UNIVERSITAT DE BARCELONA

Defectos en la reparación homóloga producen un aumento del metabolismo oxidativo en cáncer de ovario: relevancia para los tratamientos con inhibidores de PARP

Álvaro Lahiguera Belenguer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (**www.tdx.cat**) y a través del Repositorio Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Defectos en la reparación homologa producen un aumento del metabolismo oxidativo en cáncer de ovario: relevancia para los tratamientos con inhibidores de PARP

Tesis doctoral

Álvaro Lahiguera Belenguer

Junio 2020, Barcelona

Defectos en la reparación homologa producen un aumento del metabolismo oxidativo en cáncer de ovario: relevancia para los tratamientos con inhibidores de PARP

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Álvaro Lahiguera Belenguer para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr.Francesc Viñals i Canals en el instituto catalán de oncología y el instituto de investigaciones biomédicas de Bellvitge

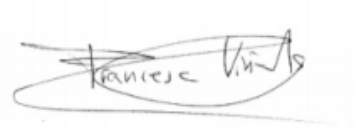
Tesis adscrita al departamento de Ciencias fisiológicas

Programa de Doctorado en biomedicina

Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona

Junio 2020, Barcelona

Francesc Viñals Canals
Director de tesis



Alvaro Lahiguera Belenguer
Doctorando

“Prefiero tener preguntas que no pueden ser respondidas que respuestas que no pueden ser cuestionadas”

Richard Feynman

Abreviaturas

µl	Adenosín difosfato	**ACC**	Acetil-CoA carboxilasa
µM	Intra peritoneal	**Acetil-CoA**	Acetil coenzima A
ADN	American Joint Committee on Cancer	**AMP**	Adenosín monofosfato
ADP	Serum fetal bovino	**ARN**	El ácido ribonucleico
AJCC	Platino	**ATC**	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
ATP	Sala libre de patógenos	**BCA**	Dodecilsulfato sódico
BRC	Micromolar	**CoA**	Coenzima A
CA-125	Daño monocatenario	**DCA**	dicloroacetato
CCC	Dominios directos de interacción con RAD51	**DLAT**	Dihidrolipoamida S-acetil-transferasa
CDDP	Poli ADP ribosa polimerasa	**DLD**	Deshidrogenasa dihidropoamida
DMEM	Carcinoma de célula clara	**DSB**	Double-strand break
FBS	Microlitro	**DSBR**	Double-strand break repair
FDA	Radicales libres	**ECACC**	European Collection of CEll cultures-Sigma Aldrich
FIGO	Resonancia magnética	**F-1,6-BP**	Fructosa-1,6-bisfosfato
HGSC	Tomografía axial computarizada	**F-6P**	Fructosa-6-fosfato
HK2	Tomografía por emisión de positrones	**G-6p**	Glucosa-6-fosfato
IP	Adenosín trifosfato	**GDP**	Guanosina difosfato
LDL	Ácido desoxirribonucleico	**GLUT**	Transportador de glucosa 1
ml	Agencia de Medicamentos y Alimentación	**GTP**	Guanosín trifosfato
mM	Microgramo	**HR**	Homologous recombination
MMR	Low density lipoproteins	**ITS**	Insulina transferrina sodium selenite

MRI	Imagen por resonancia Magnética	**MCTs**	Proteínas de transporte monocarboxiladas
Na	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	**MTT**	Polymerase chain reaction
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleótido	**NHEJ**	Non-homologous ADN end joining
NAM	Superóxido dismutasa	**O/N**	Durante la noche
NAMPT	Carcinoma seroso de alto grado	**OB**	Lugares de unión a oligonucleótidos
NER	Dulbecco's modified Eagle's médium	**PBS**	Phosphate-buffered saline
NR	Nicotinamida ribósido	**PCR**	fructose-2,6-bisphosfatasa
PARP	Cisplatino	**PDH**	Piruvato deshidrogenasa
PET	Fosfatidilinositol bisfosfato	**PDKs**	Piruvato deshidrogenasa quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol trifosfato	**PDPs**	Polivinildeno fluoreide
PIP3	*International Federation of Gynecology and Obstetrics*	**PEP**	Ácido fosfoenol pirúvico
PT	Ácido nicotínico	**PFA**	
RM	Antígeno de cáncer 125	**PFK1**	Fosfofructoquinasa-1
ROS	Nucleotide excision repair	**Q**	Ubiquinona
SOD	DNA mismatch repair	**QH2**	Ubiquinol
SPF	Hexoquinasa 2	**SDS**	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazoli
SSB	Mililitro	**SDSA**	Synthesis-dependent strand annealing
TAC	Nicotinamida	**TIGAR**	Paraformaldehído

Contenido

1. El Ovario 18

1.1 Tumores Endometrioides 20

1.2 Carcinoma de célula clara 20

1.3 Adenocarcinoma mucinoso 21

1.4 Carcinoma seroso de bajo grado 21

1.5 Carcinoma seroso de alto grado 22

2. Epidemiología del cáncer de ovario 22

3. Diagnóstico del cáncer de ovario 24

4. Tratamiento del cáncer de ovario 29

4.1 Terapia convencional 32

5. Quimioresistencia 33

5.1 Mecanismos de quimioresistencia principales 35

5.1.1 Bombas de exportación de drogas 35

5.1.2 Vías de señalización 36

5.1.3 Mecanismos de reparación del ADN 39

6. La recombinación homóloga 40

6.1 Mecanismos de reparación Homóloga (BRCA1/BRCA2) 43

6.2 BRCA1/2 44

6.2.1 BRCA2 46

6.2.2 P53 y BRCA 48

7. Metabolismo 51

7.1 Glucólisis 51

7.2.1 Regulación de la Glucólisis 54

7.2 Metabolismo oxidativo 56

Piruvato + CoA + NAD+ ——> CO_2 + Acetil-CoA + NADH + H^+ 57

7.3 Ciclo de Krebs 59

7.4 Cadena respiratoria 64

7.4.1 Complejos protéicos de la cadena de electrones 65
7.5 Metabolismo del NAD^+ 69
7.6 Metabolismo y cáncer 70
Materiales y métodos 75
1.Experimento Invivo 75
1.1 Estabulamiento de los ratones 75
1.2 Inyección y generación ortotópica de tumores en ratones atímicos 75
1.3 Tratamiento y caracterización de los tumores 76
1.4 Obtención Y procesamiento de las muestras 76
2. Cultivos celulares 77
2.1 Mantenimiento de las células en cultivo 77
2.2 Producción de lentivirus CRISPRCAS9 para BRCA2 78
2.3 Generación de líneas celulares estables CrisCas9 79
2.4 Generación de tumores a partir de células 79
2.5 Generación células resistentes 80
2.5 Ensayo de proliferación 80
2.6 Análisis de crecimiento células 81
2.7 Inhibidores i factores de crecimiento utilizados in *vitro* 82
3. Proteínas 82
3.1 Extracción de proteína de tumores 82
3.2 Extracción de proteína de células 83
3.3 Electroforesis en geles de poli-acrilamida/sds y Western Blot 83
3.*4 Western Blot* 85
4. Extracción de RNA 86
4.2 Extracción, purificación y secuenciación de ADN 86
5. Metabolismo 87
5.1 Consumo de oxígeno en tiempo real (OROBOROS) 87
5.2 Consumo de glucosa 88

5.3 Producción de lactato 89
5.4 Concentración de ATP mediante fluorescencia 91
5.5 Flujo Glucolítico 92
5.6 Cuantificación NAD^+/NADH 93
5.7 Procesamiento de muestras de proteómica 93
6. Citometría 93
6.1 Detección de la masa mitocondrial (MitoTracker) 93
6.2 Cuantificación ROS mitocondriales (MitoSOX) 94
6.3 Citometría de flujo para valorar la histona H2AX 94
6.4 Apoptosis 95
7.Ensayo de ciclo celular 95
Hipótesis: 97
Objetivos 97
Resultados 99
1. Problemas crónicos en la integridad del ADN aumentan el metabolismo oxidativo 100
1.1 Evaluación de la resistencia a cisplatino en el modelo celular de resistencia SKOV-3-R12 100
1.2 Las células Skov-3-R12 consumen más oxígeno y tienen más daño crónico en el ADN 101
1.3 Evaluación de la expresión protéica de marcadores mesenquimales en SKOV-3-R12 102
1.4 Niveles de expresión de enzimas clave en el metabolismo celular en las células SKOV-3-R12. 103
..... 104
1.5 Secuenciación de las células SKOV-3 CRISPR-CAS9 BRCA2 -/- 104
..... 105
1.6 Células con mayor sensibilidad a olaparib tienen aumentado el consumo de oxigeno 105

1.7 Las células p53/Brca2 -/- tienen mayor daño crónico en el ADN, mayor consumo de oxígeno y mayor sensibilidad a olaparib..... 108

..... 109

1.8 Las células p53/Brca2 -/- tienen un leve aumento en la masa mitocondrial 110

1.9 Se observan pocas diferencias en la proliferación celular al deleccionar Brca2..... 112

1.10 Las diferencias en el consumo de oxígeno únicamente aparecen con la glucosa como sustrato 113

1.11 La delección de BRCA2 produce una bajada en la expresión de GLUT1 y un aumento de TIGAR 114

1.12 Las células p53/Brca2 -/- tienen un descenso en el flujo glucolítico y en el consumo de glucosa 115

1.13 Aumento en la actividad PDH y descenso en la de la ACC en p53/Brca2 -/-..... 117

1.14 En las células p53/Brca2 -/- se produce un aumento del ciclo de Krebs 118

2. El cambio metabólico está producido para mantener los niveles de ATP y NAD^+ con el fin de mantener la actividad PARP 122

2.1 Problemas en HR sensibiliza a inhibidores de la cadena respiratoria 122

2.2 Metformina no incrementa la apoptosis, pero sí produce parada del ciclo celular..... 124

2.3 Al tratar con metformina se produce una bajada del ciclo de Krebs y una drástica reducción del consumo de oxigeno 125

2.4 Metformina desciende los niveles del ratio NAD^+/NADH y ATP en p53/Brca -/-..... 127

2.5 Metformina desciende la actividad PARP en p53/Brca2 -/-..... 128

2.6 Otros inhibidores de la cadena respiratoria también producen una bajada de la actividad PARP..... 130

2.7 Metformina al bloquear la actividad PARP aumenta el daño en el ADN 131

3. Cambios en el metabolismo celular producen cambios en la efectividad a los inhibidores de PARP 133

3.1 La sensibilidad a metformina se modifica cambiando los niveles de su combustible (NAD+) 133

3.2 Inhibidores de cadena respiratoria incrementan ROS 135

3.3 La modificación de la sensibilidad a metformina por piruvato no viene dada por cambios en los niveles de ROS. 136

3.4 Metformina reduce el crecimiento tumoral en p53/Brca2 -/- 137

3.6 Bloqueando el metabolismo oxidativo disminuye el efecto de olaparib 139

3.7 Bloqueando el metabolismo oxidativo disminuye la inhibición de la actividad PARP bajo olaparib. 140

3.8 Aumentando el metabolismo oxidativo se aumenta la sensibilidad a olaparib y la actividad PARP 141

3.9 El piruvato potencia el efecto Warburg producido por metformina que produce protección frente a Olaparib 143

Discusión 146

Problemas crónicos en la integridad del ADN aumentan el metabolismo oxidativo 146

El cambio metabólico está producido para incrementar los niveles de ATP y NAD^+ para mantener la actividad PARP 149

Cambios en el metabolismo celular producen cambios en la efectividad a los inhibidores de PARP 153

Conclusiones 157

Bibliografía 158

Introducción

Introducción

1. El Ovario

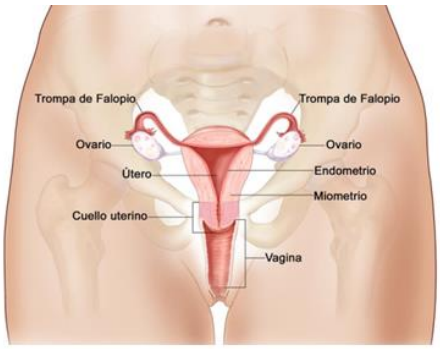


Figura 1: Anatomía del aparato reproductor, extraída de la web del instituto nacional del cáncer (NCI)

El ovario es el órgano reproductor femenino encargado de la producción y secreción de los óvulos y de las hormonas sexuales. Están localizados en la parte baja del abdomen, son del tamaño y forma de una almendra, de alrededor de 6 a 7 gramos de peso y están situados a ambos lados del útero. Los ovarios están formados por una zona central y una zona periférica donde se encuentran los folículos ováricos[1]. A nivel histológico, los ovarios están formados por 3 tipos principales de células: las células epiteliales de la superficie que recubren el ovario, las células germinales, que se encuentran en el interior y forman los óvulos. Finalmente existen las células estromales, que son las encargadas de producir las hormonas femeninas[2].

Cuando el feto tiene 20 semanas ya cuenta con más de 6 millones de oocitos (células ovulares que se encuentran en desarrollo) de los cuales sobreviven alrededor de 2 millones al nacer. Una vez se llega a la pubertad quedan entre 300 000 y 400 000 oocitos disponibles para madurar y convertirse en óvulos[3]. Cada ciclo ovárico mensual termina con la maduración y liberación de un ovulo, aunque en ocasiones pueda liberarse más de uno. Los cientos de miles de oocitos que no siguen el proceso de maduración van degenerando de forma gradual hasta que finalmente en la menopausia no queda ninguno[2].

Las hormonas femeninas secretadas por el ovario tienen la función de posibilitar y regular el aparato genital de la mujer, siendo las principales

hormonas secretadas los estrógenos y la progesterona. Los estrógenos son los responsables del correcto crecimiento del endometrio durante la fase proliferativa del ciclo menstrual, por lo que son esenciales en la regulación del ciclo reproductor. Además de intervenir en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, participan en múltiples procesos biológicos ajenos al aparato genital femenino, como puede ser su contribución al mantenimiento de la masa ósea y a la fijación de calcio en el hueso, o bien facilitando la relajación de las paredes arteriales aumentando así el aporte sanguíneo a los tejidos. Por otro lado, la progesterona actúa principalmente durante la segunda parte del ciclo menstrual. Su función principal es la de frenar los cambios proliferativos endometriales que inducen los estrógenos y estimulan los cambios madurativos, preparando así al endometrio para la implantación del embrión. Durante el periodo de lactancia también tiene un papel relevante, ya que prepara las glándulas mamarias aumentando de tamaño los senos y preparándolos para la segregación de leche[4].

Todos los procesos mencionados de la regulación de los ciclos menstruales, los niveles hormonales, la correcta maduración de los óvulos, tiene un elevado nivel de complejidad e interconectividad. Las células del ovario están sometidas a múltiples interacciones hormonales, por lo tanto, cualquier anomalía puede desencadenar una patología, como es el caso de los ovarios poliquísticos, la endometriosis o el cáncer de ovario.

El cáncer es el nombre común que reciben el conjunto de enfermedades que comparten un crecimiento anormal celular con el potencial de invadir o diseminar otras partes del cuerpo. Dependiendo del tipo de células en el que se origine este crecimiento, cáncer será nombrado con el nombre de dichas células. En nuestro caso, como las células que originan este cáncer en general se encuentran en el ovario, será denominado cáncer de ovario[5].

El cáncer de ovario puede ser originado por los diferentes tipos de células que lo forman, por lo que cada tipo celular puede desarrollar un tipo tumoral diferente. Los tumores ováricos de células germinales, son

los generados por las células encargadas de la formación de los óvulos. Los tipos más comunes son teratomas, disgerminomas, tumores del seno endodérmico y coriocarcinomas, suelen ser benignos ya que solo representan el 2% del total de cánceres de ovario. Por otro lado, los tumores ováricos estromales, son los que se originan en las células del tejido estructural y productor de hormonas del ovario. Solo representan un 1% del total de neoplasias malignas, a causa de sus síntomas tempranos (suelen generar sangrados vaginales) y normalmente tienen buen pronóstico.

Por último, están los tumores que provienen de las células epiteliales que recubren el ovario y reciben el nombre de carcinomas. Son el tipo de neoplasia maligna más común, ya que el 90% de los tumores de ovario tienen una histología epitelial y son llamados tumores epiteliales de ovario. Estos se clasifican en función de sus características histopatológicas: tumores endometrioides, célula clara, mucinoso, tumores de Brenen o tumores serosos, que se dividen en serosos de alto y bajo grado.

1.1 Tumores Endometrioides

Los tumores Endometrioides son mayoritariamente de tipo maligno, representan alrededor del 20% del total de carcinomas. Están producidos por las glándulas tubulares similares a las del endometrio. Estos tumores son bilaterales (se presentan en ambos ovarios) en el 28% de los casos. Macroscópicamente presenta un tamaño promedio de 15 cm. Mutaciones somáticas en B-catenina y PTEN son las más comunes. Además, mutaciones en los genes ARID1A, RAS y una elevada inestabilidad de microsatélites están presentes en este tipo tumoral[6]. El pronóstico depende del grado de invasión del tumor en el momento del diagnóstico, pero en tumores localizados en el ovario tienen un 75% de supervivencia en 5 años.

1.2 Carcinoma de célula clara

Es una neoplasia ovárica epitelial poco frecuente representando

únicamente el 4% de los casos, comúnmente son abreviados como CCC. Macroscópicamente presenta un rango de tamaño promedio de 15 centímetros con contenido mucinoso. Están caracterizados por células epiteliales claras, en tachuela y con un gran citoplasma eosinófilo. Los CCC tienen mutaciones en PTEN, ARID1A y en los genes PBK. No están descritas mutaciones en BRCA o que presenten inestabilidad genómica[7]. Raramente son bilaterales, están asociados con mala prognosis en estados avanzados.

1.3 Adenocarcinoma mucinoso

El adenocarcinoma mucinoso de ovario es un tumor epitelial maligno del ovario poco frecuente, ya que representa únicamente un 3% de todos los carcinomas. Tienen una apariencia quística de tamaño variable, con una superficie con áreas lisas, solidas uniformemente distribuidas, suelen estar rellenos de un líquido gelatinoso. Macroscópicamente el tamaño promedio ronda los 18 cm. Suelen tener mutaciones en KRAS y en RBB2 mutaciones que participan en la tumorogénesis en este tipo tumoral, no se han encontrado mutaciones en BRCA[8]. Raramente son bilaterales, únicamente un 5% de los casos presentan bilateralidad.

1.4 Carcinoma seroso de bajo grado

Neoplasia de origen epitelial que representa del 5% al 8% de todos los cánceres de ovario. De aspecto quístico y con muy poca necrosis, a diferencia de los carcinomas de alto grado con abundante proliferación epitelial y complejidad con formación de papilas. Estos tumores se caracterizan por la ausencia de inestabilidad genómica, por lo que tienen un número bajo de mutaciones, dentro de las cuales se encuentran mutaciones en KRAS Y BRAF[9]. Los pacientes suelen ser diagnosticados a edades tempranas, teniendo una alta supervivencia pese a que tienen baja respuesta a la quimioterapia convencional.

1.5 Carcinoma seroso de alto grado

Es el tipo tumoral epitelial más común, alrededor del 70% del total de los cánceres de ovario. Es por esa razón que la investigación biomédica se centra en estos últimos, utilizando en su mayoría líneas celulares procedentes de este tipo tumoral. Alrededor del 66% de los casos son bilaterales y de un tamaño variable. Macroscópicamente son multiloculares, con papilas friables blandas y contenido seroso en los quistes, presentando necrosis y células multinucleares en la mayoría de los casos. En más del 80% de los casos muestran mutaciones en p53 además de índices de proliferación celulares elevados. Es importante destacar que estos tumores suelen tener rearreglos cromosómicos que reflejan el elevado grado de inestabilidad genética. Se considera que alrededor del 10% de los casos de cáncer de ovario son hereditarios y que más del 90% de estos casos están asociados a alteraciones en los genes BRCA1 y BRCA2. En este contexto se considera al paciente con mutaciones en BRCA1 tiene un riesgo de entre el 40% y el 50%, siendo de un 20 al 30% para los pacientes con mutaciones en BRCA2[10].

2. Epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario de origen epitelial con más de 230.000 mujeres diagnosticadas anualmente, representa el séptimo tipo de cáncer más diagnosticado en mujeres en el mundo, con un 46% de supervivencia a los 5 años después del diagnóstico y más de 150.000 muertes anuales. El alto porcentaje de mortalidad es producido principalmente porque el diagnostico suele ser en estados avanzados de la enfermedad (75% de los casos), ya que en los estadíos iniciales suele ser asintomático.

Como en la mayoría de procesos cancerígenos uno de los factores de riesgo más importantes es la edad. El cáncer de ovario no iba a ser una excepción, la incidencia del cáncer de ovario incrementa con la edad, con una edad media de diagnosis de 63 años, siendo más del 80% de las

pacientes diagnosticadas con más de 45 años.

Uno de los riesgos más importantes en el cáncer de ovario es el historial familiar de la enfermedad, ya que alrededor del 7% de las mujeres diagnosticadas tienen antecedentes familiares. Como hemos descritos anteriormente, la mayoría de estos casos hereditarios son atribuidos a BRCA1 y BRCA2, pudiendo ser los causantes de alrededor del 10-15% del total de los cánceres de ovario[11]. El cáncer de ovario también está relacionado en familias en las que se ha diagnosticado síndrome de Lynch, ya que los defectos en los sistemas de reparación del ADN están relacionados con alrededor del 2% de los casos, añadiendo un 12% de riesgo a desarrollar cáncer de ovario[12].

Otro de los factores que promueven la carcinogénesis en el ovario son las propias hormonas que producen, el estrógeno y la progesterona. Hay principalmente dos teorías, la primera, correlaciona el número de ciclos ovulativos, con el ratio de división celular necesario para reparar la superficie del tejido dañado, incrementando por lo tanto el riesgo de mutaciones en este proceso[13]. La segunda hipótesis, que suele nombrarse "la hipótesis de la gonadotropina", postula que tanto la gonadotropina como la LSH y la FSH sobreestimulan el epitelio del ovario, causando un incremento de la proliferación con la consiguiente posibilidad de carcinogénesis[14].

Dando argumentos a favor de la primera hipótesis, una edad temprana de la primera ovulación y una edad tardía de la última, debería incrementar el riesgo de cáncer de ovario, ya que se produce un número más elevado de ovulaciones. Por otro lado, de acuerdo con la segunda teoría una edad de menopausia tardía retrasa la oleada de hormonas gonadotropinas, reduciendo la posibilidad de cáncer de ovario. Existen numerosos estudios que relacionan el tiempo de vida medio de ovulación con el riesgo de padecer cáncer de ovario. La mayoría de los estudios identifican un ligero incremento del riesgo sobre las mujeres que han tenido antes de los 12 años la primera ovulación[1516], pese a que también existen estudios que lo contradicen o que afirman que no existe relación entre la edad del primer ciclo y el riesgo de padecer cáncer de ovario[1718]. Por lo que respecta a la relación entre la edad del

inicio de la menopausia y el riesgo de padecer cáncer de ovario, también existen considerables discrepancias. Por un lado numerosos estudios de casos control han encontrado relación entre la edad tardía de menopausia y un aumento del cáncer de ovario [1920]. Pero por otro lado también numerosos estudios de cohortes o de casos control han desmentido esta afirmación[2122]. Por lo que la edad temprana o tardía de aparición de la menopausia no se considera un factor de riesgo importante en el cáncer de ovario.

Otro factor importante que influye en el cáncer de ovario es el embarazo, en este caso la anovulación y la supresión de gonadotropinas que se produce durante el mismo está vinculada a un efecto protector. Se estima que las mujeres que tienen un embarazo tienen un entre un 30-60% menos de riesgo de padecer cáncer de ovario[17,19] y cada embarazo adicional se estima que baja en un 15% el riesgo[23]. A su vez, la lactancia, que suele tener lugar posteriormente del embarazo y la correspondiente supresión de las hormonas gonadotropinas que conlleva a la anovulación también presenta una reducción del riesgo, especialmente durante los primeros meses[16].

Finalmente, una de las correlaciones epidemiológicas más establecidas es la protección que brinda la toma de anticonceptivos orales. Según los estudios se establecen una reducción del 30 al 40% del riesgo de padecer cáncer de ovario, aproximadamente cada año de anticonceptivos brinda un 5% de menos riesgo.

3. Diagnóstico del cáncer de ovario

El principal problema del cáncer de ovario (como otros tipos tumorales) es la ausencia de síntomas iniciales, por lo tanto, cuando ya se sospecha de un carcinoma suele detectarse en estadios avanzados, con el consiguiente impacto que eso conlleva en la supervivencia. Es más, desafortunadamente los pocos síntomas iniciales que se puedan manifestar, son síntomas comunes en otras enfermedades gastrointestinales o ginecológicas, haciendo que sea aún más difícil de diagnosticar en estadios iniciales. Esto es principalmente debido a que

el ovario es un órgano de localización pélvica sin conexión con el exterior, teniendo lugar el crecimiento en la cavidad peritoneal, donde se comparte espacio con otros órganos que pueden llevar a síntomas difusos. Alrededor del 20 al 30% de las pacientes son diagnosticadas en estos estadios iniciales, si el tumor está confinado en el ovario tiene unas ratios de supervivencia a 5 años del 70 al 90%.

Desgraciadamente, del 70 al 80% de las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados, suelen tener diseminaciones distales del tumor primario, ya sea por vía linfática, hematógena o como en la mayoría de los casos peritoneal, haciendo que la mortalidad supere el 70%. Queda patente, por lo tanto, que hay que intentar mejorar en lo posible el diagnóstico prematuro de esta enfermedad, porque si el tumor es detectado cuando está localizado la esperanza de vida aumenta radicalmente.

Es por esa razón que se están realizado importantes esfuerzos en intentar implementar un cribado general de la población para intentar diagnosticar de forma prematura los posibles casos, mejorando así la supervivencia de las pacientes. En 1981 se descubrió el antígeno de cáncer 125 (CA-125) estableciéndose como un marcador tumoral para cáncer de ovario epitelial en sangre[24]. Esta glicoproteína de alto peso molecular está expresada en una gran porción de los cánceres de ovario, pero la sensibilidad y la especificidad del marcador es todavía poco conocida. Únicamente aparece aumentado en aproximadamente el 50% de los estadios I y en el 75-90% de los pacientes con carcinoma de ovario avanzado[25]. Además la especificad del test es muy baja, produciendo un elevado número de falsos positivos[24]. De hecho se realizó un cribado con casi 200 000 personas, utilizando el antígeno CA125, pero no se realizó una mejora en el cribado respecto el uso de la ecografía transvaginal[26].

Pese a los esfuerzos de encontrar nuevas dianas para realizar un cribado, la probabilidad de encontrar un marcador para el cáncer epitelial de ovario es baja, debido principalmente a la heterogeneidad de la enfermedad. Pese a ello, es importante encontrar marcadores que permitan una detección temprana, bajando así la alta mortalidad de la

enfermedad.

Como el cribado todavía no está implementado, las pacientes una vez son diagnosticadas son caracterizadas/cribadas en función de cuanto y como ha diseminado el tumor (estratificación). Mediante diferentes técnicas de diagnóstico como pueden ser diagnóstico por imagen (PET, RM, TAC) o bien por biopsias en la propia cirugía extirpadora, los médicos deciden en qué etapa (estadio) se encuentra el tumor. Dependiendo de en qué estadio se encuentre la paciente, tendrá un tipo de tratamiento u otro, de la misma forma que tendrá un pronóstico u otro[27].

En cáncer de ovario, los estadios van del estadio I al IV, en general, mientras más alto sea el número, más se habrá propagado el cáncer y tendrá un peor pronóstico. Aun teniendo en cuenta que cada tumor se considera un caso único, dos pacientes con el mismo estadio suelen tener un mismo tratamiento y pronóstico.

Se utilizan dos sistemas para la estadificación del cáncer de ovario, por un lado, el sistema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics)* y el sistema de clasificación del cáncer TNM del AJCC *(*American Joint Committee on Cancer). Se utilizan básicamente tres factores para clasificar el cáncer de ovario: El tamaño del tumor, la propagación a los nódulos linfáticos y la diseminación o metástasis distales.

- El tamaño del tumor: ¿Ha alcanzado el tumor al crecer los órganos pélvicos adyacentes, como la vejiga o el útero? ¿Se ha propagado el tumor fuera del ovario o de las trompas?
- La propagación a los nódulos linfáticos adyacentes: ¿Ha diseminado el tumor a los ganglios linfáticos? ¿Ha podido diseminar a través del líquido linfático?
- La propagación (metástasis) a sitios distantes: ¿Se ha diseminado el cáncer a órganos distales como el hígado o los huesos? ¿Ha diseminado a través del líquido ascítico por el peritoneo?

Una vez determinadas las categorías de la paciente, esta información se combina para asignar una etapa general. Si no es posible realizar la cirugía, se le asignará una etapa clínica, basada en los resultados médicos obtenidos hasta el momento, como una biopsia o estudio por imágenes realizados antes de la cirugía.

Tabla 1: Estadificación quirúrgica del cáncer de ovario (Estadios de la FIGO)	
I	**Tumor limitado a los ovarios**
IA	Tumor limitado a un ovario o trompa de Falopio, sin ascitis, sin implantes en la superficie del ovario y con la cápsula del ovario intacta.
IB	Tumor limitado a ambos ovarios o trompas, sin ascitis, sin implantes en la superficie del ovario y con la cápsula del ovario intacta.
IC	Tumor limitado a uno o ambos ovarios o trompas, con alguna de las características: IC1: Diseminación quirúrgica. IC2: Cápsula rota o con implantes en la superficie ovárica o trompas. IC3: Células neoplásicas en ascitis o lavados peritoneales.
II	**El tumor afecta a uno o ambos ovarios con extensión a órganos o estructuras de la pelvis**
IIA	Extensión al útero o a las trompas de Falopio.
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos.
III	**Tumor en uno o ambos ovarios o trompas, con implantes fuera de la pelvis y/o en los ganglios linfáticos retroperitoneales pélvicos o para-aórticos**
IIIA1	Tumor con afectación solo de ganglios retroperitoneales (confirmados histológicamente). IIIA1i: Tamaño de los ganglios hasta 10 mm. IIIA1ii: Tamaño superior a 10 mm.
IIIA2	Tumor con implantes microscópicos fuera de la pelvis (en la cavidad abdominal), con o sin afectación ganglionar retroperitoneal.
IIIB	Tumor macroscópico con implantes de 2 cm o menos fuera de la pelvis (en la cavidad abdominal), con o sin ganglios retroperitoneales afectados.
IIIC	Tumor macroscópico con implantes de 2 cm o más, fuera de la pelvis (en la cavidad abdominal), con o sin ganglios retroperitoneales afectados. Incluye extensión a la cápsula hepática o bazo.
IV	Presencia de metástasis a distancia. Incluye derrame pleural, parénquima hepático o de bazo, ganglios inguinales o extraabdominales, invasión transmural de intestino. IVA: Presencia de derrame pleural con células neoplásicas. IVB: Extensión fuera de la cavidad abdominal (excepto derrame pleural) o en el parénquima hepático y/o bazo, ganglios inguinales o extraabdominales, invasión transmural de intestino.

Tabla 1: Clasificación en el sistema FIGO más reciente 2018 Es el sistema de estadificación para el cáncer de ovario, trompas de Falopio y cáncer peritoneal primario.

4. Tratamiento del cáncer de ovario

Como se ha mencionado anteriormente, en las pacientes que tienen el tumor localizado en el ovario, sin tener riesgo de metástasis, son sometidas a cirugía para extraer el tumor primario sobreviviendo en un 90% a los 5 años. Pero desgraciadamente la inmensa mayoría de pacientes son diagnosticadas demasiado tarde, por lo que el tratamiento estándar desde 1980 es la combinación de cirugía y quimioterapia[28].

El principal factor pronóstico de supervivencia es una buena cirugía del primario eliminando por completo toda la zona tumoral, por lo que una extirpación exitosa es determinante tanto en carcinomas avanzados como en estadios iniciales[29]. Por lo tanto, la cirugía para la extirpación del tumor primario y la posterior quimioterapia coadyuvante es considerada alrededor del mundo como el tratamiento estándar para el cáncer de ovario epitelial.

Como se ha comentado, la cirugía también tiene por objetivo determinar la etapa en la que se encuentra el tumor para ver su grado de diseminación. En general se suele extirpar el útero (histerectomía), ambos ovarios y las trompas de Falopio (salpingooferectomía bilateral) y el epiplón (capa de tejido adiposo que cubre los contenidos abdominales). Además, se suele realizar biopsia de ganglios linfáticos de la pelvis y el abdomen para saber si el tumor ha penetrado en el sistema linfático. A su vez si existe líquido ascítico en la cavidad peritoneal será extraído y analizado, se procede a realizar un lavado con agua salina y a tomar biopsias de diferentes zonas para realizar una correcta estadificación del tumor[28]. Este punto es muy importante, ya que de la correcta estadificación del tumor conllevará a un tipo de tratamiento u otro.

Por lo tanto, dependiendo de la etapa en la que se encuentre el cáncer, recibirá un protocolo de tratamiento u otro. A grandes rasgos los diferentes tipos de tratamientos en función de su estadio serían:

Cánceres en etapa I: Extirpación del tumor y con frecuencia se extirpa el útero, las trompas de Falopio y ambos ovarios (histerectomía con una salpingooforectomía bilateral). El tratamiento después de la cirugía depende de la manera en que las células cancerosas aparecen en el laboratorio (llamado *grado del tumor*)[30]. Para diagnosticar en qué grado se encuentran las pacientes se compara con microscopia que tan parecidas es la histología de las células cancerígenas con las células sanas. A su vez también se observa la estructura del tejido tumoral, si está bien definido o no, si presenta morfología normal o patológica etc.

- Grado I (Bajo grado): la mayoría de las mujeres no necesita ningún tratamiento después de la cirugía.
- Grado II (Alto grado): las pacientes o bien son sometidas a un riguroso control después de la operación, pero sin recibir tratamiento, o bien son tratadas con quimioterapia. El tratamiento de quimioterapia más frecuente es la combinación de carboplatino y paclitaxel (Taxol) con 3 a 6 ciclos, aunque el cisplatino se puede usar en lugar del carboplatino, y el docetaxel (Taxotere) se puede usar en lugar del paclitaxel.
- Grado III: Suelen recibir el mismo tratamiento que será explicado para las pacientes de grado II A y B.

Cánceres etapa II: de la misma forma que los de etapa I, el tratamiento comienza con una cirugía para extirpar el tumor y determinar el grado de diseminación exacto. El tratamiento posterior consistirá en al menos 6 ciclos de la combinación de carboplatino y paclitaxel. Aunque algunas pacientes pueden ser tratadas con quimioterapia intraperitoneal (IP) en lugar de quimioterapia intravenosa (IV).

Cánceres etapa III: generalmente es similar al tratamiento para los cánceres en etapa II. De la misma forma que las otras etapas, en primer lugar, se realiza una cirugía para reducir y clasificar el tumor. Se extirpan las trompas de Falopio, el útero, ambos ovarios y el epiplón. El objetivo de la cirugía es eliminar tanto tumor como sea posible, que no quede cáncer visible que mida más de 1 cm. Si es necesario debido a que el

tumor ha metastatizado a otros órganos, como puede ser el caso del intestino, es necesario remover esa zona del mismo. Si sucede lo mismo en otros órganos, como la vejiga o el hígado, también hay que extraer todo lo que sea posible.

Una vez que la paciente se ha recuperado de la cirugía, se vuelve a utilizar una combinación de carboplatino y Taxol intravenoso, durante al menos 6 ciclos. Otra opción es la de administrar quimioterapia intraabdominal junto a la intravenosa, aunque esto solo es una opción si se ha conseguido disminuir notablemente el tamaño del tumor. Pacientes de estos estadios, dependiendo del caso particular, también pueden llegar a recibir tratamientos antiangiogénicos como bevacizumab (avastin). Durante el tratamiento también se realiza un seguimiento del marcador tumoral CA-125 mencionado anteriormente, además de realizarse un PET o MRI para verificar la efectividad del tratamiento.

En esta etapa III también existe la situación que la paciente no está en el estado de salud adecuado como para someterse a la cirugía citorreductora, por lo que el tratamiento inicial será la quimioterapia. Si el tratamiento da efecto y la paciente se fortalece, se procederá a la cirugía y posteriormente a más quimioterapia. Se suele administrar 3 ciclos de quimioterapia antes de la cirugía y posteriormente otros 3 ciclos después de la misma.

Es importante mencionar, que, si el cáncer parece haber remitido después del tratamiento inicial, se puede llegar a recomendar una quimioterapia adicional para algunas pacientes, esta terapia se denomina de mantenimiento. Tiene como objetivo eliminar cualquier célula cancerígena que pudiera quedar después del tratamiento, es decir, evitar la posterior recidiva del tumor. Es en este punto donde se está innovando más en la terapia, implementado medicamentos como el pazopanib, niraparib u olaparib, que serán explicados posteriormente con detenimiento.

Cánceres en etapa IV: En esta etapa el cáncer se ha propagado a lugares distantes, como pueden ser el hígado, los huesos o los pulmones. Este tipo de situación es la más difícil de curar con los tratamientos actuales.

Por esa razón, todo va enfocado no tanto a la remisión completa de la enfermedad si no a ayudar a aumentar la calidad y la esperanza de vida a las pacientes. A nivel de tratamiento esta etapa se suele asimilar a una etapa III, siguiendo el mismo procedimiento de cirugía y tratamiento. Dependiendo del caso de la misma forma que en la etapa anterior, también puede ser necesario realizar ciclos pre cirugía y post cirugía.

Si la paciente tiene la enfermedad muy avanzada se puede barajar la posibilidad de los tratamientos paliativos, que van enfocados a mejorar la calidad de vida de la paciente y no tanto a la curación de la misma. Cuando el cáncer está muy desarrollado, las pacientes suelen presentar una acumulación de líquido en el abdomen, este presenta muchas molestias a las pacientes, ya que genera dolor entre otros síntomas. Por esa razón la eliminación de este líquido mediante cirugía, permite eliminar las molestias que este genera. Otra opción es inyectar directamente bevacizumab en el abdomen, con la intención de disminuir la secreción de líquido.

4.1 Terapia convencional

Como hemos ido comentando anteriormente, el tratamiento de cáncer de ovario lleva décadas sin mejorar. El tratamiento de elección suele ser la combinación que incluye platino como principio activo (habitualmente el cisplatino o carboplatino), y otro tipo de quimioterapia que basa su principio activo en taxoles, como paclitaxel (Taxol) o docetaxel (Taxotere).

El cisplatino (CDDP) es un agente alquilante (añaden alquilos al ADN) basado en el elemento químico platino (PT). Es el precursor de los actuales tratamientos que se utilizan, como son el carboplatino y el oxaliplatino, pero su mecanismo de acción es el mismo. Fue Barnett Rosenberg el que descubrió su aplicabilidad en los años 60, observaba que esta molécula impedía el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*, haciendo que la misma aumentara en tamaño hasta 300 veces[31]. El mecanismo de acción del cisplatino consiste en insertarse en el ADN de las células cancerígenas, produciendo una unión cruzada entre dos

bases del ADN, concretamente las más comunes son las uniones 1,2-intracatenarias con bases de purinas, alterando así la mitosis celular. Este daño que produce en el ADN suele activar múltiples mecanismos de reparación, que finalmente causarán la muerte celular programada de la mayoría de células que tengan alta proliferación, entre las que se encuentran las células tumorales. Por lo tanto, el cisplatino no ataca únicamente a las células tumorales, lo hace por igual con cualquier célula proliferativa, lo que da lugar a una alta toxicidad.

Por lo que respecta al Taxol, fue descubierto en la misma época que el cisplatino, el principio activo viene del tejo del pacifico (*Taxus brevifolia*). Se comercializa bajo el nombre de paclitaxel, su mecanismo de acción es diferente del cisplatino, ya que el Taxol ataca el citoesqueleto celular, concretamente la tubulina. Este se une a la subunidad beta de la tubulina promoviendo así la estabilización de los mismos e impidiendo la despolimerización de los microtubulos. Los cromosomas, por lo tanto, no podrán alcanzar la metafase, bloqueando así la mitosis y haciendo que la célula entre en apoptosis o bien revertiendo la mitosis a fase G, donde no tendrá lugar la división[32].

5. Quimioresistencia

En primer lugar, es importante explicar dos conceptos a la hora de entender la quimioresistencia en el cáncer de ovario, estos son: la resistencia adquirida y la innata.

