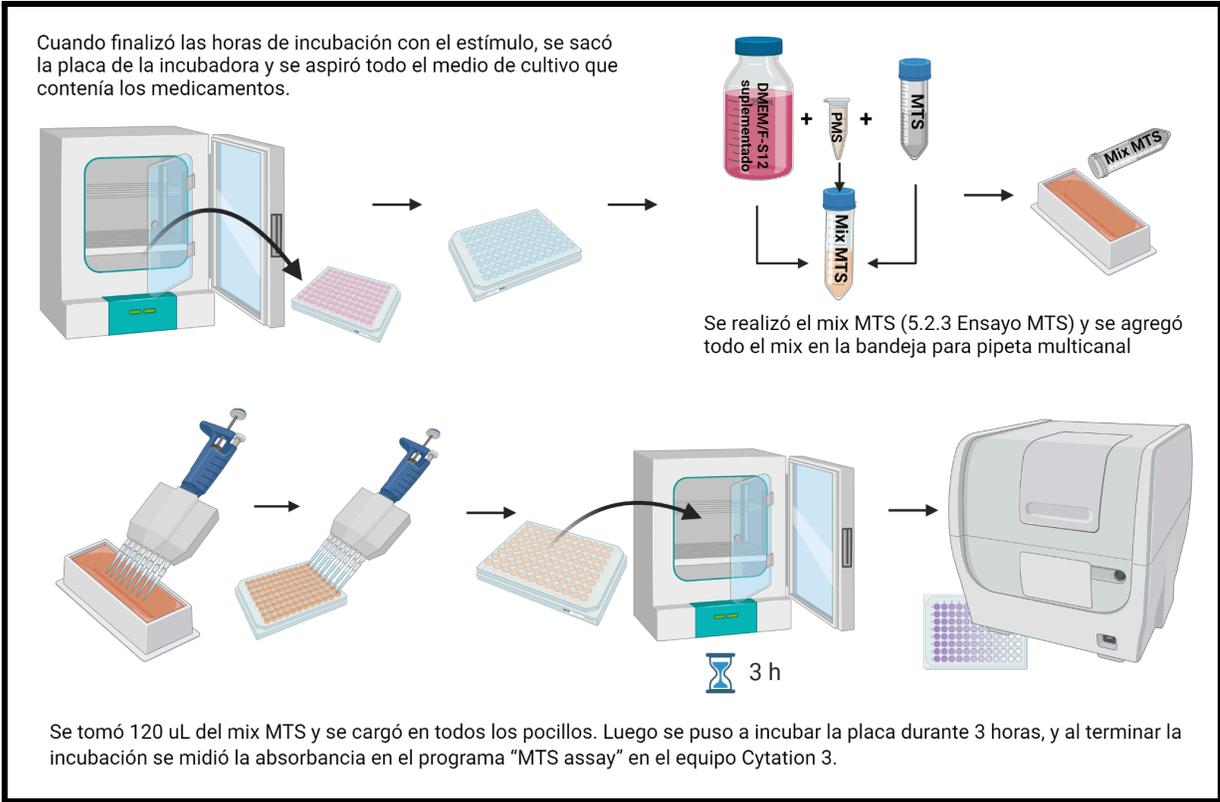
Anexo 3: La figura muestra el flujo de trabajo desde la obtención de la suspensión de células, hasta la incubación de la placa con el estímulo de los medicamentos.

CONCENTRACIONES DE MEDICAMENTOS EN MCF7 Y MDA-MB-231									
Olaparib (μM)		RGFP-966 (μM)		SAHA (μM)		EYA2 (μM)		Cisplatino (μM)	
1	0,01	1	0,001	1	0,001	1	0,001	1	0,01
2	0,1	2	0,01	2	0,01	2	0,01	2	0,1
3	1	3	0,1	3	0,1	3	0,1	3	1
4	10	4	1	4	1	4	1	4	10
5	100	5	10	5	10	5	10	5	100

Anexo 4: Las concentraciones utilizadas para cada medicamento, corresponden a concentraciones en logaritmo base 10 que contienen la concentración de IC50 declarado por el fabricante de cada medicamento.



Anexo 5: La figura muestra el procedimiento para la elaboración del MTS desde que se toman los 21 mL de PBS al 1X, hasta la congelación del reactivo MTS ya elaborado.



Anexo 6: La figura muestra el proceso desde la carga del mix MTS, hasta la obtención de resultados por el equipo Cytation 3.