La primera vez que la paciente recibe el tratamiento, las células cancerígenas expuestas a esa dosis pueden terminar en dos situaciones finales, o bien la célula entra en muerte celular o bien sobrevive. El hecho de que unas sobrevivan y otras perezcan depende de múltiples factores, el conjunto de factores que hace que una célula ante la misma situación sobreviva y otra no, será denominado **quimioresistencia innata**. Existen múltiples factores para que una célula tenga esa resistencia innata a sobrevivir a una dosis determinada, que a otra célula puede producirle la muerte celular. Por poner algunos ejemplos,

una célula que tiene más bombas de expulsión de drogas, o bien tiene un pH intracelular determinado o un metabolismo determinado que le permite sobrellevar mejor la situación.

Una vez la paciente va recibiendo la quimioterapia, las células que no hayan entrado en muerte celular, irán padeciendo cambios, irán adaptándose a "convivir" con el tratamiento. Este proceso que lleva desde que la paciente recibe el tratamiento hasta que deja de recibirlo, produce una serie de adaptaciones, que llevan a la **quimioresistencia adquirida**. Es decir, el hecho de someter a una presión selectiva a estas células, hace que se desarrolle un proceso "evolutivo" que desencadena en la supremacía de las células que vayan desarrollando la característica que les permita proliferar más rápido bajo estas condiciones. Un ejemplo podría ser una modulación negativa de la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis, haciendo que estas células no entren en apoptosis en condiciones que deberían hacerlo.

En este contexto, Alrededor del 60-80% de pacientes con cáncer de ovario epitelial avanzado responden a la combinación mencionada de platino con taxoles hasta conseguir una remisión clínica[33]. Desgraciadamente alrededor del 20-30% de pacientes tienen tumores que son resistentes innatos (denominados refractarios) al tratamiento, por lo que continuarán la progresión de la enfermedad pese a estar siendo tratadas con la quimioterapia. Hay que destacar que en el tratamiento actual si bien es efectivo inicialmente ya que consigue reducir significativamente el volumen tumoral, también produce un elevado número de pacientes que padecen quimioresistencia al cabo de los años, se estima exactamente que alrededor del 85% de las pacientes que han tenido una remisión completa en el primer tratamiento acabe desarrollando una recidiva tumoral[34].

Para los pacientes en que la cirugía ha funcionado y tienen poca enfermedad residual (tumores reducidos a menos de 1 cm de diámetro) el riesgo de recurrencia se estima alrededor del 60% al 70%. Pacientes con más enfermedad residual sube hasta el 80% de riesgo de que la enfermedad vuelva a aparecer[35].

Debido a que la mayoría de pacientes son diagnosticadas cuando la enfermad está en estado avanzado, haciendo que haya un alto porcentaje de pacientes que padecen recurrencia, unido a su vez, que una gran parte acaba haciéndose resistente al tratamiento inicial, hace que el cáncer de ovario avanzado tenga una supervivencia en 5 años de solo el 29%[36]. Por lo tanto, queda patente que la supervivencia en las pacientes no ha sido mejorada en los 20 años pasados, urge pues intentar implementar mejoras en los tratamientos con la finalidad de mejorar la esperanza de vida de las pacientes.

5.1 Mecanismos de quimioresistencia principales

A continuación, se desglosará los principales mecanismos de resistencia descritos actualmente, divididos en su mecanismo de acción.

5.1.1 Bombas de exportación de drogas

En primer lugar, comentaremos uno de los mecanismos de resistencia más genéricos en el cáncer, ya que son múltiples los tipos de cáncer que consiguen resistir al tratamiento, simplemente bombeando la droga fuera del citoplasma celular (utilizando bombas de exportación) y haciendo que no pueda realizar su función. Se ha descrito que células que tienen niveles más elevados de ATP7A/ATP7B, ambas ATPasas transportadoras de cobre, consiguen resistir más al cisplatino. En las líneas celulares que tienen elevada su expresión se ha demostrado que el flujo de CDDP que es capaz de penetrar en la célula es significativamente menor (40% vs 65% en las sensibles)[37–39]. En esta situación tenemos ambos tipos de quimioresistencia, por un lado, las células que de forma basal tengan más bombas de exportación, conseguirán sobrevivir al tratamiento (Resistencia Innata). Pero a su vez, es posible que la toxicidad del propio tratamiento, inicie patrones de expresión que desencadenen un aumento de la expresión de dichas bombas (resistencia adquirida). La combinación de ambas situaciones

terminará en un conjunto de células que, debido a una presión selectiva, terminan teniendo niveles elevados de estas bombas de exportación, haciendo que la quimioterapia no consiga entrar o estar el tiempo suficiente dentro de la célula y por lo tanto no consiga eliminarla. Estas células debido a ese incremento de bombas, también tendrán un incremento de la demanda energética para mantenerlas activas, ya que toda adaptación tiene su correspondiente reajuste metabólico. Existen diversas proteínas con una finalidad similar, como es el caso de la glicoproteína P, que también ha sido ampliamente descrita su sobreexpresión en tumores resistentes al platino[40,41].

Como era de esperar, se generaron fármacos que intentaban inhibir estas proteínas que expulsaban el tratamiento fuera de las células. Los fármacos de primera y segunda generación como son el verapamil o el VX-710 fallaron por su baja especificidad, baja potencia y alta toxicidad al ser combinados con platino y Taxol[42,43]. Actualmente se han desarrollado fármacos denominados de "tercera generación" como es el caso del Tariquidar (XR9576), un prometedor inhibidor de las glicoproteínas P que está mostrando mayor potencia y menor toxicidad al ser combinado con taxanos[44]. Se ha realizado algún experimento ex vivo utilizando biopsias de pacientes, en los que la combinación de tariquidar con los tratamientos estándar, mejora la eficiencia de los mismos en tumores resistentes[45].

5.1.2 Vías de señalización

Cuando una célula tumoral recibe el tratamiento, es de esperar que esta inicie los procesos necesarios para intentar no entrar en muerte celular. La comunicación celular juega un papel fundamental en esta situación, hay multitud de vías de comunicación descritas en la quimioresistencia, a continuación, se van a describir las principales.

5.1.2.1 Vía PI3K/AKT

Si no es la vía de señalización más descrita debe de ser una de las que más se ha descrito sobre todo en el cáncer de ovario, ya que suele tener mutaciones o hiperactivaciones en los diferentes tipos de cáncer de ovario[46,47]. Utilizando la información que nos proporcionan los bancos de tumores se estima que alrededor de más del 40% de los cánceres de ovario tienen alteraciones en esta vía[48]. Estas alteraciones juegan un papel fundamental en la tumorogénesis del cáncer de ovario, pero también en la quimioresistencia del mismo. PI3K es una quinasa, (proteínas que fosforilan), localizada en la membrana celular, estimulada por múltiples factores de crecimiento y factores reguladores, siendo la responsable de la fosforilación de PIP2 a PIP3. Una vez fosforilado, PIP3 puede activar múltiples dianas como pueden ser AKT o PDK1, ambas quinasas que están involucradas en la síntesis protéica y la proliferación celular. Estas proteínas y sus diferentes isoformas (Akt1-2-3) también se ha descrito que juegan un papel importante en la quimioresistencia en cáncer de ovario, aumentando la resistencia a platino y taxanos[49,50]. Por ejemplo, un aumento de la expresión de AKT2 esta correlacionado con un aumento de la resistencia a cisplatino[51]. Otra proteína de vital importancia en esta vía es PTEN, ésta desfosforila la PIP3 a PIP2, también se encuentra ampliamente alterada en el cáncer de ovario, jugando un papel clave en la quimioresistencia, ya que una bajada en la expresión de PTEN se asocia a una mayor resistencia al tratamiento.[52–54]

Considerando la importancia que tiene la vía de PI3K y AKT tanto en el desarrollo del tumor como en la posterior quimioresistencia, era lógico esperar que se hayan desarrollado fármacos que intenten inhibir esta vía. La primera generación de inhibidores de PI3K como son el LY294002 y Wortmannin demostraron que conseguían sensibilizar a las células de ovario resistentes a cisplatino[55]. Debido a sus malas propiedades farmacocinéticas, se desarrollaron una segunda generación de inhibidores, más selectivos y con mejor farmacocinética,

inhibidores como buparlisib o pilarisib, que están siendo probados actualmente en estudios de fase Ib[56].

5.1.2.2 Vía MAPK

Otra vía de señalización implicada directamente en la supervivencia es la de las MAP quinasas. Esta vía consiste en una serie de proteínas en cascada, que van siendo fosforiladas de forma escalonada entre ellas, para finalmente activar varias vías de proliferación, síntesis protéica o vías de supervivencia celular.

Existen multitud de factores que terminan desencadenando la activación de esta vía, factores de crecimiento, de supervivencia, factores que activan receptores tirosina quinasa… Por esta razón la vía MAPK se considera clave en la regulación de la homeostasis celular, ya que es una vía integrativa de diferentes señales que terminan convergiendo en ella. Existen diferentes cascadas MAPK, siendo los más importantes las que activan a ERK1/ERK2, JNK/SAPK y p38[57]. La vía tradicional promitogénica es la cascada, en que RAS activa a RAF que a su vez activa a MEK y esta a ERK1/ERK2 y así hasta que finalmente se promueve la división o la supervivencia celular.

Como era de esperar, determinados tratamientos contra el cáncer activan esta vía, produciendo un incremento en la fosforilación de ERK1/ERK2, esta activación puede desequilibrar el balance entre apoptosis o supervivencia celular promoviendo así la supervivencia de las células tumorales[58]. Se ha descrito que el cisplatino aumenta la actividad de ERK1/ERK2 dando la posibilidad a las células de promover la fase S y por lo tanto seguir dividiéndose pese al tratamiento[59]. Por lo que se han diseñado fármacos contra la cascada de MAPK ERK1/ERK2, es el caso del trametinib o el buparlisib, estos fármacos producen una inhibición de la vía MAPK, pero paradójicamente esta inhibición produce un aumento de la vía de PI3K/AKT[60] que en parte puede terminar compensando la inhibición.

5.1.3 Mecanismos de reparación del ADN

Existen muchas evidencias que una de las formas en las que el tumor se hace resistente a la quimioterapia, que basa su toxicidad dañando el ADN, es aumentando sus mecanismos de reparación del mismo[61,62]. Cuando sólo una de las dos cadenas de la doble hélice tiene un defecto, la otra puede ser utilizada como molde para dirigir la corrección de la cadena dañada[63]. A continuación, voy a describir los principales tipos de mecanismos de reparación en esta situación:

5.1.3.1 Proceso de reparación por escisión de nucleótidos (NER)

Uno de los mecanismos que utiliza la célula cancerígena para reparar los aductos que forma el platino es el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER)[61,64]. Este proceso implica varias proteínas que lo que hacen es eliminar y reemplazar secuencias de nucleótidos en la cadena del ADN. Proteínas como ERCC1, que juntamente con XPF forman complejos endonucleasa, capaces de cortar el ADN en el lugar dañado. Se ha correlacionado su expresión con el grado de resistencia a compuestos de platino[65,66]. Se han desarrollado pequeñas moléculas para inhibirla como el fármaco XPA-ERCC, que pese a que no tiene una actividad enzimática conocida y ser por lo tanto un candidato complicado a un fármaco, sí que se ha demostrado que si se consigue inactivar aumenta la sensibilidad a platino[67].

5.1.3.2 Reparación de desajuste (mismatch repair MMR)

Otro mecanismo de reparación es el de desajuste conocido en inglés como MMR, este reconoce un desorden o un desaparejamiento de una base del ADN, reparándolo y volviéndolo a ensamblar de forma correcta[65]. Cuando los compuestos de platino llegan al núcleo y forman los aductos, la célula no realizar el proceso de reparación de desajuste llevando a la célula a entrar en apoptosis[65]. En este caso los mecanismos de adaptación que se han encontrado son una pérdida de expresión del gen MLH1, gen que regula proteínas de este mecanismo.

Con esta pérdida de expresión, las células pueden continuar proliferando pese a la presencia de estos fallos, incluso bajo el tratamiento de platino, ya que al tener baja actividad de este tipo de reparación no pueden entrar en apoptosis[6,68]. Existe controversia sobre el papel de los mecanismos de MMR, ya que también se han reportado estudios que afirman que no hay correlación entre una deficiencia de estos mecanismos y la resistencia a platino[69,70]. Esto sugiere que hay un limitado número de estudios, siendo necesarios más para poder determinar concretamente el papel de estos mecanismos de reparación en la quimioresistencia en el cáncer de ovario.

6. La recombinación homóloga

La recombinación homóloga es un tipo de recombinación genética en la que se intercambian secuencias de nucleótidos entre dos moléculas similares o idénticas de ADN. Durante la meiosis utilizando la recombinación homóloga se producen nuevas combinaciones de secuencias, aumentando así la variabilidad genética y siendo uno de los mecanismos evolutivos mediante los cuales las especies evolucionan. También las bacterias y virus utilizan esta recombinación para intercambiar material genético. A pesar de que la recombinación homóloga varía ampliamente entre los diferentes organismos y tipos de células, la mayoría de las especies comparten unas etapas básicas[71].

Una vez que se ha producido una rotura en la doble cadena, las cadenas de ADN en torno a los extremos 5' de la ruptura se seccionan, este proceso es llamado resección, todos los pasos están representados en la figura 2. En el lugar de la rotura se abre una burbuja abriendo las hebras de ADN de las hebras homólogas sanas, permitiendo el acceso al resto de proteínas que intervienen en el proceso. El siguiente paso se denomina invasión de hebra, un extremo saliente del 3' de una de las cadenas rotas "invade" su cadena homóloga sana, el proceso puede continuar de dos formas, las vías DSBR (*DNA double-strand break repair*) o la vía SDSA (*Synthesis-dependent strand annealing*)[71].

En la vía DSBR el segundo saliente 3’ que no participó en la invasión, también lo hace formando una unión de Holliday con el cromosoma homólogo, es decir una estructura de ADN ramificado que contiene cuatro brazos bicatenarios unidos. Comienza la síntesis del ADN empleando como molde esta región homóloga, la cadena invasora es liberada y se liga con el otro extremo de la rotura, resultando en la formación de una molécula unida a través de dos uniones Holliday. Es entonces cuando se produce una torsión de las hebras y un corte de las mismas, generando dos posibilidades en función de cómo se produzca el corte. Si una unión Holliday se corta en la hebra del cruce y la otra unión se corta en la hebra sin cruce se producirá un entrecruzamiento cromosómico. En cambio, si las dos uniones Holliday se cortan en las hebras de cruce los cromosomas no estarán entrecruzados.

De la misma forma que en el modelo anterior, en la vía SDSA la reparación es iniciada por una digestión del extremo 5’ formando una larga cola de ADN de cadena sencilla 3’, que a su vez también invade el dúplex homologo y ceba la síntesis de ADN. La nueva síntesis de la terminación 3' de la hebra invasora es entonces capaz de hibridar con el otro saliente 3' en el cromosoma dañado a través de un apareamiento de bases complementarias. Finalmente, la vía SDSA termina con el resellado, también conocida como ligadura, de cualquier hueco de las hebras restantes. A diferencia del modelo DSBR, el ADN sintetizado se realinea con la otra parte de la rotura, reparando así la misma y reduciendo de esta forma la formación de uniones de Holliday y por lo tanto sobrecruzamientos. Aun así, la vía SDSA puede producir recombinantes no entrecruzados.

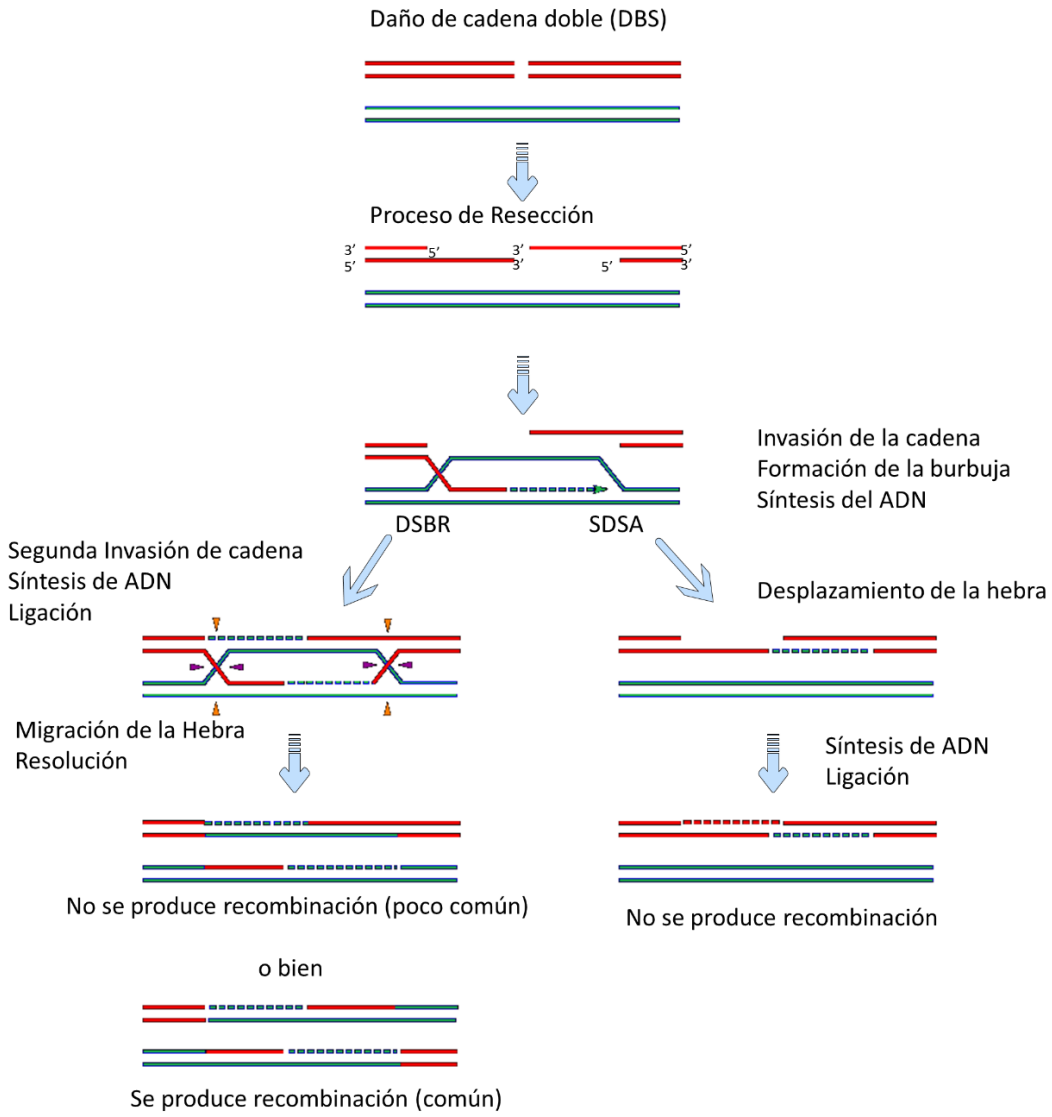


Figura 2. Comparación de las vías DSBR y SDSA, como se puede apreciar ambas tienen unos pasos iniciales comunes que terminan divergiendo. La vía DSBR suele ser en la que se produce más frecuentemente el entrecruzamiento cromosomal. Por otro lado, la vía SDSA (derecha) nunca termina en entrecruzamientos.

6.1 Mecanismos de reparación Homóloga (BRCA1/BRCA2)

Situaciones en las que ambas cadenas de la doble hélice quedan rotas (Double strand break (DSB)) son de alto riesgo para la célula, ya que pueden provocar graves problemas en el genoma. Esto es debido a que ninguna cadena puede servir como plantilla para la reparación, haciendo que la célula muera en la siguiente mitosis o incluso que sobreviva con mutaciones. En la célula cancerígena estas mutaciones pueden ser una ventaja, aumentando así su malignidad, promoviendo la proliferación celular o adquiriendo la capacidad de invadir nuevos tejidos. Se ha descrito que multitud de células cancerígenas muestran anormalidades genómicas debido a la reparación aberrante de estas roturas de doble cadena[72].

Esta situación puede ser reparada mediante dos mecanismos: Recombinación homóloga (homologous recombination (HR) o bien puede ser reparados mediante recombinación no homóloga (cuya siglas en inglés son NHEJ o Non-homologous ADN end joining)[73]. Cada una de estas vías requiere mecanismos específicos de reparación produciendo diferentes reparaciones. Entre ambos mecanismos, el que suele reparar de una forma más precisa el fallo es la recombinación homóloga. Mientras que el mecanismo de reparación no homóloga suele tener mayor potencial de fallos y por lo tanto de mutaciones, aumentando así la malignidad del tumor.

Se ha descrito que los sistemas de NHEJ son los primeros que suelen actuar ante una rotura de doble cadena[74,75], probablemente debido a que sean mucho más rápidos que los de HR[75]. Cuando células que se encuentran en división son ionizadas, para aumentar así los DBs, se ha estimado que alrededor del 80% de los fallos producidos por la ionización son reparados por este mecanismo[74]. Si se da la situación que este mecanismo no consigue reparar el fallo, elimina una de las cadenas dañadas, generando así una única cadena y produciendo así un fallo en cadena único permitiendo que otro mecanismo de reparación lo intente reparar[72]. Es por ello que la recombinación homóloga es una herramienta de reparación que solo sería considerada en unas

situaciones específicas o bien cuando ha fallado la reparación no homologa[76].

Uno de los factores que condiciona qué mecanismo será utilizado para reparar el DBS, es como ha quedado la rotura, es decir su nivel de complejidad para llevar a cabo la reparación. Por ejemplo, la irradiación de células provoca roturas de DBs más complejas y no pueden ser reparadas por los mecanismos no homólogos, es en esa situación cuando el mecanismo más utilizado es el de HR[77,78]. En cambio si se realiza un corte sencillo mediante una nucleasas la célula utiliza principalmente mecanismos de reparación no homologos[76]. Eso demuestra que el grado de complejidad del daño, termina condicionando qué mecanismo será el que lo repare.

Otro factor determinante a parte del tipo de daño, será el tipo celular y la frecuencia y la fase en el ciclo celular de la misma. Por ejemplo, la reparación homóloga es más frecuente en células madre, mientras que la no homóloga se utiliza más en células diferenciadas[79]. También se han realizado estudios para medir en qué proporción se utiliza cada mecanismo de reparación, dependiendo de la fase celular en que se encuentre. Durante la fase S el mecanismo HR es el que alcanza su actividad máxima, mientras que el NHEJ es el predominante en la fase G1 y G2[80]. Sin embargo ese mismo mecanismo se reprime durante la mitosis[81]. Que se utilice un tipo de reparación u otro ya sea en un tipo celular, o en una fase del ciclo celular u otra, está determinado por múltiples proteínas que regulan ambas maquinarias de reparación dependiendo de la situación en concreto.

6.2 BRCA1/2

BRCA1 y BRCA2 son considerados genes supresores de tumores, ya que desempeñan un papel fundamental en la respuesta al estrés celular mediante la activación de procesos de reparación del ADN[82,83]. Como ya hemos descrito anteriormente, mutaciones en ambos genes predisponen a las pacientes a desarrollar cáncer de mama y de ovario[84].

Ha sido descrito que mutantes en BRCA1 tienen disfunciones en los telómeros, translocación de cromosomas y aberraciones en las cromátidas[85]. En cambio mutantes en BRCA2 acumulaban roturas y acumulaciones de cromátidas y aberraciones en los intercambios de las mismas[86].

Aunque también se ha descrito su implicación en otros órganos diferentes a la mama o el ovario, estando involucrados en procesos como la remodelación de la cromatina, la regulación del ciclo celular, el control transcripcional o por supuesto los mecanismo de reparación[87]. También se ha descrito la participación de ambos genes en enfermedades como la Anemia de Fanconi, una rara enfermedad hereditaria causada por defectos en las proteínas de reparación y caracterizada por la inestabilidad genómica, implicando un aumento en el riesgo de cáncer[88]. Está ampliamente descrito como BRCA1/2 tienen una implicación directa en el control del ciclo celular y la reparación del ADN, pero todavía se desconoce el porqué del desarrollo especifico de la tumorogénesis en mama y ovario[89].

Pese a que BRCA1 y BRCA2 tienen algunas funciones diferentes, también comparten más de una interacción protéica y función. De hecho está descrito que ambas proteínas interactúan físicamente, ya que existe una proteína PALB2 que se une directamente a BRCA1 y BRCA2[90]. Esta interacción es necesaria para que RAD51 se pueda unir al ADN dañado y realizar su función como se explicará posteriormente[91], en cambio no es necesario para que BRCA1 realice su función de la regulación de la fase S[92]. Por lo tanto, una depleción de PALB2 termina con un fenotipo de depleción de BRCA2, ya que no es posible que RAD51 realice su función y por lo tanto la depleción de PALB2 desencadena problemas en la reparación por recombinación homóloga. Esta proteína es un ejemplo de los múltiples factores que interactuarán y regularan la actividad de ambas proteínas, que en determinados escenarios son proteínas complementarias que desarrollan una función similar o como es el caso de BRCA1, que puede actuar con independencia en otras de sus funciones.

En la reparación HR mediada por BRCA1/2, BRCA1 está regulando a su vez la de BRCA2, condicionando por lo tanto su actividad a BRCA1. Además, hay que destacar que en mamíferos también se puede producir reparación HR mediante un mecanismo alternativo a BRCA1/2. Cuando la función de BRCA2 es suprimida en una célula tumoral, se ha descrito que RAD52 puede ayudar a la célula a mantener su viabilidad. De hecho, las células que son deleccionadas simultáneamente de RAD52 y BRCA2 exhiben letalidad sintética[93]. Estos resultados suportan la hipótesis que BRCA1 y BRCA2 están interconectados en la reparación homóloga para reparar las roturas de doble cadena.

Por otro lado, el papel de BRCA1 en la reparación y en el cáncer de ovario ha sido ampliamente descrito en múltiples artículos, pero el objeto principal de esta tesis doctoral ha sido BRCA2 por lo que a continuación será principalmente explicado BRCA2, sus diferencias y su papel en los mecanismos de reparación.

6.2.1 BRCA2

En el año 1994 Wooster identifico el gen BRCA2[94], con 27 exones y un peso de más de 384 kDA mucho más grande que su hermano BRCA1 (220 kDA). Se localiza su expresión principalmente en el nucleo[95], aunque también se ha observado co-localizdo con BRCA1 en la región subnuclear en células somaticas[96].

La mayoría de la información sobre la estructura de BRCA2 proviene de porciones de proteínas ortólogas, como BrH2 en hongo del maíz (*U. maydis*) o bien BRC-2 en gusanos (*C.elegans)*[9797,98]. Probablemente debido a su gran tamaño, 3418 aminoácidos, ha sido muy complicado aislar y cristalizar la proteína, aunque finalmente algunos grupos lo han conseguido, aportando información clave sobre su estructura en mamíferos[99,100].

Pese a haber alguna similitud entre los exones de BRCA1 y BRCA2 no existe una secuencia homóloga entre ellos[96]. BRCA2 contiene un dominio de unión al ADN (DBD en inglés) que se puede unir tanto a los

daños de cadena única como a los daños de doble cadena. El dominio DBD contiene 5 componentes, un domino de 190 aminoácidos helicoidal, tres lugares de unión a oligonucleótidos (OB) que son lugares de unión a daños en cadena única y un dominio de torre (TD)[101]. A su vez contiene más de 8 dominios repetidos llamados BRC, considerados dominios directos de interacción con RAD51, proteína clave en los mecanismos de reparación de doble cadena[102]. Por lo que es lógico afirmar que BRCA2 media el reclutamiento y por tanto regula la actividad de la recombinasa RAD51 hacia la rotura de doble cadena que se haya producido[103]. No todos los dominios de unión a RAD51 tienen la misma afinidad, ya que pequeños cambios en el dominio hacen que tenga una afinidad diferente. Se han observado mutaciones en estos dominios de unión a RAD51 en pacientes que desarrollan cáncer hereditario de mama y ovario[104].

Queda claro que la principal función de BRCA2 es facilitar que se produzca la reparación homologa. Las células que sean deficientes en BRCA2 tendrán problemas para reclutar RAD51 a los daños de doble cadena y por lo tanto tendrán dificultades para reparar su ADN mediante HR[105]. Existen también artículos que afirman que una función secundaria de BRCA2 es la de proteger la horquilla de replicación. Ya que en mutantes de BRCA2, al añadir hidroxiurea (produce el bloqueo de las horquillas de replicación), se observan defectos en el mantenimiento de la longitud de la misma. Pero pese a que las células que tienen mutaciones que producen perdida de función en BRCA2 presentan problemas en la replicación, BRCA2 es no esencial para estos procesos[106]. Pese a ello la mayoría de las mutaciones homocigóticas son letales embrionarias, aunque las mutaciones heterocigotas no tienen un fenotipo fuerte[107]. Esto es probablemente debido a que los embriones de ratón con mutaciones homocigotas para BRCA2 son hipersensibles a la radiación ionizante y tienen aberraciones cromosómicas y cromátidas generalizadas. El fenotipo de estos embriones mutados es idéntico al de ratones con mutaciones inactivadoras de RAD51, lo cual es evidente, ya que sin un BRCA2, RAD51 no puede funcionar correctamente[108].

6.2.2 P53 y BRCA

P53 juega un papel crucial en el mantenimiento de la integridad del material genético, regulando la transcripción de infinidad de proteínas que están involucradas desde el arresto del ciclo celular a la reparación del ADN o la apoptosis[109]. Múltiples estudios sugieren que la pérdida de p53 coopera en la tumorogénesis de alguna forma con la perdida de BRCA1 o BRCA2[110,111]. Además, ya se ha descrito que la mayoría de pacientes en cáncer de ovario tienen mutado p53 y alrededor del 30 al 50% del total de todos los cánceres tienen mutado p53, correlacionando más en los tumores que tienen también mutado BRCA1/2[112]. En cáncer de ovario alrededor del 70% de todas las pacientes tienen p53 mutado y concretamente en el cáncer de ovario seroso de alto grado más del 90% de las pacientes tienen mutado p53[113].La delección de p53 en embriones BRCA1 o BRCA2 mutados es letal, como era de esperar en embriones PALB negativos también se produce esta situación[114].

La rotura de cromosomas causada por la pérdida de la función de BRCA, activa p53 que a su vez activa los procesos apoptóticos, impidiendo por lo tanto la proliferación de una célula potencialmente cancerígena. Por lo tanto, es de esperar que la presión selectiva desemboque en que las células tumorales que tengan BRCA mutado también tengan p53 inactivado, ya que sin esta situación no es posible el desarrollo de estas células tumorales. Hay varios estudios que dan validez a esta hipótesis, ya que en células T que son deficientes de BRCA2, se ven aumentadas las aberraciones cromosómicas, aumentando la apoptosis mediada por p53[115]. A su vez, las células que son BRCA negativas tienen un ambiente genético más propicio para que se termine mutando p53, dando por lo tanto una célula que sea viable para el progreso tumoral.

Terapia dirigida a pacientes BRCA mutados.

La situación genética de las pacientes con mutaciones en BRCA les genera una vulnerabilidad particular, ya que al tener problemas en los mecanismos de reparación homóloga son más susceptibles a tratamientos que provoquen daño en el ADN como es el caso del cisplatino o el Taxol. Esta ampliamente descrito que los tumores con mutaciones en BRCA2 son particularmente sensibles al tratamiento con platino. Pero pese a ello, este tipo de tumores también termina desarrollando resistencia al platino[105]. Además, esta carencia en este mecanismo de reparación genera una necesidad de otros mecanismos, esta vulnerabilidad fue explotada con los fármacos que salieron hace relativamente poco, los inhibidores de PARP.

El papel principal de la familia de proteínas PARP es la detección y señalización de roturas en el ADN, paso esencial para que se reclute la maquinaria de reparación y el ADN pueda ser reparado. Una vez que detecta un daño en el ADN, ya sea mono o bicatenario, PARP se une al ADN y mediante un cambio estructural se activa su actividad enzimática de poliADP ribosilación. Este proceso consiste en la adición de una o más ADP ribosas a una proteína, es un proceso reversible y entre sus funciones se encuentra el reclutamiento de otras enzimas de reparación como la ligasa III, que junto a otras proteínas procederán a la reparación del ADN. Una vez realizada la reparación, las cadenas PAR son degradadas mediante la ribosa glycohydrolasa (PARG)[116].

En 2005 se publicaron 2 artículos que demostraban que la ausencia de BRCA1 o BRCA2 aumentaba la sensibilidad de las células tumorales a inhibidores de PARP1[117,118]. En la actualidad la FDA ha aprobado múltiples drogas para el tratamiento del cáncer de ovario, como son el Rucaparib, Olaparib, Talozoparib todas ellas inhibidores de PARP.

El más utilizado es Olaparib, su uso está aprobado para cáncer de ovario, mama o trompas de Falopio, para pacientes con mutaciones en BRCA1/2 y para pacientes que presenten enfermedad avanzada resistente a otros tratamientos[119].

Existen varios mecanismos por los cuales estos fármacos son especialmente eficaces en células con mutaciones en BRCA1/2. La visión clásica es que estos inhibidores matan a través de mecanismos de letalidad sintética, es decir, cuando una combinación de deficiencias en la expresión de dos o más genes conduce a la muerte celular, en este caso, mecanismo de reparación al ADN. Acorde con este modelo cuando lo inhibidores de PARP bloquean los mecanismos de reparación por escisión, el daño en cadena única termina convirtiéndose en uno de doble cadena. Teniendo en cuenta que estas células también tienen BRCA1/2 mutado también les será imposible reparar esta rotura de doble cadena, por lo que finalmente la célula morirá[117]. Otro mecanismo tiene que ver en como los inhibidores de PARP actúan, se cree que estos se unen a PARP1 e impiden que este se despegue del ADN, por lo que para ser eliminado se tendrá que utilizar mecanismos de reparación de doble cadena, siendo estos deficientes en células con mutaciones en BRCA1/2[120].

Es importante destacar que para que PARP pueda funcionar necesita combustible, este no es otro que la nicotinamida adenina dinucleotido (NAD^+), es el substrato necesario para poder formar los monómeros de ADP-ribosa. Una sobreactivación de PARP llevará a la célula a agotar los depósitos de NAD^+, generando una situación metabólica peculiar, en la que hay una necesidad imperiosa de generar NAD^+. Para poder entender estos posibles cambios adaptativos que serán expuestos en esta tesis, se procede a explicar a grandes rasgos las principales vías metabólicas de la célula que se verán implicadas en esta adaptación descrita en esta tesis.

7. Metabolismo

Se entiende por metabolismo al conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en las células con objetivo de transformar determinados substratos en energía y otros metabolitos necesarios para la viabilidad celular. A grandes rasgos el metabolismo se puede dividir en dos procesos, catabolismo y anabolismo. El primer proceso consiste en la degradación de compuestos para la obtención de energía, esta energía se obtiene a través de la energía potencial que se libera con la rotura de los enlaces químicos. Por otro lado, las reacciones anabólicas utilizan esa energía liberada para recomponer los enlaces químicos y construir nuevos componentes para la célula. Ambos procesos pese a ser opuestos están totalmente acoplados entre ellos, siendo dependientes uno de otro y mediante los cuales la célula consigue realizar todas sus funciones.

Dentro del catabolismo celular también se pueden dividir las reacciones en función de que substratos consumen, por ejemplo, si las reacciones catabólicas consumen oxígeno serán agrupadas dentro del metabolismo oxidativo, por otro lado, si el oxígeno no es consumido serán catalogadas como reacciones no oxidativas. También se pueden clasificar en función de que compuesto es degradado inicialmente, carbohidratos, lípidos, aminoácidos…

7.1 Glucólisis

La glucólisis es el proceso metabólico que se encarga de degradar la glucosa para obtener energía. Consta de 10 reacciones enzimáticas consecutivas que terminan convirtiendo la glucosa en dos moléculas de piruvato, que a su vez puede ser metabolizado de diferentes formas para seguir suministrando energía a la célula. Es importante remarcar

que la glucólisis puede realizarse en presencia o en ausencia de oxígeno, ya que en esta reacción no se consume oxígeno, por lo tanto la glucólisis se considera un proceso anaeróbico[121] . En cambio, la glucólisis no puede producirse sin NAD^+, ya que es el aceptor de electrones, por lo que será vital para poder realizar la glucólisis mantener los niveles de NAD^+.

El rendimiento neto de la glucólisis es de dos moléculas de ATP, nucleótido fundamental en el metabolismo celular, y dos moléculas de NADH. El NADH es una coenzima formada por dos nucleótidos, encargada de ser un intercambiador de protones y electrones. Este puede tener diferentes funciones, como, por ejemplo, utilizarse como poder reductor en reacciones anabólicas. Por otro lado, si existe oxígeno, puede ser utilizado para generar el potencial de membrana necesario en la cadena respiratoria o bien si no hay oxigeno se utiliza para la fermentación láctica, es decir, reducir el piruvato a lactato y regenerar así NAD^+. Si la célula necesita una rápida obtención de energía y dispone de los sustratos necesarios, siempre recurrirá a la glucólisis ya que es la vía más rápida de obtención de energía[121]. Generalmente se separa en dos fases, una primera fase en la que se gasta energía y una segunda fase en la que se obtiene energía.

La primera fase a grandes rasgos consiste en transformar la molécula de glucosa en dos moléculas de gliceraldehído 3 fosfato, utilizando dos moléculas de ATP.

El primer paso es internalizar la glucosa que se encuentra en el espacio extracelular. Para ello la célula cuenta con múltiples transportadores de glucosa, los más importantes son los transportadores GLUT, estos se encargan de facilitar el transporte de la glucosa al interior de las células a favor de gradiente. Dentro de esta familia uno de los más descritos por su importancia es GLUT1. Se ha descrito que los niveles de expresión de GLUT1 en las membranas celulares se incrementan en respuesta a concentraciones bajas de glucosa en el plasma, y por el contrario disminuyen con el incremento en la glucemia[122].El siguiente paso tiene lugar mediante una hexoquinasa, es la encargada de fosforilar la glucosa para transformarla en glucosa 6 fosfato.

Posteriormente en este paso, la glucosa-6-fosfato se isomeriza a fructosa-6-fosfato, mediante la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa. Luego se volverá a añadir otro grupo fosfato, mediante la fosfofructoquinasa-1 (PFK1), se pasará de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato. Es importante desatacar que tanto ésta como la primera reacción son irreversibles, ya que conllevan gasto energético para realizarse, por lo que no se puede volver atrás sin gastar energía. Por lo tanto, esta enzima es considerada un *checkpoint*, es decir, está altamente regulada a muchos niveles, mediante niveles de sustratos, concentraciones de otros reguladores alostéricos, fosforilaciones… Es entonces cuando una aldolasa mediante una condensación alcohólica reversible, rompe esta fructosa 1-6-bifosfato en dos moléculas: dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehido-3-fosfato.

La dihidroxiacetona fosfato será isomerizada también para transformar la molécula en otra de gliceraldehido-3-fosfato. Con este último paso se termina la primera fase de gasto energético, con dos moléculas de gliceraldehído que serán transformadas en la siguiente fase, la fase de producción energética.

En esta fase de producción energética, serán transformadas estas dos moléculas de gliceraldehido-3-fosfato a dos moléculas de piruvato y 4 ATPs. Por lo que en ésta se genera de forma neta 2 ATPs de energía. A su vez se reducirán dos moléculas de NAD^+ transformándolas en NADH que serán utilizados principalmente en la cadena respiratoria. Es importante remarcar, que la glucólisis está "consumiendo" NAD^+ que puede ser necesario para otras funciones como se ha descrito anteriormente, ser utilizado como combustible para la enzima reparadora PARP1, más adelante se verá la posible implicación del metabolismo en la capacidad de funcionamiento de esta molécula[121].

El primer paso de esta fase de producción energética de la glucólisis es oxidar la molécula de gliceraldehido-3-fosfato reduciendo una molécula de NAD^+ en NADH, transformado el gliceraldehído en 1,3-Bisfosfoglicerato. El siguiente paso es el primero en el que la fosfogliceratoquinasa fosforilará una molécula de ADP,

transformándola así en una de ATP. En este paso la molécula 1,3-bisfosfoglicerato será transformada a 3-Fosfoglicerato, que será isomerizada por la fosfoglicerato mutasa cambiando su fosfato de lugar, transformándose en 2-Fosfoglicerato. A su vez a esta molécula mediante una enolasa se le eliminará una molécula de agua y se formará un doble enlace, obteniendo fosfoenolpiruvato y H_2O. Finalmente el último paso de la glucólisis es la generación de piruvato mediante la piruvato quinasa, obteniendo una molécula de ATP y una de piruvato, llegando así a su fin la glucólisis, este proceso como todos en los que se fosforila ATP es irreversible[121].

7.2.1 Regulación de la Glucólisis

La glucólisis en sí es un proceso muy regulado, sometido a múltiples puntos de regulación y a diferentes estímulos que terminarán condicionando el flujo metabólico. Además del momento concreto metabólico de la célula, las características de la misma condicionarán también los flujos metabólicos a largo plazo.

Una condición importante para regular el flujo de la glucólisis es la disponibilidad o no de oxígeno. En ausencia de oxígeno el flujo glucolítico se ve aumentado, ya que la vía de la cadena respiratoria se verá bloqueada, siendo necesario aumentar la glucólisis para obtener energía. El sustrato principal también condiciona el flujo evidentemente, si la célula tiene más capacidad de internalizar glucosa, aumentando los transportadores GLUT1, por ejemplo, conseguirá aumentar la disponibilidad de glucosa en el interior de la célula, aumentando así la glucólisis.

Enzimáticamente la glucólisis tiene 3 puntos clave, en los que se producen reacciones irreversibles, donde los sustratos y las modificaciones post-traduccionales regularán los flujos de la glucólisis. Los tres puntos son: en la primera reacción **(G → G-6P)**, por medio de la hexoquinasa; en la tercera reacción **(F-6P → F-1,6-BP)** por medio de la PFK1 y en el último paso **(PEP → Piruvato)** por la piruvato quinasa.

El primer punto, la hexoquinasa, no está muy regulada, se inhibe por acumulación de su producto (como la mayoría de enzimas), pero la G6P suele acumularse poco en la célula, ya que puede ser utilizada por diferentes vías. Por lo tanto, en este punto no se suele producir mucha regulación.

El siguiente punto de regulación es la enzima fosfofructoquinasa-1, en este caso sí que es un punto de regulación muy importante en la glucólisis. La actividad de esta enzima condicionará el flujo de la glucólisis, si la enzima tiene una alta actividad, se producirá una elevada cantidad de piruvato y viceversa. Esta enzima principalmente está regulada de forma alostérica, por un lado, se inhibe por concentraciones abundantes de sus productos (ATP y citrato indirectamente), por otro lado, se activa cuando los sustratos son elevados (ADP y AMP). Esta enzima también se activa en presencia de fructosa-2,6-Bifosfato, este metabolito (que no forma parte de la glucólisis ni de la gluconeogénesis) es sintetizado por la PFK2. El último punto de regulación es la piruvato quinasa, se inhibe en presencia de ATP y Acetil-CoA, por otro lado se activa con el sustrato de nuevo, es decir concentración de fosfoenolpiruvato.

Hay que destacar que además de estas regulaciones existen cientos de diferentes modulaciones a diferentes niveles, además que estas se pueden ver modificadas en función de qué tipo celular estemos observando, no es lo mismo una célula pancreática, que una muscular, Por lo tanto, no es lo mismo un cáncer pancreático que uno de ovario, añadiendo también que a su vez sus mutaciones condicionarán el tipo de flujo metabólico que desarrollará la célula.

Hasta aquí es lo que se conoce como glucólisis, el piruvato puede tomar diferentes caminos en función de las necesidades y los flujos metabólicos prioritarios en ese momento en particular en esa célula en particular. Principalmente puede tomar dos caminos, o bien va hacia ciclo de Krebs, generando Acetil-CoA (será explicado más adelante) o

bien, en ausencia de oxígeno o en una situación anómala como es la de una célula cancerígena el piruvato puede ser transformado en lactato.

En esta reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa el piruvato será reducido a lactato consumiendo NADH que será transformado en NAD+, cosa que permite que la glucólisis pueda seguir funcionando en condiciones de hipoxia[121]. Aunque está ampliamente descrito que las células cancerígenas en general tienen predisposición a tener una alta actividad de la lactato deshidrogenasa, para así poder seguir consumiendo glucosa hacia glucólisis, esto será explicado más adelante, en el apartado de metabolismo y cáncer.

Este lactato en la célula suele ser inútil, por lo que es rápidamente secretado hacia el exterior mediante unas proteínas transportadoras, la familia de proteínas de transporte de monocarboxilatos (MCTs). Existen más de 14 isoformas de esta familia, cada isoforma tendrá diferentes funciones, por ejemplo, MCT4 está más relacionada con la capacidad glucolítica y participa en la eliminación (salida) del lactato en la célula. Unas células que sean menos oxidativas y muy glucolíticas tendrán niveles de MCT4 elevados para poder deshacerse de la mayor cantidad de lactato posible, para que así el NAD+ pueda seguir renovándose y así se mantenga el flujo en la glucólisis[123]. A su vez, también hay que tener en cuenta que la glucólisis produce muchos metabolitos que son utilizados para el anabolismo celular.

7.2 Metabolismo oxidativo

La mayor parte del ATP utilizado por muchas células se produce por la oxidación del piruvato en el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC o ciclo de Krebs). En este proceso de oxidación se genera nicotinamida-adenina-di-nucleótido (NADH) y flavina-adenina-di-nucleótido ($FADH_2$). Ambos se utilizan principalmente para generar el potencial de membrana mitocondrial necesario para que tenga lugar los procesos de fosforilación oxidativa, que son los responsables de la generación del ATP.

Como hemos visto el destino del piruvato depende de diferentes factores como la concentración de oxígeno, o bien el estado energético de la célula. En tejidos o células con alta carga energética, el piruvato será redirigido hacia la gluconeogénesis (síntesis de glucosa), en cambio, cuando la célula tenga un estado energético bajo, el piruvato será oxidado a CO_2 y H_2O en el ciclo Krebs, generando 15 ATPs por cada piruvato. Este proceso tendrá lugar en la mitocondria, cuando el piruvato sea transportado a su matriz se encontrará con dos enzimas metabólicas principales: la piruvato carboxilasa (enzima de la gluconeogénesis clave para sintetizar glucosa) o la piruvato deshidrogenasa (PDH), la primera enzima del complejo PDH (PDHc) y de la oxidación del piruvato.

Con una carga de energía alta en la célula la coenzima A (CoA) estará altamente acilada (con grupos acil), principalmente como Acetil CoA, y siendo capaz de activar alostéricamente a la piruvato carboxilasa dirigiendo al piruvato hacia la gluconeogénesis. En cambio, si la carga de energía de la célula es baja, la coenzima A no estará acilada y por lo tanto la piruvato carboxilasa estará inactiva, siendo el piruvato metabolizado preferentemente por la vía del PDHc y las enzimas del ciclo de Krebs a CO_2 y agua.

La PDHc es un complejo proteico que se compone de múltiples copias de 3 enzimas diferentes: la piruvato deshidrogenasa (PDH), la dihidrolipoamida S-acetil-transferasa (DLAT) y la dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLD). Para intentar simplificar lo trataremos como si fuera una proteína única llamándola PDH, la cual cataliza la siguiente reacción:

Piruvato + CoA + NAD^+ ——> CO_2 + Acetil-CoA + NADH + H^+

La regulación de la PDH es de vital importancia, ya que al ser el primer paso hacia el ciclo de Krebs actúa en cierta forma a modo de “grifo”, regulando el caudal metabólico destinado a la cadena respiratoria. Teniendo en cuenta que el proceso que cataliza la PDH termina siendo un punto de convergencia de las vías metabólicas de la glucólisis, gluconeogénesis y oxidación de los ácidos grasos, la actividad de la PDH

está altamente regulada por la fosforilación y desfosforilación, reacciones que están catalizadas por quinasas (PDKs) y fosfatasas (PDP). La fosforilación de la PDH resulta en la inhibición de la actividad, en cambio, la desfosforilación aumenta su actividad enzimática.

Existen cuatro isoformas de la PDK, de la 1 a la 4, cada una de ellas está expresada de forma diferente en función del tejido que se analice. Como suele suceder en este tipo de proteínas que regulan reacciones enzimáticas, existen lugares alostéricos específicos para los sustratos y los productos de la reacción. Por lo tanto, el piruvato o el NAD+ serán inhibidores de la PDK, por lo que aumentarán la actividad de la PDH. Por el contrario, el NADH o el Acetil CoA activarán la PDK, haciendo disminuir la acción de la enzima. La sensibilidad a estos sustratos también depende del tipo de isoformas, unas serán más sensibles a los ratios de ATP/ADP y otras a los de NAD^+/NADH.

Es importante resaltar que la PDH, independientemente de los mecanismos de regulación de su actividad mediante fosforilaciones, también cuenta con centros alostéricos que modulan su actividad. Es decir, si la PDH se encuentra sin estar inhibida y por lo tanto activa, cuenta con centros alostéricos para NADH o para Acetil-CoA, por lo que cuando estos incrementan su concentración, se irán uniendo a estos centros alostéricos, modulando así negativamente la afinidad del piruvato por la PDH. Por lo tanto, al ser una proteína clave en el metabolismo celular, cuenta con una compleja regulación estando regulada por muchísimos más factores de los mencionados.

Existen diferentes compuestos que modulan la actividad de la PDH, un ejemplo es el dicloroacetato (DCA), este es un inhibidor de la PDK1, activando la PDH y promoviendo la entrada de piruvato hacia el ciclo de Krebs. En esta tesis será utilizado como activador del metabolismo oxidativo, con la finalidad de aumentar la fosforilación oxidativa.

7.3 Ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs, que recibe ese nombre por su descubridor Adolf Krebs, también conocido como ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxilicos, (TCA en inglés), es una sucesión de reacciones químicas, donde a través de la oxidación del acetil-CoA se genera el poder reductor necesario (NADH y FADH) para generar el potencial de membrana mitocondrial, que permite sintetizar ATP. Además de energía, el ciclo proporciona precursores de ciertos aminoácidos y poder reductor que se utiliza en otras reacciones que la cadena respiratoria. El metabolismo oxidativo de la glucosa se suele dividir en tres etapas, la primera ha sido explicada y lleva la glucosa hasta el Acetil-Coa, la segunda va a ser explicada a continuación, que es la transformación de este Acetil-CoA en poder reductor y la tercera es la transformación de ese poder reductor en ATP, es decir la fosforilación oxidativa. Es importante destacar que el ciclo de Krebs que tiene lugar en la mitocondria, unifica el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, ya que el catabolismo de las tres converge en la producción de Acetil-CoA, siendo este el sustrato inicial del ciclo.

Antes de explicar paso a paso el ciclo, a nivel general el ciclo cuenta con 8 enzimas, que oxidarán completamente el Acetil-CoA en dos moléculas de CO2. También se convertirán 3 moléculas de NAD^+ en NADH, un FAD^+ en $FADH_2$ y un equivalente de guanosina difosfato en guanosina trifosfato.

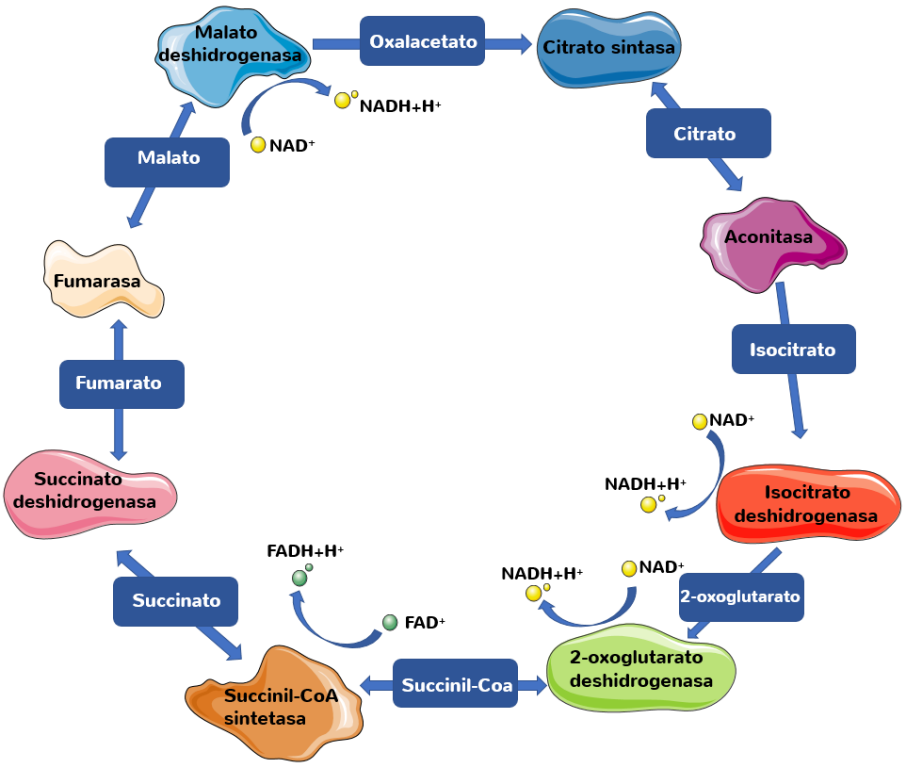


Figura 3: Esquema del Ciclo de Krebs

El primer paso del ciclo es convertir el Acetil-CoA en citrato, esto se realiza mediante la citrato sintasa. El Acetil-CoA reacciona con una molécula de oxalacetato (4 carbonos) para formar citrato (6 carbonos), mediante una reacción de condensación. Esta enzima pese a realizar una actividad en la mitocondria, su codificación se encuentra en el núcleo de la célula, es transcrita en el citoplasma e importada en la mitocondria. En primer lugar, se une el oxalacetato a la enzima, lo que produce un cambio de conformación permitiendo que se una el Acetil-CoA, produciéndose la liberación de la Coenzima A del acetil y formando así el citrato.

Oxaloacetato + Acetil-CoA →Citrato + CoA-SH

La citrato sintasa es inhibida por su producto, es decir elevadas concentraciones de citrato disminuyen su actividad, también elevados ratios de ATP/ADP, o NADH/NAD^+ la inhiben, incluso elevados ratios de acetil-CoA/CoA, todos estos ratios indicarían un suministro energético elevado. Cuando esta carga energética aumenta, el ciclo de Krebs disminuirá su flujo y eso llevará a un aumento del citrato. Este puede ser exportado al citoplasma y utilizado allí para la síntesis de colesterol y ácidos grasos. A su vez, este aumento de citrato a nivel citoplasmático activa la enzima clave en la síntesis de ácidos grasos, la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y a su vez se produce una inhibición de la PFK1. Como se había comentado anteriormente la PFK1 es una de las enzimas reguladoras de la glucólisis más importante, por lo que su inhibición dará lugar a una bajada de la actividad glucolítica. Esta reacción es irreversible por eso en parte se acumula el producto de la misma, ya que las dos reacciones posteriores serán reversibles.

El siguiente paso es una deshidratación que realiza la Aconitasa, que transformará el citrato en cis-Aconitato, eliminando una molécula de agua. A vez también la Aconitasa isomerizará el cis-Aconitato y lo volverá a hidratar transformándolo en Isocitrato.

Citrato-→cis-Aconitasa+H20→Isocitrato

Este isocitrato será transformado en una primera etapa en Oxalosuccionato, en esta reacción se producirá poder reductor en forma de NADH, por lo que necesitará NAD^+ para realizar su actividad. En la segunda etapa se produce una descarboxilación del Oxalosuccionato utilizando un protón y generando CO_2 generando alfa-cetoglutarato también llamado 2-oxoglutarato. Al ser una reacción irreversible debe de ser regulada cuidadosamente, otra vez esta enzima está regulada por la disponibilidad de sustrato (NAD^+, isocitrato) e inhibida por el producto (NADH, 2-Oxoglutarato). A su vez como todas las enzimas del ciclo de Krebs irreversibles están reguladas por inhibición competitiva por el ATP. De esta forma se garantiza un

correcto *feedback* entre el balance energético de la célula y los flujos que suministran dicha energía.

Isocitrato + NAD^+ → 2-oxoglutarato + CO_2 + NADH

De la misma forma que hay puntos en el ciclo que sirven de salida como era el caso del citrato, existen otros en los que puede haber una entrada de carbonos externa del ciclo, que sirva para aumentar el flujo del ciclo. Este punto del ciclo en el que tenemos alfa-cetoglutarato puede ser rellenado por diferentes vías, ya que este metabolito se puede generar con diferentes reacciones anapleroticas. El glutamato es un aminoácido crítico para la función celular, este puede ser transformado a alfa-cetoglutarato a través de la enzima glutamato deshidrogenasa. Además, también hay que poner de manifiesto el papel del alfa-cetoglutarato en la lanzadera de malato aspartato, ya que al no haber un transportador que pueda introducir el oxalacetato dentro de la mitocondria, esta juega un papel muy importante.

La lanzadera de malato-aspartato es el principal transporte de poder reductor (NADH) del citoplasma a la mitocondria. El oxalacetato a través de la malato deshidrogenasa se pasa a malato, a la vez que el NADH se transforma en NAD^+. El malato sí que tiene transportador que le permite entrar dentro de la matriz mitocondrial. Una vez dentro el malato vuelve a transformarse en oxalacetato otra vez a través de la malato deshidrogenasa en sentido inverso, gastando esta vez NAD^+ y generando NADH. Este Oxalacetato puede volver a transformarse en aspartato mediante la aspartato aminotransferasa, que juntamente con glutamato transformará el oxalacetato en aspartato y alfa-cetoglutarato, permitiendo la salida de este fuera de la mitocondria a través del transportador especifico o bien siendo consumido en el ciclo de Krebs. En todo este proceso si se realiza en forma de ciclo al final lo que acaba entrando netamente en el interior de la membrana mitocondrial no es otra cosa que NADH, el cual podrá ser destinado en la producción de ATP en la cadena respiratoria.

Volviendo al siguiente paso, el alfa glutarato se descarboxila oxidativamente a Succinil-CoA mediante el complejo alfa-glutarato deshidrogenasa. En esta reacción como la anterior tiene lugar de forma irreversible, el NAD^+ es el aceptor de electrones, transformándose en NADH. A su vez la coenzima A vuelve a ser el "*carrier*" del grupo succinilo, generando CO_2 y Succinil-coA en la reacción. Este complejo enzimático de la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa es muy similar al complejo de la piruvato deshidrogenasa, tanto en función como en estructura. El succinil junto con la glicina también puede ser dedicado a la síntesis de las porfirinas.

Alfa-cetoglutarato+NAD^+ + Conenzima A→ Succinil-CoA+CO_2+NADH

El Succinil-CoA se transforma en succinato por la Succinil-CoA sintetasa, en esta reacción se convierte una molécula de GDP en una de GTP. Este o bien es transformado rápidamente a ATP, o bien puede ser esencial para otras funciones de señalización que lo necesiten de sustrato, como las reacciones asociadas a proteínas G. A su vez esta reacción también libera la coenzima A.

Succinil CoA+GDP→ Succinato+GTP+Coenzima A

Este succinato pasará a fumarato mediante una oxidación que realiza la succinato deshidrogenasa, que está ligada a la membrana interna mitocondrial e interviene tanto en el ciclo de Krebs como en la cadena respiratoria, formando parte del complejo II mitocondrial. Además, esta enzima contiene unido covalentemente el FAD^+ que forma parte de la reacción de oxidación del succinato, convirtiéndose en la reacción en $FADH_2$, que al no poder desprenderse de la enzima será oxidado *insitu*, cediendo sus electrones a la coenzima Q, que será reducida a ubiquinol, abandonando así la enzima y difundiendo en la bicapa lipídica hasta alcanzar el siguiente complejo enzimático de la cadena.

Succinato+Coencima Q→ Fumarato+ubiquinol

El fumarato será hidratado para transformarse en L-Malato, esta reacción la cataliza la fumarasa, esta reacción es reversible.

Fumarato+H_2O→ Malato

El siguiente paso ya es el último del ciclo, convertir este malato en Oxalacetato. Este último paso del ciclo de Krebs lo realiza la malato deshidrogena, que oxidará el malato transformándolo en oxalacetato, siendo este el primer reactivo de nuevo en el ciclo. Para realizar esta oxidación una molécula de NAD^+ será reducida a NADH.

S-malato + NAD^+ -> oxaloacetato + NADH

El balance neto del ciclo es el siguiente:

Acetil-CoA + 3 NAD^+ + FAD^+ + GDP + P_i + 2 H_2O → CoA-SH + 3 (NADH + H^+) + $FADH_2$ + GTP + 2 CO_2

7.4 Cadena respiratoria

Tanto de la glucólisis, como de la oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs se termina generando una gran cantidad de NADH. Por cada molécula de glucosa que se consume en la vía glucolítica y si esos piruvatos posteriormente realizan el ciclo de Krebs, se producen un total de 10 moléculas de NADH y 2 de FADH, que serán los encargados de generar el diferencial de carga que termina generando ATP. Este proceso se denomina fosforilación oxidativa, ya que se utiliza la energía de la oxidación de los nutrientes para generar ATP. Este proceso dentro de una célula normal, es el que más energía genera, llegando a ser producido de esta forma más del 90% del total del ATP celular.

La fosforilación oxidativa se puede dividir en dos tipos de reacciones que están acopladas entre sí, unas van encaminadas a liberar energía mientras que otras utilizan esa energía para que tenga lugar su reacción. El flujo de electrones que será explicado a continuación a través de la cadena de transporte de electrones, desde los donantes (NADH Y FADH) y los aceptores (O_2) es un proceso exergónico, es decir, proceso en el que se libera energía. Por otro lado, la posterior síntesis de ATP es un proceso endergónico, es decir, que se necesita energía para que tenga lugar.

La cadena de transporte de electrones está compuesta por una serie de complejos protéicos capaces de catalizar encadenadamente reacciones secuenciadas de oxidación y reducción. Estos complejos tienen como objetivo captar los electrones de los donadores NADH y FADH, para ir trastocándolos entre los diferentes complejos protéicos, atrayendo de esta forma protones que serán traslocados y acumulados en la cara interna mitocondrial, generando así un gradiente electroquímico. Finalmente, el oxígeno será el aceptor final de estos electrones en la cara interna de la mitocondria, atrayendo así a dos protones y generando una molécula de agua. Este gradiente será el que haga girar la ATP sintasa, permitiendo así que mecánicamente fosforile el ADP para transformarlo en ATP, concretamente el balance energético es que por cada dos electrones que se transfieren desde el NADH al oxígeno, se sintetizan 2,5 equivalentes de ATP y 1,5 por $FADH_2$.

7.4.1 Complejos protéicos de la cadena de electrones

En células eucariotas animales se han descrito 4 complejos protéicos asociados al transporte de protones, tres de ellos son complejos transmembrana estando incrustados en la membrana interna mitocondrial y el 4 está asociado a la membrana interna mitocondrial. Estos tres complejos tienen la capacidad de actuar como bombas de protones, ya que utilizando el NADH, van a tener la capacidad de bombear protones al espacio intermembrana mitocondrial y finalmente

el ultimo aceptor de estos protones será el oxígeno, generando así H20. A continuación, vamos a explicar los diferentes complejos:

La NADH deshidrogenasa o complejo I es un complejo formado por múltiples subunidades, estas o bien son codificadas por el ADN nuclear (NDUFV) o bien por el ADN mitocondrial (ND). El complejo I es el encargado de captar dos electrones del NADH y transferirlos a un transportador denominado ubiquinona (Q), haciendo que este se reduzca en ubiquinol (QH_2), que tiene la capacidad de difundir libremente por la membrana. Gracias a ese proceso se pueden translocar cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial, desde la matriz hacia el espacio intermembrana. El complejo I es el más grande de la cadena respiratoria y produce el 40% del potencial de membrana[124].

El complejo II ya ha sido explicado, ya que forma parte del ciclo de Krebs, la succinato deshidrogenasa. No es un transportador de protones y es la única proteína de la cadena respiratoria que no está intercalada en la membrana si no que está asociada a ella. Aquí el donador de electrones es el $FADH_2$, que también irá a reducir la coenzima Q a ubiquinol (QH_2), que transportará los electrones hacia el complejo III.

El complejo III o citocromo c reductasa, obtiene esos dos electrones del ubiquinol, transfiriéndolos a dos moléculas de coenzima C, transfiriendo cuatro protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana. El citocromo C es un transportador de electrones hidrosoluble, que será el que transportará los electrones del complejo III hasta el complejo IV.

Finalmente, el ultimo complejo es el IV, también llamado citocromo C oxidasa, ya que capta 4 electrones de 4 moléculas de Citocromo C y las transfiere al oxígeno, generando dos moléculas de agua. En este proceso se vuelven a translocar cuatro protones al espacio intermembrana, por los cuatro electrones y a su vez "desaparecen" de la matriz 2 protones que forman parte del H_2O, generando así más diferencia de carga entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. El proceso general sería así:

NADH → ***Complejo I*** → **Q** → ***Complejo III*** → **Citocromo *C*** → ***Complejo IV*** → **H_2O**

↑

Complejo II

Todo este proceso ha generado un gradiente de pH y un gradiente electroquímico, este será utilizado por el complejo V o ATP sintasa para generar ATP. Esta actúa como un canal de iones, al abrirse, permite el paso de protones del espacio intermembrana a la matriz, esta energía será suficiente para que se produzca la fosforilación del ATP. Es imprescindible que la membrana mitocondrial interna esté en perfecto estado, ya que, si no se producirían filtraciones de protones, perdiéndose así el gradiente electroquímico. Aun teniendo en cuenta que la membrana se encuentre en perfectas condiciones, se siguen produciendo pequeñas "filtraciones" de electrones, estas generarán lo que se conoce como radicales libres (ROS). La mayoría de esas filtraciones se producen durante el traspaso de electrones a la coenzima Q, produciéndose moléculas de O_2-. En la célula existen complejos antioxidantes que actúan en contra de estos superóxidos, la mayor familia de complejos protéicos de este tipo es la de superóxido dismutasas (SOD), que actúan como sistemas de defensa antioxidantes. Estos complejos son vitales para la célula, ya que una acumulación de superóxidos puede terminar dañando a las proteínas celulares, llegando a inducir la muerte por apoptosis[125]. Un aumento del metabolismo oxidativo conlleva posiblemente un aumento de los radicales libres, aunque células que tengan como metabolismo principal el oxidativo, tienen sobreexpresados los mecanismos de defensa, consiguiendo no ver aumentados los ROS.

Existen diferentes inhibidores de la cadena de transporte de electrones que consiguen bloquear dicha cadena, produciendo el bloqueo de la misma y aumentando los radicales libres. Algunos de estos inhibidores están siendo probados para ser utilizados como tratamiento en el cáncer, ya sea por su faceta de bloqueo metabólico o por su incremento

de radicales libres que pueden inducir la muerte celular. Otros de estos inhibidores han sido utilizados para comprender el funcionamiento de la cadena mitocondrial, ya que inhiben complejos específicos con muy alta afinidad. A continuación, se muestra una tabla con los inhibidores más importantes, algunos de los cuales han sido utilizados durante esta tesis:

Inhibidores de la Fosforilación Oxidativa

Nombre	Función	Sitio de Acción
Rotenona	inhibidor del transporte de e^-	Complejo I
Amital	inhibidor del transporte de e^-	Complejo I
Antimicina A	inhibidor del transporte de e^-	Complejo III
Cianuro	inhibidor del transporte de e^-	Complejo IV
Monóxido de Carbono	inhibidor del transporte de e^-	Complejo IV
Azida	inhibidor del transporte de e^-	Complejo IV
2,4,-dinitrofenol	Agente desacoplante	Transportador transmembrana de H^+
Pentaclorofenol	Agente desacoplante	Transportador transmembrana de H^+
Oligomicina	Inhibe la sintasa de ATP	Fracción OSCP de la sintasa de ATP

Figura 4: Esquema de los principales inhibidores de la fosforilación oxidativa.

Otro inhibidor ampliamente utilizado durante esta tesis que requiere una mención especial es la metformina. Este fármaco es ampliamente utilizado a nivel mundial para tratar y prevenir la diabetes tipo II. Esto es debido a su capacidad de bajar los niveles elevados de glucosa en sangre, además de rebajar los niveles de LDL y triglicéridos[126]. A nivel sistémico es absorbido en el tracto digestivo, una vez en sangre consigue reducir los niveles de glucosa en sangre, aumentando su captación a nivel celular, también disminuye la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. Todo esto lo consigue sin alterar los niveles de insulina, pese a que sí que potencia su acción a nivel de señalización. Actualmente los mecanismos moleculares por los que la metformina actúa no son completamente comprendidos debido a su complejidad y promiscuidad molecular, ya que debido a su tamaño puede interactuar

con múltiples proteínas. A nivel sistémico, la metformina tiene su acción principalmente en los hepatocitos, donde inhibe el complejo I de las mitocondrias, suprimiendo así una gran parte de la producción ATP y desencadenando un drástico descenso del ratio ATP/ADP. Todo esto inhibe la síntesis de lípidos y glucosa, haciendo que los niveles plasmáticos de estos biocompuestos bajen en sangre[127].

Otro mecanismo de acción debido a la bajada de la ratio ATP/ADP es la activación de una proteína que hasta el momento no hemos comentado, pero tiene mucha importancia en la regulación del metabolismo, la AMPK. Esta proteína, también llamada proteína quinasa activada por AMP, será un sensor energético celular, que responderá ante una subida de los niveles de AMP, indicando la necesidad de obtener energía. La activación de la AMPK tiene un impacto directo en la inhibición de la gluconeogénesis y en la síntesis de ácidos grasos, bajando así los niveles plasmáticos de glucosa, lípidios y triglicéridos.

La metformina también actúa por mecanismos independientes de la AMPK, por ejemplo, el aumento del AMP, produce la inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa, lo cual también produce una bajada en la producción de glucosa. En general todas las enzimas de la gluconeogénesis se verán inhibidas por esta bajada del ATP, desencadenando la bajada en la producción de glucosa.

La inhibición del complejo I también tiene su impacto e importancia en el ratio NAD^+/NADH, ya que al estar bloqueado uno de los mayores "consumidores" de NADH, este se irá acumulando, con las consecuencias metabólicas y celulares que eso conlleva.

7.5 Metabolismo del NAD^+

Ha quedado más que patente la importancia del NAD^+/NADH en el metabolismo celular, y en el correcto funcionamiento de mecanismos de reparación celular como es el caso de PARP1, explicado

anteriormente, por lo que será importante dar una explicación breve sobre su síntesis y reciclaje.

El NAD^+ puede ser sintetizado a través de dos rutas metabólicas: ruta de *novo* a partir de aminoácidos o en rutas de reciclaje, donde se vuelve a transformar componentes preformados como la nicotinamida en NAD^+.

En la síntesis de *novo*, se sintetiza a partir de aminoácidos, generalmente a partir de triptófano o acido aspártico a través de una serie de reacciones se acaba sintetizando de nuevo la molécula de NAD^+. Una parte de esos NAD^+ sintetizados serán transformados en $NADP^+$ mediante la NAD^+ quinasa, fosforilándolo[128]. En las rutas de reciclaje, una gran parte del NAD^+ se genera reutilizando principalmente tres compuestos que contienen nicotinamida: el ácido nicotínico (Na), la nicotinamida (NAM) y la nicotinamida ribósido (NR)[129]. Estos precursores, a través de una serie de reacciones de adenilación y fosforilación terminan volviendo a generar NAD^+, que volverá a ser utilizado por la célula. Estos precursores pueden ser captados en la dieta, por ejemplo, por la vitamina B3 o bien reutilizados de la propia de la célula de metabolitos como la nicotinamida. Uno de las enzimas que utiliza NAD^+ como combustible es PARP1, como hemos explicado anteriormente, poliADP-Ribosila proteínas para realizar su función. En esta reacción el NAD^+ después de liberar el ADP pasa a nicotinamida, es por ello, que la mayoría de enzimas involucradas en las vías de rescate están concentradas en el núcleo celular, ya que es el lugar donde más consumo de NAD^+ y por lo tanto donde más necesidad hay de reutilizarlo. Una de estas enzimas que reutilizan la nicotinamida para volverla a convertir en NAD^+ es la NAMPT, de la cual existen inhibidores específicos para bloquear su actividad, como el GMX1778, que será utilizado en este artículo con la intención de bajar los niveles de NAD^+, al bloquear una de las vías de reciclaje.

7.6 Metabolismo y cáncer

En situaciones normales todos estas vías, flujos y niveles metabólicos están altamente regulados, pero esta homeostasis se ve modificada

constantemente, incluido en las células cancerígenas. De la misma forma que el tipo tumoral, es decir, el tejido de origen, condiciona las vías de señalización por la cuales una célula malignizada terminará intentado sobrevivir, el metabolismo celular también condiciona y se ve modificado conforme la célula se va malignizando. Cada tipo tumoral priorizará un determinado comportamiento metabólico en función de su ambiente, de si es tratado o no con quimioterapia y del propio crecimiento tumoral. Cuando un tumor adquiere cierto volumen tumoral, el oxígeno y los nutrientes no llegan de la misma forma que lo hacían antes, por lo que las células cancerígenas del interior o se adaptan o terminarán muriendo por la falta de nutrientes. Es importante tener en cuenta, que un tumor no es una masa homogénea de células donde todas tienen el mismo metabolismo ya que vienen de una célula originaria. Células que estén en determinados lugares geoespaciales del tumor, ya sea interior o exterior, cerca o lejos de un vaso sanguíneo, verán adaptado su metabolismo a la situación concreta en la que se encuentre. Sucede lo mismo con el *background* genético, las mutaciones por las cuales se ha originado el tumor también condicionarán las necesidades metabólicas y por lo tanto necesitarán un reordenamiento del metabolismo celular.

Desde que Otto Warburg propuso una alta tasa de glucólisis aeróbica en las células cancerosas (efecto Warburg) en 1923, el carácter metabólico único de las células cancerosas se ha investigado intensamente como un objetivo para la terapia contra el cáncer. El efecto Warburg propone que la glucólisis anaerobia es el principal medio mediante el cual la célula aparte de obtener ATP, obtiene intermediarios de la glucólisis que serán los precursores que necesita la célula cancerígena para sintetizar aminoácidos y nucleótidos entre otros. Aunque, recientemente y más de 80 años después se ha demostrado que ambas vías metabólicas pueden estar aumentadas en las células cancerígenas, Warburg puso de evidencia la importancia que jugaba el metabolismo en tumorogénesis.

En el cáncer de ovario en general según la bibliografía la glucólisis aerobia se encuentra aumentada, produciendo más lactato a través de

la lactato deshidrogenasa para poder mantener el flujo de NAD^+ y permitir que se siga oxidando glucosa. Este lactato como ha sido explicado anteriormente será secretado al espacio extracelular a través de los transportadores de lactato MCT. Esto generará un microambiente acido en el espacio extracelular, este ambiente ha sido descrito que promueve y facilita la invasión y la metástasis[130]. Además se ha descrito que una aumentada glucólisis promueve la quimioresistencia[131,132]. Si se bloquea este aumento de la glucólisis se puede llegar a sensibilizar a los tratamientos actuales[133,134].

Existen ya varios inhibidores de la glucólisis que se encuentran en desarrollo clínico. Un ejemplo de ello son los inhibidores de la Hexoquinasa 2. Esta proteína se ha descrito que su expresión está aumentada en cáncer de ovario, especialmente en los serosos, pero no en el tejido normal. Además se ha descrito que existe una correlación entre la expresión de la HK2 y la quimioresistencia[135]. Por esa razón se han desarrollado fármacos para este candidato (lonidamina) que actualmente está siendo utilizado en el carcinoma de próstata en Europa[136]. A su vez se han realizado estudios en clínica para utilizarlo en el cáncer de ovario avanzado, observando que consigue revertir la quimioresistencia al cisplatino y al placlitaxel[137].

Otra proteína que se ha observado que juega un papel importante en el cáncer de ovario es la PDK1, proteína clave en la regulación de la PDH y por lo tanto en la derivación metabólica del piruvato. Como hemos explicado antes, la PDK inhibe por fosforilación la PDH haciendo que el piruvato no ingrese en el ciclo de Krebs y sea derivado principalmente a lactato, con el objetivo de regenerar el NAD^+ que será utilizado en la glucólisis. En la mayoría de células de ovario normales la expresión de PDK1 es muy baja o indetectable, incluso en el 60% de los tumores de ovario benignos. En cambio en los cánceres de ovario seroso de alto grado se ha descrito una alta expresión, llegándose incluso a poder correlacionar su expresión con la supervivencia[138,139]. También se ha observado que PDK1 puede jugar un papel importante en la quimioresistencia, ya que células que sobreviven al tratamiento consiguen estabilizar la presencia de PDK1, impidiendo su

ubiquitinización y posterior degradación[140]. Por esa razón se han diseñados fármacos que intentan inhibir la actividad de la PDK1, es el caso del Dicumarol, éste al aumentar la actividad de la PDH produce que las células cambien de un metabolismo glucolítico anaeróbico a uno aeróbico, aumentando el metabolismo oxidativo y produciendo así un aumento de los radicales libres, que termina incrementando la apoptosis[141].

Por otro lado, también existen diferentes estudios que afirman una adaptación metabólica de las células cancerígenas en la otra dirección. Células aisladas del líquido ascítico de pacientes de cáncer de ovario, clasificadas como células madre al ser positivas para CD44 y CD117, tenían un perfil metabólico oxidativo y una mayor absorción de glucosa. Esas mismas células cuando eran sometidas a inanición disminuyeron la mayoría de actividades metabólicas, pero mantenían su perfil OXPHOS[142]. También existen diferentes estudios que correlacionan la expresión de diferentes marcadores de células madre cancerígenas de cáncer de ovario, con la expresión de marcadores de metabolismo oxidativo[143].

Con todo esto queda claro que no hay unos fenotipos claros, si bien en términos generales cada célula dependiendo de la situación que se encuentre y gracias a su plasticidad metabólica, desarrollará un perfil metabólico u otro. Ese perfil determinará qué tipo de vulnerabilidades pueden ser explotadas en cada situación determinada.

Materiales y métodos

1.Experimento In vivo

1.1 Estabulamiento de los ratones

Todos los ratones utilizados en este trabajo han sido mantenidos en jaulas con ventilación individual a una temperatura constante de 20-25ºC, en una sala libre de patógenos (SPF) en condiciones de esterilidad. La comida y la bebida fue suministrada ad *libitum*. Todos los experimentos han sido realizados en cabinas de flujo laminar, siguiendo todos los protocolos en concordancia con las guías y la legislación aprobadas por el comité de ética del estabulario de IDIBELL y la Generalitat de Cataluña.

Se utilizaron ratones C57/Bl-6 de 5 a 6 semanas de vida y un peso aproximado de 20 a 22 gramos por ratón, comprados a la empresa Janvier (Francia).

1.2 Inyección y generación ortotópica de tumores en ratones atímicos

Las células ID8 p53 -/- o p53/Brca2-/- fueron las que utilizaron para generar tumores ortotópicos de ovario en ratones de 7 semanas C57/Bl-6. Los ratones son anestesiados por inhalación de isolofluorano, se desinfecta la piel del abdomen con povidona iodada (Betadine) y se realiza una incisión en la piel y la pared del abdomen. A continuación, se exterioriza el ovario colocándolo sobre una gasa estéril, en el, se inyectaron 2 millones de células dentro del ovario en 20 µL de DMEM. Se introduce el ovario dentro de la cavidad peritoneal y el animal es suturado utilizando grapas quirúrgicas de 9 mm (Becton-Dickinson) uniendo la capa muscular y la piel. Se vuelve a desinfectar la zona con povidona iodada y se coloca al ratón sobre una gasa cerca de la luz infrarroja para calentarlo. Una vez se despierta se le administran 500 µl

de suero fisiológico en el lomo de la espalda de forma subcutánea para rehidratarlo y se le inyectan 200 µl de Buprex como analgésico. Las grapas serán extraídas 10 días después una vez, antes de ello se realizaron curas con Povidina 2 veces por semana, cuando se detecta una buena cicatrización de la herida.

1.3 Tratamiento y caracterización de los tumores

Una vez los tumores implantados llegaban a palpación (unos tres meses) los animales fueron randomizados en dos grupos y metformina (100 mg/kg) fue suministrada intraperitonealmente de lunes a viernes durante cuatro semanas. El grupo control recibía de forma intraperitoneal salino, usando las mismas pautas de administración que el tratado con metformina. Todos los ratones a su vez recibían una inyección subcutánea de 500ul de una solución acuosa de glucosa al 5%. El tratamiento no tuvo efecto significativo en el peso del ratón, los animales se encontraban vitales y sin problemas durante el estudio.