A

	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control	Control	
1	Olaparib	Olaparib	Olaparib	RGFP-966	RGFP-967	RGFP-968	SAHA	SAHA	SAHA	EYA2	EYA2	EYA2
2	Olaparib	Olaparib	Olaparib	RGFP-966	RGFP-967	RGFP-968	SAHA	SAHA	SAHA	EYA2	EYA2	EYA2
3	Olaparib	Olaparib	Olaparib	RGFP-966	RGFP-967	RGFP-968	SAHA	SAHA	SAHA	EYA2	EYA2	EYA2
4	Olaparib	Olaparib	Olaparib	RGFP-966	RGFP-967	RGFP-968	SAHA	SAHA	SAHA	EYA2	EYA2	EYA2
5	Olaparib	Olaparib	Olaparib	RGFP-966	RGFP-967	RGFP-968	SAHA	SAHA	SAHA	EYA2	EYA2	EYA2
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco

B

	Control	Control	Control								
1	Cisplatino	Cisplatino	Cisplatino								
2	Cisplatino	Cisplatino	Cisplatino								
3	Cisplatino	Cisplatino	Cisplatino								
4	Cisplatino	Cisplatino	Cisplatino								
5	Cisplatino	Cisplatino	Cisplatino								
	Blanco	Blanco	Blanco								

Anexo 7: Distribución de la placa de 96 pocillos para el experimento N°1.

La figura muestra la placa de 96 pocillos, y la distribución de cada pocillo. Los pocillos “control” consisten en pocillos con células y medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado, y los pocillos “blanco” corresponden a pocillos que solo contienen 100 µL de DMEM/F-12 suplementado. La figura A muestra la distribución de Olaparib, RGFP-966, SAHA y EYA2, y la figura B muestra la distribución en placa de Cisplatino. Todos los pocillos contienen un total de 300 µL cada uno.

1	Olaparib + RGFP-966	Olaparib + RGFP-967	Olaparib + RGFP-968	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + EYA2	Olaparib + EYA3	Olaparib + EYA4	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino
2	Olaparib + RGFP-966	Olaparib + RGFP-967	Olaparib + RGFP-968	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + EYA2	Olaparib + EYA3	Olaparib + EYA4	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino
3	Olaparib + RGFP-966	Olaparib + RGFP-967	Olaparib + RGFP-968	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + EYA2	Olaparib + EYA3	Olaparib + EYA4	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino
4	Olaparib + RGFP-966	Olaparib + RGFP-967	Olaparib + RGFP-968	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + SAHA	Olaparib + EYA2	Olaparib + EYA3	Olaparib + EYA4	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino	Olaparib + Cisplatino
1	Olaparib	Olaparib	Olaparib	Control de carga	Control de carga	Control de carga	Control	Control	Control	Control	Control	Control
2	Olaparib	Olaparib	Olaparib	Control de carga	Control de carga	Control de carga	Control	Control	Control	Control	Control	Control
3	Olaparib	Olaparib	Olaparib	Control de carga	Control de carga	Control de carga	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
4	Olaparib	Olaparib	Olaparib	Control de carga	Control de carga	Control de carga	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco

Anexo 8: Distribución de la placa de 96 pocillos para el experimento N°2.

La figura muestra la distribución de cada pocillo en la placa de 96 pocillos. Los pocillos “control” consisten en pocillos con células y medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado, los pocillos “blanco” corresponden a pocillos que solo contienen 100 µL de DMEM/F-12 suplementado, y los pocillos “control de carga” son pocillos con células y medio de cultivo suplementado (realizado para controlar

el pipeteo al cargar las células). Los números ubicados a la izquierda de la imagen corresponden a las distintas concentraciones usadas en todos los pocillos que se cargó un medicamento, siendo de 1 a 4 las concentraciones de Olaparib de 0.01 a 100 μM (en Olaparib y Cisplatino) y 0.001 a 10 μM (en RGFP-966, SAHA y EYA2). Los distintos inhibidores se utilizaron con una concentración fija, correspondiente al IC50 calculado en el experimento anterior. Todos los pocillos contienen un total de 300 μL cada uno.

Fármaco	IC50 errado en MCF7 (μM)	IC50 utilizado en MCF7 (μM)	IC50 real en MCF7 (μM)	IC50 errado en MDA-MB-231	IC50 utilizado en MDA-MB-231 (μM)	IC50 real en MDA-MB-231 (μM)
Olaparib	19.561	_____	150.28	16.159	_____	197.068
RGFP-966	0.00043	0.08	13.336	0.0099	0.08	27.787
SAHA	1.381	1.6	10.75	1.797	1.6	10.635
EYA2	0.008	3	21.286	0.948	3	28.703
Cisplatino	14.138	15	18.949	13.646	15	29.388

Anexo 9: Tabla de comparación entre el IC50 errado y el IC50 real, en ambas líneas celulares.

El “IC50 errado” corresponde a la concentración que se utilizó como evidencia para elegir la concentración fija para el experimento N°2, la cual está descrita en la tabla como “IC50 utilizado”. El “IC50 real” corresponde al IC50 calculado con la correcta curva de regresión lineal.