1.4 Obtención Y procesamiento de las muestras

A punto final de tratamiento los ratones fueron sacrificados en todos los grupos y el mismo día, mediante dislocación cervical. A continuación, se procedía a pesar y medir el ancho y largo del tumor con un pie de rey. El resultado del volumen tumoral se obtuvo mediante la siguiente formula: Volumen= largo x ($ancho^2/2$). En este caso los tumores se incluyeron en parafina para realizar inmunohistoquímicas o tinciones de hematoxilina-eosina. El protocolo de inclusión en parafina consistía en una primera fase de fijación de los tumores en formol 4% durante 24 horas, una posterior deshidratación, donde las muestras tumorales pasaban por una batería de alcoholes hasta llegar finalmente a xilol (1 hora en etanol 70%, 1 hora en etanol 96%, O/N en etanol 96%, 1h 30 en cada uno de los pasos siguientes: 3 alcoholes de 100% y xilol). Finalmente, la pieza termina en un baño de parafina liquida a 60ºC O/N.

Las muestras finalmente serán guardadas en la parafina solidificada listas para ser procesadas.

2. Cultivos celulares

En esta tesis se ha desarrollado el trabajo con 4 líneas celulares. La línea celular más importante ya que se ha desarrollado la mayoría de experimentos en ella son las células epiteliales de la superficie ovárica de ratón ID8.

También se han utilizado las células SKOV3, un modelo de células ascíticas procedentes de una paciente de adenocarcinoma que han sido obtenidas de la ECACC (*European Collection of CEll cultures-Sigma Aldrich*).

Otra línea utilizada son las murinas de cáncer de ovario, obtenidas de tumores generados con las siguientes alteraciones genéticas: Por un lado, la línea control TRP53 -/- con sobre expresión de AKT y MYC por otro lado la línea TRP53-/- BRCA1-/-, con sobre expresión de AKT y MYC. Estas líneas fueron cedidas por la Dra. Orsulic (Xing & Orsulic, 2008).

2.1 Mantenimiento de las células en cultivo

Las células ID8 han sido cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium High Glucose 25mM) suplementado con un 4% de FBS (Serum fetal bovino de GIBCO), 1 mM de L –Glutamina de Sigma-aldrich, ITS (5 ug/ml de insulina, 5 µg/ml transferrina y 5 ng/ml de sodium selenite). También se añadieron antibióticos (100u/ml penicilina y 0.1 mg/ml de streptomicina).

En el caso de las SKOV-3 han sido cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium High Glucose 25mM) suplementado con un 10% de FBS (Serum fetal bovino de GIBCO), 1 mM de L –Glutamina, 1mM de piruvato ambos de Sigma-aldrich. También

se añadieron antibióticos (100u/ml penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina).

Las células TRP53 -/-, TRP53-/- BRCA1-/-, con sobre expresión de AKT y MYC fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium High Glucose 25mM) suplementado con un 10% de FBS (Serum fetal bovino de GIBCO), 1 mM de L –Glutamina, 1mM de piruvato ambos de Sigma-aldrich. También se añadieron antibióticos (100u/ml penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina).

En todos los casos las células fueron cultivadas en condiciones constantes de atmosfera al 5% de CO_2 a una temperatura de 37°C. Se realizaron test de micoplasma por PCR mensualmente y se utilizaron entre pases 5 a 25.

2.2 Producción de lentivirus CRISPRCAS9 para BRCA2

Los lentivirus producidos fueron los GenCRISPR™ gRNA/Cas9 lentiCRISPR v2 vector (GenScript, Piscataway, NJ), se compró en forma de plásmido, el cual fue introducido en bacterias (DH5alpha). Una vez introducido el plásmido en las bacterias estas fueron amplificadas en LB con ampicilina (50 µg/ml). Para obtener el plásmido amplificado se realizó una *maxiprep* con el kit de QUIAGEN® Plasmid Maxi Kit. Una vez purificado el plásmido se realizó una triple transfección en células 293FT, con el plásmido empaquetador pSPAX.2, el plásmido de envoltura pMD2.G y el plásmido lentivirual con la sequencia gRNA/Cas9. Las células fueron transfectadas con polyethulenimine (PEI) (25 kDa, linear, powder (Polysciences Inc.), partiendo de una solución 1 mg/ml en una solución 20 mM HCl, 10 mM NaoH a pH 7 filtrada a 0,22 µm. Por cada virus que se quería transfectar se utilizaba una placa de 15 cm de diámetro de células 293FT. En cada placa se transfectó 5,4 µg de pMD2.G, 16,8 µg de pSPAX.2 y 22,5ug de pLKO.1. Los plásmidos fueron mezclados en 1,25 ml de NaCl 150 mM y fueron mezclados con 1,25 ml de solución de 1/5 de PEI en NaCl mM previamente preparada e incubada durante 5 minutos. La mezcla de transfección se dejó reposar a temperatura ambiente y se fueron añadiendo gota a gota a la

placa de 293FT. Pasadas 24h el medio de transfección fue cambiado a 3ml de medio durante 48h, donde se iban liberando los lentivirus. Una vez concentrado el virus en el sobrenadante de las 293 este fue filtrado a 0,45 µM para depurar debris. Los lentivirus producidos fueron los siguientes:

Virus	Gen	Vector	Sequencia gRNA
Crisp 1	BRCA2	pLentiCRISPR v2	CTGTCTACCTGACCAATCGA
Crisp 2	BRCA2	pLentiCRISPR v2	ATGTAGCACGCATTCACATA
Crisp 3	BRCA2	pLentiCRISPR v2	CGATTACCTGTGTACCCTTT
SC	Nonsh	pLentiCRISPR v2	Empty

2.3 Generación de líneas celulares estables CrisCas9

Una vez generados los vectores lentivirales se procedió a la generación de líneas estables. Para transducir las células con los vectores lentivirales se sembraron pozos de 6, una vez llegada la confluencia al 60% se procedió a la transducción. Se cambió el medio por el medio de sobrenadante con el virus suplementado con polibrein (Santa Cruz Biotechnology, inc) 8 µg/ml durante 24 horas. Se retiró el medio con el virus dejándose medio fresco durante 48 horas. Es entonces cuando se realizó la selección, añadiendo medio fresco con puromicina 5 µg/ml (Sigma), ya que el plásmido incorporaba resistencia a puromicina, seleccionando así únicamente las células que hayan sido infectadas correctamente. Pasada una semana donde las células recrecieron, se realizó una generación de clones por dilución máxima. Se fue diluyendo las células hasta terminar con una única célula, generando así clones de cada gRNA.

2.4 Generación de tumores a partir de células

Las células ID8 p53 -/- y ID8 p53 -/- BRCA2 -/- fueron resuspendidas en 20 µl de medio DMEM sin FBS a una concentración de $4 \cdot 10^6$ células /ml.

Inmediatamente fueron inyectadas en el ovario contrario al bazo. Para realizar la punción se sometió al ratón a la misma cirugía que en el caso de los tumores ortotópicos, pero en vez de coser un trozo tumoral, se procedió a la inyección.

2.5 Generación células resistentes

Se generaron células resistentes a CDDP utilizando de base las células SKOV3. En el medio de cultivo se añadió una concentración de 1 µM de CDDP durante una semana, concentración en la que iban creciendo las células y representaba aproximadamente un 25% de su IC50. Semanalmente se fue añadiendo cisplatino doblando la dosis, es decir la segunda semana 2 µM la tercera semana 4 µM y así paulatinamente. Finalmente se llegó a una dosis de mantenimiento de 12 µM dosis en la que estuvieron creciendo alrededor de 4 semanas. Pasado ese tiempo se retiró el cisplatino durante 4 semanas y es entonces cuando se procedió a congelar el stock con el que se realizarían los experimentos. La razón de no mantener la presión de CDDP es debido a que el comportamiento celular se veía condicionado a la presencia del CDDP, por lo que se decidió dejar "normalizar" las células durante esas 4 semanas.

2.5 Ensayo de proliferación

Durante la muerte celular las células adherentes en cultivo se desprenden del fondo de la placa de cultivo. Esta característica se puede usar para la cuantificación indirecta de la muerte celular y para determinar las diferencias en la proliferación tras la estimulación con agentes que inducen la muerte. Un método simple para detectar la adherencia mantenida de las células es la tinción con colorante cristal violeta, el cual interactúa con las proteínas y el ADN. Por lo tanto, las células que sufren muerte celular pierden su adherencia y posteriormente en proceso de tinción se pierden está población de células, reduciendo la cantidad de tinción que será cuantificado

Durante la tesis serán utilizados diferentes inhibidores metabólicos, es por esta razón que se ha preferido utilizar este método y no el reactivo de MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazoli), ya que este se ha de internalizar en las mitocondrias pudiendo dar resultados artefactuales.

Son sembradas 750 células en una placa de 96 pozos en un volumen de 100 µl. Una vez se adhieren a la placa (unas dos horas), se añade otros 100 µl con la cantidad de inhibidor necesaria para realizar un punto de los seis de diferentes dosis. Las células se mantienen con el tratamiento correspondiente durante 72h, es entonces cuando se procede a la lectura de la placa. Se retira el medio de cultivo por aspiración y se añaden 100uL de Metanol durante 15 minutos, en este proceso las células quedan fijadas a la placa. Es entonces cuando se retira el metanol y se añaden 100 µl de Cristal violeta al 0.01%, durante 20 minutos. Se retira el reactivo y se realizan dos lavados con agua. Se deja secar durante 10 minutos y se añade una solución de Ácido acético al 10% y metanol al 5%, se resuspende el reactivo y se deja en el *shaker* durante 15 minutos para una correcta disolución. Pasado ese tiempo se procede a la lectura de la absorbancia en 595 nm en un lector de placas.

2.6 Análisis de crecimiento células

Para analizar el crecimiento y poder comprar los niveles de proliferación entre las diferentes líneas celulares, se sembraron 15.000 células por pozo en una placa de 24. Pasadas 24, 48 y 72 horas se fueron realizando contajes de cada pozo. Se contaban 4 pozos por línea celular y día. Las células fueron contadas utilizando una cámara de Neubauer y utilizado *trypan blue* para contar únicamente las células vivas.

2.7 Inhibidores i factores de crecimiento utilizados in *vitro*

Compuesto	*Compañía*
Olaparib	***LC laboratories (Woburn, MA)***
FBS	***ThermoFisher***
Glutamina	
Piruvato	
P/S	
Metformina	***Sigma***
Nicotinamida	
GMX1777	
Rotenona	
Dicloroacetato	
Cisplatino	

3. Proteínas

3.1 Extracción de proteína de tumores

La extracción de proteínas de las muestras tumorales se realizaba de piezas tumorales de unos 4x4 mm de un trozo fresco o congelado (en este último caso el corte se realizaba sobre nieve carbónica para evitar su descongelación). La pieza de tumor se disgregaba mecánicamente con la ayuda de un pequeño mortero de 5 ml. La pieza era disgregada mecánicamente en 400 µL de Buffer RIPA (0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5% sodio deoxicolate) con los inhibidores de proteasas: (100 µM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride), 0,1 µg/µl benzamidina, 1 µM pepstatina A, 5 µg/ml leupeptina i 2 µg/ml aproptina) y los de fosfatasas (10 mM NaF, 40 mM B- glicerofosfato, 100 µM ortovanodato sódico). Los lisados son incubados una hora a 4°C en agitación y seguidamente son centrifugados durante 15 minutos a 12 000 rpm a 4°C. El sobrenadadante es cuantificado y conservado a -20ºC. La cuantificación protéica de las muestras se realiza mediante el kit *BCA protein assay kit* (Pierce), un método colorimétrico de cuantificación de proteínas. En

este caso al tratarse de muestra tumoral se cargaban 100 µg de proteína por pozo.

3.2 Extracción de proteína de células

Para la extracción protéica en células, se limpian las células dos veces con PBS 1x a 5°C, apurando mucho el ultimo lavado para no dejar restos de PBS que puedan diluir la muestra. Con la placa sobre hielo se añade la solución de lisis RIPA, con exactamente los mismos inhibidores que para las muestras tumorales mencionadas anteriormente. Se deja 15 minutos a 4°C en el *shaker*. Pasado ese tiempo se lisan las células con un *scrapper*, se centrifuga el lisado a 14000 rpm durante 10 minutos, también a 4°C. Finalmente nos quedamos con el sobrenadante que será cuantificado mediante el kit de BCA. Para las muestras celulares se utilizaba 40 µg de proteína. Finalmente, se les añade ¼ de *Loading Buffer*, el cual lleva en 1 ml 180 de B-mercaptoetanol. Además, las muestras son hervidas a 95°C durante 5 minutos, todo esto para desnaturalizarlas y que su estructura no interfiera en la separación por tamaño.

3.3 Electroforesis en geles de poli-acrilamida/sds y Western Blot

SDS-Page y transferencia de proteínas

La electroforesis en geles de poli-acrilamida (acrilamida/bisacrilamida (29:1)) en presencia de detergente dodecilsufato sódico (SDS), también recibe el nombre como *SDS-PAGE*. Esta técnica permite separar las proteínas en función a un gradiente de tamaño, las proteínas más grandes terminaran arriba y las más pequeñas debajo del gel. Estos geles constan de dos partes: la primera es un gel empaquetador, conocido como *stacking*, este permite que las proteínas entren a la vez en la siguiente fase del gel. Esta segunda parte se conoce como gel separador, es el gel que separará las proteínas en función a su tamaño.

Para evitar que otras características protéicas como la carga, la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas pueda influir en como estas se desplazan por el gel de separación, todo este proceso se realiza en condiciones desnaturalizantes, añadiendo SDS y un agente reductor β-mercaptoetanol a las muestras.

El gel separador es el que se prepara primero, el porcentaje de acrilamida es variable y se elige en función del peso molecular de la proteína de interés. Este gel se prepara utilizando una solución de 9.4 M tris base pH 8,8, 0,1% de SDS, 1% APS y 0,1% TEMED (ambos catalizadores de la polimerización) y finalmente los ml de acrilamida al 30% necesarios para llegar al % adecuado en función de la proteína a analizar. Los geles realizados en esta tesis oscilaban entre el 7.5% y el 12% de acrilamida. Una vez polimerizado el gel separador, en el que previamente se le habrá añadido una fina capa de agua para que el gel separador quede lo suficientemente recto, se prepara el *stacking.* Este gel empaquetador está compuesto por un 4% de acrilamida, 125 mM de tris base pH 6,8, 0,1% SDS, 1% APS y 0.1% TEMED. En cuanto se ha añadido el *stacking* se coloca molde para los pozos, que será lo que permitirá que se puedan cargar con las proteínas. Las muestras a cargar se igualan por volumen y cantidad de proteína, añadiendo antes de cargar el tampón de carga 4x (60 mM tris-HCL pH 6.8, 2% SDS 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol y 5% β-Mercaptoetanol).
La cantidad de proteína a cargar siempre es la misma entre muestras, esta oscila entre los 30 y 50 µg para cultivos celulares. Siempre se carga un marcador de proteína comercial con tal de conocer el peso molecular de las bandas. Una vez colocadas las muestras en el gel, se coloca en este el tampón de electroforesis 1 X (25 mM tris HCL pH 8,3, 192 mM glicina y 17 mM SDS). Se monta todo el kit en la cubeta de electroforesis y se corren las muestras a 120V durante 90 minutos aproximadamente.

Una vez separadas las proteínas en el gel de acrilamida se transfirieron las proteínas en una membrana PVDF (Polivinildeno fluoreide:

inmobilon Milipore), esta membrana había sido activada previamente durante un minuto en metanol. Se realiza un montaje en sándwich, en la que el gel y la membrana se encuentran en contacto directo, envueltos por esponjas y papel de Whatman. Todo esto, está sujeto por un soporte plástico y sumergido en tampón de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina y 10% metanol). Se coloca de una forma en que la membrana queda en el polo positivo, de esta forma cuando se aplica una corriente eléctrica continua de 100V durante hora y media, las proteínas migrarán del gel a la membrana.

3.4 Western Blot

Una vez realizada la transferencia protéica se procede al bloqueo de la membrana, ésta se cubre de una solución de leche al 5% en TBS1x (TBS 10X: 99 mM Tris base y 1,49 M NaCl) durante una hora en temperatura ambiente y agitación. Este paso es necesario para evitar las uniones inespecíficas de la membrana con los anticuerpos. A continuación, las membranas serán incubadas con los anticuerpos primarios, estos serán diluidos en leche en polvo al 1% en TBS1X y serán incubados toda la noche en agitación a 4°C. Todos los anticuerpos utilizados están detallados en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución
NDUFV2	Novus biologicals	Conejo	1/500
MCT4	Novus biologicals	Conejo	1/500
p-Histona H2A.x	Cell signaling	Conejo	1/500
VDAC	Abcam	Ratón	1/500
GLUT1	Abcam	Conejo	1/500
TIGAR	Santa cruz	Conejo	1/500
p-PDH-E1A (Ser 293)	Calbiochem	Conejo	1/500
PDH-E1A	Calbiochem	Conejo	1/1000
p-ACC (Ser79)	Cell signaling	Conejo	1/1000
ACC	Cell signaling	Conejo	1/1000
PARP1	Cell signlaing	Conejo	1/1000
Anti-poli-ADP-ribosa	Calbiochem	Conejo	1/1000

PPAR	Cell signaling	Conejo	1/1000
PDK1	Cell cignaling	Conejo	1/1000
Tubulina	Thermofisher	Ratón	1/2500
Vinculina	Thermofisher	Ratón	1/2500

Una vez retirado el anticuerpo al día siguiente, se realizan tres lavados de 10 minutos de las membranas con TBS1X 0.1% de tritón X-100. Posteriormente se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes unidos a la peroxidasa. Después de la incubación de 1 hora en temperatura ambiente y agitación, se retira el anticuerpo secundario y se vuelven a realizar 3 lavados de TBS1X 0.1% tritón X-100. Finalmente se detectó la señal utilizando el método de quimioluminiscencia basado en la oxidación del luminol por parte de la peroxidasa unida al anticuerpo secundario (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences).

4. Extracción de RNA

La extracción de RNA de las líneas celulares se realizó utilizando el *RNeasy mini kit* (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1 Obtención de cADN per retrotranscripción

A partir del RNA obtenido de las muestras de células o bien muestras tumorales se procedió a la obtención de cADN utilizando el kit high-capacity cADN reverse transcription kit (aplied Biosystems) y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Antes de realizar la amplificación se cuantificará el RNA mediante *nanodrop,* además de verificar el estado óptimo del RNA corriendo un gel de agarosa para ver si existe degradación.

4.2 Extracción, purificación y secuenciación de ADN

Se realizó una extracción de ADN a partir de pellets de las células SKOV-

SC o SKOV-1.2 para comprobar si había funcionado el CRISPR. En primer lugar, se limpiaron las células dos veces con PBS, se levantaron mediante acutasa y fueron centrifugadas. Los pellets se lisaron en 1 ml de SET1X, se añadieron 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml) por cada ml de SET1X y fueron incubados en agitación durante 1 hora a 55°C. Se añadieron 20 µl de NaCl 5 M por ml de SET1 y 1V de fenol/cloroformo. Se realizó un vortex y se centrifugo 20 minutos a 10 000 rpms. Una vez centrifugado se recuperó la parte superior del tubo y se añadieron 2V de etanol absoluto. Una vez precipitado el DNA se centrifugo a 25000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol a T.A durante 30 minutos. El DNA fue resuspendido con H_2O. La cantidad de ADN fue cuantificada mediante *nandrop* y se comprobó la calidad del ADN mediante un gel de agarosa.

5. Metabolismo

5.1 Consumo de oxígeno en tiempo real (OROBOROS)

El oxígeno, como gas disuelto en medio acuoso, puede ser cuantificado mediante sensores específicos, en el caso de Oxygraph-2K, se utilizan sensores de oxígeno polarográfico (electrodo Clark). Este sensor está aislado de la cámara que contiene los medios mediante una membrana permeable al O_2. Por lo tanto, el O_2 puede alcanzar el cátodo donde se reduce y esta reducción permite la lectura de un flujo de corriente, esta diferencia de potencial se registra y es lo que permite la lectura del consumo de oxígeno en tiempo real.

El consumo de oxígeno se midió utilizando un *Oxygraph* de alta resolución (Oroboros, Innsbruck, Austria). Las diferentes células que fueron analizadas recibieron el mismo protocolo de lectura detallado a continuación:

- Las células fueron sembradas en placas de 10, para que 48 horas después estuvieran a una confluencia del 80%
- Las células fueron lavadas dos veces con PBS y levantadas mediante Acutasa
- Son resuspendidas en su medio y centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos
- Una vez contado el número de células, 2,5 millones de células son resuspendidas en 2,5 ml de medio.

La respiración se evaluó en los propios medios de cultivo, en primer lugar, el medio se equilibró con aire a 37 ° C y se agitó a 750 rpm hasta que se obtuvo una señal estable para la calibración a saturación de aire. Las celdas se agregaron a las cámaras que estaban cerradas. Se mantuvieron la temperatura y la agitación. Los niveles de respiración basal se midieron después de alcanzar el estado estacionario (respiración de rutina), que se completó en 10 minutos y los valores se adquirieron utilizando un sistema de adquisición de datos impulsado por computadora (*Datlab; Oroboros*). Los valores de la respiración basal se normalizaron por el número de células.

5.2 Consumo de glucosa

La determinación colorimétrica de la concentración de glucosa se basa en dos reacciones enzimáticas acopladas en las que se utiliza o-dianisidina (ODD) como sustrato colorimétrico. En primer lugar, la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico y H_2O_2. La segunda reacción es catalizada por la peroxidasa, que transfiere 2 e- del H_2O_2 a ODD, que en su estado oxidado cambia de color de incoloro a marrón. La intensidad del color marrón es proporcional a la concentración de glucosa.
La peroxidasa y la glucosa oxidasa están disponibles comercialmente como enzimas PGO (Sigma, # P7119) en cápsulas. Cada cápsula contiene 500 unidades de glucosa oxidasa y 100 unidades de peroxidasa. La

solución de PGO se preparó disolviendo 1 cápsula en 100 ml de H_2O. La solución ODD se preparó disolviendo 25 mg de ODD (Sigma) en 10 ml de H_2O. El rango del estándar de glucosa (Sigma, # G6918) es 0-1 mg / ml, donde la reacción se satura después del punto de 0,5 mg/ml. Por lo tanto, es necesario diluir las muestras según la concentración esperada.

Fue utilizado el siguiente protocolo:

- En una placa de 96 pocillos, se mezclan 15 µl de medio diluido / estándar con 200 µl de mezcla de reacción. (La mezcla de reacción se obtiene añadiendo 1.6ml de ODD a 100 ml de solución de la enzima PGO).
- Incubar la placa a 37° durante 30 minutos
- Leer la absorbancia a 450 nm
- Calcular la concentración de glucosa en las muestras utilizando la recta patrón para extrapolar la concentración.

La absorbancia fue medida utilizando un lector de microplacas Tecan SunriseTM. Para calcular la cantidad de glucosa consumida, restamos las concentraciones obtenidas en el momento final de las concentraciones del medio original. Se normalizó la concentración de glucosa consumida en las muestras cuantificando la proteína de las muestras.

5.3 Producción de lactato

La concentración de lactato fue determinada utilizando una reacción enzimática, catalizada por la Lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH convierte NAD^+ y lactato en piruvato utilizando NADH. Para mantener la reacción en esa dirección, el NAD^+ es añadido en exceso. NADH tiene una longitud de absorción alrededor de 340 nm, la cantidad de NADH producida será proporcional a la concentración de lactato de la muestra. Puede ser utilizado danto absorbancia como fluorescencia

para cuantificar el NADH producido. Para una mayor sensibilidad se recomienda fluorescencia, utilizando placas blancas de 96 pozos.

La mezcla de la reacción está compuesta por buffer (0,3 M sulfato de hidracina y 0,87 M de glicina pH 9.5) al que se le añade 2,5 M de NAD+ (Sigma, #10127981001) y 0.19 M EDTA (pH 8,5). El siguiente protocolo utilizado fue:

- En una placa de 96 pozos se mezcla 10 µl de medio/estándar y 200 µl de la reacción *mix*.
- Se midió la absorbancia a 360 nm o fluorescencia con excitación a 360 nm y emisión 460 nm. Se realiza una primera lectura a tiempo 0 para establecer la autofloresencia posible. T0
- Se añaden 25 µl de la solución de trabajo de LDH (Roche, #10127876001). Finalmente se prepara a una dilución a una concentración de 344 unidades/ml en un buffer 0,5x
- Se incuba la placa durante 20 minutos en temperatura ambiente
- Se mide la absorbancia a 360 nm o la fluorescencia a 360 de emisión y 460 de absorbancia. T1
- Restando la T0 de la T1 se calcula la absorbancia final de NADH producido en esta reacción.
- Finalmente se calcula la concentración de lactato usando una curva estándar para extrapolar de la longitud de onda a una concentración conocida.

Para calcular la cantidad de lactato producido, restamos las concentraciones originales de lactato en medio del valor obtenido midiendo la concentración de lactato en medio después de cultivar con células. La concentración de proteínas o CV se utilizaron para normalizar la concentración de lactato en las muestras.

5.4 Concentración de ATP mediante fluorescencia

La cantidad de ATP en las muestras se detectó por reacción dependiente de luciferina-luciferasa-ATP. En esta reacción, se consume ATP y se emite luz cuando la luciferasa cataliza la oxidación de la luciferina. La luz emitida se mide con un luminómetro.

Las muestras para el ensayo de ATP se prepararon mediante el método de extracción con agua hirviendo que será descrito a continuación. Posteriormente se utilizó reactivo de luciferina-luciferasa altamente estable (rLucHS, Biovision, # K790-1000). rLucHS es sensible a la luz y se recomienda realizar todos los pasos del ensayo con luz tenue. Además, rLucHS es muy sensible y es importante para evitar la contaminación con fuentes exógenas de ATP (bacterias, huellas dactilares, etc.).

Protocolo de extracción y cuantificación de ATP:

La extracción con agua hirviendo fue descrita como la más adecuada para el análisis de rutina del ATP celular[144]. Las células se cultivaron en placas de 12 pocillos antes del análisis y fueron lisadas al mismo tiempo con agua hirviendo.

- Se aspira el medio y se limpia las células dos veces con PBS.
- Se añade el agua hirviendo (500 µl/pocillo) y se resuspenden las células mediante pipeteo repetido. (Las pipetas con puntas de plástico pierden precisión cuando se usa agua caliente. Por lo tanto, se usaron pipetas Pasteur de vidrio con una marca de 500 µl para agregar agua hirviendo).
- Se transfieren los extractos a eppendorfs, se agitan en vortex vigorosamente
- Se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm a 4° durante 5 minutos.

- Se mezclan 80 µM de mQ H2O con 10 µl de rLucHS reconstituido en un tubo eppendorf. Se procede a leer el eppendorf sin muestra para eliminar el ruido de fondo.
- Se añaden 10 µl de muestra en cada eppendorf y se cuantifica la luz en un luminómetro
- Se calcula la concentración de ATP por muestra gracias a una recta patrón realizada previamente.

La luminiscencia se midió utilizando un luminómetro TD 20/20, para normalizar las muestras se utilizó la concentración de proteína analizada posteriormente

5.5 Flujo Glucolítico

El principio metabólico por el cual se determinó la velocidad glucolítica fue midiendo la liberación de tritio de D- [5-3 H] glucosa a [3 H] agua en la reacción catalizada por enolasa, fue realizado en colaboración con la Dra. Petra Hyrossova. Las células fueron sembradas en una placa de 12 pozos ($3x10^5$ células por pozo), una vez adheridas y antes de medir, se incubaron en medio basal con 1 µCi de D-[5-3 H] glucosa (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO) por mililitro de medio durante 60 minutos. Después de la incubación, 50 µl de medio se alícuota y son transferidos a 36 microtubos sin tapa que contenían previamente 50 µl de 0.2 N HCL. Cada tubo se colocó en un vial que contenía 0,5 ml de H_2O fría, evitando el contacto entre el agua en el vial y el contenido del microtubo. Los viales se sellaron para permitir que el agua [3 H] se evapore del microtubo y se condense en los 0,5 ml de agua en el fondo del vial. La difusión tuvo lugar durante 24h a 37°C. Las cantidades de agua [3 H] difundida y no difundida se determinaron por recuento de centelleo. Se usó una muestra de control que no contenía células para corregir el agua [3 H] en la glucosa D- [5-3 H]. Además, se usó una muestra que contenía una cantidad conocida de agua [3 H] para determinar la integridad de la difusión. Los resultados fueron normalizados por proteína posteriormente.

5.6 Cuantificación NAD^+/NADH

Las concentraciones de NAD^+/NADH fueron determinadas con el kit NAD^+/NADH- Glo™ (cat. G9071, Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante y en colaboración con la Dra. Petra Hyrossova. La concentración de proteína fue utilizada para la normalización.

5.7 Procesamiento de muestras de proteómica

$1x10^6$ de células p53 -/- o p53/Brca2 -/- fueron sembradas en placas de 10 cm de diámetro, al cabo de 12 horas fueron tratadas con 5 mM de metformina durante 48 horas. Las 12 horas del punto final el medio fue cambiado por medio DMEM con piruvato glutamina y en presencia de 25 mM de D-glucosa marcada (U-13C6, Cat. CLM-1396-1, Cambridge Isotope Laboratories Inc, Andover, MA).

Pasadas 12 horas las células fueron lavadas en PBS, levantadas 5 minutos con acutasa y resuspendidas en 1 ml de PBS frío. Posteriormente fueron centrifugadas a 300 g durante 5 minutos y el pellet fue congelado en nitrógeno líquido. Los pellets fueron almacenados a -80ºC hasta que fueron enviados al Dr. Oscar Yanes para realizar la metabólica.

6. Citometría

6.1 Detección de la masa mitocondrial (MitoTracker)

Las células fueron sembradas en una placa de 6 pozos, sembrando $5x10^4$ por pozo, que pasados dos días lleguen a una confluencia aproximada del 80%. El día de la lectura se añade el reactivo de *MitoTracker* a una concentración final de 5 µM tal y como especifica la compañía. Se deja incubando durante 10 minutos y se procede a retirar

el sobrenadante con el reactivo, lavando las células dos veces con PBS, tripsinizándolas y centrifugándolas. Con la mayor brevedad posible se resuspenden las células en tubos de citometría en 300 µl de HBBS al 1% de BSA/EDTA y se procede a la lectura en el citómetro.

6.2 Cuantificación ROS mitocondriales (MitoSOX)

Las células fueron sembradas en una placa de 6 pozos, sembrando $5x10^4$ por pozo, para que después del tratamiento (48h) llegarán a una confluencia aproximada del 80%. El día de la lectura se añade el reactivo de *MitoSox* a una concentración final de 5 µM tal y como especifica la compañía. Se deja incubando durante 10 minutos y se procede a reiterar el sobrenadante con el reactivo, lavando las células dos veces con PBS, tripsinizándolas y centrifugándolas. Con la mayor brevedad posible se resuspenden las células en tubos de citometría en 300 µl de HBBS al 1% de BSA/EDTA y se procede a la lectura en el citómetro.

6.3 Citometría de flujo para valorar la histona H2AX

Las células son sembradas en una placa de 6 pozos a una densidad de 50 000 células por pozo, para que 48 horas después se llegue a una confluencia aproximada del 80%. Todas las células son tripsininadazas, lavadas con PBS y centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Es entonces cuando son resuspendidas en 100 µl de PFA 4% y alicuotadas en tubo os de 15 ml, se deja incubar el PFA durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Una vez terminada la incubación, las células son lavadas con 1ml de PBS y centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpms. Se resuspenden las células con 100 µl de 1X Buffer de saponina: PBS, 1%BSA, 0,1% acida, Ph 7,4) y 5 µl de suero de cabra, se deja bloqueando durante 15 minutos a RT en oscuridad. Pasado ese tiempo se vuelve a lavar añadiendo 1ml de buffer de saponina 1x, y se centrifuga 5 minutos a 1000 rpm. Se resuspenden las células con 100 µl de saponina y se añade el anticuerpo primario a 1:100 anti-phospho-histone H2A.X (Ser139) anticuerpo (Cat. ab11174,

Abcam, Cambridge, UK), se deja incubar a RT en oscuridad durante 30 minutos. Se vuelve a lavar con saponina y centrifugar. Es entonces cuando se resuspenden con 100 µl de saponina y se añade el secundario Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Invitrogen, TermoFisher) dejándolo otros 30 minutos en oscuridad a RT. Por último, se realiza el lavado con saponina y se centrifuga por última vez. El pellet de células es resuspendido en 300 µl de saponina y alicuotando en tubos de citometría estériles, procediéndose a la lectura en el citómetro galios.

6.4 Apoptosis

2x 10^5 células fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm, 24h después se trataron con olaparib 5 µM o metformina 5 mM durante 2 días más. El día de la lectura, las células fueron alicuotadas en tubos de 15 ml y centrifugadas a 300 g durante 5 minutos. Posteriormente fueron resuspendidas en una concentración de 5 x10^5 células/ml de 1X PBS-1%FBS. Se mezclaron con 100 µl de la suspensión celular con el tampón del kit Annexina-V (1: 1; Muse ™ Annexin V & Dead Cell Assay, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Pasados 20 minutos de incubación a temperatura ambiente las células fueron examinadas por un citómetro de células Muse ™ (Merck Millipore)

7.Ensayo de ciclo celular

Después de dos días con el tratamiento de metformina a 2mM, las células fueron contadas y un millón de células fue centrifugado a 600g durante 5 minutos. El pellet de células fue resuspendido en 100 µl de buffer de citrato (250 mM sucrosa, 40 mM citrato de sodio deshidratado, pH 7,6) y tratadas con Acutasa. Las muestras fueron tratadas con ioduro de propidio en hielo durante 10 minutos. Una vez lavadas fueron analizadas en el *FACS scaliburub* utilizando el sofware ModFit.

Hipótesis: ¿El daño crónico en el ADN o bloqueo de la HR crónico produce un shift o una selección de células que han cambiado su metabolismo para poder sobrevivir a la situación?

Objetivos

El principal objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar la correlación entre los defectos de reparación en la recombinación homóloga o daño crónico en el ADN y la adaptación metabólica que se lleva a cabo para poder sobrevivir en esa situación en el cáncer de ovario seroso de alto grado. Como objetivos concretos de la tesis tenemos:

A) Generación y caracterización de modelos que padezcan daño crónico en el ADN o sufran defectos en la reparación por recombinación homóloga.

B) Estudiar los mecanismos de adaptación metabólica de estos modelos celulares al daño crónico y los fallos en la recombinación homologa

C) Ver el papel que pueden jugar inhibidores de la cadena respiratoria como posibles tratamientos a tumores de estas características y las interacciones con otros tratamientos que se utilizan actualmente.

Resultados

Esta tesis comienza con la generación de un modelo celular de resistencia al tratamiento estándar en cáncer de ovario, Cisplatino o CDDP. Este modelo se ha generado adaptando las células a sobrevivir en presencia de dosis bajas, que van creciendo con el tiempo, como está descrito en la metodología. Es importante destacar que con este tipo de selección las células se están adaptando activamente al tratamiento, no estás únicamente seleccionando células que consigan sobrevivir, estás seleccionando células que se consigan adaptar rápidamente a sobrevivir a dosis bajas permanentes. Este tipo de generación de resistencia continuada es diferente a una generación por "selección" o "pulsátil", es decir, tratar a las células con un "shock" de quimioterapia, una dosis muy alta que elimine las células que no tengan los mecanismos necesarios para sobrevivir a la primera dosis elevada de tratamiento. Con esta generación de resistencia a "Shocks" terminarás seleccionando principalmente células con mecanismos "innatos" de resistencia, células que, por sus características en el momento del tratamiento, consiguen sobrevivir a la dosis elevada. En cambio, con la selección continua, terminas con una población de células que se ha adaptado a vivir con la droga; al haber sido tratada con dosis bajas, no se han seleccionado las células que consiguen sobrevivir al "pulso" de cisplatino, sino que, al ser una dosis no letal, se permite que la célula active procesos para desarrollar un fenotipo molecular que le permita proliferar en condiciones adversas. Con el tiempo la dosis de tratamiento va aumentando paulatinamente, ya que las células al haber tenido tiempo para realizar una adaptación consiguen proliferar cada vez en dosis mayores de cisplatino.

1. Problemas crónicos en la integridad del ADN aumentan el metabolismo oxidativo

1.1 Evaluación de la resistencia a cisplatino en el modelo celular de resistencia SKOV-3-R12

Para comprobar si realmente se había conseguido que las células se hayan adaptado al CDDP se realizó un ensayo de proliferación con MTT para comprobar si había aumentado la IC50 en las células SKOV-3-R12 (Fig: 1). Para ello se sembraron 1000 células, que fueron tratadas durante 5 días. Se observó una IC50 de 2,79 µM para las SKOV-3, mientras que nuestras células resistentes SKOV-R-12 tenían una IC50 de 22,45 µM. Por lo tanto, se demostró que las células en las que habíamos generado resistencia adquirida lográbamos subir la IC50 en 8 veces más que en la línea parental. Por lo que teníamos un modelo valido para caracterizar su expresión de proteínas en las vías que consideráramos oportunas.

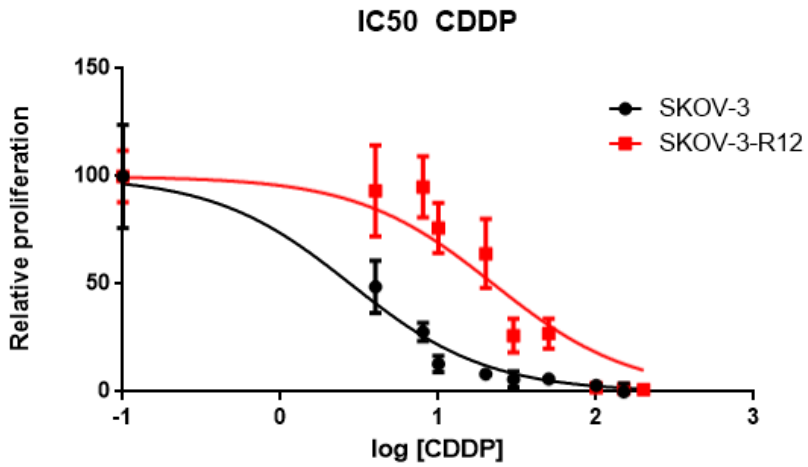


Figura 1 Células Skov-3-R12 son más resistentes a CDDP: Células SKOV-3 o SKOV-3-R12 fueron incubadas durante 3 días bajo un rango de concentraciones crecientes de Cisplatino. La viabilidad fue determinada utilizando la absorbancia mediante una tinción de cristal violeta. Los resultados son expresados relativos al control en ausencia de cisplatino. Cada punto individual representa la media de 8 replicados independientes.

1.2 Las células Skov-3-R12 consumen más oxígeno y tienen más daño crónico en el ADN

En primer lugar, teníamos que comprobar si realmente las células resistentes padecían de daño crónico en el ADN. Para ello dejamos de tratar las células con cisplatino durante 2 meses. Decidimos analizar los niveles de fosforilación de la histona H2A.X, esta histona incrementa su fosforilación cuando se produce daño en el ADN[145]. Observamos un incremento significativo de la fosforilación en las células SKOV-R12, esto nos indicaba que, tras cesar el tratamiento, las células seguían padeciendo daño en el ADN.

El siguiente paso era comprobar qué sucedía con el consumo de oxígeno de forma basal. Para ello, utilizamos un respirómetro de alta resolución (Oroboros O2k) en colaboración con el Dr. José Carlos Perales del laboratorio de biofísica de la facultad de medicina de Bellvitge. Con este instrumento es posible analizar el consumo de oxígeno en tiempo real de la línea parental Skov-3 y la línea resistente Skov-3-R12. Se aprecia que las células Skov-3-R12 consumen significativamente más oxígeno que la línea parental (58±5 vs 39±4 pmol/sec respectivamente) (Fig:2) Por lo tanto, hemos confirmado los resultados previos, demostrando que las células resistentes, que han sido sometidas a un tratamiento constante, que ha desencadenado un aumento del daño en el ADN crónico, han respondido aumentando su metabolismo oxidativo.

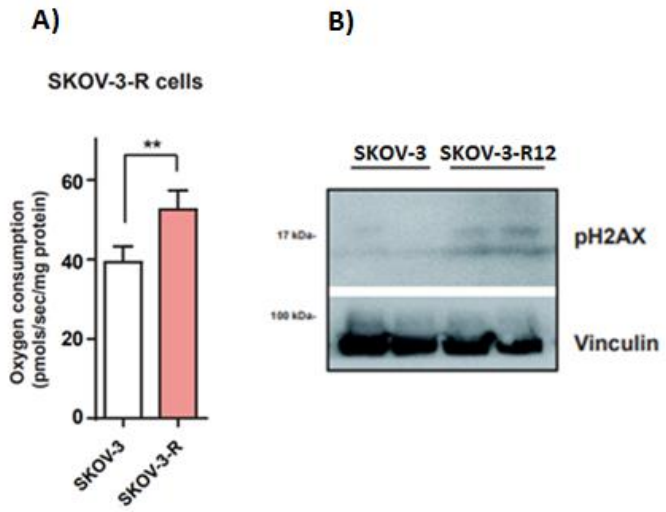


*Figura 2: Las células SKOV-R12 tienen más consumo de oxígeno y más daño en el ADN: A) Ratios de consumo de oxígeno medido mediante Oxygraph-2K en células SKOV-3 control (n=5) y SKOV-3-R (n=5). Las barras indican la media y el error estándar. Los datos son significativamente diferentes utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney: **=P=0,007 B) Se analizaron los niveles basales de fosforilación de la proteína H2AX mediante Western blot, en las líneas SKOV3 y SKOV-3-R12. Se utilizó como control de carga Vinculina.*

1.3 Evaluación de la expresión protéica de marcadores mesenquimales en SKOV-3-R12

Ya que las características fenotípicas mesenquimales está descrito que proporcionan una mayor resistencia a las células cancerígenas de ovario[146,147], se decidió evaluar mediante Western blot la expresión de dos proteínas que son marcadores utilizados para observar si se ha producido una transición epitelio mesénquima (EMT del inglés *Epithelial–mesenchymal transition*). Un descenso en la E-cadherina y un aumento en la vimentina está vinculado a un perfil más mesenquimal, mientras que niveles más elevados de E-cadherina y bajos de vimentina están asociados a un perfil epitelial[148].

Observamos un aumento de la expresión de vimentina en las SKOV-3-R12 y una bajada en la expresión de E-cadherina, todo esto comparado a la línea parental SKOV-3 (Fig: 3). Por lo que podemos inferir que las células SKOV-3-R12 en su proceso adaptativo al cisplatino, han realizado una transición a un fenotipo más mesenquimal.

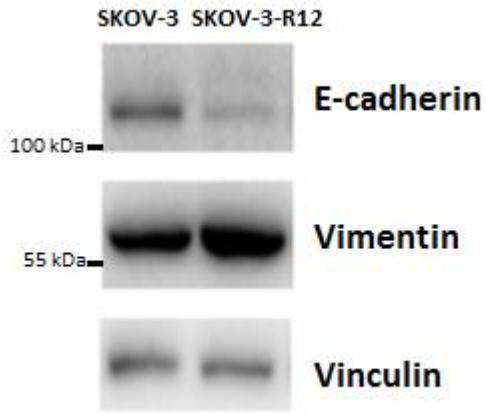


Figura 3: las células SKOV-3-R12 tienen un perfil de expresión más mesenquimal. Niveles de expresión de las proteínas E-cadherina, Vimentina. Se utilizó vinculina como control de carga.

1.4 Niveles de expresión de enzimas clave en el metabolismo celular en las células SKOV-3-R12.

Teniendo en cuenta que nuestras células R12 habían desarrollado un fenotipo más mesenquimal y que esta transición puede llevar consigo a cambios metabólicos[149] ya que existen datos en la bibliografía que indican, que pueden reprogramar su metabolismo para adaptarse a la nueva situación[150], decidimos estudiar los niveles de expresión de unas cuantas proteínas clave en el metabolismo por si nos daba algún indicio de que se había producido un cambio metabólico en este proceso adaptativo de resistencia. Evaluamos los niveles de expresión de 2 proteínas que nos podían aportar rasgos metabólicos: la fosforilación de la acetil-CoA-Carboxiliasa (ACC) y los niveles de expresión de GLUT1 (Fig: 4). La ACC es una enzima clave en la regulación de la biosíntesis de los ácidos grasos, su actividad es regulada por fosforilación siendo esta inhibitoria. Se observó que las células Skov-3-R12 presentaban una mayor fosforilación de la ACC, lo que nos daba un indicio de que existía un desequilibrio entre el balance anabolismo/catabolismo de los ácidos grasos en estas células resistentes, decantándose la balanza hacia el catabolismo, dirigiendo los ácidos grasos principalmente hacia la síntesis de Acetil-CoA. Por otro lado, se cuantificó la expresión de GLUT1, uno de los transportadores principales de glucosa hacia el interior de la célula. Cuando se analiza por Western blot, esta proteína muestra un patrón de bandas ya que GLUT1 se encuentra sujeta a glicosilaciones que terminan dando un patrón de bandas en forma de múltiples bandas. Se vio claramente una bajada significativa en los niveles totales de GLUT1 en las células SKOV-3-R12, con este dato solo se podía intuir que probablemente estas células no tuvieran tanta necesidad de internalizar glucosa, bien fuera porque no era su sustrato principal o eran más eficientes utilizando glucosa y no necesitaban tanta capacidad de internalización.

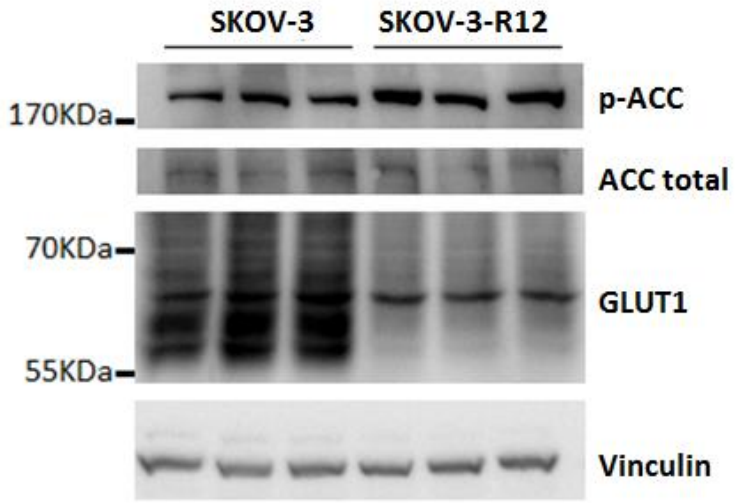


Figura 4: Perfil metabólico de las células SKOV-3 y SKOV-3-R12. Niveles de fosforilación de la proteína ACC, niveles de expresión de las proteínas ACC y GLUT1, en las líneas celulares SKOV-3 y SKOV-3-R12. Se utilizó vinculina como control de carga.

1.5 Secuenciación de las células SKOV-3 CRISPR-CAS9 BRCA2 -/-

Con el fin de generar un nuevo modelo de daño en el DNA debido a fallos en la HR, se intentó eliminar la expresión del gen BRCA2 en células SKOV-3. Para demostrar que se había realizado una mutación en el gen BRCA2, se secuenció dicho gen de las células SKOV-3 BRCA2 -/- justo en la secuencia target del CRISPR-CAS9. De color amarillo se ha resaltado la secuencia target del gRNA del CRISPR, en la fila superior se observa la secuenciación de la secuencia estándar de unas células humanas en las que no hay mutación. Justo en la segunda fila está la secuenciación que realizamos de nuestras células SKOV-3 Brca2 -/-. Como se puede apreciar en la figura 5, existen cambios en la secuencia correcta, por lo que podemos confirmar que la técnica funcionó correctamente y que el clon SKOV-1.2 padece una mutación que termina truncando la expresión de BRCA2.

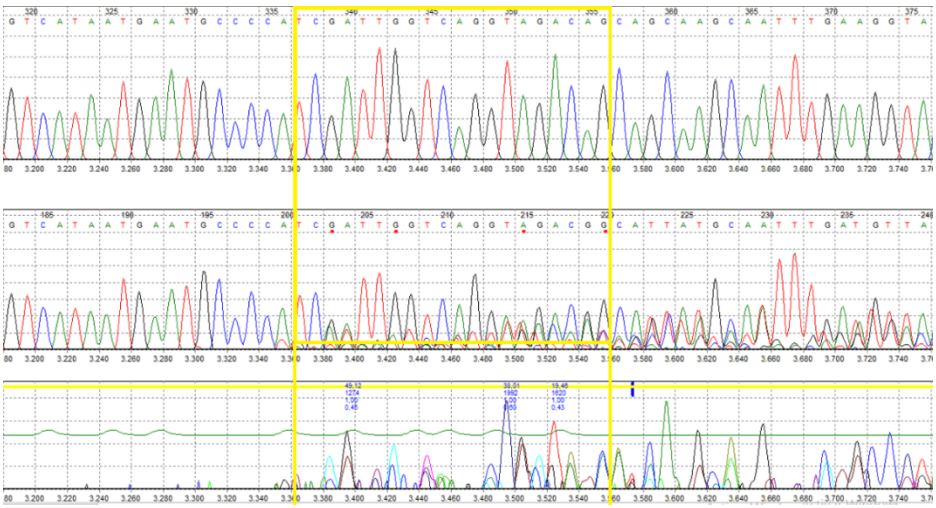


Figura 5. Las células SKOV-3 CRISPR CAS9 BRCA2 -/- tienen alteraciones que cambian la pauta de lectura. Se purificó el ADN de las células SKOV-3-SC y SKOV-3 BRCA2 -/-, fue enviado a secuenciar a la empresa STABvida.

1.6 Células con mayor sensibilidad a olaparib tienen aumentado el consumo de oxigeno

Para observar si era posible extrapolar la hipótesis de que problemas en los mecanismos de reparación o situaciones de inestabilidad genómica generaban una adaptación metabólica, que producía un aumento en el metabolismo oxidativo, decidimos utilizar diferentes modelos celulares. Se han caracterizado los diferentes modelos en función a su sensibilidad a olaparib, asumiendo que las células más sensibles a olaparib indicaban una mayor necesidad de reparación del ADN mediante PARP y por lo tanto una mayor inestabilidad genómica. El primer modelo fue proporcionado por el Dr Xing y Dr.Orsulic (USA, UCLA), estas líneas celulares provienen de tumores de cáncer de ovario murinos generados, con alteraciones genómicas en Trp53-/-, Myc y Akt, en las que se deleccionó la expresión de BRCA1 mediante *small hairpin rna*[151]. El segundo modelo utilizado son las células SKOV-3 que mediante la tecnología CRISPR se les ha deleccionado BRCA2 (SKOV-3 BRCA2 -/-) con su control negativo infectadas con un vector vacío (SKOV-3-SC). Este

modelo fue generado para demostrar de nuevo la asociación entre problemas en los mecanismos de reparación HR (Brca-/-) y el aumento del metabolismo oxidativo. El modelo fue generado justo al final de la tesis, por lo tanto, solo nos dio tiempo a realizar los experimentos claves, ver su sensibilidad a olaparib y su consumo de oxígeno.

En todas las líneas celulares se realizaron ensayos de proliferación para valorar la sensibilidad a inhibidores de PARP1 (olaparib). Si las células están sometidas a daño crónico en el ADN, los mecanismos de reparación cobran mucha más importancia, por lo tanto, nuestra hipótesis era que estas líneas celulares podían ser más dependientes de mecanismos de reparación dependientes de PARP, siendo más sensibles a inhibidores como olaparib. Todas las líneas celulares que fueron presuntamente catalogadas como inestables genómicamente eran más sensibles a olaparib. En el primer modelo, las células que tenían expresión de Brca1 (Trp53-/-) tenían una IC50 de 5,9 µM mientras que se eliminaba BRCA1 (Trp53/Brca -/-), las células se volvían mucho más sensibles a olaparib teniendo una IC50 de 0,63 µM (Fig: 6A). El segundo modelo pasó de tener una IC50 en las células donde no se había eliminado BRCA2 (SKOV-3-SC) de 6 µM a 3,3 µM (Fig: 6B) cuando se eliminaba la expresión de BRCA2 (SKOV-3-BRCA2).

El siguiente paso fue valorar si estas células que padecían problemas en los mecanismos de reparación o bien mutaciones que aumentaban la inestabilidad genómica, incrementaban su metabolismo oxidativo. Se cuantifico el consumo de oxígeno en tiempo real en todas las líneas observando en todas las mismas tendencias: todos los modelos celulares en que aumentaba la sensibilidad a olaparib, aumentaba el consumo de oxígeno. Ya sea en Trp53 -/- vs Trp53/BRCA1 -/- (54,0±2,8 vs 67,5±4,0 pmol/sec) o en SKOV-3-SC vs SKOV-3-BRCA2-/- (53,0±3,2 vs 78,1±7,3pmol/sec, respectivamente) (Fig: 6C) todas las líneas catalogadas con inestabilidad genómica aumentaban su metabolismo oxidativo.

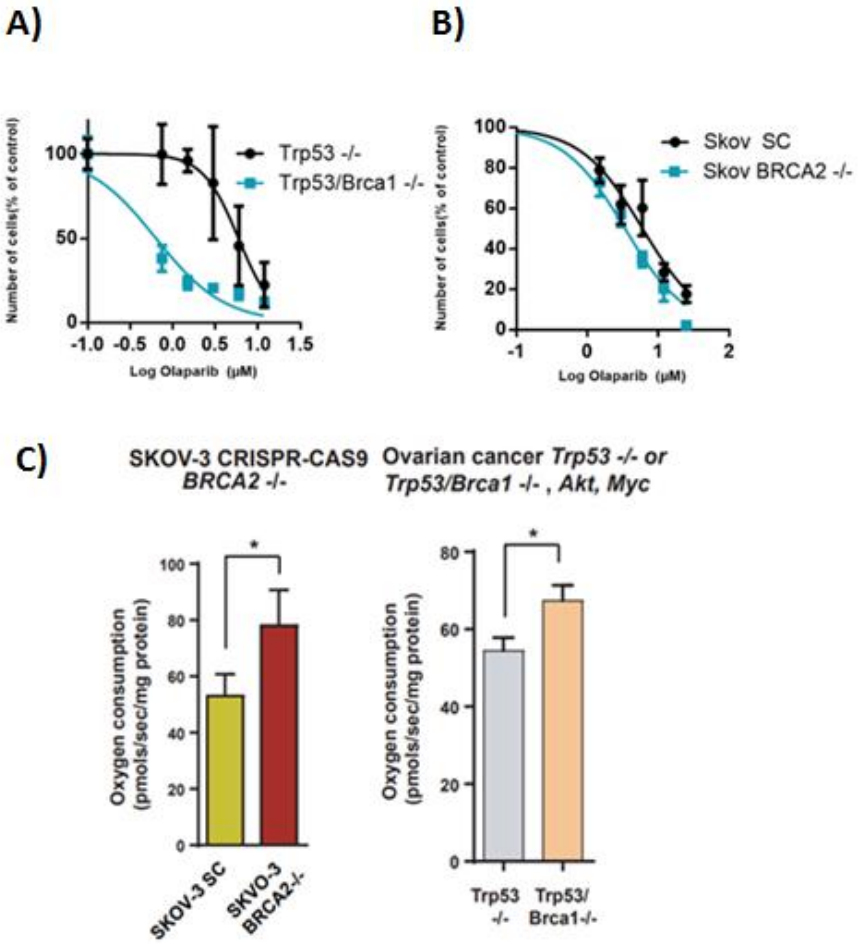


Figura 6: A mayor consumo de oxígeno mayor sensibilidad de olaparib.

A) *Células Trp53 -/- y Trp53/Brca1 -/- fueron incubadas durante 3 días bajo un rango de concentraciones crecientes de Olaparib. La viabilidad fue determinada utilizando la absorbancia mediante una tinción de cristal violeta. Los resultados son expresados relativos al control en ausencia de olaparib. Cada punto individual representa la media de 8 replicados independientes.* B) *Células Skov SC y Skov BRCA2 -/-fueron incubadas durante 3 días bajo un rango de concentraciones crecientes de Olaparib. La viabilidad fue determinada utilizando la absorbancia mediante una tinción de cristal violeta. Los resultados son expresados relativos al control en ausencia de olaparib. Cada punto individual representa la media de 8 replicados independientes.* C*) Ratios de consumo de oxígeno medidos mediante Oxygraph-2K en células SKOV-3 SC control (n=5) vs SKOV-3 BRCA2 -/- n=3 Los datos son significativamente diferentes utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney: *P = 0,0238, TRP53 -/- vs Trp53 BRCA 1-/-. (n=8). Las barras indican la media y el error estándar. Los datos son significativamente diferentes utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney: *P = 0,0281.*

1.7 Las células p53/Brca2 -/- tienen mayor daño crónico en el ADN, mayor consumo de oxígeno y mayor sensibilidad a olaparib

Para tener un modelo en el cual exista inestabilidad genómica, pero se pueda controlar el *backgraound genético*, algo que era imposible en el modelo de SKOV-R12, se decidió utilizar un modelo isiogénico murino, en el cual se había eliminado la expresión del gen BRCA2 mediante CRISPR-CAS9. Este fue el principal modelo de esta tesis generado mediante la tecnología CRISP, que produce una delección de la proteína BRCA2 en células ID8 (células de cáncer de ovario seroso murinas). Para que esta delección pueda tener lugar es necesario también eliminar la expresión del gen p53, todos los experimentos se realizarán comparando las células deleccionadas únicamente de p53, con las células doble deleccionadas p53/Brca2-/-. Estas células fueron generadas en el laboratorio de Ian McNeish y están descritas en el siguiente articulo (Walton et al., Cancer Res 76: 6118, 2016).

En primer lugar, queríamos confirmar que estas células realmente tenían daño crónico en el ADN, por lo que hicimos el Western blot contra la histona H2Ax para chequearlo. Como se puede apreciar en la figura 7A se confirmó el aumento de fosforilación, confirmándose así que se producía un incremento del daño en el ADN al tener eliminada la expresión de BRCA2. De la misma forma que con las líneas anteriores, se realizó una IC50 de olaparib para observar el impacto de bloquear los sistemas de reparación dependientes de PARP1. Tal y como esperábamos, las células que padecen la doble mutación (p53/Brca2-/-) son mucho más vulnerables a la inhibición de PARP1 que las p53 -/- (Fig: 7C), confirmando que la delección de BRCA2 produce un aumento de la dependencia de los mecanismos de reparación dependientes de PARP1. Esto que ya había sido descrito en la bibliografía[152,153], nosotros lo utilizamos para demostrar que el proceso de eliminación de la expresión de BRCA2 ha sido correcto y estábamos trabajando con un modelo adecuado.

El siguiente punto fue medir el consumo de oxígeno en tiempo real (Fig. 7B), el menor consumo es el de las células ID8 control (43±4,3 pmol/sec), seguido de las células p53 -/- (62±4,9 pmol/sec). El mayor consumo de oxígeno registrado fue el de las células doble mutadas p53/Brca2 -/- (79±6,1 pmol/sec). Con todo esto se demostró que las células que tienen problemas en los mecanismos de HR, tienen niveles mayores de daño en el ADN de forma basal, mayor sensibilidad a inhibidores de PARP y también son las que tienen el mayor consumo de oxígeno.

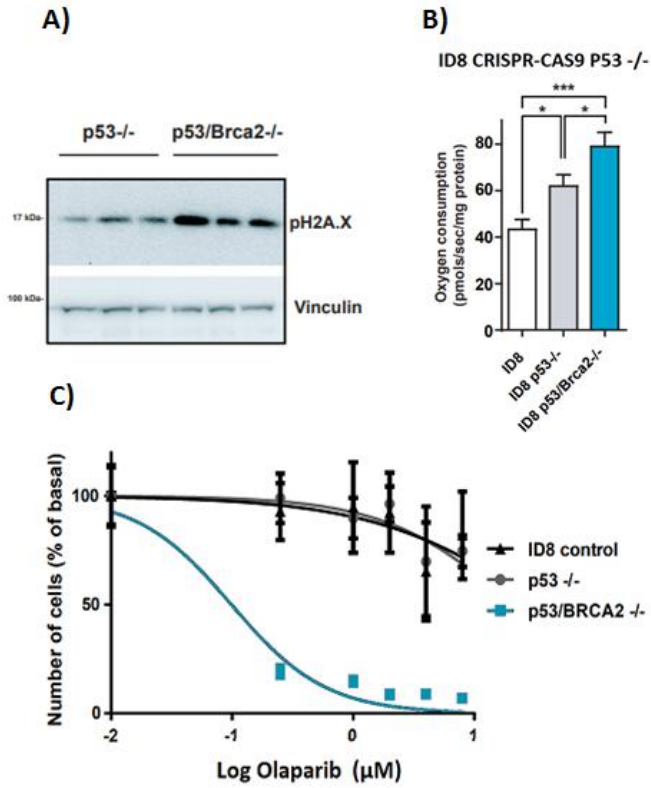


Figura 7: Las células p53/Brca2 -/- tienen mayor daño crónico en el ADN, mayor consumo de oxígeno y mayor sensibilidad a olaparib. A) niveles de fosforilación de la histona H2AX mediante western blot de las líneas celulares ID8 p53 -/- vs p53/Brca2 -/-. Se utilizó Vinculina como control de carga.

*B) Ratios de consumo de oxigeno medidos mediante Oxygraph-2K en células ID8 control (n=10), ID8 p53-/- (n=18) vs p53/Brca2 -/- (n=17). Los datos son significativamente diferentes utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney: ID8 control vs p53 -/- * P=0,0266, ID8 control vs p53/Brca2 -/- ***P = 0,0009, and p53 -/- vs p53/Brca2 -/- *P = 0,0204.*

C) Células ID8 control, p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días bajo un rango de concentraciones crecientes de Olaparib. La viabilidad fue determinada utilizando la absorbancia mediante una tinción de cristal violeta. Los resultados son expresados relativos al control en ausencia de olaparib. Cada punto individual representa la media de 8 replicados independientes.

1.8 Las células p53/Brca2 -/- tienen un leve aumento en la masa mitocondrial

Para poder determinar si este aumento en el consumo de oxígeno era debido únicamente a un aumento de la masa mitocondrial, decidimos evaluarla. Utilizamos dos reactivos que responden al número de mitocondrias y a su potencial de acción (*Mitotracker*) o únicamente al número de mitocondrias independientemente del potencial de acción (*Mitogreentracker*). Ambos reactivos son internalizados por la célula viva y posteriormente cuantificados mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. Utilizando el primer reactivo (*Mitotracker*) observamos en la Figura 8A una leve tendencia a dar más señal en las células p53/Brca2 -/-, pero no llega a ser significativa. Cuando utilizamos el segundo reactivo (*Greentracker*) el cual es independiente de carga, se pueda apreciar esta vez mediante citometría que hay un incremento del 15% (Fig: 8C), incremento no es significativo estadísticamente.

Para abordar otra aproximación a la hora de determinar si existían diferencias en el número de mitocondrias, se cuantificó la expresión de una proteína considerada "*house keeping*" mitocondrial, VDAC Esta proteína es un canal mitocondrial, que suele ser utilizada para normalizar "la masa mitocondrial". Como se puede apreciar no existen diferencias apreciables en cuanto a la expresión de VDAC entre muestras (Fig: 8B). También decidimos observar si había aumentado algún factor de transcripción que promueva la mitogénesis, como PCG1α, pero en el único factor que observamos diferencias fue PPARγ[154], donde se apreciaba un ligero aumento de la expresión en las células doble mutadas (Fig: 8C). Otro factor que analizamos fue BACH1, donde observamos una bajada significativa en los niveles de mRNA de las células p53/Brca2 -/-. Si bien todas estas diferencias pese a ser sutiles, podían contribuir en la diferencia de consumo de oxígeno, opinamos que era factible también que las células estuvieran teniendo cambios en los flujos metabólicos, por lo que decidimos seguir profundizando.

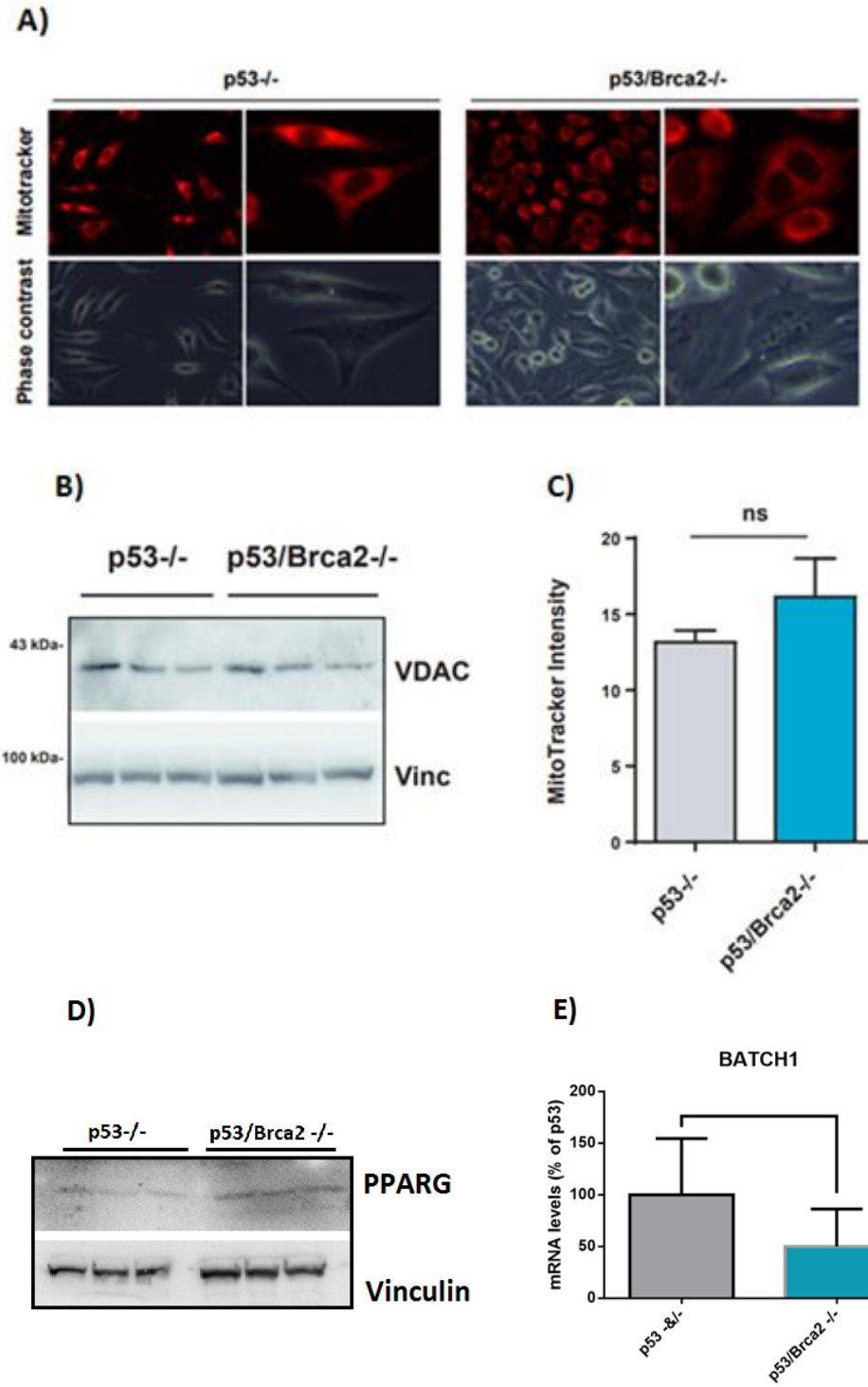

A)
p53-/-
p53/Brca2-/-
Mitotracker
Phase contrast
B)
p53-/-
p53/Brca2-/-
43 kDa-
100 kDa-
VDAC
Vinc
C)
ns
MitoTracker Intensity
20
15
10
5
0
p53-/-
p53/Brca2-/-
D)
p53-/-
p53/Brca2 -/-
PPARG
Vinculin
E)
BATCH1
mRNA levels (% of p53)
200
150
100
50
0
p53 -&/-
p53/Brca2 -/-

Figura 8. Defectos en la reparación homologa no parecen incrementar la masa mitocondrial. A) Imágenes representativas de ID8 p53-/- vs p53/Brca2 -/- teñidas mediante Mitotracker (red) contrapuestas con contraste de fase.
B) Expresión de la proteína VDAC mediante Western blot en las células p53-/- y p53/Brca2 -/-. Se utilizó Vinculina como control de carga.
C) Células p53 -/- y p53/brca2 -/- han sido incubadas con Green Mitotrack, las células fueron fijadas y analizadas por citometría de flujo n=3.
D) Expresión de la proteína PPARγ mediante Western blot en las células p53-/- y p53/Brca2 -/-. Se utilizó Vinculina como control de carga.
E) Niveles de ARNm BACH1 en las líneas celulares las líneas celulares ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- (n=6).

1.9 Se observan pocas diferencias en la proliferación celular al deleccionar Brca2

Otro punto que queríamos aclarar era si al producir esta delección se producían cambios en la proliferación celular. Por esa razón realizamos un ensayo de proliferación, donde simplemente sembrando un numero predeterminado de células, se fueron levantando y contando día a día. No observamos diferencias significativas en ninguno de los puntos observados, lo que sí se apreció fue una clara tendencia de que las p53 -/- conseguían proliferar más rápido que las p53/Brca2 -/-, pero al no ser una gran diferencia, no fue significativo estadísticamente.

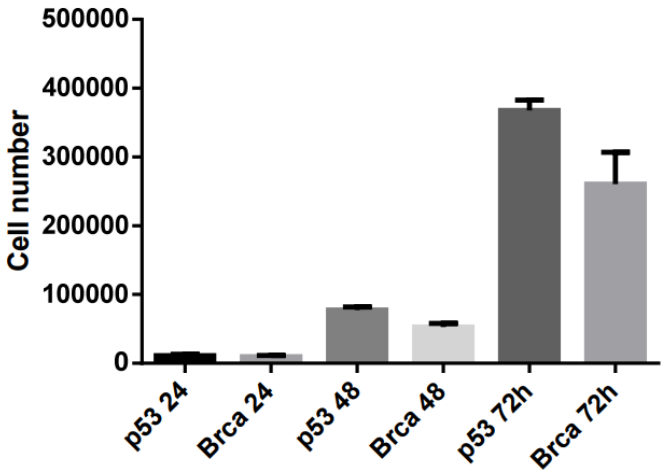


Figura 9: No se observan diferencias significativas en la proliferación celular al deleccionar Brca2. Se representan el número de células de 5 contajes independientes, realizados mediante cámara de Neubauer.

1.10 Las diferencias en el consumo de oxígeno únicamente aparecen con la glucosa como sustrato

Decidimos realizar el mismo experimento de consumo de oxígeno en tiempo real, pero incubando las células únicamente con un tipo de sustrato durante 48 horas. De esta forma podríamos dilucidar si había un sustrato predilecto que estuviera explicando las diferencias de consumo de oxígeno. Uno de nuestros candidatos eran los ácidos grasos, pero al incubar con el palmitato como único sustrato no apreciamos grandes diferencias, pese a que sí que se observaba que bajo palmitato las células p53/Brca -/- conseguían respirar casi el doble de oxígeno que las p53 -/-, pero teniendo en cuenta los números absolutos no era el sustrato que principalmente utilizaban las células.

Otro sustrato principal en el metabolismo oxidativo es la glutamina, pero no parecía haber diferencias entre ambas células. Ahora bien, en el caso de la glucosa sí que aparecieron grandes diferencias entre líneas, es con la glucosa como sustrato donde las diferencias entre líneas se acrecientan, algo que nos indica que la diferencia en el consumo de oxígeno radica en la utilización diferencial de la glucosa como sustrato.

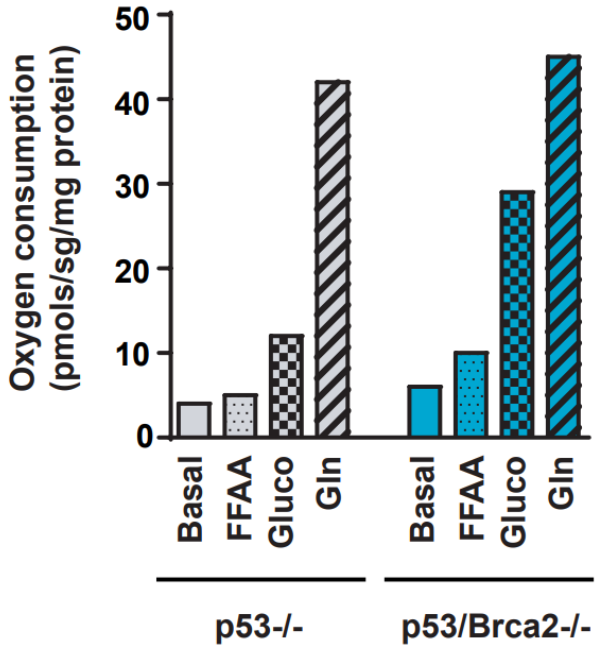


Figura 10: Las principales diferencias del consumo de oxígeno vienen de la glucosa como sustrato. Ratios de consumo de oxígeno son mesurados utilizando el Oxygraph-2K en ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/-. Las células fueron incubadas durante 2 días en medio basal Hank's (Basal), Hank's con 1mM de ácido palmítico (FFAA), con 25 mM de glucosa (Gluco) o 2mM de glutamina (Gln). Cada punto representa la media de dos lecturas independientes.

1.11 La delección de BRCA2 produce una bajada en la expresión de GLUT1 y un aumento de TIGAR

Teniendo presente en primer lugar, que los cambios en la masa mitocondrial no eran muy grandes y podían explicar solo en parte el aumento del consumo de oxígeno, así como el hecho de que la glucosa era el sustrato principal que contribuía a los cambios en el consumo de oxígeno, decidimos analizar los niveles de expresión de diferentes proteínas clave en el metabolismo glucolítico, como son GLUT1 y TIGAR. En primer lugar, se vio un claro descenso de la expresión en la proteína GLUT1, concretamente se observó un 55% de reducción de la expresión de GLUT1 en las células p53/Brca2 -/-. Debido a que estas células tenían un consumo de oxígeno aumentado, podría tener sentido observar una bajada en la expresión de GLUT1, ya que las células pueden ser más "eficientes" a nivel energético si priorizan el consumo de glucosa hacia Krebs y posteriormente hacia la cadena respiratoria. A su vez se apreciaba un marcado aumento de la expresión de TIGAR (3,7 veces más en las células doble mutadas), un regulador negativo de la glucólisis ya que inhibe la PFK1, otro resultado que iba en concordancia con el aumento del consumo de oxígeno. Mediante RT-PCR se analizaron la expresión del RNA mensajero de otras dos proteínas clave en el metabolismo glucolítico la Hexoquinasa I y la LDHA. La primera, cataliza la primera fosforilación de la glucosa una vez es internalizada, y en la que observamos un descenso de la expresión del 50% en las células doble mutadas. También se observa un descenso del 53% en la expresión del RNA mensajero en la LDHa, encargada de transformar el piruvato en lactato, algo que permite regenerar el NAD+ para que siga funcionando la glucólisis. Ambas proteínas tienden a tener niveles elevados de expresión en células que prioricen el metabolismo glucolítico no oxidativo.

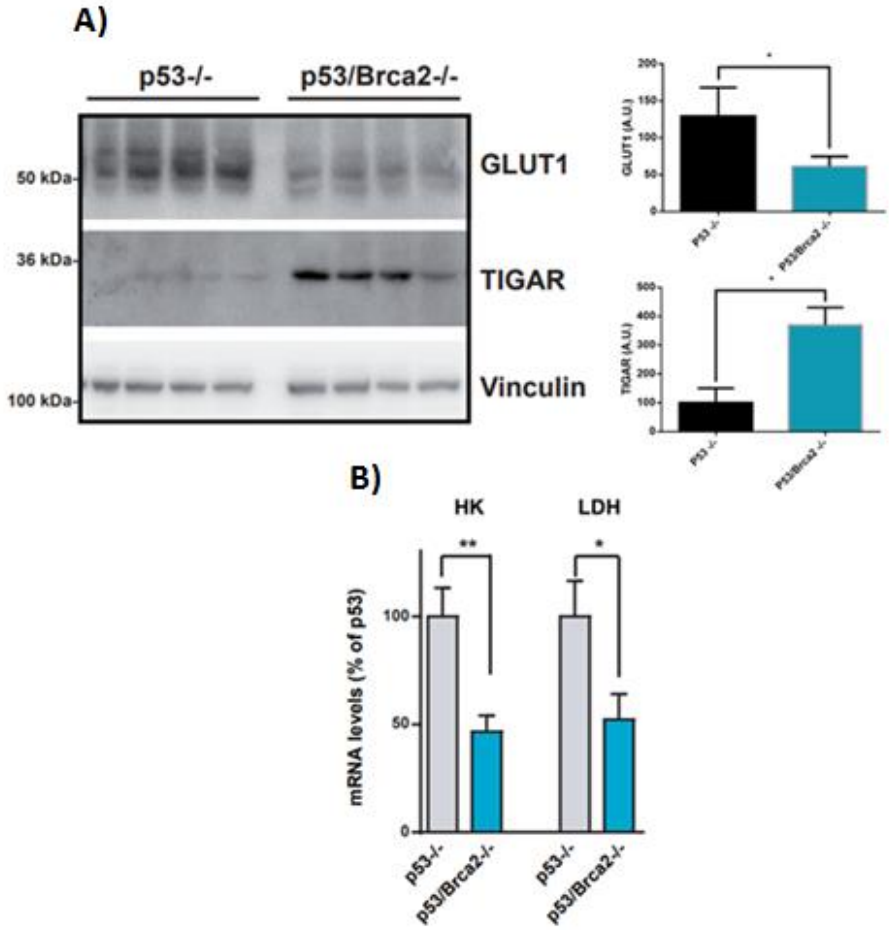


Figura 11: La delección de BRCA2 produce una bajada de GLUT1 y un aumento de TIGAR.
A) Niveles de expresión de GLUT1 y TIGAR en las líneas celulares ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/-. (n=4) Se utilizó Vinculina como control de carga. Utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney los resultados fueron significativos tanto para GLUT1 (*P=0,0286) como para Tigar (*P=0,0286)
B) Niveles de ARNm de la Hexoquinasa1 y LDHA en las líneas celulares las líneas celulares ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- (n=6). Utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney los resultados fueron significativos tanto para HK (**P=0,0095) como para LDH (*P=0,0381).

1.12 Las células p53/Brca2 -/- tienen un descenso en el flujo glucolítico y en el consumo de glucosa

Para comprobar si los patrones de expresión de GLUT1 y TIGAR se correspondían con una realidad funcional, se decidió realizar ensayos de flujo glucolítico y de consumo de glucosa. Utilizando glucosa marcada se comprobó que las células doble mutadas consumían menos

glucosa que las p53 -/-. Además, si nos fijamos en el flujo glucolítico, se observa que las p53/Brca2 -/- tienen un 18% menos flujo que las p53 -/- y a su vez, éste va asociado a un descenso en la producción basal de lactato (ultimo metabolito después de oxidar la glucosa hasta lactato). Niveles más elevados en la producción de lactato nos muestran que las células priorizan la utilización de glucosa para degradarla completamente a lactato en el caso de las células p53 -/-, mientras que las células doble mutadas prefieren utilizar la glucosa para generar piruvato, que posteriormente se comprobará si será utilizado para aumentar el flujo dentro del ciclo de Krebs.

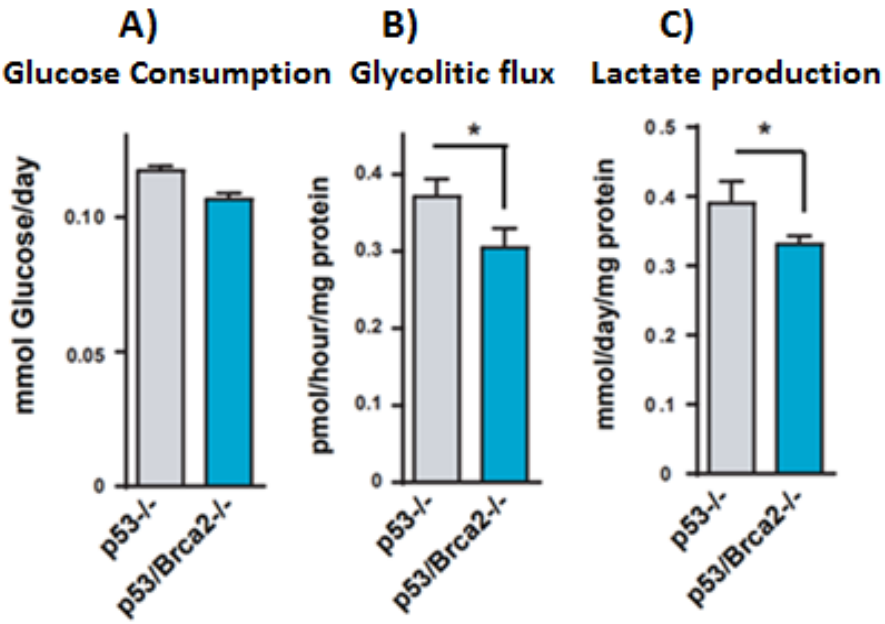


Figura 12: Las células p53/Brca2 -/- tienen un descenso en el flujo glucolítico. A) Consumo de glucosa (mmoles) medido bajo condiciones de DMEM en las líneas celulares ID8 p53 -/- vs p53/Brca2 -/- (n=3) durante 24h. Los datos han sido normalizados mediante proteína.
*B) El flujo glucolítico ha sido medido en p53-/- y p53/Brca2 -/- (n=3) durante 24h en medio DMEM completo en presencia de glucosa marcada durante 60 minutos. Se midió los pmoles de 3H H_20 producidos y el resultado se normalizó por proteína. Utilizando un test estadístico U-Mann-Whitney los resultados fueron significativos. *P=0,0153*
*C) Producción de lactato (mmoles) medida en medio DMEM de las células ID8 p53 -/- vs p53/Brca2 -/- (n=4) durante 24h. los datos han sido normalizados mediante proteína. Utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney los resultados fueron significativos. *P= 0,0236.*

1.13 Aumento en la actividad PDH y descenso en la de la ACC en p53/Brca2 -/-

Viendo que anteriormente los datos de expresión protéica nos proporcionaban indicios suficientes para poder generar hipótesis, que podíamos confirmar posteriormente con los experimentos de flujos, decidimos observar el estado de activación de proteínas clave en la regulación del flujo hacia ciclo de Krebs. Se observó en las células doble mutadas que existe una tendencia a tener un aumento en la fosforilación de la enzima ACC, pero al elevar ligeramente también sus niveles totales, esta no aparece significativa al realizar la estadística. La Acetil carboxilasa al encontrarse fosforilada se encuentra inhibida, esto nos indica que a menor actividad de la ACC menor anabolismo de los ácidos grasos, por lo que, en vez de estar sintetizándolos, probablemente la célula pueda estar realizando catabolismo de los mismos, aunque como ya hemos visto anteriormente no son el sustrato predilecto de las células p53/Brca2 -/-.

Por otro lado, sí que se observa un descenso significativo de la fosforilación del complejo PDH, extractos protéicos de las células p53/Brca2 -/- tienen un 58% menos de fosforilación en la PDH que las células p53 -/-. Este descenso puede ser producido por una bajada en la expresión de la PDK1, quinasa que fosforila directamente la PDH y que se encuentra infraexpresada en las células p53/Brca2 -/-.

Es necesario recordar que la inhibición de la PDH también es inhibitoria, por lo que menor fosforilación indica mayor actividad enzimática, teniendo en cuenta la función enzimática de la PDH, este resultado nos indica que las células mutadas de Brca2 priorizan la utilización de piruvato hacia Acetil-CoA, aumentando así el flujo hacia el ciclo de Krebs, terminando en la fosforilación oxidativa.

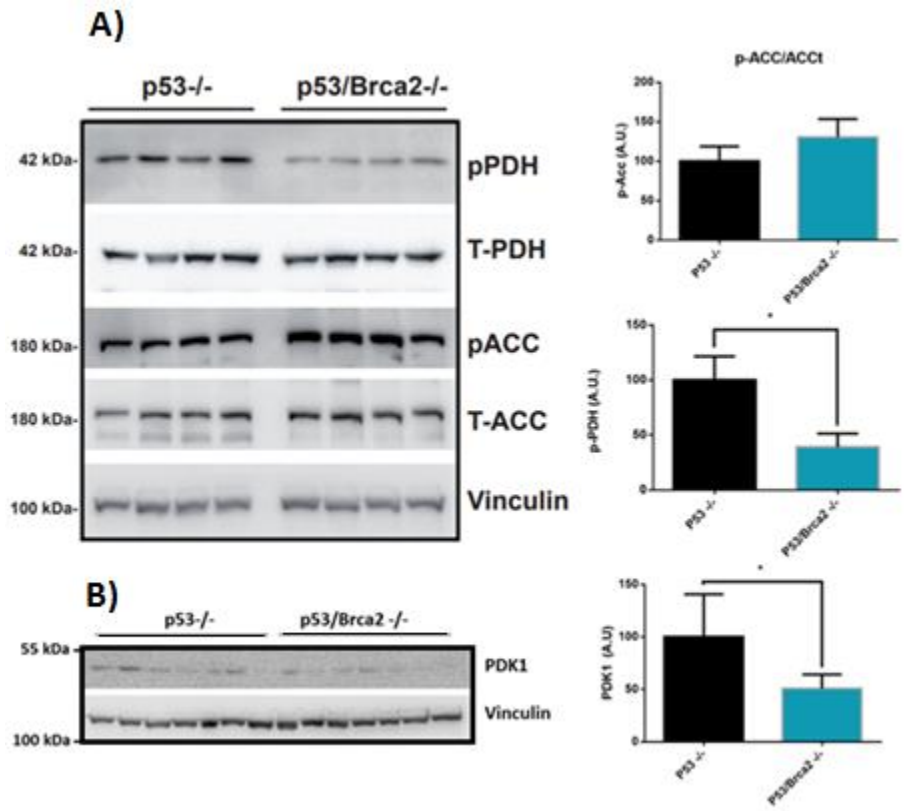


*Figura 13: Las células p53/Brca2 -/- tienen un aumento de la actividad PDH y un descenso en la de la ACC. A) Niveles de fosforilación de la PDH y la ACC en las células p53 -/- y p53/Brca2 -/- (n=4) mediante western blot. Los niveles han sido normalizados por sus proteínas totales respectivamente y a su vez la vinculina ha sido escogida como control de carga. Utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney los resultados fueron significativos para p-PDH (*P=0,0286). B) Niveles de expresión de PDK1 en p53 -/- y p53/Brca2 -/- (n=6) mediante western blot. Se utilizó vinculina como control de carga. Utilizando un test estadístico U- Mann-Whitney los resultados fueron significativos para PDK1 (*P=0,0177).*

1.14 En las células p53/Brca2 -/- se produce un aumento del ciclo de Krebs

Tras los resultados que nos proporcionaba el análisis de la expresión de puntos clave en el metabolismo, nuestra hipótesis de que las células doble mutadas tienen aumentado el ciclo de Krebs solo se podía sostener en base al descenso de la fosforilación inhibitoria de la PDH. Es por ello, que en colaboración con el Dr. Oscar Yanes, de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona) decidimos medir flujos

metabólicos mediante glucosa marcada, gracias a esta técnica podíamos ver si la glucosa era utilizada de forma diferencial al eliminar la expresión de Brca2. A partir de los resultados se observó un claro aumento casi generalizado de los metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs, la glucosa marcada estaba aumentada en las p53/Brca2 -/- en fumarato, aspartato, citrato y glutamato. Esto indicaba claramente un aumento en el ciclo de Krebs, algo que por otra parte estaba explicando el aumento en el consumo de oxígeno final. Este dato nos permitió confirmar nuestra hipótesis: uno de los motivos principales del aumento del consumo de oxígeno al deleccionar Brca2 es la utilización diferencial de la glucosa como sustrato, produciéndose un aumento del ciclo de Krebs.

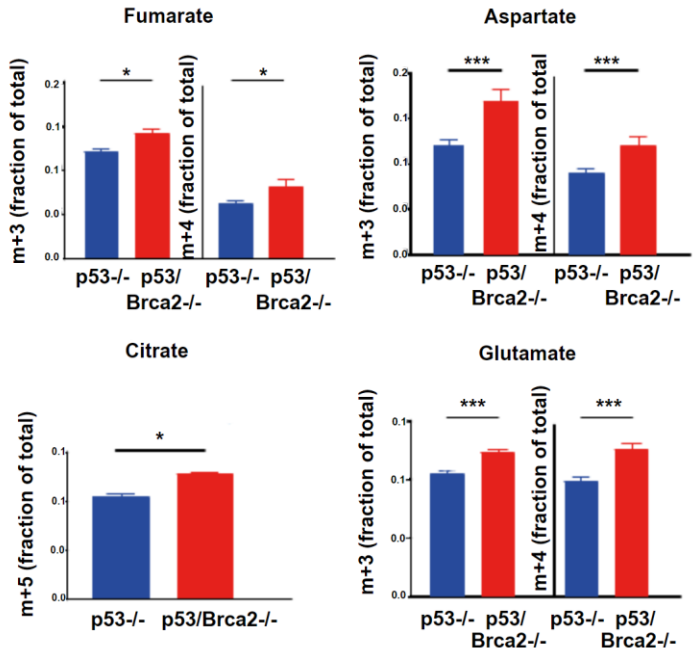


*Figura 14: En las células p53/Brca2 -/- se produce un aumento del ciclo de Krebs. Análisis de enriquecimiento metabólico dirigido utilizando Glucosa-C13-U. El enriquecimiento isotopológico de fumarato, aspartato (equilibrado con el grupo de oxalacetato) y glutamato (equilibrado con el grupo de a-cetoglutarato) se muestran para ilustrar la entrada en el ciclo TCA de carbonos del piruvato. El enriquecimiento de citrato m + 5 también se muestra como una medida de la capacidad de las mitocondrias para oxidar el piruvato completamente marcado Se muestra la media de cuatro replicas para cada línea celular. Significación estadística para citrato m+5 a través de la prueba estadística de la U de Mann-Whitney ID8 p53 -/- vs p53/Brca2 -/- *P=0,0286. Significación estadística a través de ANOVA unidireccional.*

A modo de resumen de la caracterización metabólica realizada, integrando la información que nos proporcionó los análisis de western blot, el flujo glucolítico, la producción de lactato y la metabólica, son resumidos en la siguiente figura:

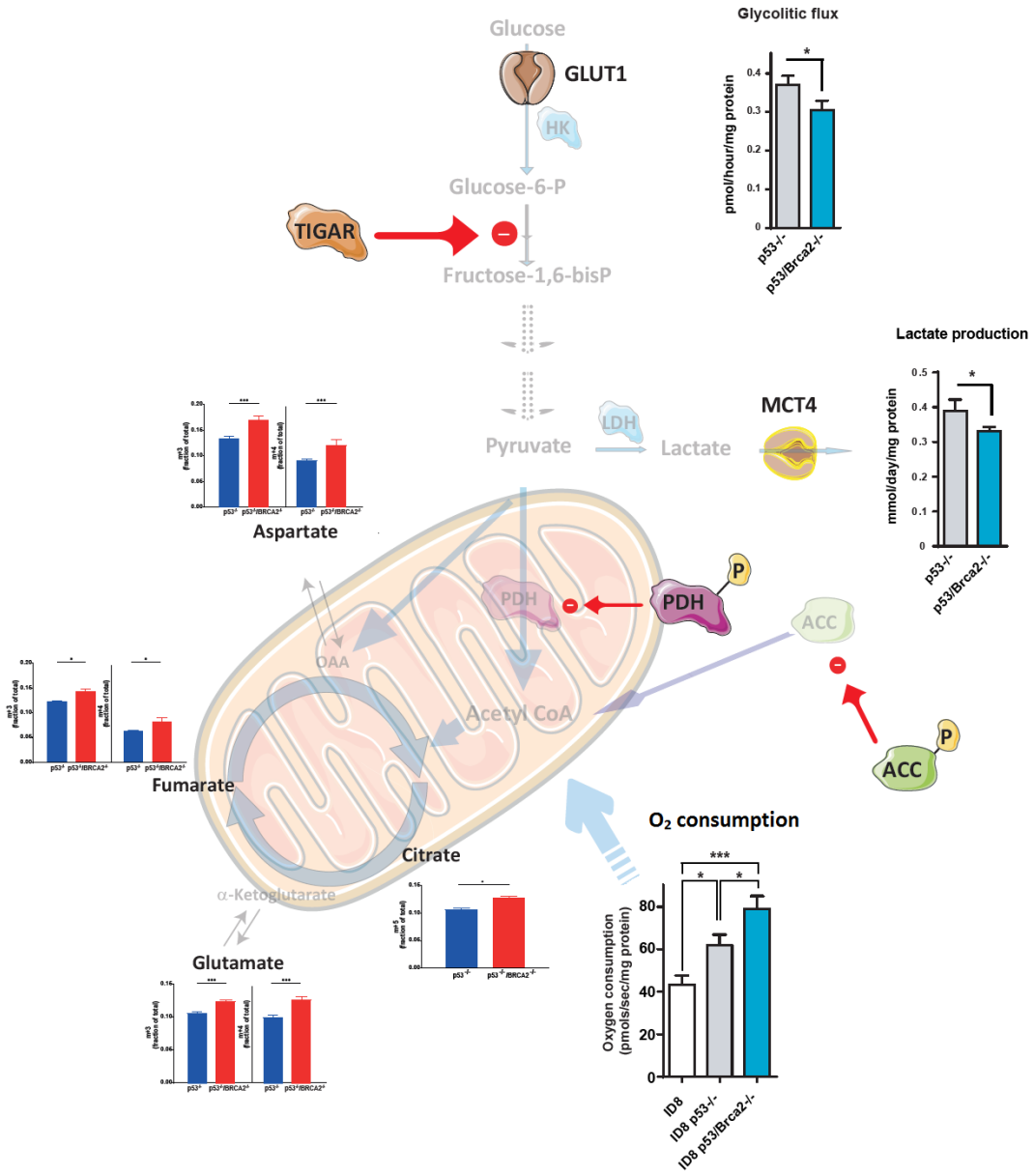


Figura 15. Esquema que resume los resultados poniéndolos en un contexto general.

2. El cambio metabólico está producido para mantener los niveles de ATP y NAD^+ con el fin de mantener la actividad PARP

2.1 Problemas en HR sensibiliza a inhibidores de la cadena respiratoria

Una vez demostrado que las células p53/Brca -/- consumían más oxígeno debido a que tenían aumentado el ciclo de Krebs, había que averiguar si eso había sido una consecuencia indirecta o si realmente el aumento del metabolismo estaba dando una ventaja de supervivencia a células con problemas en la reparación por HR. Para ello realizamos ensayos de proliferación con diferentes drogas que bloquean selectivamente los diferentes complejos de la cadena respiratoria. Se utilizó Rotenona, un potente inhibidor del complejo I, metformina que también bloquea el complejo I pero de una forma mucho menos potente que la rotenona y oligomicina, que bloquea la ATP sintasa (Complejo V). Estas drogas, consiguen bloquear la cadena respiratoria, produciendo a su vez un bloqueo del ciclo de Krebs y permitiéndonos comprobar si las diferencias metabólicas observadas son vitales para sostener la viabilidad celular en ausencia de Brca2.

Las células p53/Brca2 -/- eran más sensibles a los inhibidores del complejo I y el complejo V, en el caso de la metformina la IC50 pasaba de 8,2±0,7 mM en las p53 -/- a 5,2±0,5 mM en p53/Brca -/-; para rotenona 48,9± 8,2 nM vs 16,3±0,26 nM respectivamente, lo que supone un aumento de la sensibilidad del 67% en las células p53/Brca2 -/-. Por lo que respecta a la oligomicina, también se observaba la misma tendencia, la IC50 para las células p53-/- era de 1,36±0,26 nM mientras que para p53/Brca2-/- era de 0,53±0,1 nM. Esto nos demostraba que realmente esta adaptación que habían realizado las células era indispensable para la supervivencia celular. Es decir, el metabolismo

oxidativo les estaba dando algún tipo de ventaja que les permitía desarrollar un mecanismo alternativo para sobrevivir pese a tener problemas en la reparación por HR. Esto nos abría la posibilidad a desarrollar un nuevo enfoque de tratamiento a estos tipos de tumores que padecen mutaciones en proteínas clave en la recombinación homóloga como son BRCA1/2, ya que esta adaptación nos muestra una vulnerabilidad que puede ser explotada.

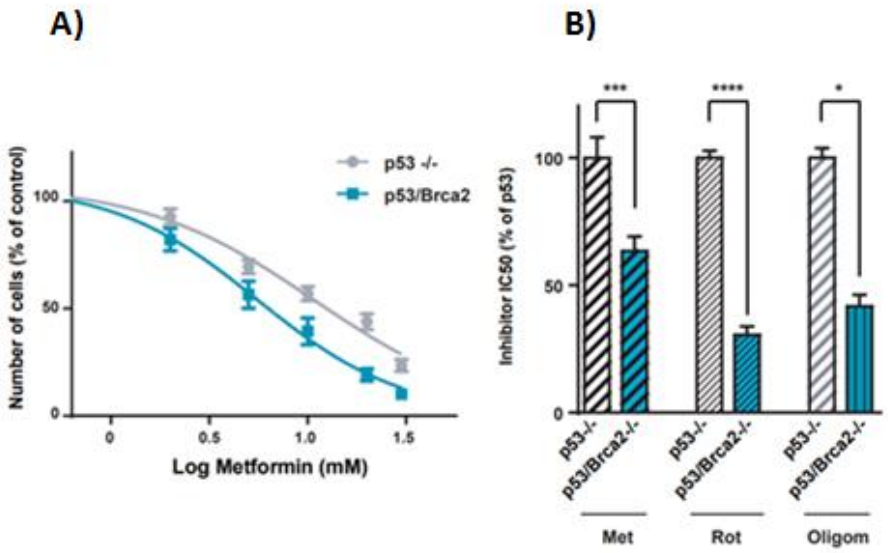


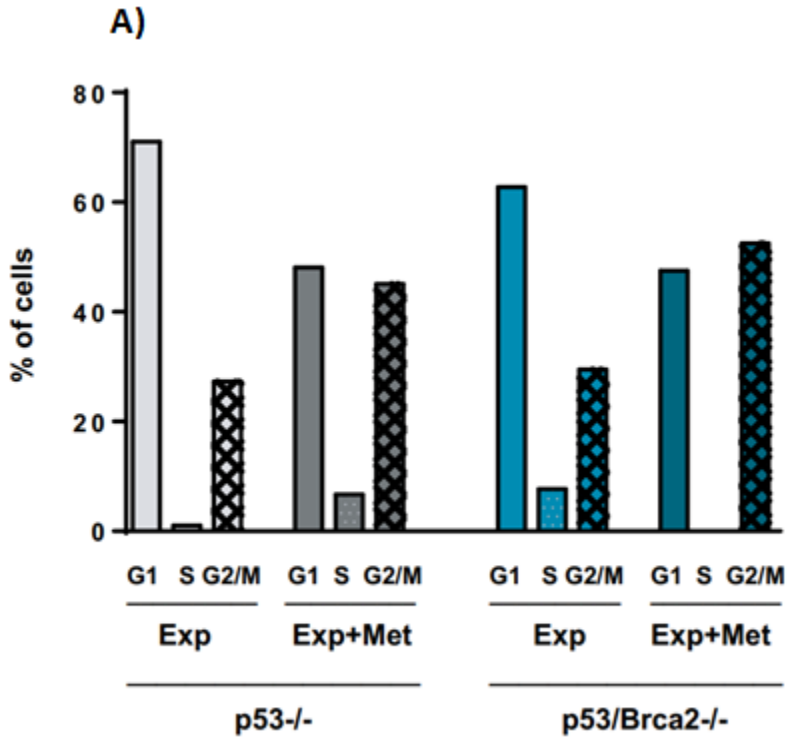
Figura 16: Problemas en HR sensibiliza a inhibidores de la cadena respiratoria

A) Células ID8 control, p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días bajo un rango de concentraciones crecientes de Metformina. La viabilidad fue determinada utilizando la absorbancia mediante una tinción de cristal violeta. Los resultados son expresados relativos al control en ausencia de Metformina. Cada punto individual representa la media de 8 replicados independientes.

*B) ID8 p53 -/- vs p53/Brca2 -/- han sido incubadas durante 3 días con rangos crecientes de metformina (Met), rotenona (Rot) u oligomicina (Oligom). La viabilidad fue determinada utilizando la absorbancia mediante una tinción de cristal violeta. Los resultados son expresados relativos al control en ausencia de tratamiento. Se determinó el 100% de la IC50 en función de la IC50 de las células ID8 p53-/-. Cada punto de datos representa la media y SEM de n = 16 (Met), n = 14 (Rote), o n = 4 (Oligom) determinaciones independientes, cada determinación constaba de 8 puntos independientes de lectura. La significación estadística utilizando una U de Mann-Withney es en el caso de la metformina entre p53-/- vs p53/Brca2 -/- ***P=0,0006, en el caso de la rotenona ****P=0,0001 y en el caso de la oligomicina *P=0,028.*

2.2 Metformina no incrementa la apoptosis, pero sí produce parada del ciclo celular

Con tal de identificar como la metformina afecta a la viabilidad celular, decidimos estudiar el efecto de la metformina sobre el ciclo celular y la apoptosis: Metformina produce una disrupción del ciclo celular en ambas líneas celulares. Bajo metformina desaparece la fase S en las células doble mutadas y disminuye la fase G1 en ambas líneas, aumentando la fase G2/M (Fig: 17A). En contraste, no se observó un incremento de la apoptosis bajo metformina en p53/Brca2 -/-, en cambio cuando se administró olaparib sí que se producía un claro incremento de la apoptosis (Fig: 17B)



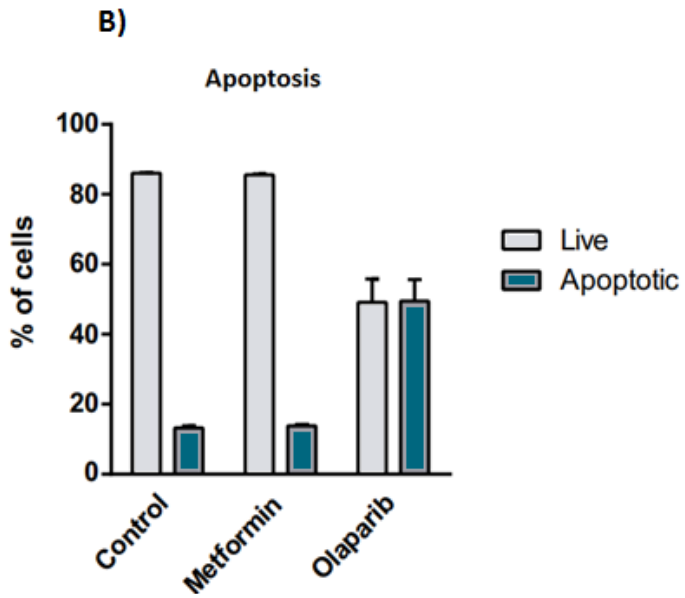


Figura 17. Metformina no incrementa la apoptosis, pero sí produce parada del ciclo celular
A) Células ID8 p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 2 días en medio completo DMEM en presencia o ausencia de 2 mM de metformina o 5 μM de olaparib. Después de ese tiempo, las células fueron incubadas con yoduro de propidio fijadas y analizadas por citometría de flujo. Se muestra la media de dos experimentos independientes.
B) Células ID8 p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 2 días en medio completo DMEM en presencia o ausencia de 2 mM de metformina o 5 μM de olaparib. Después de ese tiempo las células han sido fijadas y se han evaluado las células positivas por anexina V mediante citometría. Se muestra la media de dos experimentos independientes.

2.3 Al tratar con metformina se produce una bajada del ciclo de Krebs y una drástica reducción del consumo de oxigeno

En el experimento anterior habíamos demostrado que los inhibidores de la cadena respiratoria bloqueaban la proliferación celular de forma diferencial entre p53 -/- y p53/Brca2 -/-. Ahora bien, nos faltaba demostrar que realmente esta bajada diferencial estaba producida por el bloqueo de la cadena respiratoria y el ciclo de Krebs. En colaboración con el Dr. Oscar Yanes se realizaron flujos metabólicos de las células p53 -/- y P53/Brca2 -/- en ausencia o presencia de metformina durante 48 horas. Como se puede apreciar en la Figura 18, metformina bloquea completamente el ciclo de Krebs en todos sus intermediarios al mismo nivel en ambas líneas celulares. Por lo tanto, metformina, bloqueando el complejo I, consigue inhibir el ciclo de Krebs, bloqueando así la

adaptación producida en p53/Brca2 -/- y por lo tanto descendiendo significativamente la viabilidad celular.

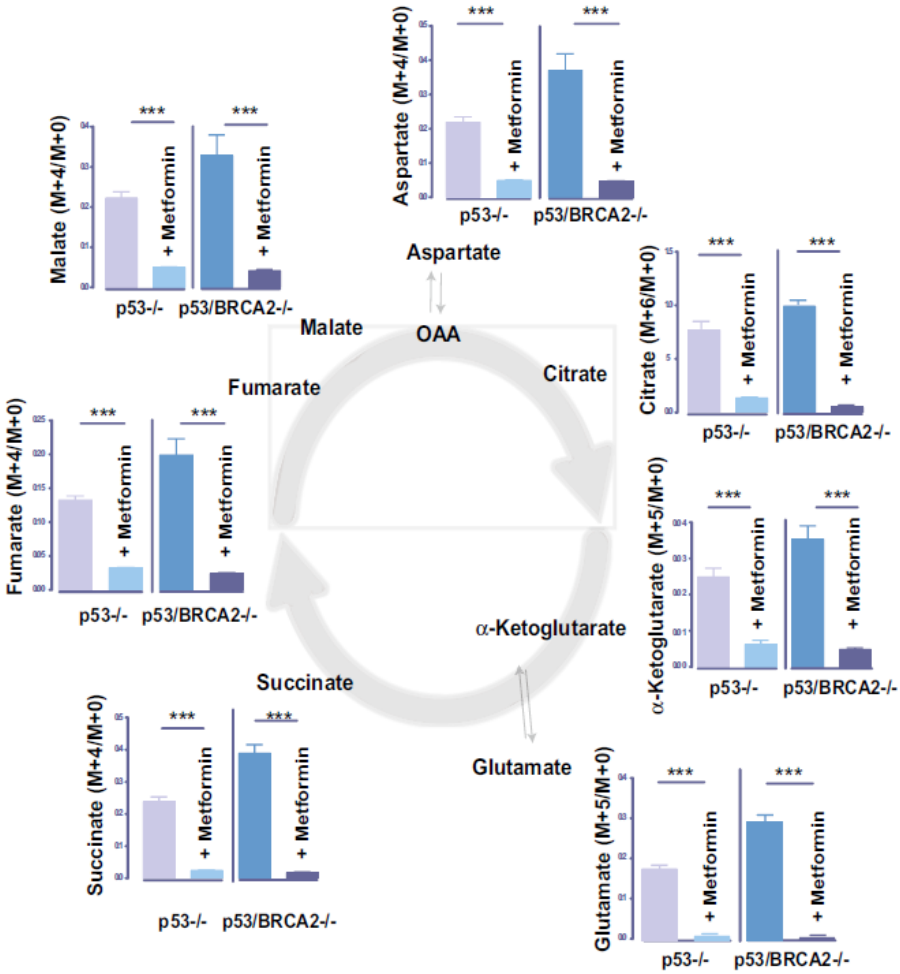


Figura 18. Al tratar con metformina se produce una bajada del ciclo de Krebs y una drástica reducción del consumo de oxígeno.
A) Ratios de consumo de oxígeno medidos utilizando el Oxygraph-2K en ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- . Las células fueron incubadas durante 2 días en medio basal con o sin metformina, los datos son la media de dos lecturas independientes.
*B) Flujos de glucosa carbono en metabolitos del ciclo TCA y sus vías de ramificación. Se muestra la proporción de la cantidad de isotopólogo completamente marcado y sin marcar para cada metabolito analizado por la metabolómica dirigida en células p53 -/- y p53/Brca2 -/-, en presencia o no de 5 mM metformina durante 2 días. Se muestra la media de cuatro réplicas para cada línea celular. Las barras de error indican el SEM. Significado estadístico de one way ANOVA: *** P <0,001.*

2.4 Metformina desciende los niveles del ratio NAD⁺/NADH y ATP en p53/Brca -/-

Un aumento en el metabolismo oxidativo da lugar principalmente a un aumento en la capacidad de producción de ATP, ya que es mucho más rentable a nivel energético oxidar la glucosa completamente en el ciclo de Krebs que no convertirla en lactato. A su vez la cadena respiratoria también consume NADH, convirtiéndolo en NAD^+, que mediante la lanzadera de malato/aspartato aumentará del ratio NAD^+/NADH en el citosol. Así que en colaboración con la Dr. Petra Hyrossova analizamos los niveles de ATP y NAD^+/NADH en nuestros modelos celulares en condiciones basales y con metformina:

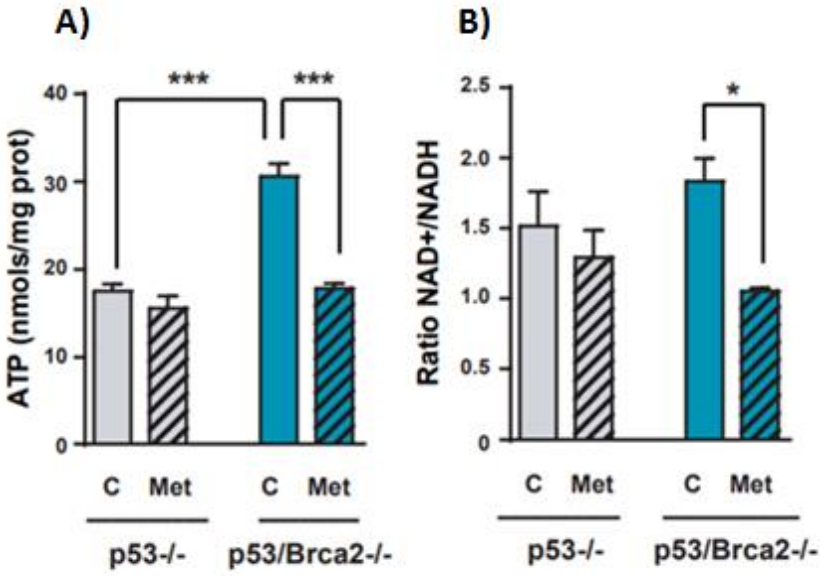


Figura 19: Metformina desciende los niveles del ratio NAD+/NADH y ATP en p53/Brca -/-
*A) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2-/- han sido incubadas durante 48h con medio completo DMEM en presencia o ausencia de 5 mM Metformina. Posteriormente fueron lisadas y se cuantificó la cantidad total de ATP respecto al total de proteína. Se muestran las medias de 7 experimentos independientes. Al realizar el test estadístico de la U de Mann-Whitney: ID8 p53 -/- basal vs p53/Brca2 -/- ***P=0,0006 y p53/Brca2 -/- basal vs p53/Brca2 -/- Met ***P=0,0006.*
*B) ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 48h con medio completo DMEM en presencia o ausencia de 5 mM Metformina. Las células fueron lisadas y se cuantificó el total de NAD+ y NADH utilizando el protocolo descrito anteriormente. Se representa la media de 3 lecturas independientes y normalizadas por proteína. Al realizar el test estadístico de la U de Mann-Whitney aparece significación estadística entre p53/Brca2 -/- basal y p53/Brca2 -/- metformina *P= 0,0286.*

En primer lugar, se observó que las células p53/Brca2 -/- a nivel basal tenían un 74% más de ATP, así como un 14% más del ratio NAD^+/NADH, principalmente debido a un aumento del 46% del NAD^+. Este dato, nos estaba dando un indicio de que la mutación de Brca2 genera una situación que requiere un aumento de la producción tanto de ATP como de NAD^+. Al bloquear la cadena respiratoria con metformina durante 48 horas, se producía una bajada significativa en los niveles de ATP, siendo más significativo el descenso en p53/Brca2-/- que en p53 -/- (42% vs 11%).

Bajo el mismo bloqueo de metformina, solo tenía lugar un descenso del NAD^+/NADH del 48% en las células p53/Brca2 -/-, algo que nos mostraba que este aumento del metabolismo oxidativo es el culpable del aumento del ratio NAD^+/NADH, ya que si se bloquea, se pone a niveles de p53 -/-, además que este efecto no tiene lugar en las células p53 -/-.

2.5 Metformina desciende la actividad PARP en p53/Brca2 -/-

Una bajada del ATP es coherente que desencadene una bajada en la proliferación, ahora bien, es importante destacar el otro metabolito que también se ve afectado por metformina, el NAD^+. Células que se encuentran en la situación de las p53/Brca2 -/- sin HR, necesitan de otros mecanismos de reparación alternativos para poder sobrevivir, estos mecanismos consumen mucho ATP, pero concretamente existe un mecanismo que también consume NAD^+, la reparación regulada mediante PARP1. Esta proteína de localización nuclear, poli-ADPribosila proteínas que son necesarias para la reparación del ADN. PARP1 tiene como combustible el NAD^+ que es consumido directamente y degradado hasta nicotinamida.

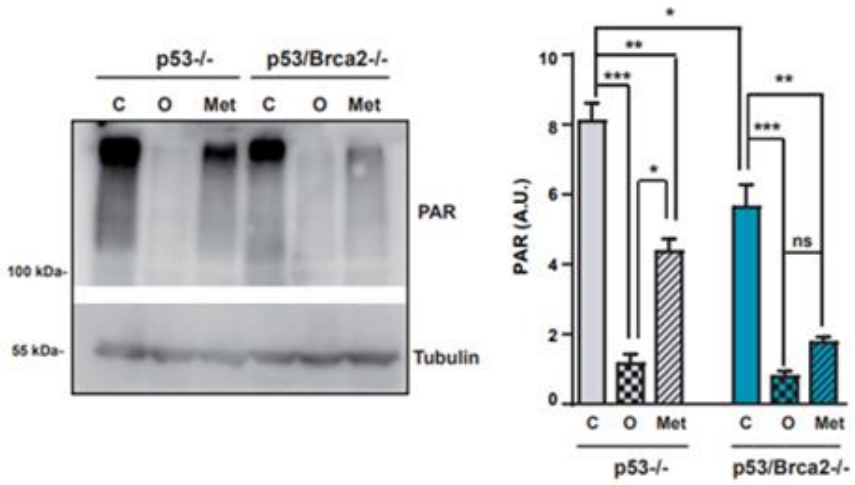


*Figura 20: Metformina desciende significativamente la actividad PARP en p53/Brca2 -/-. Expresión de proteínas Poli-ADP-Ribosiladas (PAR) y tubulina como control de carga analizado mediante western blot. Las células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas en presencia o ausencia de Olaparib 5 µM (O) o Metformina 5mM (Met). Se muestra un western representativo de cuatro experimentos independientes. Las barras muestran la media de expresión de proteínas Poli-ADP-Ribosiladas normalizada por tubulina de cuatro experimentos independientes. Mediante el test estadístico ANOVA de comparaciones múltiples aparecen diferencias significativas *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,005*

Al realizar un western blot contra la poli-ADP-Ribosilación, es posible ver las proteínas que hayan sido marcadas por PARP1 y por lo tanto nos muestra de una forma directa la actividad de la proteína. En primer lugar, los niveles basales de proteínas poli ADPribosilasdas se encuentran más elevados en las células p53 -/- concretamente un 25%. En segundo lugar, el segundo carril de cada línea celular nos muestra el efecto de olaparib, un inhibidor selectivo de PARP utilizado en las pacientes que padecen mutaciones en BRCA1/2 en cáncer de ovario. Como era de esperar el olaparib bloquea completamente la actividad en ambas líneas celulares. Ahora bien, cuando en el tercer carril añadimos metformina se aprecia que este inhibidor del complejo I consigue también descender la actividad de PARP1, siendo esa diferencia significativamente mayor en las células p53/Brca2 -/- ya que el descenso es del 63% mientras que en las p53 -/- es del 40%. De hecho, la bajada es tal en las células p53/Brca2 -/- que tienen una actividad

similar cuando se encuentran bajo olaparib que cuando son tratadas con metformina.

Al bloquear la cadena respiratoria con metformina, se producía una bajada en los niveles de NAD^+, haciendo bajar la actividad de PARP1, proteína que se ha convertido en esencial para estas células ya que no tienen BRCA2 y produciendo finalmente una bajada en la viabilidad celular.

2.6 Otros inhibidores de la cadena respiratoria también producen una bajada de la actividad PARP

Para comprobar si inhibidores diferentes del complejo I como la rotenona, o si bloqueando diferentes complejos de la cadena respiratoria como son el complejo III (Antimicina A) o el complejo IV (oligomicina), se sigue produciendo esta bajada en la actividad PARP, decidimos analizar la actividad PARP bajo los diferentes inhibidores. Como se puede apreciar, olaparib de nuevo bloquea completamente la actividad PARP y la metformina vuelve a producir una bajada de la actividad. Ahora bien, cuando bloqueamos únicamente el complejo III no se produce una bajada en la actividad PARP. En cambio, cuando bloqueamos el complejo I con rotenona o el complejo IV con oligomicina sí que se produce una bajada significativa de la actividad PARP.

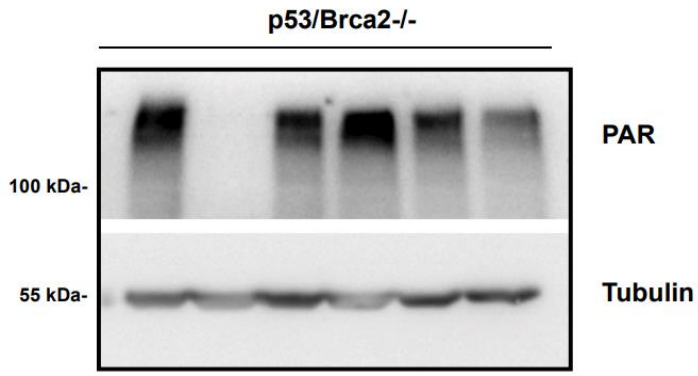


Figura 21: Inhibidores de la cadena respiratoria también bajan la actividad PARP. Expresión de proteínas Poli-ADP-Ribosiladas (PAR) y tubulina como control de carga analizado mediante western blot de las células ID8 p53/Brca2 -/- bajo diferentes inhibidores de la cadena respiratoria.

2.7 Metformina al bloquear la actividad PARP aumenta el daño en el ADN

Hemos comprobado que, al tratar las células con metformina, ésta baja los niveles de ATP y NAD+, haciendo bajar la actividad PARP, ahora bien, teníamos que demostrar si realmente era imprescindible e la actividad PARP para mantener a raya el daño en el ADN, manteniendo así la viabilidad celular en p53/Brca2 -/-. Para demostrar la hipótesis medimos los niveles de fosforilación de la histona H2AX, de dos formas diferentes, mediante western blot y mediante citometría de flujo. Los resultados nos mostraron en primer lugar, algo que ya habíamos comprobado anteriormente, de forma basal las células p53/Brca2 -/- tenían más fosforilada la histona y por lo tanto tenían basalmente más daño en el ADN, algo completamente lógico si tenemos en cuenta que tienen problemas en la reparación HR al tener silenciado el gen Brca2.

Ahora bien, al añadir metformina se observó que en las células p53/Brca2 -/- el daño aumentó significativamente, mientras que en las p53 -/- no lo hizo. Esto nos indica que realmente la metformina al bajar esa actividad PARP está aumentando el daño en el ADN disminuyendo así la viabilidad celular. En último lugar también se observó que inhibiendo PARP directamente con olaparib, el daño en el ADN se disparaba en las células p53/Brca2 -/-, dejando de manifiesto claramente que PARP es una pieza clave en el mantenimiento de la integridad del ADN en las células p53/Brca2 -/-. Y que, por lo tanto, el cambio metabólico se ha convertido en una adaptación necesaria en las células al haber suprimido Brca2, ya que es el encargado de poder suministrar combustible a este nuevo sistema de reparación. Si se bloquea esta adaptación metabólica utilizando metformina, bloquearemos el mecanismo de supervivencia en las células p53/Brca -/-.

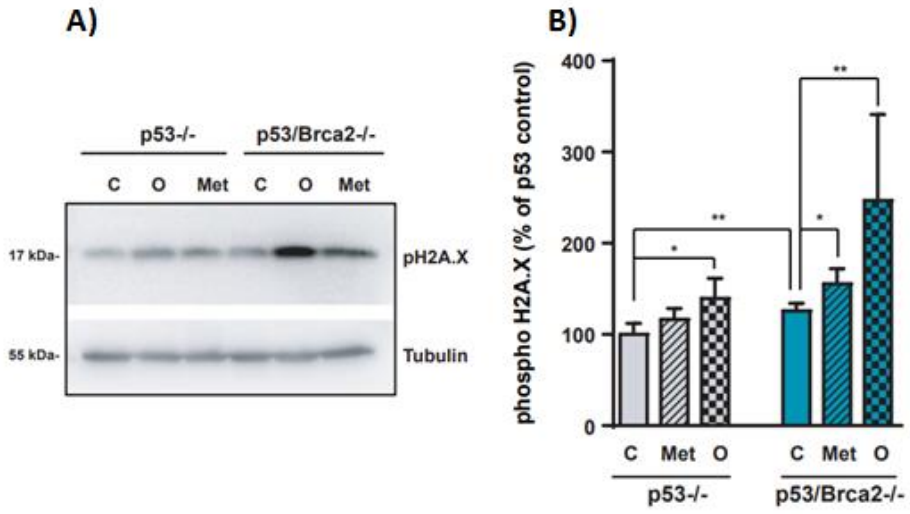


Figura 23. Metformina aumenta el daño en el ADN.
A) Fosforilación de la histona H2AX mediante western blot, se utiliza tubulina como control de carga. Las células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 48h con medio completo DMEM en ausencia (C) o presencia de 5mM de metformina (Met) o durante las últimas 12 horas en presencia de 5 µM de olaparib (O).
*B) Niveles de fosforilación de la histona H2AX analizados mediante citometría de Flujo en las células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/-. Las células -/- fueron incubadas durante 48h con medio completo DMEM en ausencia (C) o presencia de 5mM de metformina (Met) o durante las últimas 12 horas en presencia de 5 µM de olaparib (O). Cada barra representa la media de seis replicados independientes. Aparece Significación estadística utilizando el test estadístico de Mann Whitney entre p53 -/- basal vs p53/Brca2 -/- basal (**P=0,0087), p53 -/- control vs p53-/- olaparib (*P=0,019), p53/Brca2 -/- control vs p53/Brca2 -/- Metformina (*P=0,0152) y p53/Brca2 -/- control vs p53/Brca2 -/- olaparib (**P=0,0022).*

3. Cambios en el metabolismo celular producen cambios en la efectividad a los inhibidores de PARP

3.1 La sensibilidad a metformina se modifica cambiando los niveles de su combustible (NAD+)

Con el objetivo de demostrar que realmente la correlación entre el efecto en la viabilidad de metformina estaba teniendo lugar por la bajada de NAD^+ y por ende la bajada en la actividad PARP, decidimos jugar con las vías de reciclaje de NAD^+. Queríamos observar si modificando las vías de reciclaje de NAD^+ se modificaba la sensibilidad a metformina, ya sea disminuyendo el NAD^+ a través de inhibidores del reciclaje del NAD^+ (GMX1777) o bien aumentando el NAD^+ disponible con su sustrato principal (Nicotinamida). En la figura 24A se puede observar como a medida que se añade GMX1777 en dosis crecientes va aumentando la sensibilidad a metformina, de forma más incrementada en p53/Brca -/-. Por lo tanto, observamos que al rebajar los niveles disponibles de NAD^+ todavía se sensibilizan más las células a metformina.

Por otro lado, en la figura 24B se hizo justo lo contrario, se fomentó el reciclaje de NAD^+ aumentando su sustrato principal al medio, nicotinamida. Aumentando los niveles de nicotinamida aumentamos la resistencia de las células p53/Brca2 -/- a metformina casi doblando la IC50.

Incluso añadiendo Piruvato, que o bien puede ser utilizando en el ciclo de Krebs directamente, o bien en una situación de bloqueo de la cadena respiratoria bajo metformina, puede ser utilizado por la lactato deshidrogenasa generando NAD^+, se genera resistencia a metformina. Dicho de otra forma, eliminado el piruvato del medio sensibilizamos aún más las células a metformina. Como podemos observar en la figura 24C, al eliminar el piruvato tanto las p53 -/- como las p53/Brca2 -/- se vuelven igual de sensibles a metformina. En la figura 24D se puede ver como en p53/Brca2 -/- la actividad basal de PARP se incrementa

significativamente solo con añadir piruvato al medio. Además, en presencia de metformina el piruvato también aumenta la actividad PARP, algo que vuelve a correlacionar la actividad PARP con la viabilidad celular.

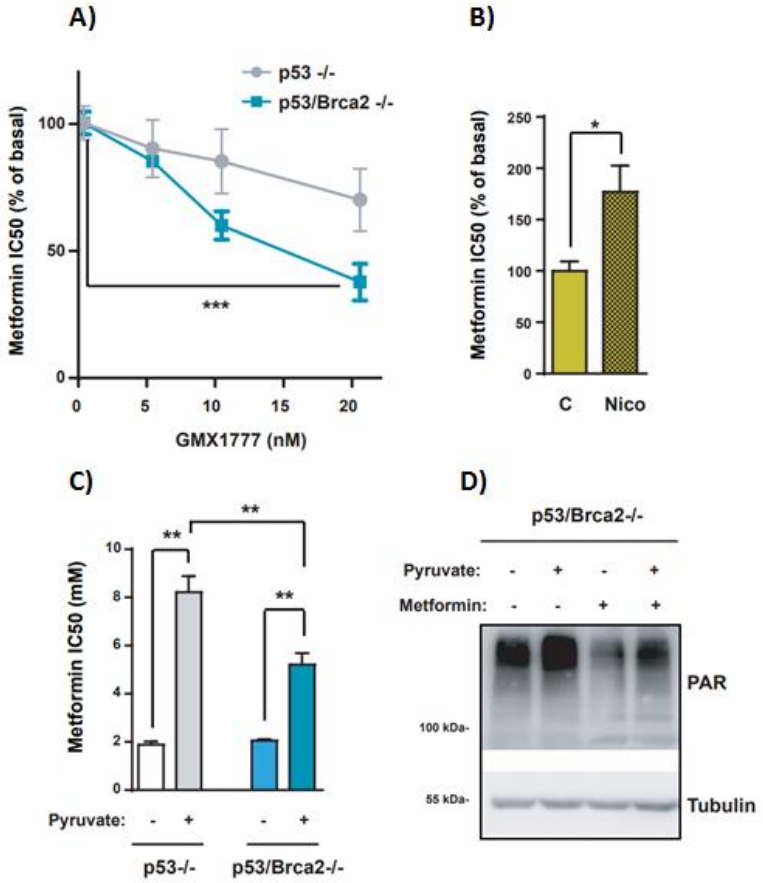


Figura 24: Modificando el metabolismo celular se modifica la sensibilidad a Olaparib.
*A) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días en concentraciones crecientes de metformina en medio completo DMEM, en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de GMX1777 (nM). La viabilidad celular fue medida utilizando cristal violeta. Se ha representado la IC50 de cada una de las condiciones de una media de 4 determinaciones independientes. Utilizando el test estadístico de Mann-Whitney aparece significancia estadística ***P=0,0006.*
*B) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días en concentraciones crecientes de metformina en medio completo sin piruvato, en presencia o no de 1mM Nicotinamida (+Nico). La viabilidad celular fue medida utilizando cristal violeta. Se ha representado la IC50 de cada una de las condiciones de una media de 6 determinaciones independientes. Utilizando el test estadístico de Mann-Whitney aparece significación estadística *P=0,028.*
C) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/ fueron incubadas durante 3 días en un rango de concentraciones crecientes de metformina en medio completo DMEM con o sin piruvato 1mM

*(+Pyr). La viabilidad celular fue medida utilizando cristal violeta. Se ha representado la IC50 de cada una de las condiciones de una media de 6 determinaciones independientes. Utilizando el test estadístico de ANOVA aparecen diferencias significativas**P<0,01.*
D) Células ID8 p53/Brca2 -/- fueron incubadas en medio completo DMEM con o sin piruvato 1mM o con o sin Metformina 5mM durante 48 horas. Las células fueron lisadas y se realizó un western blot para determinar la expresión de proteínas Poli-ADP-ribosiladas.

3.2 Inhibidores de cadena respiratoria incrementan ROS

Al observar el efecto diferencial de los diferentes inhibidores de la cadena respiratoria y conociendo que estos pueden producir un aumento de los radicales libres, decidimos analizar mediante citometría los niveles de intensidad de ROS (I.R) inducidos por los diferentes inhibidores.

En primer lugar, no encontramos diferencias en los niveles basales entre las p53 y las células p53/Brca2 -/- ambas líneas tenían niveles similares de ROS (2,79 vs 2,88 I.R). Bloqueando el complejo I con metformina sí que incrementan los ROS en ambas líneas, aunque produce un incremento más pronunciado de ROS en las células p53/Brca2 -/- que en las p53-/- (7 vs 11,54 I.R). Cuando bloqueamos el complejo IV (ATP sintasa) es cuando observamos la mayor diferencia entre ambas líneas celulares, mientras que en las p53-/- apenas incrementan los ROS, en las células p53/Brca2-/- aumentan considerablemente (4 vs 12 I.R). Finalmente, tratando con Antimicina A (inhibidor del complejo III), observamos que en estas circunstancias no aumentan los ROS en ninguna de las dos.

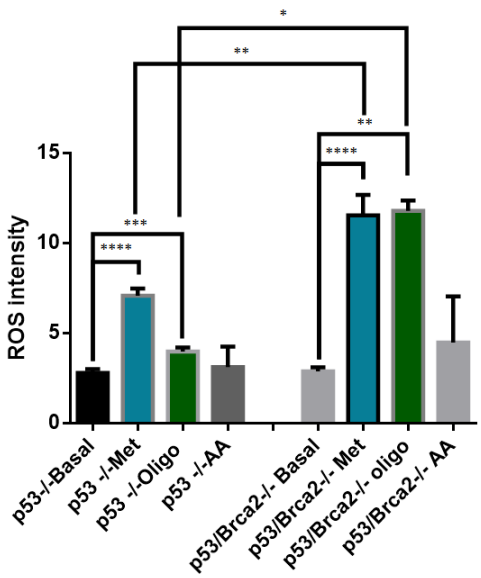


*Figura 25. Inhibidores de cadena respiratoria incrementan ROS. Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- son incubadas durante 48h con medio completo en ausencia o presencia de los diferentes inhibidores de la cadena respiratoria: Basal (Control) n=12, Met (Metformina)n=10, Rot (Rotenona) Oligo (Oligomicina) AA (Antimicina A). Las células fueron incubadas durante 10 minutos con Mitosox y analizadas por citometría de flujo. Se muestra la media de n=16 para p53 basal, n= 12 Brca basal, n=3 Oligo, n=3 AA. Utilizando el test estadístico de Mann-Whitney aparece significación estadística entre p53-/-Basal vs p53 -/- Met(****P=0,0001), p53-/- basal vs p53-/- Oligo (***P=0,0008), p53/Brca2-/- basal vs p53/Brca2 -/- Met (****P=0,0001), p53/Brca2 -/- basal vs p53/Brca2-/- Oligo (**P=0,0055), p53-/- Met vs p53/Brca2-/- Met (**P=0,0057) y p53-/- Oligo vs p53/Brca2-/- Oligo (*P=0,0238).*

3.3 La modificación de la sensibilidad a metformina por piruvato no viene dada por cambios en los niveles de ROS.

Teniendo en cuenta los datos anteriores se nos planteaba que posiblemente los cambios en la actividad a PARP y la sensibilidad a metformina podrían ser debidos a cambios en los radicales libres y no solo a la bajada de los niveles de NAD^+. Hemos comprobado que, añadiendo piruvato como sustrato, se modificaba la actividad de PARP modificándose la sensibilidad a metformina. Es por esa razón que queríamos comprobar si los ROS se modificaban en presencia de piruvato. Como se puede apreciar en la figura 26 el piruvato ni por sí mismo ni en presencia de metformina consigue bajar los ROS en las células p53/Brca2 -/-. Por lo tanto, estos resultados nos indican que los

cambios en la actividad de PARP y en la sensibilidad a metformina son independientes de los ROS.

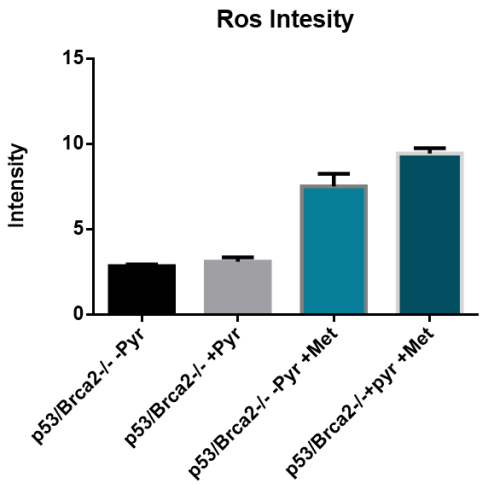


Figura 26. La modificación de la resistencia a Metformina es independiente de ROS. Células p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 48h con medio completo con o sin piruvato, en ausencia o presencia de DCA o metformina. Las células fueron incubadas durante 10 minutos con Mitosox y analizadas por citometría de flujo (n=3).

3.4 Metformina reduce el crecimiento tumoral en p53/Brca2 -/-

Para estudiar si lo observado en el modelo *in vitro* y comprobar si los resultados de la metformina se podían reproducir a nivel de *invivo*, en colaboración con la Dr. Agnes Figueras se inyectaron las células p53 -/- y p53/brca2 -/- ortotópicamente en el ovario de ratones nsg. Pasadas 4 semanas cuando estos tumores eran palpables, se randomizaron en dos grupos, unos fueron tratados con metformina (100 mg/kg) 5 días a la semana durante 4 semanas y los otros tratados con suero. Como se puede apreciar en la gráfica, los tumores tratados con metformina disminuían significativamente su volumen únicamente en el modelo de p53/Brca2 -/-. Esto nos estaba indicando que de nuevo que incluso en un ambiente fisiológico, con todo lo que ello conlleva, las células tumorales mutadas para BRCA2 continuaban siendo más sensibles a

metformina, por lo tanto, en un modelo *invivo* siguen teniendo esta dependencia de la cadena respiratoria, algo que no sucede en el modelo de p53.

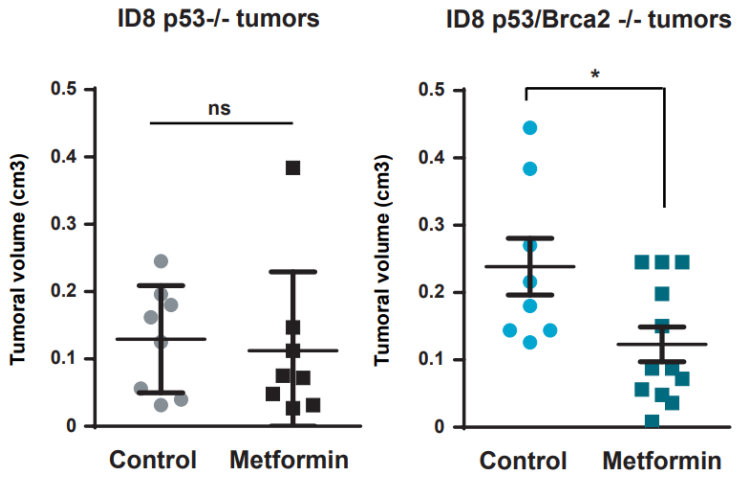


*Figura 27. Metformina reduce el crecimiento tumoral en p53/Brca2 -/-. Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron inyectadas en el ovario de ratones C57/BL-6. Después de 1 mes, los animales fueron tratados con vehículo o metformina (100 mg/kg) durante 4 semanas, 5 días a la semana. Los resultados son la media de 8 tumores control y 8 tumores tratados con metformina, en el caso de las p53 -/- y 8 controles y 12 tratados con metformina en el caso de las p53/Brca2 -/-. Realizando el test de Mann-Whitney aparece significación estadística *P=0,0446.*

3.5 Tumores procedentes de pacientes de cáncer de ovario mutado por Brca2 tienen patrones de expresión típicos de un fenotipo metabólico oxidativo.

En colaboración con el Dr. Alberto Villanueva, utilizando muestras tumorales mutadas para BRCA2 de pacientes de cáncer de ovario seroso. Estos tumores fueron procesados para obtener tanto proteína como ARN.

En primer lugar, se observaron los niveles de expresión protéica de la proteína MCT4 (transportador de lactato), como se puede apreciar en la figura 28, los tumores mutados para BRCA2 tenían menor expresión del transportador que los tumores control. A su vez, también se analizó la expresión de una subunidad del complejo I, NDUFV2. Al contrario que

con MCT4 la expresión de NDUFV2 se ve aumentada en los tumores BRCA2 mutados. Estos resultados fueron comprobados también por nivel de expresión de ARN, dando el mismo resultado que en proteína y apuntando en la misma dirección que nuestro modelo, los tumores BRCA2 mutados tienen un perfil de expresión proteico que nos da indicios de un fenotípico metabólico oxidativo.

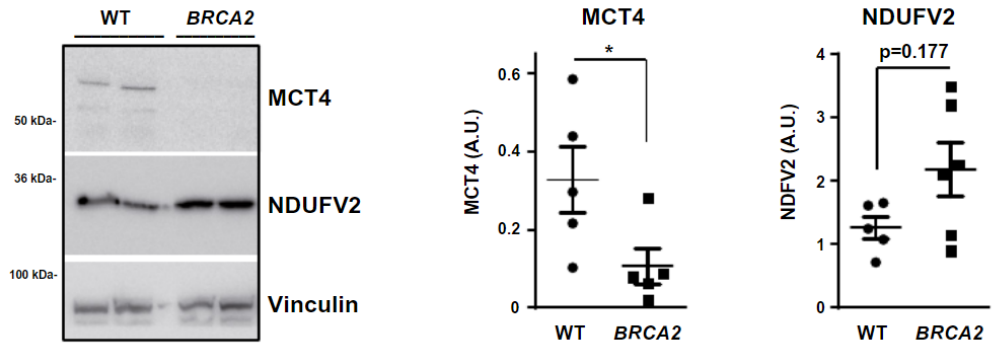


*Figura 28. Perfil de expresión oxidativo en tumores de ovario Brca2 mutados. Muestras de tumores de ovario seroso procedentes de pacientes, no mutado para Brca2 (n=5) o con mutaciones en Brca2 (n=6) fueron lisadas y cuantificada la expresión de las proteínas MCT4 y NDUFV2 por western blot. Aparece significación estadística en la expresión de MCT4 (*P= 0,0317) pero no para NDUFV2.*

3.6 Bloqueando el metabolismo oxidativo disminuye el efecto de olaparib

Viendo que la metformina era más efectiva en las células con BRCA2 mutado, una hipótesis plausible era esperar que quizás la metformina pudiera sensibilizar las células a olaparib. Por lo que decidimos combinar ambos medicamentos, realizando la IC50 de respuesta a olaparib bajo 0 mM, 2 mM o 5 mM de metformina. A su vez también realizamos una IC50 de olaparib bajo rotenona un potente inhibidor del complejo I. La hipótesis era observar si al bloquear el complejo I aumentaba la sensibilidad a olaparib. Sorprendentemente ambos inhibidores del complejo I no solo no sensibilizaban las células a olaparib, sino que disminuían el efecto de olaparib sobre las células p53/Brca2 -/. De los dos inhibidores utilizados Metformina figura 29A

pasa de 0,75µm en 0 mM a 4,71 µm en 5 mM en las células p53/Brca2 -/-, mientras que en las p53 el mayor cambio es de 3,3 µm a 5,78 µm bajo 5mM de metformina. Por lo que respecta a la rotenona, en la figura 29B se aprecia que el aumento de la resistencia a olaparib solo se da en p53/Brca2. Por lo tanto, bloqueando la cadena respiratoria y en consecuencia aumentando la glucólisis anaeróbica, se producía una disminución del efecto de olaparib. De alguna forma, estábamos transformando metabólicamente, utilizando los inhibidores, las células p53/Brca2 -/- en células p53-/-.

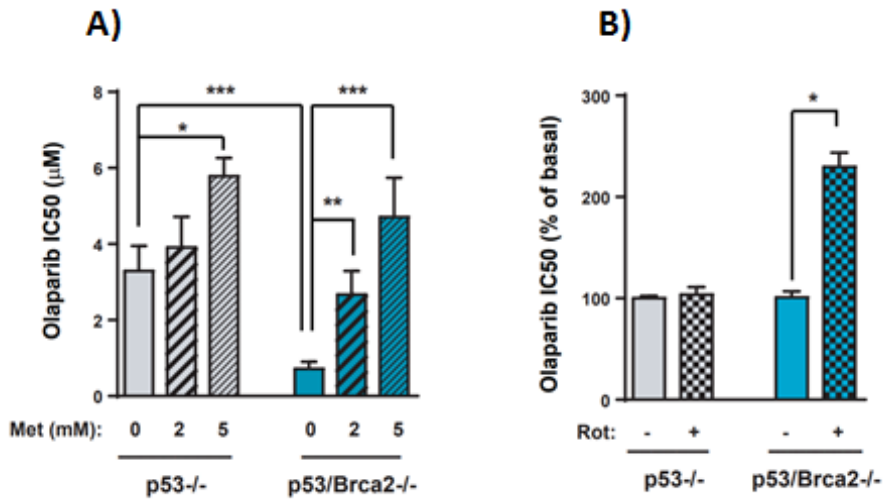


Figura 29: Bloqueando el metabolismo oxidativo disminuye la sensibilidad a olaparib.
A) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días en un rango de concentraciones crecientes de olaparib en ausencia o presencia de Metformina. La viabilidad celular fue medida utilizando cristal violeta. Se ha representado la IC50 de cada una de las condiciones de una media de 5 determinaciones independientes. Analizando los datos con un test ANOVA aparece significación estadística (P<0,0001).
B) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días en un rango de concentraciones crecientes de olaparib en ausencia o presencia de 5 nM de Rotenona. La viabilidad celular fue medida utilizando cristal violeta. Se ha representado la IC50 de cada una

3.7 Bloqueando el metabolismo oxidativo disminuye la inhibición de la actividad PARP bajo olaparib.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, decidimos profundizar en porqué la metformina estaba proporcionando algún tipo de ventaja que dificultaba la actividad de olaparib. Por lo tanto, realizamos un western

contra la actividad PARP con una dosis respuesta a olaparib, para ver si esta protección de la metformina venia correlacionada de alguna forma con la actividad PARP. Como se puede apreciar en las células p53/Brca2 -/- al ir añadiendo olaparib va despareciendo la actividad PARP en condiciones basales. Cuando se añade metformina esta desaparición no tiene lugar, manteniéndose cierta actividad basal pese a ir incrementando la dosis de olaparib. Sorprendentemente metformina logra mantener cierto nivel de actividad PARP pese a incrementar las dosis de inhibidor, ahora bien, es importante destacar que esta actividad es muy baja comparada con una situación basal. Pero este resultado, nos estaba indicando que bloqueando el metabolismo oxidativo producía cambios en la efectividad de los inhibidores de PARP1.

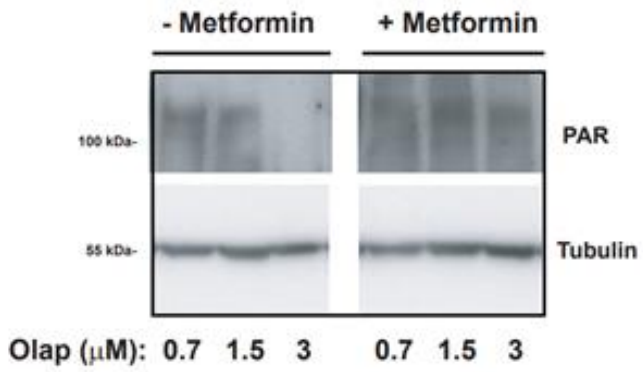


Figura 30: Al bloquear el metabolismo oxidativo disminuye el bloqueo de actividad PARP bajo olaparib. Células ID8 p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 48h en medio completo DMEM en presencia de 0,7, 1,5 o 3 μM olaparib, todo esto en presencia o ausencia de 5mM Metformina. Las células fueron lisadas y se cuantifico el total de proteínas Poli-ADP-Ribosiladas mediante Western Blot

3.8 Aumentando el metabolismo oxidativo se aumenta la sensibilidad a olaparib y la actividad PARP

Al observar que modificando el metabolismo se modificaba la sensibilidad a olaparib se decidió hacer lo mismo, pero en la dirección opuesta a la metformina. Utilizando DCA, un inhibidor de la PDK1 que

es la quinasa que fosforila e inhibe la PDH, inhibiendo por tanto la entrada de piruvato hacia el ciclo de Krebs. Si se utiliza DCA, lo que se está intentando hacer es aumentar el flujo de carbonos que irán derivados hacia el ciclo de Krebs y por lo tanto aumentando finalmente el metabolismo oxidativo. En primer lugar, observamos que al contrario que con metformina, al utilizar DCA sensibilizamos a ambas líneas celulares a olaparib. Por lo tanto, aumentando el metabolismo oxidativo se aumenta la sensibilidad a inhibidores de PARP. Del mismo modo, también quisimos valorar la actividad PARP. Como se aprecia en la 31B, la actividad aumentó cuando se incrementaba el metabolismo oxidativo. Esto nos remarca que un aumento del metabolismo brinda a la célula más cantidad de sustratos necesarios para que PARP pueda funcionar mejor, pero esta mayor actividad de PARP hace que las células se vuelvan más sensibles a inhibidores como olaparib.

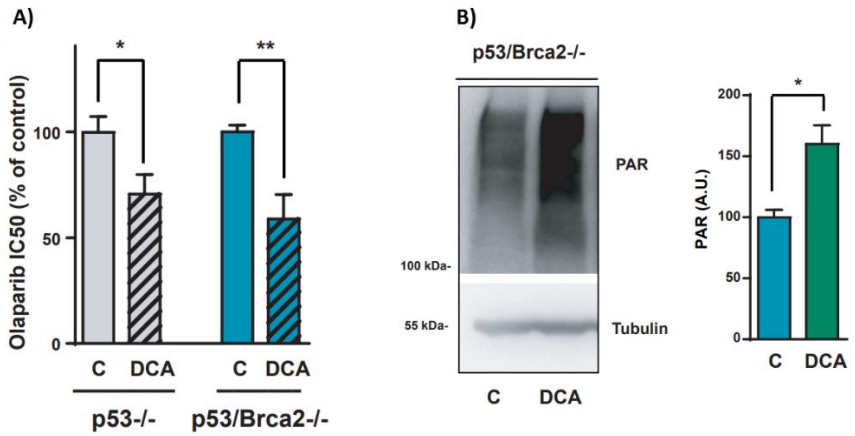


Figura 31: Aumentando el metabolismo oxidativo se aumenta la sensibilidad a olaparib.
*A) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días en un rango de concentraciones crecientes de olaparib en ausencia o presencia de 10mM DCA. La viabilidad celular fue medida utilizando cristal violeta. Se ha representado la IC50 de cada una de las condiciones de una media de 6 determinaciones independientes. Utilizando un test estadístico de Mann Whitney aparece significación estadística en p53 -/- *P=0,0303 y en p53/Brca2 -/- **P=0,0087.*
*B). Células ID8 p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 48h en medio Completo DMEM en presencia o ausencia de 10mM de DCA. Las células fueron lisadas y se cuantifico el total de proteínas Poli-ADP-Ribosiladas mediante Western Blot. Se utilizó tubulina como control de carga. A la derecha se muestra la media de 5 experimentos independientes, que al utilizar el test estadístico de Mann-Whitney *P=0,0159.*

3.9 El piruvato potencia el efecto Warburg producido por metformina que produce protección frente a Olaparib

En experimentos anteriores hemos visto que la ausencia de piruvato en el medio sensibilizaba a las células a metformina, bajando la actividad PARP. Si se añadía piruvato al medio, aumentaba la resistencia a metformina y de forma basal aumentaba la actividad PARP. Por lo tanto, decidimos comprobar si sucedía lo mismo con olaparib. Como se aprecia en la figura 32A, en las células p53/brca2 -/- únicamente al añadir piruvato ya aumenta la IC50 a olaparib. Ahora bien, metformina por si misma también aumenta la resistencia a olaparib y al añadir piruvato lo hace de forma sinérgica consiguiéndose la máxima resistencia a olaparib combinando piruvato y metformina. Para entender por qué el piruvato está aumentando la resistencia tanto a metformina como a olaparib se realizó un estudio de flujo glucolítico en dichas condiciones. Como se puede ver en la figura 32B, en ausencia de piruvato y añadiendo metformina, el flujo glucolítico únicamente se incrementa significativamente en las p53-/-. Estas células que ya de por sí tienen un perfil metabólico no oxidativo, cuando se les añade metformina todavía viran su metabolismo aún más independientemente del piruvato. Ahora bien, en p53/Brca -/- pese a no ser significativo el flujo glucolítico también aumenta, pero únicamente aumenta de forma significativa cuando se añade el piruvato. Es decir, en las células p53/Brca -/- bajo metformina, el piruvato les permite incrementar el flujo glucolítico de forma significativa, volviendo resistentes al olaparib a las células. De alguna forma es como si las células p53/Brca -/- al ver bloqueada la cadena respiratoria con metformina se vuelven con un perfil metabólico similar a las p53 -/- y esto les otorga cierta resistencia a inhibidores de PARP. Para comprobar que el piruvato no estuviera aumentando el metabolismo oxidativo, incluso bajo metformina analizamos el consumo de oxígeno en presencia o ausencia de piruvato, con o sin metformina. Como se aprecia en la figura 32C el piruvato no modifica el consumo de oxígeno, ni de forma basal ni bajo metformina.

Por lo tanto, se observa que la sensibilidad a inhibidores de PARP se ve modificada en función del perfil metabólico y que, modificando dicho perfil, se puede modificar la sensibilidad a olaparib. Perfiles metabólicos más oxidativos serán más sensibles a olaparib, perfiles más glucolíticos serán más resistentes.

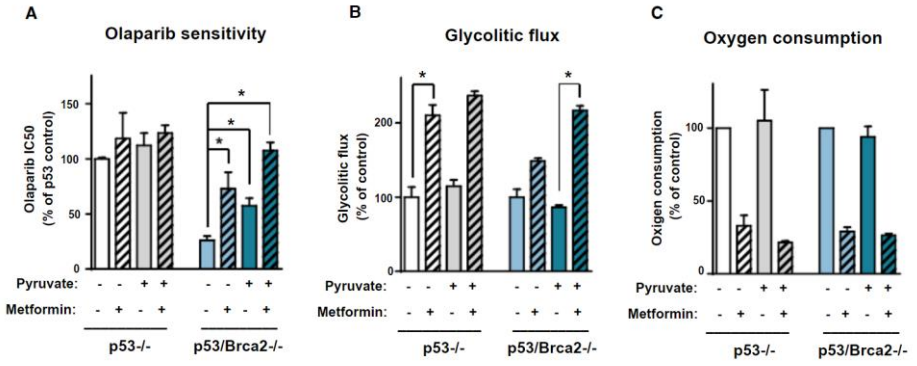


Figura 32: El piruvato potencia el efecto Warburg producido por metformina que produce protección frente a Olaparib.

*A) Células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 3 días en un rango de concentraciones crecientes de olaparib en ausencia o presencia de 2mM de Metformina y 1 mM piruvato. La viabilidad celular fue medida utilizando cristal violeta. Se ha representado la IC50 de cada una de las condiciones de una media de 5 determinaciones independientes. Analizando los datos mediante un test de Mann Whitney aparecen diferencias significativas Entre p53/Brca2 -/- en ausencia de piruvato y metformina vs p53/Brca2 en ausencia de piruvato en presencia de Metformina (*P=0,0286), en presencia de piruvato y ausencia de metformina (*P=0,0238) y en presencia de piruvato y Metformina (*P=0,0238).*

*B) Células ID8 p53 -/- y en p53/Brca2 -/- fueron incubadas durante 48 horas en medio completo DMEM en ausencia o presencia de 2mM de metformina o en ausencia y presencia de 1mM de piruvato. Las células fueron incubadas durante una hora en presencia de Glucosa H3 y se cuantifico el flujo glucolítico, los valores fueron normalizados por proteína. Se muestra la media de 4 experimentos independientes. Utilizando el test estadístico de Mann Whitney aparece significancia estadística al comparar las células p53 -/- en ausencia de piruvato y metformina comparadas con esas mismas células en ausencia de piruvato y presencia de Metformina (*P=0,0286). También al comparar las células p53/Brca2-/- en presencia de piruvato y ausencia de metformina con las mismas células en presencia de piruvato y metformina (*P=0,0286)*

C) Se midió el consumo de oxígeno en las células ID8 p53 -/- y p53/Brca2 -/-. Las células fueron incubadas durante 48 h en medio DMEM en presencia o ausencia de metformina y piruvato. Se muestran los resultados de tres lecturas independientes

Discusión

Problemas crónicos en la integridad del ADN aumentan el metabolismo oxidativo

La célula como un organismo vivo e independiente siempre intenta estar lo más adaptada posible a la situación del momento. Por lo tanto, ante un cambio de escenario en este caso, un aumento del daño en el ADN, producido por problemas en la reparación homóloga o generado por agentes externos como la quimioterapia, desencadena una readaptación a la nueva situación. Este nuevo estado de aumento del daño en el ADN, se ha descrito que promueve un aumento de la inestabilidad genómica. Así, al eliminar la expresión de ATM (proteína clave en la reparación del ADN), se ha observado que desencadena un aumento del daño en el ADN y este produce un aumento de la inestabilidad genómica. En la misma dirección, los tratamientos crónicos a cisplatino producen un incremento del daño en el ADN y consecuentemente de la inestabilidad genómica[155].

Esta nueva situación requiere de unas nuevas necesidades para mantener la viabilidad celular, en el caso concreto de las células en las que hemos generado una delección de BRCA2, la adaptación a esta nueva situación requerirá de una alternativa para conseguir compensar, ni que sea parcialmente, la ausencia de reparación homóloga. En nuestro modelo esta adaptación pasa por un aumento de la importancia en la reparación mediante PARP. Esta compensación que realiza la célula tumoral, para remediar la situación, genera nuevas necesidades energéticas muy concretas, que hemos visto que llevan asociadas un reajuste metabólico. Esta remodelación se observa en células de Leucemia mieloide aguda humana cuando son tratadas con citarabina (quimioterapia intercalante en el DNA), se ha descrito que incrementa su metabolismo oxidativo aumentando el número de mitocondrias[156].

También en células no cancerígenas, se ha observado que al someter a daño agudo o crónico al ADN se produce un aumento del metabolismo oxidativo, a causa principalmente de un aumento de la oxidación de ácidos grasos[157]. Algo similar sucede en células madre no cancerígenas, las cuales, al ser sometidas a daño agudo en el ADN terminan desencadenando una adaptación metabólica que se traduce en un aumento del metabolismo oxidativo[158].

Si nos centramos en modelos de células cancerígenas también se había descrito que en células MCF10A haploinsuficientes de BRCA1 se había encontrado un incremento de los intermediarios del TCA[159] y un aumento del metabolismo mitocondrial[160]. Pese a que esta asociación había sido caracterizada en otros modelos cancerígenos, hasta el momento no se había observado en cáncer de ovario ni tampoco se había vinculado directamente a la delección de BRCA2.

Ahora bien, la forma mediante la cual, nuestro modelo con incremento de la inestabilidad genómica basal, ha conseguido aumentar el metabolismo oxidativo, parece tener diferentes explicaciones. Por un lado, se ha descrito que una de las formas en las que las células cancerígenas de melanoma aumentan su metabolismo oxidativo, es aumentando factores de transcripción como PCGα, aumentando así el número de mitocondrias y por lo tanto el consumo de oxígeno. En nuestro modelo no aparece aumentado este factor, sí que lo hace levemente PPARγ, que se ha descrito que también puede producir un aumento de la biogénesis mitocondrial y preparar a la célula para un aumento del metabolismo oxidativo[154]. Otro factor que puede tener un papel importante en nuestro modelo, pero necesitaríamos más tiempo para profundizar más en él, es el factor BACH1. Recientemente en un artículo han descrito que BACH1 baja el consumo de glucosa en el TCA, bajando así su oxidación completa[161]. Al parecer BACH1 aumenta la expresión de la PDK1, aumentando así la fosforilación inhibitoria de la PDH, descendiendo así el flujo de piruvato hacia el TCA. En nuestro

modelo se aprecia un descenso de los niveles de mRNA de BACH1 en las células p53/Brca2 -/-, que, a su vez, también tienen bajos niveles de la PDK1 y por lo tanto bajos niveles de fosforilación inhibitoria de la PDH, dando como resultado un aumento de la entrada de piruvato en el TCA. Faltaría por demostrar si una situación de daño crónico en el ADN termina desencadenando como respuesta una bajada en los niveles de BACH1, que fomentaría un cambio metabólico hacia un perfil más oxidativo. Por esa razón, BACH1 es una de las proteínas que seguimos estudiando, como posible candidata a ser el vínculo entre la inestabilidad genómica y el aumento del metabolismo oxidativo.

Otros trabajos en cáncer de ovario, han realizado un cribaje del tipo de metabolismo, clasificando las células por su metabolismo. Se ha observado una amplia heterogeneidad metabólica, dentro de la cual, las células más oxidativas tenían los ROS aumentados de forma crónica, lo que producía un incremento de la expresión de PGC1-α. Este a su vez, incrementaba la biosíntesis de las mitocondrias reforzando todavía más el metabolismo oxidativo[162].

Si bien nuestro modelo no mostraba diferencias significativas de forma basal en los niveles de ROS, también decidimos chequear la masa mitocondrial. Es cierto que, se observaban diferencias de un 10% de aumento en el número de mitocondrias según *greentracker*, pero esta diferencia no era significativa. Cuando medimos los niveles de mRNA de diferentes factores de transcripción que promueven la biogénesis mitocondrial no observamos diferencias significativas. Así que, si bien no es descartable, no parece que el aumento de la masa mitocondrial sea uno de los factores determinantes[163].

Al realizar la metabolómica sí que observamos que había diferencias significativas en el TCA entre ambos modelos, ya que las células p53/Brca2 -/- tenían aumentado su flujo de Krebs, por lo que las diferencias en la respiración celular podían ser debidas a un uso

diferencial de los sustratos metabólicos. En nuestro modelo el aumento del consumo de oxígeno en la cadena respiratoria se había producido a causa de un aumento en el flujo del ciclo de Krebs. Es decir, las diferencias en la respiración celular venían producidas por un uso diferencial de los sustratos metabólicos y no principalmente por un aumento del número de mitocondrias.

El cambio metabólico está producido para incrementar los niveles de ATP y NAD^+ para mantener la actividad PARP

Aunque se había caracterizado en otros modelos esta adaptación metabólica, cómo este reajuste generaba una ventaja que aumentaba la viabilidad ante un aumento de la inestabilidad genómica quedaba por esclarecer. Es por esa razón, que durante esta tesis nos hemos centrado en el motivo por el cual nuestros modelos de inestabilidad genómica, producido por problemas en la recombinación homologa principalmente, han realizado ese reajuste metabólico.

No fue hasta que no demostramos que los inhibidores de la cadena respiratoria afectaban más a las células p53/Brca2 -/-, que pudimos afirmar que esta adaptación era necesaria y clave para la supervivencia celular ante la inestabilidad genómica. Actualmente estos inhibidores están siendo estudiados para suministrarse en pacientes de cáncer de ovario avanzado en combinación con tratamientos basados en platino[164]. Incluso se ha observado que bloqueando el complejo I con metformina se consigue aumentar la sensibilidad a cisplatino en cáncer de ovario[165]. En cáncer de mama también se ha descrito que células con mutaciones en BRCA1 aumentan su metabolismo oxidativo para aumentar la biosíntesis de metabolitos intermediarios del TCA, aumentando así su sensibilidad a metformina[160].

Para entender por qué los inhibidores del complejo I tenían un efecto diferencial en nuestro modelo, teníamos que entender qué estaban haciendo a nivel metabólico estos inhibidores. Al bloquear la cadena

respiratoria, se bloquea la ATP sintasa, uno de los mayores productores de ATP. Una disminución en los niveles de ATP en células cancerígenas se había correlacionado con bajadas en la proliferación celular[166]. Por lo que parte de este efecto diferencial de metformina podía ser explicado por un aumento de la necesidad de consumo de ATP en las células p53/Brca2 -/-, debido entre otras cosas a mantener mecanismos alternativos de reparación del DNA. En primer lugar, observamos que los niveles basales de ATP eran mayores en las células doble mutadas y que cuando bloqueabas la cadena respiratoria con metformina, solo descendía la producción de ATP en las células p53/Brca2 -/. De ese dato podíamos deducir que los niveles de ATP basales elevados estaban producidos gracias al aumento de la cadena respiratoria. Está descrito que al producir defectos en los mecanismos de escisión (NER) las células remodelan su metabolismo aumentando la producción de ATP[167]. De la misma forma hemos visto como nuestras células al producir defectos en los mecanismos de HR, se produce un reajuste metabólico que también produce una subida en los niveles de ATP.

Ahora bien, no podíamos pasar por alto el claro aumento de la sensibilidad de olaparib al deleccionar Brca2 que se estaba produciendo en nuestro modelo. Este aumento de la sensibilidad era explicado por un aumento de la dependencia de la actividad PARP en este tipo de modelos en los que había problemas en la reparación homologa, ya que la falta de actividad de otros mecanismos de reparación independientes de BRCA2, como por ejemplo del mecanismo NER, también aumenta la sensibilidad a olaparib[168]. Es decir, cualquier problema en todo lo referente a la maquinaria de detección y reparación del ADN terminará aumentando la dependencia de las células de PARP[169].

Para que PARP pueda realizar su función necesita NAD^+, el cual es su principal sustrato para la reacción de poli-ADPribosilación que cataliza. De hecho el 80% del NAD^+ es consumido por PARP cuando las células son expuestas a daño en el ADN[170]. Además, hay que tener en cuenta que las células cancerígenas tienen ratios de NAD^+/NADH bajos y que

cambios en este ratio están más asociados al crecimiento tumoral que los cambios en el ratio de ATP/ADP[171]. Por esa razón nos centramos en medir los niveles de NAD^+/NADH de la célula de forma basal o bajo metformina.

Al medir los niveles de NAD^+/NADH de nuestras células expuestas a metformina, se apreciaba que el ratio cae únicamente en las células p53/Brca2-/-, por lo que este aumento del metabolismo oxidativo está manteniendo los niveles elevados de NAD^+/NADH, de la misma forma que sucedía con los niveles de ATP. Uno de los principales factores que determina el estado redox de la célula, es el complejo I, si este es bloqueado mediante metformina se produce una bajada del ratio NAD^+/NADH[172].

Por lo tanto, al descender con metformina los niveles de NAD+, disminuye drásticamente la actividad PARP, descendiendo así la viabilidad celular. No sucede así en las células p53-/-. De entrada, al tener BRCA2, son menos dependientes de la actividad PARP, por lo que no necesitan tener aumentado el ratio NAD^+/NADH y en consecuencia, no tienen la necesidad de aumentar el metabolismo oxidativo. Por lo tanto, al bloquear la cadena respiratoria con metformina~~,~~ no se produce la drástica bajada que se observa en las células doble mutadas.

Se ha descrito, que bajadas en los niveles de NAD^+ producen una disminución en la capacidad de reparación del ADN, que a su vez, produce una acumulación de daño en el ADN[173].

Nuestros resultados nos indican que las células p53/Brca2-/- presentan una vulnerabilidad metabólica que puede ser explotada, necesitan mantener niveles elevados de NAD^+/NADH para mantener la actividad PARP, actividad que se ha convertido en esencial para las células por la delección de BRCA2. De la misma forma, está descrito que si se produce una bajada de los niveles de NAD^+, por ejemplo, limitando la fuente de carbonos (glucosa o piruvato) o bien inhibiendo la síntesis o el reciclaje

de NAD^+ las células cancerígenas se vuelven más sensibles a agentes citotóxicos o inhibidores de PARP[174,175]. En la misma dirección, si se eleva la ratio NAD^+/NADH, suministrando piruvato o directamente NAD^+ las células se vuelven más resistentes a agentes citotóxicos[172,176].

Cuando añadimos inhibidores del reciclaje de NAD como el GMX177, vemos que se aumenta la sensibilidad a metformina, confirmando que realmente esa sensibilidad a metformina viene dada por la bajada de los niveles de NAD^+. Inhibidores similares que bloquean también la NAMPT como lo hace la GMX177, se están empezando a plantear para ser utilizados en cáncer de ovario[177], por lo que nuestro trabajo podría asentar investigaciones futuras para plantear estos inhibidores en cáncer de ovario con BRCA mutados. De hecho, en cáncer de pulmón se ha descrito que utilizando el inhibidor GMX1778 las células se sensibilizan al permetrexed. Es decir, bajando la síntesis de NAD^+ bloqueando el reciclaje, aumentas la eficacia de tratamientos que se ha descrito que aumentan la actividad PARP.

Aunque esta aproximación pueda ser prometedora y actualmente se está estudiando su aplicabilidad en el cáncer, también se ha observado que las células cancerígenas pueden generar resistencia rápidamente, por ejemplo, aumentando la síntesis de *novo* de NAD^+[178].

Otros artículos, apuntan que la metformina podría ser utilizada en líneas de cáncer de ovario resistentes al paclitaxel, bloqueando la autofagia y aumentando la apoptosis[179]. Algo similar sucede en cáncer de mama, células tumorales resistentes muestran sensibilidad a metformina, ya que esta inhibe la actividad de YAP, proteína que se encuentra sobreexpresada en los tumores resistentes de mama. Metformina también parece tener potencial en otros tipos tumorales como colon[180], leucemia[181] o carcinomas[182].

Otra de las ventajas de la posible utilización de metformina, es que esta es mundialmente utilizada para la diabetes, por lo que sus niveles de

toxicidad y efectos adversos están ampliamente descritos. Por lo tanto, también se estudiado las combinaciones con diferentes quimioterapias, facilitando el posible uso para pacientes con cáncer.

Estos resultados nos brindan nuevas posibles aproximaciones terapéuticas de explotar una nueva vulnerabilidad en pacientes BRCA mutado o problemas en los mecanismos de reparación homóloga. Por un lado, utilizar inhibidores de la cadena respiratoria para bloquear la producción de NAD^+ o bien utilizar inhibidores de reciclaje del propio NAD^+ como es el caso del GMX177.

Cambios en el metabolismo celular producen cambios en la efectividad a los inhibidores de PARP

Otro punto de esta tesis doctoral ha sido demostrar como los cambios en el metabolismo celular producen cambios en la sensibilidad a inhibidores de PARP. Por el patrón que habíamos obtenido de los resultados, podía correlacionarse que las líneas celulares que tenían un metabolismo más oxidativo eran más sensibles a olaparib, ahora bien, no quedaba claro si esto era causa o consecuencia.

Hasta que no intervenimos activamente, modificando el metabolismo celular, ya sea aumentando el flujo de Krebs, bloqueando la PDK1 con DCA, aumentando así la actividad de la PDH. O bien, bloqueando la cadena respiratoria con inhibidores del complejo I, como metformina o rotenona. Es en esas situaciones, cuando podíamos averiguar qué sucedía con la resistencia innata a olaparib bajo los cambios metabólicos.

Cuando combinábamos la metformina (descendiendo así el metabolismo oxidativo y aumentando la glucólisis no oxidativa) las células se vuelven menos sensibles a olaparib. Por el contrario, cuando se aumenta el metabolismo oxidativo suministrando DCA aumentaba la sensibilidad a olaparib. Por lo tanto, estamos observando que

modificando el metabolismo celular se modifica la respuesta inicial a olaparib. Esta pérdida de sensibilidad puede venir por diferentes razones, en las que no ha dado tiempo a profundizar durante esta tesis.

Actualmente, la forma de predecir la sensibilidad a inhibidores de PARP es chequear el estado de la maquinaria de reparación. Mutaciones en BRCA1/2, en ATM, o en general en mecanismos de reparación del ADN son predictores de una posible elevada sensibilidad a inhibidores de PARP[183]. Incluso se han utilizado drogas que bajan la expresión de BRCA1, como es el caso de inhibidores como el CDK1-73, de esta forma convierten células competentes en células con problemas en HR, siendo estas más dependientes de PARP y por lo tanto más sensibles a inhibidores de PARP[184]. Otra aproximación descrita es inhibir la actividad de AKT, mediante inhibidores como el MK-2206, y se ha observado que ello conlleva una sensibilización a inhibidores de PARP a células deficientes BRCA en cáncer de ovario[185].

Nuestra hipótesis es que olaparib necesita que PARP esté activo para poder bloquearlo, condición necesaria para que olaparib funcione. Como hemos demostrado que, modulando el metabolismo se modula la actividad de PARP, la bajada de actividad que producen los inhibidores de la cadena respiratoria, impide que olaparib pueda encontrar una actividad elevada de PARP y por lo tanto pueda bloquearlo. Hemos observado como bajo metformina, olaparib tiene mayores dificultades para eliminar por completo la actividad PARP, quizás esa baja actividad basal bajo metformina y olaparib es suficiente para mantener la viabilidad celular a la misma concentración de olaparib.

Por el contrario, con el DCA aumentamos el metabolismo oxidativo, incrementando en consecuencia la actividad PARP y aumentando así la sensibilidad a olaparib, ya que este tiene más facilidad para poder unirse a PARP e impedir que se desacople del ADN, bloqueando así su

actividad. Esta correlación se ha descrito previamente en el cáncer cervical a mayor actividad PARP y mayor sensibilidad a olaparib[186]. La misma correlación se ha descrito en líneas de cáncer de ovario, a más actividad PARP más sensibilidad a olaparib[187] .

Estos datos parecen apuntar en la misma dirección que nuestra hipótesis, aunque nuestros resultados correlacionan la actividad PARP con el perfil metabólico, proporcionando una nueva posible aproximación a la hora de desarrollar otros posibles biomarcadores que puedan determinar la sensibilidad a inhibidores de PARP. A su vez, podríamos condicionar a las células a aumentar su actividad PARP artificialmente modificando el metabolismo, aumentando así la actividad y de esta forma aumentar la sensibilidad a los inhibidores.

Conclusiones

Las líneas celulares que padecen inestabilidad genómica, generada por daño crónico en ADN, ya sea por problemas en los mecanismos de reparación HR o bien por exposición a drogas intercalantes en el ADN aumentan su consumo de oxígeno en el cáncer de ovario. Este aumento del consumo de oxígeno es producido por un aumento del flujo de carbonos procedentes de la glucosa hacia el ciclo de Krebs.

Este aumento del metabolismo oxidativo es necesario para las células que tienen problemas en el mecanismo HR (p53/Brca2 -/-) para mantener los niveles de NAD+ y ATP. Mantener estos niveles es esencial para que estas células puedan sostener una alta actividad de la maquinaria de reparación de PARP. La actividad PARP correlaciona directamente con la viabilidad celular en las células doble mutadas, debido a un aumento de la dependencia de su actividad. Al parecer esto también sucede en un modelo *in vivo*, ya que los tumores generados en ratones atímicos que no tienen BRCA2 también son más sensibles a metformina.

La respuesta inicial a los inhibidores de PARP se ve modificada modificando el metabolismo celular, células con un metabolismo oxidativo verán incrementada su sensibilidad. Mientras que células con un perfil más glucolítico tendrán mayor resistencia innata a los inhibidores de PARP.

Bibliografía

1. Colvin, C. W. & Abdullatif, H. Anatomy of female puberty: The clinical relevance of developmental changes in the reproductive system. *Clinical Anatomy* (2013) doi:10.1002/ca.22164.
2. Oktem, O. & Oktay, K. The ovary: Anatomy and function throughout human life. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (2008). doi:10.1196/annals.1434.009.
3. Hansen, K. R. *et al.* A new model of reproductive aging: The decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum. Reprod.* (2008) doi:10.1093/humrep/dem408.
4. Douma, S. L., Husband, C., O'Donnell, M. E., Barwin, B. N. & Woodend, A. K. Estrogen-related mood disorders: Reproductive life cycle factors. *Adv. Nurs. Sci.* (2005) doi:10.1097/00012272-200510000-00008.
5. Instituto Nacional de Cáncer. ¿ Qué es el cáncer ? *Tipos cáncer [Última Actual. 9 febrero 2015, Acceso 11 diciembre 2015]* (2015).
6. Catasús, L. *et al.* Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: Similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum. Pathol.* **35**, 1360–1368 (2004).
7. Li, Z. *et al.* Genetic mutations associated with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 16172–16179 (2016).
8. Ledermann, J. A. *et al.* Gynecologic cancer intergroup (GCIG) Consensus review for mucinous ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer* (2014) doi:10.1097/IGC.0000000000000296.
9. Grisham, R. N. *et al.* NIH Public Access. **119**, 548–554 (2014).
10. Søgaard, M., Kjær, S. K. & Gayther, S. Ovarian cancer and genetic susceptibility in relation to the BRCA1 and BRCA2 genes. Occurrence, clinical importance and intervention. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **85**, 93–105 (2006).
11. Rashid, M. U. *et al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in Pakistani breast and ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer* **119**, 2832–2839 (2006).
12. Malander, S. *et al.* The contribution of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome to the development of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **101**, 238–243 (2006).

13. Casagrande, J. T. *et al.* 'INCESSANT OVULATION' AND OVARIAN CANCER. *Lancet* (1979) doi:10.1016/S0140-6736(79)91435-1.

14. Cramer, D. W. & Welch, W. R. Determinants of Ovarian Cancer Risk. II. Inferences Regarding Pathogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* (1983) doi:10.1093/jnci/71.4.717.

15. Negri, E. *et al.* Pooled analysis of 3 european case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer* (1991) doi:10.1002/ijc.2910490110.

16. Risch, H. A., Marrett, L. D. & Howe, G. R. Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am. J. Epidemiol.* (1994) doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a117296.

17. Parazzini, F., La Vecchia, C., Negri, E. & Gentile, A. Menstrual factors and the risk of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Epidemiol.* (1989) doi:10.1016/0895-4356(89)90134-0.

18. Kvåle, G., Heuch, I., Nilssen, S. & Beral, V. Reproductive factors and risk of ovarian cancer: A prospective study. *Int. J. Cancer* (1988) doi:10.1002/ijc.2910420217.

19. Wu, M. L. *et al.* Personal and environmental characteristics related to epithelial ovarian cancer: Reproductive and menstrual events and oral contraceptive use. *Am. J. Epidemiol.* (1988) doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a115076.

20. A., P. *et al.* Reproductive variables, tobacco, ethanol, coffee and somatometry as risk factors for ovarian cancer. *Int. J. Cancer* (1993) doi:10.1002/ijc.2910550312 LK - https://login.pallas2.tcl.sc.edu/login?url=http://resolver.ebscohost.com/openurl?sid=Elsevier:EMBASE&sid=EMBASE&issn=00207136&id=doi:10.1002%2Fijc.2910550312&atitle=Reproductive+variables%2C+tobacco%2C+ethanol%2C+coffee+and+somatometry+as+risk+factors+for+ovarian+cancer&stitle=INT.+J.+CANCER&title=International+Journal+of+Cancer&volume=55&issue=3&spage=402&epage=407&aulast=Polychronopoulou&aufirst=A.&auinit=A.&aufull=Polychronopoulou+A.&coden=IJCNA&isbn=&pages=402-40.

21. Hankinson, S. E. *et al.* A prospective study of reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer* (1995) doi:10.1002/1097-0142(19950715)76:2<284::AID-CNCR2820760219>3.0.CO;2-5.

22. Newhouse, M. L., Pearson, R. M., Fullerton, J. M., Boesen, E. A. & Shannon, H. S. A case control study of carcinoma of the ovary. *Br. J. Prev. Soc. Med.* (1977) doi:10.1136/jech.31.3.148.

23. John, E. M., Whittemore, A. S., Harris, R. & Itnyre, J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of seven U.S. Case-control studies. epithelial ovarian cancer in black women. *J. Natl.*

Cancer Inst. (1993) doi:10.1093/jnci/85.2.142.

24. Canney, P. A., Moore, M., Wilkinson, P. M. & James, R. D. Ovarian cancer antigen CA125: A prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. *Br. J. Cancer* (1984) doi:10.1038/bjc.1984.254.
25. Woolas, R. P. *et al.* Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* (1993) doi:10.1093/jnci/85.21.1748.
26. Skates, S. J. *et al.* Early detection of ovarian cancer using the risk of ovarian cancer algorithm with frequent CA125 testing in women at increased familial risk – Combined results from two screening trials. *Clin. Cancer Res.* (2017) doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2750.
27. Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C. & Ledermann, J. A. Ovarian cancer. *Lancet* **384**, 1376–1388 (2014).
28. Griffiths, C. T. & Fuller, A. F. Intensive surgical and chemotherapeutic management of advanced ovarian cancer. *Surg. Clin. North Am.* (1978) doi:10.1016/S0039-6109(16)41440-4.
29. du Bois, A. *et al.* Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer* (2009) doi:10.1002/cncr.24149.
30. Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I. & Oza, A. M. Epithelial ovarian cancer. *Lancet* **393**, 1240–1253 (2019).
31. Rosenberg, B., Van Camp, L. & Krigas, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode [17]. *Nature* (1965) doi:10.1038/205698a0.
32. Zhang, X. Y. & Zhang, P. Y. Recent perspectives of epithelial ovarian carcinoma (Review). *Oncol. Lett.* **12**, 3055–3058 (2016).
33. Kigawa, J. New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago Acta Med.* **56**, 43–50 (2013).
34. Foley, O. W., Rauh-Hain, J. A. & del Carmen, M. G. Recurrent epithelial ovarian cancer: An update on treatment. *ONCOLOGY (United States)* (2013).
35. Brasseur, K., Gévry, N. & Asselin, E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget* **8**, 4008–4042 (2017).
36. Oberaigner, W. *et al.* Survival for Ovarian Cancer in Europe: The across-country variation did not shrink in the past decade. *Acta Oncol. (Madr).* (2012) doi:10.3109/0284186X.2011.653437.
37. Katano, K. *et al.* Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res.* **62**, 6559–

6565 (2002).

38. Samimi, G. *et al.* Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.* (2004) doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0137.

39. Komatsu, M. *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* (2000).

40. Kamazawa, S. *et al.* Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* (2002) doi:10.1006/gyno.2002.6738.

41. Schneider, J. *et al.* High rate of expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in human endometrial carcinoma and normal endometrial tissue. *Eur. J. Cancer* **29**, 554–558 (1993).

42. Fracasso, P. M. *et al.* Phase II study of paclitaxel and valspodar (PSC 833) in refractory ovarian carcinoma: A gynecologic oncology group study. *J. Clin. Oncol.* (2001) doi:10.1200/JCO.2001.19.12.2975.

43. Seiden, M. V. *et al.* A phase II study of the MDR inhibitor biricodar (INCEL, VX-710) and paclitaxel in women with advanced ovarian cancer refractory to paclitaxel therapy. *Gynecol. Oncol.* (2002) doi:10.1006/gyno.2002.6762.

44. Kelly, R. J. *et al.* A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* (2011) doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1725.

45. Di Nicolantonio, F. *et al.* Ex vivo reversal of chemoresistance by tariquidar (XR9576). *Anticancer. Drugs* (2004) doi:10.1097/00001813-200410000-00006.

46. Urick, M. E. *et al.* PIK3R1 (p85α) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer Res.* (2011) doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0549.

47. Cheung, L. W. T. *et al.* High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov.* (2011) doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0039.

48. Cerami, E. *et al.* The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* (2012) doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095.

49. Gagnon, V., Van Themsche, C., Turner, S., Leblanc, V. & Asselin, E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* (2008) doi:10.1007/s10495-

007-0165-6.

50. Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, É., Leblanc, K. & Asselin, E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol. Oncol.* (2004) doi:10.1016/j.ygyno.2004.06.023.

51. Yuan, Z. Q. *et al.* AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and bax activation by phosphorylation of ASK1. Implication of AKT2 in chemoresistance. *J. Biol. Chem.* (2003) doi:10.1074/jbc.M302674200.

52. Wu, H. J. *et al.* Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms. *Cancer Lett.* (2008) doi:10.1016/j.canlet.2008.06.012.

53. Singh, M., Chaudhry, P., Fabi, F. & Asselin, E. Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: A potential mechanism of chemoresistance. *BMC Cancer* (2013) doi:10.1186/1471-2407-13-233.

54. Ying, H. *et al.* Chemoresistance is associated with beclin-1 and PTEN expression in epithelial ovarian cancers. *Oncol. Lett.* (2015) doi:10.3892/ol.2015.2950.

55. Ohta, T. *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in Vivo ovarian cancer models. *Endocrinology* (2006) doi:10.1210/en.2005-1450.

56. Bedard, P. L. *et al.* A Phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* (2015) doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1814.

57. Pearson, G. *et al.* Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocr. Rev.* (2001) doi:10.1210/edrv.22.2.0428.

58. Cagnol, S. & Chambard, J. C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal* (2010) doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x.

59. Kielbik, M., Krzyzanowski, D., Pawlik, B. & Klink, M. Cisplatin-induced ERK1/2 activity promotes G1 to S phase progression which leads to chemoresistance of ovarian cancer cells. *Oncotarget* **9**, 19847–19860 (2018).

60. Sinha, D., Bannergee, S., Schwartz, J. H., Lieberthal, W. & Levine, J. S. Inhibition of Ligand-independent ERK1/2 Activity in Kidney Proximal Tubular Cells Deprived of Soluble Survival Factors Up-regulates Akt and Prevents Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 10962–10972 (2004).

61. Ferry, K. V., Hamilton, T. C. & Johnson, S. W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ERCC1-

XPF. *Biochem. Pharmacol.* (2000) doi:10.1016/S0006-2952(00)00441-X.

62. Masuda, H. *et al.* Increased DNA Repair as a Mechanism of Acquired Resistance to cis-Diamminedichloroplatinum(II) in Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* (1988).

63. Slack, J. M. W. Molecular Biology of the Cell. in *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition* (2013). doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00007-0.

64. Selvakumaran, M., Pisarcik, D. A., Bao, R., Yeung, A. T. & Hamilton, T. C. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* (2003).

65. Martin, L. P., Hamilton, T. C. & Schilder, R. J. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clinical Cancer Research* (2008) doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-2238.

66. Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J. & Reed, E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J. Clin. Invest.* (1994) doi:10.1172/JCI117388.

67. Gentile, F., Tuszynski, J. A. & Barakat, K. H. New design of nucleotide excision repair (NER) inhibitors for combination cancer therapy. *J. Mol. Graph. Model.* (2016) doi:10.1016/j.jmgm.2016.02.010.

68. Samimi, G. *et al.* Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* (2000).

69. Helleman, J. *et al.* Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* (2006) doi:10.1186/1471-2407-6-201.

70. Mesquita, B. *et al.* No significant role for beta tubulin mutations and mismatch repair defects in ovarian cancer resistance to paclitaxel/cisplatin. *BMC Cancer* **5**, 1–6 (2005).

71. Alberts, B. *et al. Biologia molecular da célula*. *Biologia Molecular da Celula* (2008). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.

72. Kowalczykowski, S. C. An overview of the molecular mechanismsof recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2015) doi:10.1101/cshperspect.a016410.

73. Lieber, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* (2010) doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131.

74. Beucher, A. *et al.* ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* (2009) doi:10.1038/emboj.2009.276.

75. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. & Gorbunova, V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst).* (2008) doi:10.1016/j.dnarep.2008.06.018.

76. Shahar, O. D. *et al.* Live imaging of induced and controlled DNA double-strand break formation reveals extremely low repair by homologous recombination in human cells. *Oncogene* (2012) doi:10.1038/onc.2011.516.

77. Reynolds, P. *et al.* The dynamics of Ku70/80 and DNA-PKcs at DSBs induced by ionizing radiation is dependent on the complexity of damage. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10821–10831 (2012).

78. Shibata, A. *et al.* Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* (2011) doi:10.1038/emboj.2011.27.

79. Momcilovic, O. *et al.* DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PLoS One* (2010) doi:10.1371/journal.pone.0013410.

80. Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A. & Lahav, G. Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell* (2012) doi:10.1016/j.molcel.2012.05.052.

81. Orthwein, A. *et al.* Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science (80-.).* (2014) doi:10.1126/science.1248024.

82. Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H. & Jasint, M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol. Cell* (1999) doi:10.1016/S1097-2765(00)80202-6.

83. Moynahan, M. E., Pierce, A. J. & Jasin, M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol. Cell* (2001) doi:10.1016/S1097-2765(01)00174-5.

84. Welcsh, P. L. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* (2001) doi:10.1093/hmg/10.7.705.

85. McPherson, J. P. *et al.* A role for Brca1 in chromosome end maintenance. *Hum. Mol. Genet.* (2006) doi:10.1093/hmg/ddl002.

86. Patel, K. J. *et al.* Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol. Cell* (1998) doi:10.1016/S1097-2765(00)80035-0.

87. Orban, T. I. & Olah, E. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology* (2003) doi:10.1136/mp.56.4.191.

88. Mirchandani, K. D. & D'Andrea, A. D. The Fanconi anemia/BRCA pathway: A coordinator of cross-link repair. *Exp. Cell Res.* **312**, 2647–

2653 (2006).

89. Byler, S. *et al.* Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Research* (2014).

90. Zhang, F. *et al.* PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Curr. Biol.* (2009) doi:10.1016/j.cub.2009.02.018.

91. Xia, B. *et al.* Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2. *Mol. Cell* (2006) doi:10.1016/j.molcel.2006.05.022.

92. Zhang, F., Fan, Q., Ren, K. & Andreassen, P. R. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol. Cancer Res.* (2009) doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0123.

93. Feng, Z. *et al.* Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011) doi:10.1073/pnas.1010959107.

94. Wooster, R. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science (80-.).* (1994) doi:10.1126/science.8091231.

95. Spain, B. H., Larson, C. J., Shihabuddin, L. S., Gage, F. H. & Verma, I. M. Truncated BRCA2 is cytoplasmic: Implications for cancer-linked mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999) doi:10.1073/pnas.96.24.13920.

96. Chen, J. *et al.* Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol. Cell* (1998) doi:10.1016/S1097-2765(00)80276-2.

97. Yang, H., Li, Q., Fan, J., Holloman, W. K. & Pavletich, N. P. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature* (2005) doi:10.1038/nature03234.

98. Petalcorin, M. I. R., Sandall, J., Wigley, D. B. & Boulton, S. J. CeBRC-2 Stimulates D-loop Formation by RAD-51 and Promotes DNA Single-strand Annealing. *J. Mol. Biol.* (2006) doi:10.1016/j.jmb.2006.06.020.

99. Jensen, R. B., Carreira, A. & Kowalczykowski, S. C. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* (2010) doi:10.1038/nature09399.

100. Liu, J., Doty, T., Gibson, B. & Heyer, W. D. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2010) doi:10.1038/nsmb.1904.

101. Yang, H. *et al.* BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science (80-.).* (2002) doi:10.1126/science.297.5588.1837.

102. Wong, A. K. C., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V. & Bartel, P. L.

RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J. Biol. Chem.* (1997) doi:10.1074/jbc.272.51.31941.

103. Pellegrini, L. *et al.* Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* (2002) doi:10.1038/nature01230.

104. Venkitaraman, A. R. Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment . *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* (2009) doi:10.1146/annurev.pathol.3.121806.151422.

105. Yuan, S. S. F. *et al.* BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* (1999).

106. Daniels, M. J., Wang, Y., Lee, M. Y. & Venkitaraman, A. R. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science (80-.).* (2004) doi:10.1126/science.1102574.

107. Evers, B. & Jonkers, J. Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: Past lessons, current understanding and future prospects. *Oncogene* (2006) doi:10.1038/sj.onc.1209871.

108. Tsuzuki, T. *et al.* Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996) doi:10.1073/pnas.93.13.6236.

109. Ramus, S. J. *et al.* Increased frequency of TP53 mutations in BRCAI and BRCA2 ovarian tumours. *Genes Chromosom. Cancer* **25**, 91–96 (1999).

110. Rowley, M. *et al.* Inactivation of Brca2 promotes Trp53-associated but inhibits KrasG12D-dependent pancreatic cancer development in mice. *Gastroenterology* (2011) doi:10.1053/j.gastro.2010.12.039.

111. Jonkers, J. *et al.* Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat. Genet.* (2001) doi:10.1038/ng747.

112. Schuyer, M. & Berns, E. M. J. J. Is TP53 dysfunction required for BRCA1-associated carcinogenesis? *Mol. Cell. Endocrinol.* (1999) doi:10.1016/S0303-7207(99)00117-3.

113. Richardson, R. B. P53 mutations associated with aging-related rise in cancer incidence rates. *Cell Cycle* (2013) doi:10.4161/cc.25494.

114. Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y. & Chen, J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2009) doi:10.1073/pnas.0811159106.

115. Cheung, A. M. Y. *et al.* Loss of Brca2 and p53 synergistically promotes genomic instability and deregulation of T-cell apoptosis. *Cancer Res.* (2002).

116. Hassa, P. O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. & Hottiger, M. O. The Enzymatic and DNA Binding Activity of PARP-1 Are Not Required for NF-

κB Coactivator Function. *J. Biol. Chem.* (2001) doi:10.1074/jbc.M106528200.

117. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* (2005) doi:10.1038/nature03443.

118. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* (2005) doi:10.1038/nature03445.

119. Fong, P. C. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* (2009) doi:10.1056/NEJMoa0900212.

120. Murai, J. *et al.* Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* (2012) doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.

121. Nelson, D. . & Cox, M. . Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway. in *Lehninger Principles of Biochemistry* (2013). doi:10.1002/bmb.2005.494033010419.

122. Olson, A. L. & Pessin, J. E. Structure, Function, and Regulation of the Mammalian Facilitative Glucose Transporter Gene Family. *Annu. Rev. Nutr.* (1996) doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.001315.

123. Bonen, A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* (2001) doi:10.1007/s004210100516.

124. Hinchliffe, P. & Sazanov, L. A. Biochemistry: Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science (80-.).* (2005) doi:10.1126/science.1113988.

125. Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends in Molecular Medicine* (2017) doi:10.1016/j.molmed.2017.03.004.

126. Guimarães, C. *et al.* Tolerability and effectiveness of fluoxetine, metformin and sibutramine in reducing anthropometric and metabolic parameters in obese patients. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* (2006) doi:10.1590/S0004-27302006000600007.

127. Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K. M., Altman, R. B. & Klein, T. E. Metformin pathways: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* (2012) doi:10.1097/FPC.0b013e3283559b22.

128. Katsyuba, E. & Auwerx, J. Modulating NAD + metabolism, from bench to bedside . *EMBO J.* **36**, 2670–2683 (2017).

129. Tempel, W. *et al.* Nicotinamide riboside kinase structures reveal new pathways to NAD +. *PLoS Biol.* (2007) doi:10.1371/journal.pbio.0050263.

130. Gillies, R. J., Robey, I. & Gatenby, R. A. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *Journal of Nuclear Medicine* (2008) doi:10.2967/jnumed.107.047258.

131. Wang, J. Bin *et al.* Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* (2010) doi:10.1016/j.ccr.2010.08.009.

132. Zhou, M. *et al.* Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Mol. Cancer* (2010) doi:10.1186/1476-4598-9-33.

133. Zhao, Y. *et al.* Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer Res.* (2011) doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0127.

134. Roh, J. L., Park, J. Y., Kim, E. H., Jang, H. J. & Kwon, M. Activation of mitochondrial oxidation by PDK2 inhibition reverses cisplatin resistance in head and neck cancer. *Cancer Lett.* (2016) doi:10.1016/j.canlet.2015.11.023.

135. Suh, D. H. *et al.* Association of overexpression of hexokinase II with chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Clin. Exp. Med.* (2014) doi:10.1007/s10238-013-0250-9.

136. Brawer, M. K. Lonidamine: basic science and rationale for treatment of prostatic proliferative disorders. *Rev. Urol.* (2005).

137. De Lena, M. *et al.* Paclitaxel, cisplatin and lonidamine in advanced ovarian cancer. A phase II study. *Eur. J. Cancer* (2001) doi:10.1016/S0959-8049(00)00400-7.

138. Lohneis, P. *et al.* PDK1 is expressed in ovarian serous carcinoma and correlates with improved survival in high-grade tumors. *Anticancer Res.* (2015).

139. Ahmed, N., Riley, C. & Quinn, M. A. An immunohistochemical perspective of PPARβ and one of its putative targets PDK1 in normal ovaries, benign and malignant ovarian tumours. *Br. J. Cancer* (2008) doi:10.1038/sj.bjc.6604306.

140. Wu, Y. H., Chang, T. H., Huang, Y. F., Chen, C. C. & Chou, C. Y. COL11A1 confers chemoresistance on ovarian cancer cells through the activation of Akt/c/EBPß pathway and PDK1 stabilization. *Oncotarget* (2015) doi:10.18632/oncotarget.4250.

141. Zhang, W. *et al.* Dicumarol inhibits PDK1 and targets multiple malignant behaviors of ovarian cancer cells. *PLoS One* (2017) doi:10.1371/journal.pone.0179672.

142. Pastò, A. *et al.* Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget* (2014) doi:10.18632/oncotarget.2010.

143. Ghoneum, A., Gonzalez, D., Abdulfattah, A. Y. & Said, N. Metabolic plasticity in ovarian cancer stem cells. *Cancers (Basel).* (2020) doi:10.3390/cancers12051267.

144. Yang, N. C., Ho, W. M., Chen, Y. H. & Hu, M. L. A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP. *Anal. Biochem.* (2002) doi:10.1006/abio.2002.5698.

145. Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. & Nussenzweig, A. H2AX: The histone guardian of the genome. *DNA Repair* (2004) doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.024.

146. Deng, J. *et al.* Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression. *BMC Cancer* (2019) doi:10.1186/s12885-019-5824-9.

147. Liu, S. *et al.* NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biol.* (2016) doi:10.1007/s13277-016-4848-x.

148. Weingarten, C. *et al.* The Interplay Between Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and the Thyroid Hormones-αvβ3 Axis in Ovarian Cancer. *Horm. Cancer* (2018) doi:10.1007/s12672-017-0316-3.

149. Thomson, T. M., Balcells, C. & Cascante, M. Metabolic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Clin. Med.* (2019) doi:10.3390/jcm8070967.

150. Han, C. Y., Patten, D. A., Richardson, R. B., Harper, M. E. & Tsang, B. K. Tumor metabolism regulating chemosensitivity in ovarian cancer. *Genes and Cancer* **9**, 155–175 (2018).

151. Xing, D. & Orsulic, S. A mouse model for the molecular characterization of Brca1-associated ovarian carcinoma. *Cancer Res.* (2006) doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1495.

152. Kaufman, B. *et al.* Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol.* (2015) doi:10.1200/JCO.2014.56.2728.

153. Walton, J. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated Trp53 and Brca2 knockout to generate improved murine models of ovarian high-grade serous carcinoma. *Cancer Res.* (2016) doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1272.

154. Corona, J. C. & Duchen, M. R. PPARγ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology and Medicine* (2016) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.023.

155. Oliver, T. G. *et al.* Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev.* (2010) doi:10.1101/gad.1897010.

156. Farge, T. *et al.* Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism. *Cancer Discov.* (2017) doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0441.

157. Brace, L. E. *et al.* Increased oxidative phosphorylation in response to acute and chronic dna damage. *npj Aging Mech. Dis.* (2016) doi:10.1038/npjamd.2016.22.

158. Patten, D. A. *et al.* Mitochondrial adaptation in human mesenchymal stem cells following ionizing radiation. *FASEB J.* (2019) doi:10.1096/fj.201801483RR.

159. Breitkopf, S. B., Taveira, M. D. O., Yuan, M., Wulf, G. M. & Asara, J. M. Serial-omics of P53-/-, Brca1-/- Mouse Breast Tumor and Normal Mammary Gland. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-15132-y.

160. Cuyàs, E. *et al.* Germline BRCA1 mutation reprograms breast epithelial cell metabolism towards mitochondrial-dependent biosynthesis: Evidence for metforminbased 'starvation' strategies in BRCA1 carriers. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/oncotarget.9732.

161. Lee, J. *et al.* Effective breast cancer combination therapy targeting BACH1 and mitochondrial metabolism. *Nature* (2019) doi:10.1038/s41586-019-1005-x.

162. Gentric, G. *et al.* PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers. *Cell Metab.* (2019) doi:10.1016/j.cmet.2018.09.002.

163. Vazquez, F. *et al.* PGC1α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* (2013) doi:10.1016/j.ccr.2012.11.020.

164. Broekman, K. E. *et al.* Phase I study of metformin in combination with carboplatin/paclitaxel chemotherapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Invest. New Drugs* (2020) doi:10.1007/s10637-020-00920-7.

165. Yang, C., Zhao, N., Li, D., Zou, G. & Chen, Y. Metformin improves the sensitivity of ovarian cancer cells to chemotherapeutic agents. *Oncol. Lett.* (2019) doi:10.3892/ol.2019.10564.

166. Kang, J. H. *et al.* Aldehyde dehydrogenase inhibition combined with phenformin treatment reversed NSCLC through ATP depletion. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/oncotarget.10354.

167. Milanese, C. *et al.* DNA damage and transcription stress cause ATP-mediated redesign of metabolism and potentiation of anti-oxidant buffering. *Nat. Commun.* (2019) doi:10.1038/s41467-019-12640-5.

168. Mesquita, K. A. *et al.* ERCC1-XPF deficiency is a predictor of olaparib

induced synthetic lethality and platinum sensitivity in epithelial ovarian cancers. *Gynecol. Oncol.* (2019) doi:10.1016/j.ygyno.2019.02.014.

169. Whitacre, C. M. *et al.* Involvement of NAD-Poly(ADP-Ribose) Metabolism in p53 Regulation and Its Consequences. *Cancer Res.* (1995).

170. Liu, L. *et al.* Quantitative Analysis of NAD Synthesis-Breakdown Fluxes. *Cell Metab.* (2018) doi:10.1016/j.cmet.2018.03.018.

171. Vander Heiden, M. G. & DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* (2017) doi:10.1016/j.cell.2016.12.039.

172. Gui, D. Y. *et al.* Environment Dictates Dependence on Mitochondrial Complex I for NAD+ and Aspartate Production and Determines Cancer Cell Sensitivity to Metformin. *Cell Metab.* (2016) doi:10.1016/j.cmet.2016.09.006.

173. Wilk, A. *et al.* Extracellular NAD+ enhances PARP-dependent DNA repair capacity independently of CD73 activity. *Sci. Rep.* (2020) doi:10.1038/s41598-020-57506-9.

174. Bajrami, I. *et al.* Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol. Med.* (2012) doi:10.1002/emmm.201201250.

175. Piacente, F. *et al.* Nicotinic acid phosphoribosyltransferase regulates cancer cell metabolism, susceptibility to NAMPT inhibitors, and DNA repair. *Cancer Res.* (2017) doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3079.

176. Hodeib, M. *et al.* Metformin induces distinct bioenergetic and metabolic profiles in sensitive versus resistant high grade serous ovarian cancer and normal fallopian tube secretory epithelial cells. *Oncotarget* (2018) doi:10.18632/oncotarget.23661.

177. Nacarelli, T. *et al.* NAMPT inhibition suppresses cancer stem-like cells associated with therapy-induced senescence in ovarian cancer. *Cancer Res.* (2020) doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-2830.

178. Guo, J. *et al.* Identification of novel resistance mechanisms to NAMPT inhibition via the de novo NAD+ biosynthesis pathway and NAMPT mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017) doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.143.

179. Yu, Z., Wang, Y., Wang, B. & Zhai, J. Metformin Affects Paclitaxel Sensitivity of Ovarian Cancer Cells Through Autophagy Mediated by Long Noncoding RNASNHG7/miR-3127-5p Axis. *Cancer Biother. Radiopharm.* (2020) doi:10.1089/cbr.2019.3390.

180. Guo, J., Li, Y., Duan, H. & Yuan, L. Metformin suppresses the proliferation and promotes the apoptosis of colon cancer cells through inhibiting the expression of long noncoding RNA-UCA1. *Onco. Targets.*

Ther. (2020) doi:10.2147/OTT.S245091.

181. Na, Y. J. *et al.* Metformin enhances the cytotoxic effect of nilotinib and overcomes nilotinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. *Korean J. Intern. Med.* (2020) doi:10.3904/kjim.2019.336.

182. Mascaraque, M. *et al.* Metformin as an adjuvant to photodynamic therapy in resistant basal cell carcinoma cells. *Cancers (Basel).* (2020) doi:10.3390/cancers12030668.

183. Kubota, E. *et al.* Low ATM protein expression and depletion of p53 correlates with olaparib sensitivity in gastric cancer cell lines. *Cell Cycle* (2014) doi:10.4161/cc.29212.

184. Li, J. *et al.* CDK9 inhibitor CDKI-73 is synergetic lethal with PARP inhibitor olaparib in BRCA1 wide-type ovarian cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 1140 (2020).

185. Whicker, M. E., Lin, Z. P., Hanna, R., Sartorelli, A. C. & Ratner, E. S. MK-2206 sensitizes BRCA-deficient epithelial ovarian adenocarcinoma to cisplatin and olaparib. *BMC Cancer* (2016) doi:10.1186/s12885-016-2598-1.

186. Bianchi, A. *et al.* PARP-1 activity (PAR) determines the sensitivity of cervical cancer to olaparib. *Gynecol. Oncol.* (2019) doi:10.1016/j.ygyno.2019.08.010.

187. Conrad, L. B. *et al.* ADP-ribosylation levels and patterns correlate with gene expression and clinical outcomes in ovarian cancers. *Mol. Cancer Ther.* (2020) doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0569.